

TARTU ÜLIKOOL  
Füüsika-keemiateaduskond  
Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut

Oliver Pulges

**$\alpha_{2A}$ -ADRENERGILISE RETSEPTORI  
ISELOOMUSTAMINE ROTI  
OTSMIKUKOORE  
MEMBRAANPREPARAADIS**

Magistritöö

Juhendaja: prof. Ago Rinke

Tartu 2007

<b>1</b>	<b>Sisukord</b>	
<b>1</b>	<b>SISUKORD</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>KASUTATUD LÜHENDID</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>SISSEJUHATUS</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	<b>5</b>
4.1	ADRENORETSEPTORID	5
4.2	$\alpha_{2A}$ -ADRENERGILISED RETSEPTORID	8
4.3	G-VALKUDEGA SEOTUD SIGNAALIÜLEKANNE	10
4.4	RETSEPTORI ISELOOMUSTAMISE VÕIMALUSED	11
<b>5</b>	<b>APARATUUR JA METOODIKA</b>	<b>14</b>
5.1	MATERJALID	14
5.2	MEMBRAANIDE ETTEVALMISTAMINE	14
5.3	[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S MEMBRAANIDELE SIDUMISE ANALÜÜSID	15
5.4	[ <sup>3</sup> H]RX821002 MEMBRAANIDELE SIDUMISE ANALÜÜSID	15
5.5	ANDMETE ANALÜÜS	16
<b>6</b>	<b>TULEMUSED</b>	<b>17</b>
6.1	[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S SIDUMISE KINEETIKA	17
6.2	GDP MÕJU [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S SEOSTUMISELE ROTI OTSMIKUKOORE MEMBRAANIDES	17
6.3	DPCPX MÕJU [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S SEOSTUMISELE	18
6.4	AGONISTIDE MÕJU [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S SIDUMISELE	19
6.5	ANTAGONISTIDE MÕJU UK14304 POOLT AKTIVEERITUD [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S	
	SIDUMISELE	21
6.6	RADIOLIGANDI [ <sup>3</sup> H]RX821002 SIDUMINE MEMBRAANIDELE	23
6.7	[ <sup>3</sup> H]RX821002 SIDUMINE KÄITUMISKATSES	24
<b>7</b>	<b>ARUTELU</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>KOKKUVÕTE</b>	<b>29</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>30</b>
<b>10</b>	<b>TÄNUAVALDUSED</b>	<b>31</b>
<b>11</b>	<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b>	<b>32</b>
<b>12</b>	<b>LISAD</b>	<b>36</b>

## 2 Kasutatud lühendid

GPCR – G-valkudega seostuvad retseptorid (ingl.k. *G-protein coupled receptors*)

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat

ATP – adenosinotriifosfaat

GTP – guanosiinotriifosfaat

GDP – guanosiindifosfaat

[<sup>35</sup>S]GTPγS - guanosiin 5'-[<sup>35</sup>S]tiotriifosfaat

PLC – fosfoliipaas C

IP3 - inositoltriifosfaat

DAG – diatsüülgütserool

K<sub>D</sub>- retseptor-ligand kompleksi tasakaalukonstant

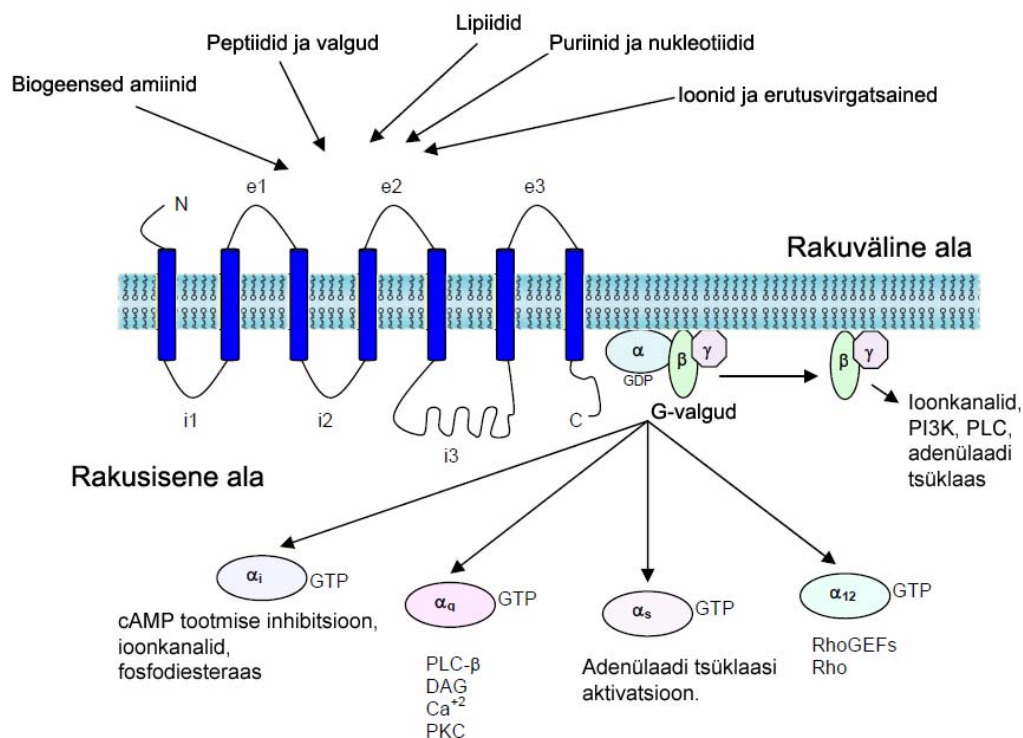
### 3 Sissejuhatus

$\alpha_{2A}$ -adrenergilised retseptorid on olulised valgud, mis on laialdase levikuga üle kogu imetajate organismi. Lisaks südame ja veresoonekonna haigustele seostatakse neid retseptoreid ka kognitiivsete funktsioonide, käitumishäirete ja depressiooni patogeneesiga. Viimaseid on näidatud omavat seost peamiselt aju otsmikukoorega.  $\alpha_2$ -retseptorid arvatakse peamiselt seostuvat  $G_i$ -perekonna G-valkudega. Antud töös püüti leida võimalusi  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori iseloomustamiseks radioligandide [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S ja [ $^3\text{H}$ ]RX821002 sidumise kaudu roti otsmikukoore membraanidele.  $\alpha_2$ -adrenoretseptori spetsiifiline ligand [ $^3\text{H}$ ]RX821002 võimaldab vahetult uurida retseptor-ligand interaktsioone. [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S võimaldab GTP analoogina iseloomustada  $G_i$ -perekonna valkudega seostuvate retseptorite signaaliülekanne. Käesolevas töös püütakse leida optimaalseid tingimusi  $\alpha_{2A}$ -adenoretseptori-spetsiifilise [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumise aktivatsiooni mõõtmiseks roti otsmikukoore membraanides. Meetod annaks olulist infot katseloomade närvisüsteemis  $\alpha_{2A}$  retseptorite signaaliülekanne efektiivsuse kohta. Lisaks optimeeriti  $\alpha_2$ -adrenoretseptori spetsiifilise ligandi [ $^3\text{H}$ ]RX821002 retseptorile seostumise tingimused ning neid rakendati käitumise järgi gruppidesse jaotatud loomade ajukoortes leiduvate  $\alpha_{2A}$  retseptorite iseloomustamiseks.

## 4 Kirjanduse ülevaade

### 4.1 Adrenoretseptorid

Kõik adrenergilised retseptorid kuuluvad G-valkudega seotud retseptorite klassi (GPCR – ingl.k. *G-protein coupled receptors*), mis on imetajatel suurim retseptorite klass. Sellest tulenevalt on ka farmakoloogiline huvi nende retseptorite toimemehhanismide kohta suhteliselt suur. GPCR osalevad rakkudevahelises signaaliüleandes ja reguleerivad nendega seostuvate, retseptori signaali rakku kandvate G-valkude talitlemist. GPCR aminohappelisse järjestusse kuulub seitse hüdfoobset regiooni, mis oletatavalt moodustavad seitse transmembraanset  $\alpha$ -heeliksit. Arvatakse et, nende heeliksrite vahele jäävaid raku sisesed ja välised aasad moodustavad sidumiskohti nii retseptoriga seostuva ligandi kui ka G-valgu sidumiseks. Arvatakse et, signaaliülekanne toimub järgnevalt: retseptorit aktiveeriva ligandi ehk agonisti seostumine retseptorile põhjustab retseptori konformatsiooni muutuse, mis omakorda indutseerib konformatsiooni muutusi temaga seostuvates G-valkudes, neid seeläbi aktiveerides. Aktiveeritud G-valgud reguleerivad edasist signaaliülekanne raku (Joonis 1).



Joonis 1. GPCR signaaliradade mitmekesisus.[1]

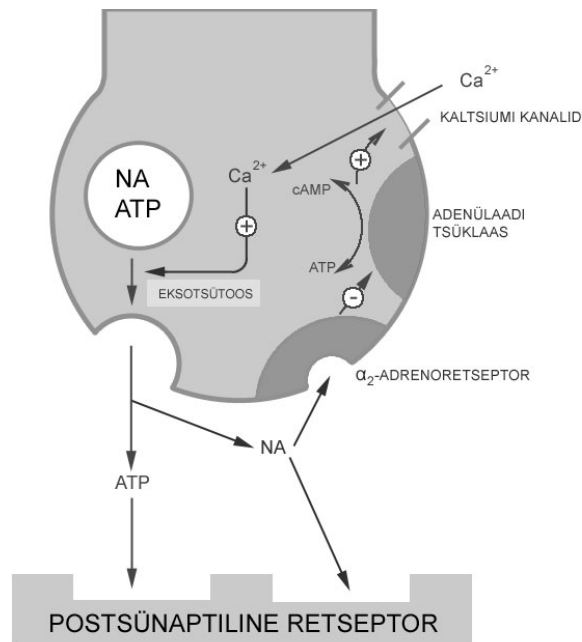
Organismisisesed adrenoretseptorite ligandid on katehoolamiinid adrenaliin ja noradrenaliin. Biokeemiliste ja farmakoloogiliste omaduste järgi jaotatakse adrenergilised retseptorid  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - ja  $\beta$ - adrenoretseptoriteks, mis omakorda jagunevad  $\alpha_{1a}$ -,  $\alpha_{1b}$ -,  $\alpha_{1c}$ -,  $\alpha_{2A/D}$ -,  $\alpha_{2B}$ -,  $\alpha_{2C}$ - ja  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -,  $\beta_4$ -adrenergilisteks retseptoriteks. Kõik need retseptorid seostuvad G-valkudega. Arvatakse et,  $\alpha_1$ -retseptorid seostuvad peamiselt  $G_q$ -perekonna valkudega aktiveerides seeläbi fosfolipaas C-d (PLC) ning tekitades inositoltrifosfaati (IP3) ja diatsüülglütserooli (DAG), mis on omakorda järgnevateks signaalmolekulideks.  $\alpha_1$ -retseptoriga seostatakse selliseid füsioloogilisi toimeid nagu veresoonte kokkutõmbumine, gastrointestinaalsete silelihaste relaksatsioon, süljeerituse suurenemine ja maksa glükogenolüüs.  $\alpha_2$ -retseptorid, mis arvatakse, et peamiselt seostuvad  $G_i$ -perekonna valkudega, inhibeerivad nende kaudu ensüüm adenülaadi tsüklaasi aktiivsust ning vähendavad tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) sünteesi.  $\alpha_2$ -retseptorite aktivatsiooni seostatakse neurotransmitterite (noradrenaliini ja atsetüülkoliini) vabanemise inhibitsiooniga, vereliistakute agregeerumisega, veresoonte silelihaste kokkutõmbega ning insuliini vabanemisega organismi (Tabel 1) [2].

$\beta$ -adrenoretseptorid jaotatakse neljaks alarühmaks  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ . Kõik  $\beta$ -adrenoretseptorid mõjutavad adenülaadi tsüklaasi aktiivsust [4].  $\beta_1$ -retseptoreid, mis põhiliselt seostuvad  $G_s$ -perekonna valkudega, leidub peamiselt südames, kus nad vastutavad katehoolamiinide positiivsete inotropsete ja kronotropsete efektide eest (tõstavad südame löögisagedust ja jõudu).  $\beta_2$ -adrenoretseptorid seevastu, mis samuti seostuvad  $G_s$ -perekonna valkudega, on näidatud vähendavat silelihase relaksatsiooni.  $\beta_2$ -adrenoretseptori aktivatsioon põhjustab bronhide lõõgastumist, veresoonte laienemist, maksa glükogenolüüsi ja lihastreemorit.  $\beta_3$  aktivatsioon põhjustab lipolüüsi (Tabel 1) [2].

Retseptor	Levikualad	Toimerada	Agonistid	Antagonistid
$\alpha_1$ :	Silelihased Veresooned Seedeelundkond	$G_q$ : fosfolipaa C (PLC) aktiveerimine, IP3 ja $Ca^{2+}$ kontsentratsiooni kasv	Noradrenaliin, Fenüülefiriin, Kirasoliin.	Fenüülbensamiin Fentoolamiin Parazosiin Terazosiin
$\alpha_2$ :	Pre- ja postsünaptilised närvilõpmed Südame ja veresoonkond Silelihased	$G_i$ : adenülaadi tsüklaasi inhibitsioon, cAMP kontsentratsiooni vähenemine.	Klonidiin, Lofeksidiin, Ksulasiin, Tisanidiin, UK 14304, Guanfatsiin.	Johimbiin Rauwolsiin Idasoksaan BRL 44408 RS 79948 RX 821002
$\beta_1$ :	Süda Ajukoor	$G_s$ : adenülaadi tsüklaasi aktivatsioon, cAMP kontsentratsiooni kasv.	Noradrenaliin Isoprenaliin, Dobutamine.	Metroprolool Atenolool
$\beta_2$ :	Hingamisteed Silelihased Väikeaju Vöötlihased	$G_s$ : adenülaadi tsüklaasi aktivatsioon, cAMP kontsentratsiooni kasv.	Isoprotenool Formoterool Metaprotenool Terbutaliin	Propanolool Butoksamiin
$\beta_3$ :	Rasvkude	$G_s$ : adenülaadi tsüklaasi aktivatsioon, cAMP kontsentratsiooni kasv.	L-796568 CL 316,243 LY 368842 Ro 40-2148	SR 59230A

**Tabel 1.** Adrenergilised ligandid [2-3].

Adrenoretseptorite üheks oluliseks funktsiooniks organismis on (noradrenaliini vahendusel) närvisignaali ülekandmine närvirakult närvirakule. Noradrenaliini talletatakse närvirakkude lõpmetes sünaptilistes vesiikulites. Puhkeolekus on noradrenaliini kontsentratsioon vesiikulites kõrge ja sünapsis madal. Normaalne noradrenaliini vabanemine sünaptilisse pilusse toimub  $Ca^{2+}$  poolt vahendatud eksotsütoosi teel [2]. Presünaptilised  $\alpha_2$ -adrenergilised autoretseptorid inhibeerivad noradrenaliini vabanemist inhibeerides adenülaadi tsüklaasi aktiivsust. cAMP kontsentratsiooni vähenemine kutsub esile  $Ca^{2+}$  kanalite sulgumise ja  $Ca^{2+}$  ei jõua enam rakku. Kuna noradrenaliini eksotsütoos on  $Ca^{2+}$  poolt vahendatud, siis viimase vähenedes peatub ka noradrenaliini vabanemine (Joonis 2) [2]. On näidatud et on olemas ka postsünaptilised  $\alpha_2$ -adrenergilised retseptorid.



**Joonis 2.** Presünaptilised  $\alpha_2$ -adrenergilised autoretseptorid inhibeervad noradrenaliini vabanemist inhibeerides adenülaadi tsüklaasi aktiivsust [2].

#### 4.2 $\alpha_{2A}$ -adrenergilised retseptorid

Käesolevas töös uuritavad  $\alpha_{2A}$ -adrenergilised retseptorid on imetajate organismis laialdaselt levinud valgud. On näidatud, et  $\alpha_2$ -adrenoretseptorite perekonnast on otsmikukoos peamiselt  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorid. Nad seostuvad peamiselt pertussis toksiooni tundlike  $G_{i/o}$ -perekonna G-valkudega [4-5]. Põhilisteks levialadeks peetakse südame-veresoonkonna- ja kesknärvisüsteemi. Lisaks südame ja veresoonkonna haigustele seostatakse neid retseptoreid ka kognitiivsete funktsioonide, käitumishäirete ja depressiooni patogeneesiga. On näidatud et, viimased omavad seost peamiselt aju otsmikukoore  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorite talitlemisega [6-7].

Enamik antidepressante mõjuvad just serotonergiliste ja adrenergiliste retseptorite sisemiste ligandide (serotoniin, adrenaliin, noradrenaliin) transporteritele. Ravimi mõju transporteritele on kiire, tõstes kohe vastavate transmitterite taset sünapisis. Kui depressioon oleks põhjustatud vaid transmitterite/virgatsainete madalast tasemest sünapsis, peaksid need ravimid kiiresti toimima. Tegelikult täheldatakse nende efekti aga alles pika aja möödumisel, mis tähendab, et depressiooni ja ärevushäirete tegelik toimemehhanism on tõenäoliselt küll vahendatud nende transporterite poolt reguleeritud transmitteri tasemete kaudu sünaptilises pilus, kuid mitte ainult. Näiteks on näidatud, et antidepressantide raviefekt korreleerub pigem adrenergiliste ja

serotonergiliste retseptorite ekspressioonitasemete muutustega. See teeb nende retseptorite ja nendega seotud mehhanismide uurimise huvipakkuvaks psühhiaatria ja farmakoloogia valdkonnas.

Kirjanduses on näidatud, et depressiooni ja ärevushäirete all kannatanud enesetapuohvrite ajudes on leitud *post-mortem*, et  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorite tihedus aju teatud osades on suurem kui tervetel, enesetappu mittesooritanud patsientidel. Mitmetel antidepressantidel on täheldatud võimet muuta nende retseptorite ekspressioonitaset ja aktiivsust. Arvatakse, et käitumishäiretega patsientidel võib olla noradrenergilises ja serotonergilises funktsioonis hälbeid, mis võivad olla konkreetsete haiguslike nähtude põhjustajaks. Kui võrreldi  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptor-G-valk signaaliülekanne aktiivsust otsmikukooses enesetapu sooritanud käitumishäiretega inimeste ja tervete inimeste vahel, leiti, et käitumishäiretega inimestel on retseptori aktiivsus mõnevõrra suurem. Samas pole teada, kas signaaliülekanne kõrgem aktiivsus on põhjustatud retseptori või temaga seotud G-valgu poolelt [7].

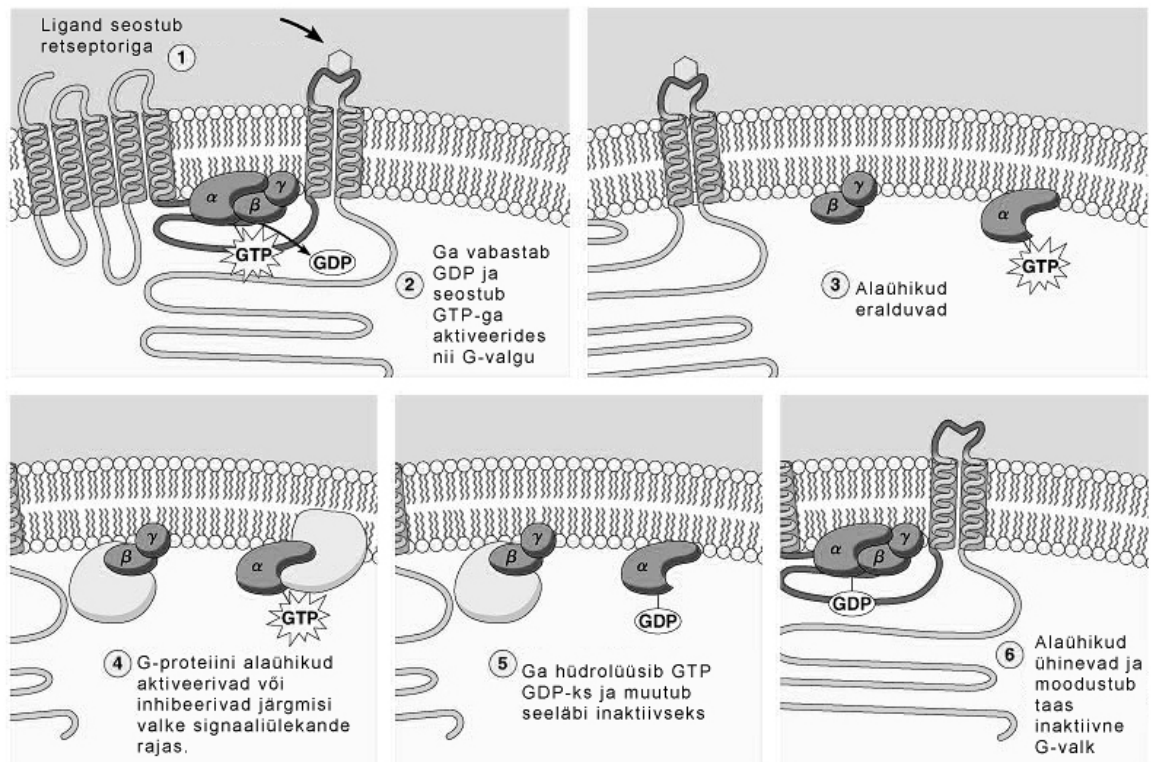
Kuigi farmakoloogia vallas pakuvad põhiliselt huvi tulemused, mis kirjeldavad inimesega seotud mehhanisme, siis enamik in vitro retseptoroloogia katseid teostatakse siiski teiste loomade ajukudedes ja rakukultuuride peal. Põhjuseks on paljude, tihti post-mortem, meetodite rakendamise piiratus või lausa võimatus inimese peal. Samas tuleb alati arvestada, et saadavad tulemused võivad märgatavalt erineda inimeses mõõdetutest. Näiteks inimese ja hiire  $\alpha_2$ -adrenoretseptorite puhul on näidatud, et nad on 89% homoloogsed, seega aminohapete järjestuse seisukohalt vaadatuna väga sarnased [8]. Sellegi poolest ei pruugi erinevate ligandide afiinsused nendele retseptoritele kattuda. Ka antud töös uuritavate  $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste retseptorite ligandide puhul on täheldatud sidumise erinevusi inimese ja roti retseptorite vahel [9-11]. Erinevus võib olla teatud juhtudel suhteliselt suur ja tihti on ligandide afiinsus roti retseptorile nõrgem kui inimese vastavale retseptorile (isegi kuni paar suurusjärku). Sellest tulenevalt võivad ka mõõtmistingimused oluliselt muutuda ja olukord mis on hästi kirjeldatav inimeses ei pruugi nii kergesti kirjeldatav olla rotis. Näiteks on kirjanduses viiteid, et  $\alpha_{2A}$ -retseptorite ligandid võivad omada mõju ka teistele, mitte  $\alpha_{2A}$ -adrenergilistele süsteemidele [11-12]. Osades allikates on

isegi välja pakutud, et roti  $\alpha_{2A}$ -retseptorit võiks eraldi ära märkida kui  $\alpha_{2D}$ -retseptorit [13]. Antud töös viidatakse retseptorile siiski kui  $\alpha_{2A}$ -adrenergilisele retseptorile.

### 4.3 G-valkudega seotud signaaliülekanne

G-valgud on guanosiinfosfaate siduvad valgud ja on laialdaselt loomorganismides levinud signaaliülekanne moduleerijad. Imetajate G-valgud võib jagada kahte suurde põhiklassi: heterotrimeersed G-valgud ja väiksed G-valgud. Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest alaühikust -  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  -molekulmassidega vastavalt 36-52, 35-36 ja 8-10 kDa [14]. Heterotrimeersed G-valgud jagatakse nelja perekonda  $G_{\alpha}$ -alaühiku järgi:  $G_{i/0}$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  ja  $G_{12/13}$ .  $G_i$ -perekonna  $\alpha$ -alaühikud inhibeerivad ja  $G_s$ -perekonna  $\alpha$ -alaühikud aktiveerivad membraanse ensüümi adenülaadi tsüklaasi aktiivsust.  $G_q$ -perekonna  $\alpha$ -alaühikud on aga ensüüm fosfolipaas C aktivaatorid [15]. G-valgu omadusi kirjeldatakse tihti just  $\alpha$ -alaühiku kaudu, kuigi on näidatud, et ka  $\beta\gamma$ -alaühikud võivad mõjutada erinevaid efektorsüsteeme rakus (näit. adenülaadi tsüklaasi, kaaliumkanaleid ja proteiinkinaase) [16-17].

Heterotrimeersed G-valgud osalevad signaaliülekanne vahendamisel ja nende aktiveerimine võimaldab spetsiifilise signaali rakku viimist. G-valgud assotsieerivad rakus olevate G-valke siduvate retseptoritega. Puhkeolekus on G-valgud guanosiin difosfaadiga (GDP) seotud. Agonisti seostumine retseptoriga põhjustab retseptori konformatsiooni muutuse, mis, omakorda põhjustades G-valgu konformatsioonilise muutuse, vähendab GDP afiinsust G-valgu  $\alpha$ -alaühikule. GDP dissotsieerumine G-valgult avab võimaluse selle asendamiseks guanosiin trifosfaadiga (GTP). GTP seostumisel toimub heterotrimeerse G-valgu dissotsiatsioon  $G_{\alpha}$  ja  $G_{\beta\gamma}$  alaühikuteks. Mõlemad valgukompleksid on bioloogiliselt aktiivsed ja võimelised mõjutama järgnevat signaaliülekanne radasid. Samas  $G_{\alpha}$ -alaühik omab GTP-aasset võimet hüdrolüüsida temaga seotud GTP GDP-ks mille tagajärjel puhkeolek heterotrimeerse, GDP-ga seostunud G-valgu näol taastub. (Joonis 3) [4].



**Joonis 3.** G-valgu aktivatsiooni tsükkel. [18]

$Mg^{2+}$  -ioonid on vajalikud G-valgu funktsioneerimiseks. Nende sidumises eristatakse kõrge ( $K_D \sim 10^{-9}$  M) ja madala ( $K_D \sim 10^{-3}$  M) afiinsusega sidumist, kusjuures arvatakse, et kõrge afiinsusega sidumine tagab G-valgu GTP-aasse aktiivsuse ja madala afiinsusega sidumine on vajalik GDP/GTP vahetuseks [19].

#### 4.4 Retseptori iseloomustamise võimalused

Vaieldamatult üks lihtsamaid ja otsesemaid meetodeid, mida on võimalik rakendada retseptori iseloomustamiseks, on temaga seostuva radioaktiivselt märgistatud ligandi (enamasti antagonist) sidumine membraanidele. Radioligand on võimeline suuremal või vähemal määral mittespetsiifiliselt seostuma ka membraanidele ja kaitsevahenditele (filtrid, katseklaasid). Seetõttu määratakse eraldi ligandi mittespetsiifiline seostumine lisades keskkonda ülehulgas märgistamata antud retseptori spetsiifilist ligandi. Sellistes tingimustes on radioligandi seostumise tõenäosus retseptorile väike ning seostuv osa näitabki mittespetsiifilist sidumist (kuna mittespetsiifilisi sidumiskohti on nii suures hulgas, siis märgistamata ligand radioligandi nendest kohtadest välja tõrjuda ei suuda). Mittespetsiifiline efekt lahutatakse summaarsest, et saada kätte spetsiifiline seostumine retseptorile. Sellisel

meetodil saadud andmed kirjeldavad nii ligandi seostumise afiinsust retseptoritele kui ka retseptorite hulka. Meetodi üheks suureks puuduseks on aga see, et saadud info ei anna teadmist selle kohta, mis rakus edasi toimuma hakkab ja kas antud juhul signaali üldse kantakse raku sisse.

$G_{i/0}$ -valkudega seotud retseptorite puhul saab kasutada retseptori iseloomustamiseks ka [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise meetodit. [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S on GTP analoog millel  $\gamma$ -asendis hapnik on asendatud radioaktiivse väävliga. GTP $\gamma$ S ei ole G-valgu  $\alpha$ -alaühik võimeline hüdrolyüsima ja see võimaldabki antud ligandi retseptori aktivatsioonist tingitud seostumist G-valkudele membraanides [20-21] või aju viiludes (autoradiograafia [22-23]) määrata. Kui reaktsioonikeskkonnas ei ole GDP-d siis [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumine G-valkudele peaks olema kiire nii agonistist aktiveeritud kui tavaolekus. GDP juuresolekul aga sõltub [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise kiirus eelpool kirjeldatud G-valgu aktivatsiooniraja järgi GDP dissotsiatsiooni kiirusest, mis omakorda sõltub GDP afiinsusest G-valkudele ja on aktivatsioonitsükli kiirust limiteerivaks staadiumiks. GDP afiinsus aga väheneb, kui retseptor aktiveerib G-valgu. Seega GDP juuresolekul kirjeldab [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumine membraanidele retseptorite aktivatsiooni efekti G-valkudele. Kui aktiveerida ainult ühte kindlat tüüpi retseptoreid teisi mõjutamata siis [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumine kirjeldab nende retseptorite aktivatsiooni nendega seostuvatele G-valkudele. Meetod annab häid tulemusi retseptorite korral mis seostuvad  $G_{i/0}$ -perekonna G-valkudega. On saadud häid tulemusi nii muskariinsete  $M_2$ - [24] kui ka dopaminergiliste  $D_2$ -retseptorite [25] kirjeldamisel. Samas  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorite puhul pole see meetod veel leidnud nii laialdast kasutust. Üheks antud töö eesmärgiks oligi leida optimaalsed tingimused  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori aktivatsiooni iseloomustamiseks roti otsmikukooses.

Kirjanduses on näidatud, et G-valgu aktivatsiooni on võimalik mõõta ka fluorestsents märgitud GTP $\gamma$ S-ga (BODIPY-GTP $\gamma$ S). Antud ligandi seostumisel G-valkudele täheldatakse fluorestsentsi intensiivsuse kasvu, seega on võimalik toimuvat protsessi jälgida reaajas [26]. Samas on häid tulemusi saavutatud ainult kõrge valgu ekspressioonitasemega süsteemides. Reaalsetes membraanhomogenaatides on arvatavasti vaadeldav efekt suhteliselt väike, kuna valkude ekspressioonitase on tunduvalt madalam kui üleekspresseeritud rakusüsteemides. Häid tulemusi antud meetodiga ajuhomogenaatide uurimisel pole veel näidatud.

Aktiveeritud  $G_i$ - ja  $G_s$ -perekonna G-valgud reguleerivad adenülaadi tsüklaasi aktiivsust. Adenülaadi tsüklaas on ensüüm mis sünteesib ATP-st cAMP-i (tsükliline adenosiinmonofosfaat). cAMP on rakus sekundaarseks virgatsaineks. Määrates cAMP kontsentratsiooni muutust rakus on võimalik kaudselt määrata retseptori aktiivsust. Meeodi puuduseks on, et adenülaadi tsüklaasi talitluse toimel sünteesitud cAMP kontsentratsioon ei ole nii vahetult seotud mõõdetavate retseptorite aktivatsiooniga kui  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  analüüsil saadud tulemused. Tulemusi mõjutavaid tegureid on rohkem ja katsevead on üldiselt suuremad [7].

cAMP kontsentratsiooni määramiseks on erinevaid võimalusi. Üks nendest on kasutada radioaktiivselt märgistatud adenülaadi tsüklaasi substraati, ehk siis  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ . Elusate rakkude puhul lisatakse raku söötmesse näiteks  $[^3\text{H}]\text{adeniini}$  ja rakk sünteesib sellest ise vajaliku  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ . Katse käigus adenülaadi tsüklaasi poolt  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ -st sünteesitud radioaktiivne cAMP tuleb eraldada ja radioaktiivsuse järgi määrata tekkinud cAMP kogus, mis kajastab adenülaadi tsüklaasi aktiivsust. cAMP eraldamiseks võib kasutada  $\text{Al}_2\text{O}_3$  täidisega kromatograafilisi kolonne või seostada tekkinud cAMP-spetsiifilistele sidumisvalkudele või antikehadele. [27-28]

Määramist on võimalik teostada ka mitteradioaktiivselt, ehk kasutades fluorentsmarkeriga modifitseeritud cAMPi, mille kontsentratsiooni on võimalik spektroskoopiliselt määrata. [27,29]. Elusrakkudes määramiseks on adenülaadi tsüklaasi meetod paremini läbi uuritud ja rakendatud kui  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  meetod.

Käesolevas töös on retseptori iseloomustamiseks kasutatud nii radioligandi sidumist retseptorile kui ka G-valgu aktivatsiooni mõõtmise meetodit kasutades selleks  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -i.

## 5 Aparatuur ja metoodika

### 5.1 Materjalid

[<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (guanosiin 5'-[<sup>35</sup>S]tiotriposfaat) ja stsintsillatsiooni kokteil OptiPhase HiSafe 3 osteti PerkinElmer-ist. UK14304 (5-bromo-6-(2-imidasoliin-2-üülamino)kinoksaliin), guanfatsiin hüdrokloriid ([2,6-diklorofenüül)atsetüül]guanidiin hüdrokloriid), klonidiin hüdrokloriid (2-[(2,6-diklorofenüül)amino-2-imidasoliin hüdrokloriid), johimbiin (17 $\alpha$ -hüdrosüjohimbaan-16 $\alpha$ -karboksüülhappe metüülester), BRL44408 maleaat (2-[(4,5-dihüdro-1H-imidasool-2-üül)metüül]-2,3-dihüdro-1-metüül-1H-isoindool maleaat), RS79948 hüdrokloriid ((8aR,12aS,13aS)-5,8,8a,9,10,11,12,12a,13,13a-dekahüdro-3-metoksü-12-(etüülsulfonüül)-6H-isokino[2,1-g][1,6]naftüridiin hüdrokloriid), DPCPX (8-tsüklopentüül-1,3-dipropüülksantiin) oli ostetud Tocris Cookson Inc-lt. EGTA (etüleenglükooltetraäädikhape) Sigmalt. EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape) Merck-ilt. MgCl<sub>2</sub> firmalt Acros. Tris-HCl (2-amino-2-(hüdrokümetüül)-1,3-propaandiool hüdrokloriid) firmalt Naxo Ltd. Hepes (4-(2-hüdrosüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape) firmat AppliChem. DTT (ditiotreitool) firmalt Reanal. Wistari rottide külmutatud otsmikukoore tükid saadi prof Jaanus Harro tööruhmalt.

### 5.2 Membraanide ettevalmistamine

Katseteks kasutati Wistari rottide külmutatud otsmikukoore tükke. Koetükid homogeniseeriti külmas Tris homogeniseerimispuhvril (50mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA, 6,5mM MgCl<sub>2</sub>) ultrahelihomogenisaatoriga Bandelin Sonopuls HD2070 ja tsentrifuugiti 20 minutit 4°C ja 30 000g juures. Supernatant kallati ära ning homogeniseerimist ja tsentrifuugimist korrati veel kaks korda. Lõplik homogeniseerimine teostati vastavasse inkubatsioonipuhvrilisse. . Katsetes kasutati kolme erinevat inkubatsioonipuhvrit: A) Tris inkubatsioonipuhver (50mM Tris-HCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM DTT , 1mM EGTA, 100mM NaCl, pH 7,4); B) K-Hepes inkubatsiooni puhver (20mM K-Hepes, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT , 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 7,4); ning C) Na-fosfaatpuhver (25mM Na-fosfaat, 0,5mM EDTA, pH 7,4). [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S katseteks jaotati homogenaat võrdseteks osadeks ja säilitati -80°C juures.

### 5.3 [<sup>35</sup>S]GTPγS membraanidele sidumise analüüsid

[<sup>35</sup>S]GTPγS sidumise analüüsiks kasutati artiklis [7] kirjeldatud meetodi modifikatsioone. Membraansuspensioonidele lisati inkubatsioonpuhvris (A või B) 0,26nM [<sup>35</sup>S]GTPγS. [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumise ajaliskulgu uurides inkubeeriti otsmikukoore membraane 0.26nM [<sup>35</sup>S]GTPγS-ga 0.2mM GDP juuresolekul ning koos või ilma agonist UK 14304-ta. GDP afiinsuse määramiseks G-valkudele varieeriti GDP kontsentratsiooni konstantsel [<sup>35</sup>S]GTPγS kontsentratsioonil ning lisati α<sub>2</sub> adrenoretseptorite ligande: agoniste – UK14304, guafatsiin, klonidiin – ja antagonistid – johimbiin, BRL44408 ja RS79948 -, et määrata retseptor-spetsiifilist GDP afiinsuse muutust G-valkudele. Lähtuvalt Childers et.al. artiklitest [30-31] kasutati adenosiin A<sub>1</sub> retseptori spetsiifilist antagonistit DPCPX, et vähendada endogeense adenosini mõju basaalsele [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumisele. Seeläbi suurendati näiliselt α<sub>2A</sub> efekti ja sellega vähendati katsevigasid oluliselt. Katsed inkubeeriti temperatuuril 30°C. Reaktsioonid peatati kiire filtreerimisega läbi GF/B klaasfiiberfiltrite (Whatman Int. Ltd) ning filtreid pesti lisaks 3 korda jääkülma fosfaatpuhvriga (100mM NaCl, 20mM K-fosfaat puhver, pH =7,4). Igale filtrile lisati 5ml sintsilatsioonikokteili Optiphase Hisafe 3 ja peale 24 tundi seismist toatemperatuuril tulemused loendati sintsilatsiooni loenduril LKB Wallac 1219 Rackbeta.

### 5.4 [<sup>3</sup>H]RX821002 membraanidele sidumise analüüsid

Wistar rottide otsmikukoore tükkide homogeniseerimiseks kasutati külma Tris homogeniseerimispuhvrisse (50mM Tris-HCl, pH 7,4). Sadestati tsentrifuugimisel 28 000g ja 4°C juures tsentrifuugil Sigma 3-18K. Lõplik homogeniseerimine teostati inkubatsioonipuhvrise C (2 mg kudet/punkt alguses sidumiskatses ja 1mg kudet/punkt käitumiskatse puhul). Muus osas teostati homogeniseerimine nagu eelnevalt kirjeldatud. Käitumiskatsetes kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega (vastavalt HE ja LE) loomadeks jaotatud rottide ajusid kasutati sidumisanalüüsis 8 looma otsmikukoort grupi kohta. [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumise iseloomustamiseks varieeriti selle kontsentratsiooni lahuses. Mittspetsiifiline sidumine määrati 0,5 μM RS79948 juuresolekul. Katsepunkte inkubeeriti 45 min temperatuuril 25°C. Reaktsioon peatati ja filtritega opereeriti eelmises punktis kirjeldatud viisil. Filteerimisel kasutati külma Na-fosfaat puhvrit (25mM Na-fosfaat puhver, pH7,4).

## **5.5 Andmete analüüs**

Katsetest saadud tulemused analüüsiti mittelineaarsel vähimruutude meetodil kasutades kommertsiaalset programmi GraphPad PRISM™ (Graphpad, San Diego, CA, USA). Andmed on esitatud kujul keskmine  $\pm$  SEM, mis on saadud duplikaatides või triplikaatides mõõdetud katsepunktidest.

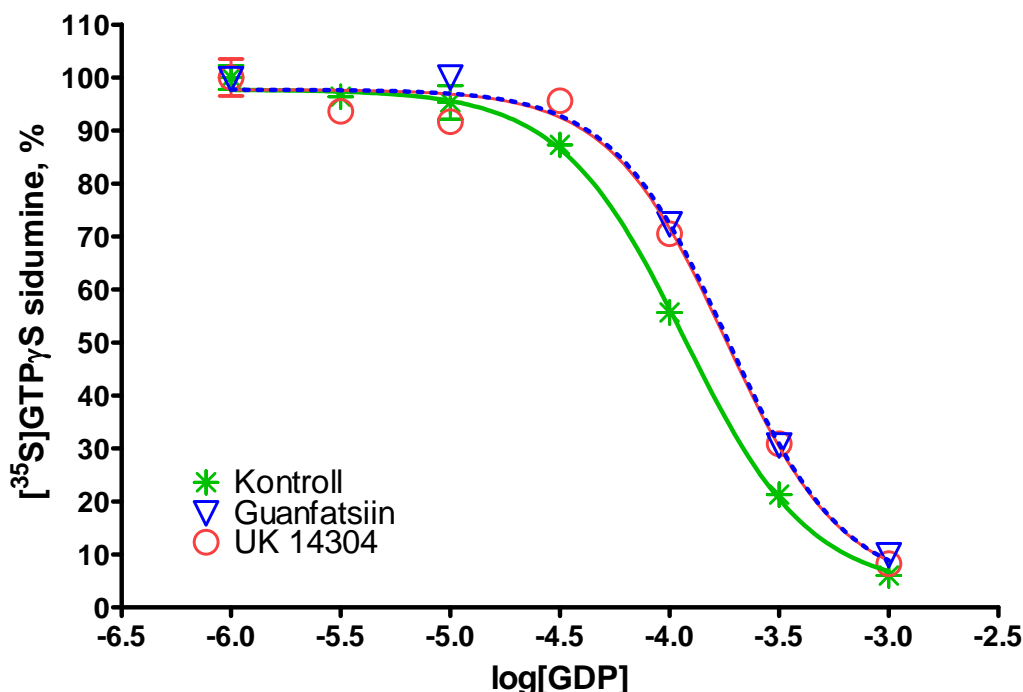
## 6 Tulemused

### 6.1 [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumise kineetika

Optimaalse inkubatsiooniaja leidmiseks uuriti [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise kiirust membraanidele. 0,26 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS lisamine membraanisuspensioonile ilma GDP juuresolekuta põhjustas selle kiire seostumise membraanidele. Adrenergiliste ligandide lisamine ei mõjutanud seostumise kiirust. 0,2 mM GDP juuresolekul vähenes [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise kiirus oluliselt. α<sub>2</sub>-retseptori agonist UK14304 tõstis 0,2 mM GDP juuresolekul [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise kiirust. Täheldatud kiiruse muutus saadi  $k_{\text{obs}}=(39.7\pm 2.9)*10^{-5}\text{sek}^{-1}$  kuni  $k_{\text{obs}}=(43.2\pm 3.6)*10^{-5}\text{sek}^{-1}$ . Peale kahte tundi inkubatsiooni jäi agonistist tingitud [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumine stabiilseks. Edasine inkubatsioon tõstis ainult basaalselt (agonistist sõltumatult) [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumise taset, vähendades seega suhtelist agonisti efekti. Kõigiks edasisteks katseteks valiti inkubatsiooniaeg 2 h. [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumine roti otsmikukoore membraanidele 0,2mM GDP juuresolekul oli kirjeldatav ühe sidumiskohaga eksponentsiaalse seostumise mudeliga.

### 6.2 GDP mõju [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumisele roti otsmikukoore membraanides

α<sub>2</sub> adrenergilised agonistid UK14304 (10μM) ja guanfatsiin (10μM) vähendasid GDP võimet konkureerida [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumisega roti otsmikukoore membraanidele, vähendades GDP afiinsust (mõõdetuna kui IC<sub>50</sub> konkurentsist [<sup>35</sup>S]GTPγS-ga). GDP afiinsus muutus pIC<sub>50</sub> = 3.93 ± 0.03-lt pIC<sub>50</sub> = 3.75 ± 0.04-ni (UK 14 304) ja pIC<sub>50</sub> = 3.74 ± 0.03-ni (guanfatsiin) (Graafik 1).

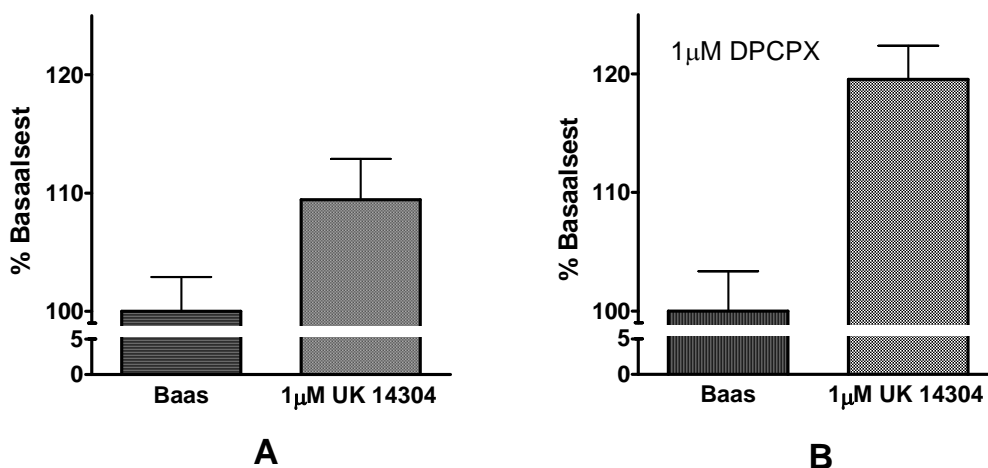


**Graafik 1.** Adrenergiliste agonistide modulatsioon GDP võimele konkureerida spetsiifilise [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumisega roti otsmikukoore membraanidele. [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S (0.26nM) sidumine roti otsmikukoore membraanidele mõõdeti erinevatel GDP kontsentratsioonidel 120 min 30°C 10 $\mu\text{M}$  UK14304 (○) ning 10 $\mu\text{M}$  guanfatsiini (∇) juuresolekul ja ilma adrenergiliste ligandideta (\*). Andmed esitatud protsentidena [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumisest ilma GDP juuresolekuta, mis on saadud kolmest erinevast duplikaatides tehtud katsest.

0,1mM GDP kontsentratsioonil saadi maksimaalne agonistist tingitud [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumine võrreldes baastasemega (Graafik 1.). Seega kõik edasised ligandide kontsentratsioonsõltuvuse katsed viidi läbi 0,1 mM GDP kontsentratsioonil.

### 6.3 DPCPX mõju [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumisele

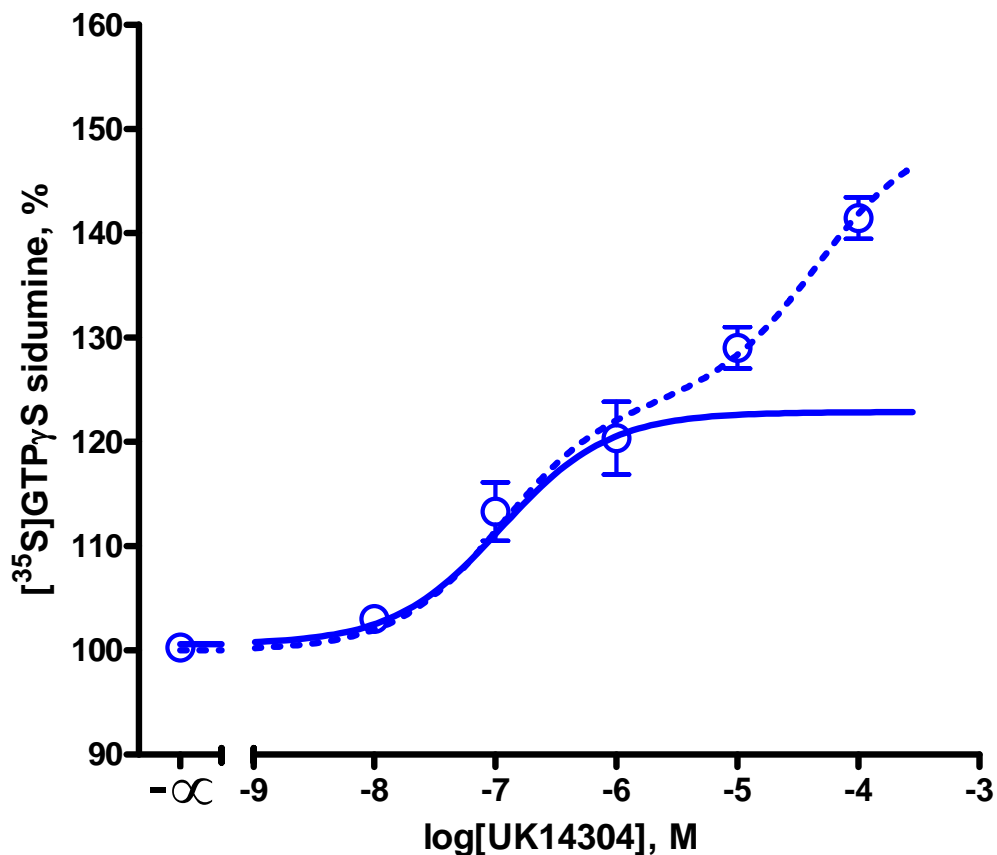
Saadud  $\alpha_{2A}$ -retseptori agonistide põhjustatud spetsiifiline efekt [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumisele on isegi 0,1mM GDP juuresolekul väike, arvestades basaalses [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise taset. Teiste mitte- $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste G-valk-seotud süsteemide mõju mängib tõenäoliselt olulist rolli kõrges basaalses sidumises. Kirjanduses on näidatud, et membraanhomogenaadid võivad sisaldada mingil põhjusel välja pesemata jäänud adenosini, mis, olles seotud adenosin A $_1$ -retseptoriga, võib samuti aktiveerida [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumist. 1 $\mu\text{M}$  A $_1$ -selektiivse antagonisti DPCPX-i juuresolek vähendas basaalses seostumist 28%, mõjutamata UK14304 esilekutsutud [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumist. Seega baasi alanemine 1 $\mu\text{M}$  DPCPX juuresolekul suurendas UK14304 spetsiifilist suhtelist efekti baastaseme suhtes (Graafik 2.)



**Graafik 2.** 1 μM selektiivse  $A_1$ -antagonisti DPCPX-i juuresolek vähendas basaalsset seostumist 28%. Seega suurenes suhteline efekt baasi suhtes.

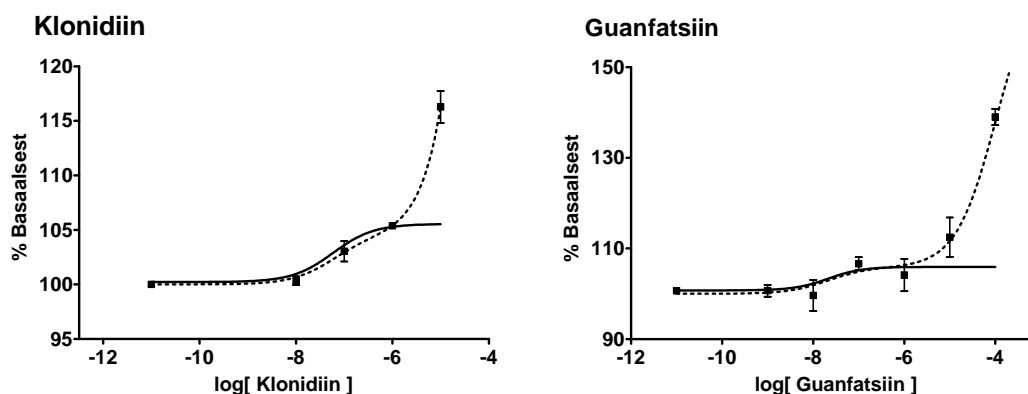
#### 6.4 Agonistide mõju [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sidumisele

$\alpha_2$ -adrenergiliste agonistide mõju lähemaks uurimiseks teostati nende kontsentratsioon-sõltuvuse katsed. UK14304 põhjustas kontsentratsioonist sõltuva [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sidumise aktivatsiooni, kuid see sõltuvus ei olnud logaritmilises teljestikus ühefaasiline sigmoid (Graafik 3.). Tulemused viitavad selgelt rohkem kui ühele sidumiskohale. Sobitades tulemusi kahe sidumiskohaga mudelisse saadi kõrgema afiinsusega sidumiskoha  $pEC_{50} = (6.96 \pm 0.11)$ , mis näib suhteliselt hästi vastavat kirjanduses eelnevalt avaldatud tulemustele [32] ja seega võib arvata, et see on seotud UK14304 aktivatsiooniga läbi  $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste retseptorite. Kõrgematel kontsentratsioonidel aktiveeris UK14304 [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S lisasidumise roti aju otsmikukooses.



**Graafik 3.** UK14304 aktivatsioon [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S sidumisele. [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S (0,26 nM) sidumine roti otsmikukoore membraanidele teostati UK14304 kontsentratsiooni varieerides 0,1 mM GDP juuresolekul 120 min 30°C nagu *materjalides ja meetodites* kirjeldatud. Andmed esitatud protsentidena [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S seostumisest ilma agonistita, mis on saadud kahest erinevast duplikaatides tehtud katsest.

Uurides lähemalt ka teiste  $\alpha_2$ -adrenergiliste agonistide toimet [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S sidumisele, saadi sarnaseid tulemusi, mis viitasid vähemalt kahele sidumiskohale. Kõrgema afiinsusega sidumiskoha väärtused guanafatsiinile ja klonidiinile, vastavalt  $pEC_{50}=7.67 \pm 0.21$  ja  $pEC_{50}=7.23 \pm 0,16$  (Graafik 4.), näisid kattuvat varasemate andmetega kirjandusest [11]. Samuti nagu UK14304 puhul aktiveerisid kõrgematel kontsentratsioonidel ka guanafatsiin ja klonidiin [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S lisasidumist mingile muule sidumiskohtade populatsioonile.



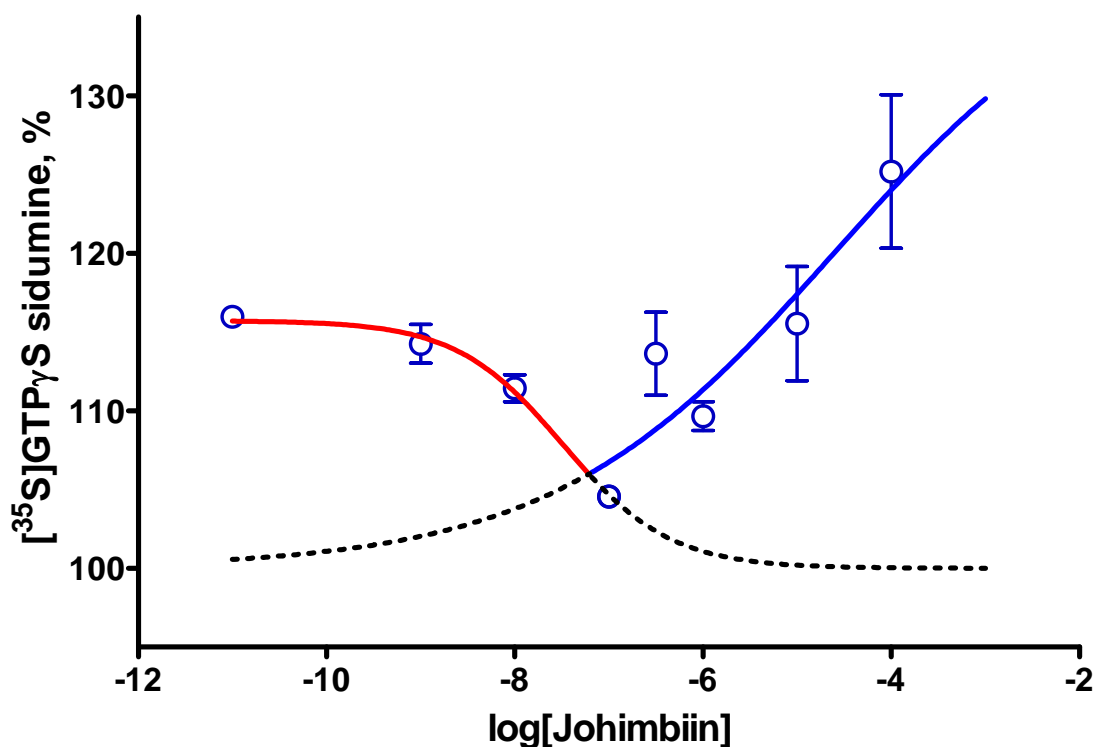
**Graafik 4.** Klonidiini ja guanfatsiini aktivatsioon  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumisele. Samuti nagu UK14304 puhul aktiveerisid kõrgematel kontsentratsioonidel ka guanfatsiin ja klonidiin  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumist. Sidumine roti otsmikukoore membraanidele teostati ligandide kontsentratsiooni varieerides 0,1 mM GDP juuresolekul 120 min 30°C nagu *materjalides ja meetodites* kirjeldatud. Andmed esitatud protsentidena  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  seostumisest ilma agonistita, mis on saadud kahest erinevast duplikaatides tehtud katses.

### 6.5 Antagonistide mõju UK14304 poolt aktiveeritud $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ sidumisele

Et ükski uuritud agonistidest ei olnud piisavalt  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori-spetsiifiline, uuriti, kas retseptorspetsiifilist osa oleks võimalik välja selgitada, kasutades  $\alpha_{2A}$ -retseptori antagonistide (johimbiin, BRL44408, RS79948), mis peaksid spetsiifiliselt inhibeerima antud retseptori aktivatsioonist tingitud  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumist.

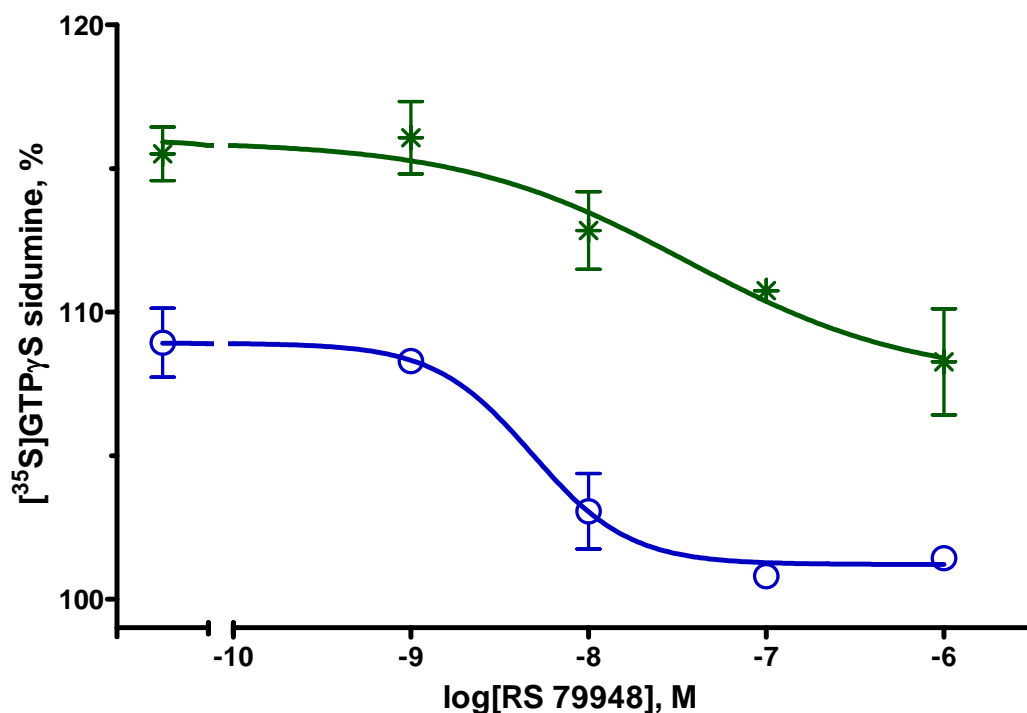
Johimbiini inhibeeriva mõju kontsentratsioon-sõltuvuse uurimiseks valiti 10 $\mu\text{M}$  UK14304 kontsentratsioon.. Kahjuks johimbiini kontsentratsiooni varieerimine näitas, et kõrgematel kontsentratsioonidel (üle 0,1 $\mu\text{M}$ ) johimbiin hoopis aktiveeris  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumist (Graafik 5.). Kuni kontsentratsioonini 0,1  $\mu\text{M}$  näis johimbiini inhibeeriv mõju kattuvat kirjandusest varasemalt leitud tulemustega [11]. Johimbiiniga soovitud miinumplatood  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumise aktivatsioonil ei saavutatud ja seega osutus antud ligand ebasobivaks efekti kirjeldamisel.

Antagonist BRL44408 kasutamisel agonistist tingitud  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumise aktivatsiooni inhibeerimiseks saadi sarnaseid tulemusi. Kõrgematel kontsentratsioonidel BRL44408 aktiveeris  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumist ja samuti soovitud miinumplatood ei olnud võimalik saavutada. Seetõttu ka BRL44408 kasutamine efekti kirjeldamiseks ei näinud sobivat.



**Graafik 5.** Johimbiini modulatsioon [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S sidumisele. [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S (0.26 nM) sidumist roti otsmikukoore membraanidele mõõdeti erinevatel johimbiini kontsentratsioonidel 10 μM UK14304 ja 0,1 mM GDP juuresolekul 120 min at 30°C nagu *materjalides ja meetodites* kirjeldatud. Andmed esitatud protsentidena [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S seostumisest ilma agonisti ja antagonistita, mis on saadud kolmest erinevast duplikaatides tehtud katsest.

Parimaid tulemusi UK14304 poolt esilekutsutud [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S sidumise aktivatsiooni inhibeerimisel näitas antagonist RS79948. Kuid ka see ligand näis aktiveerivat süsteemi kõrgematel kontsentratsioonidel. Siiski, see aktiveeriv mõju avaldus kõrgematel kontsentratsioonidel kui teistel uuritud antagonistidel. Lisaks näitas RS79948 kõrgemat potentsiaalsust α<sub>2A</sub>-adrenergilistele retseptorite efekti inhibeerimisel. Nii saavutati olukord, kus oli võimalik näha inhibitsiooni miinimum platood. 10 μM UK14304 esilekutsutud efekti inhibeeris RS79948 umbes 50%-le basaalsest mis kinnitab veelgi, et esilekutsutud aktivatsioon ei ole ainult α<sub>2A</sub>-retseptorite spetsiifiline. Samas RS79948 0,1 μM kontsentratsioon inhibeeris 1 μM UK14304 aktivatsiooni basaalseni (Graafik 6.).

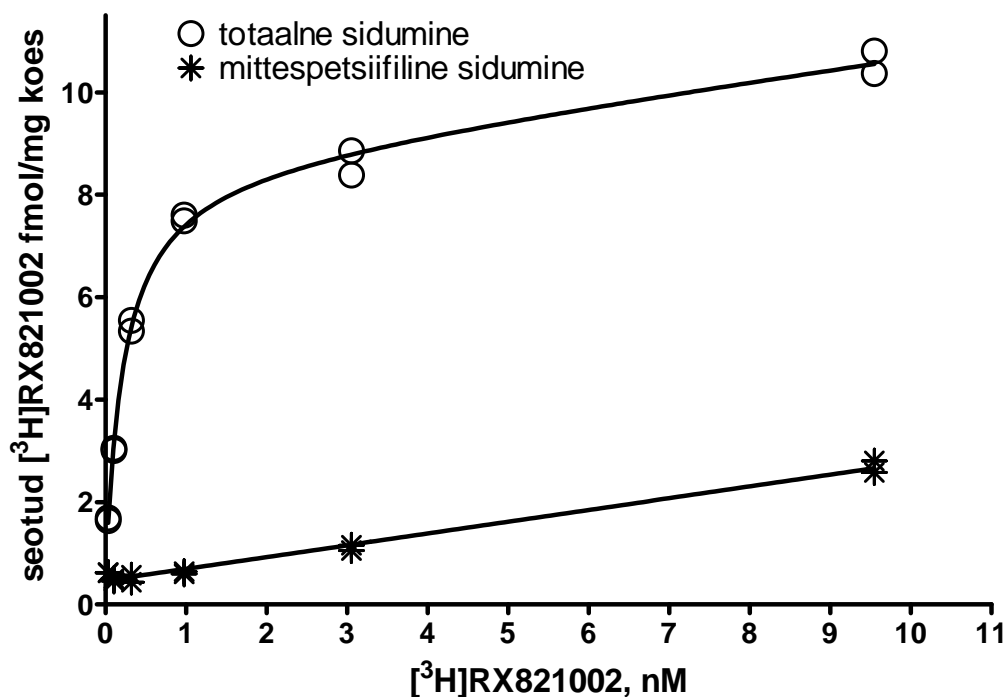


**Graafik 6.** RS79948 modulatsioon [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S sidumisele. [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S (0.26 nM) sidumist roti otsmikukoore membraanidele mõõdeti erinevatel RS79948 kontsentratsioonidel, 10 μM (\*) või 1 μM (○) UK14304 ja 0,1 mM GDP juuresolekul 120 min at 30°C nagu *materjalides ja meetodites* kirjeldatud. Andmed esitatud protsentidena [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S seostumisest ilma agonisti ja antagonistita, mis on saadud kolmest erinevast duplaikaatides tehtud katsest.

## 6.6 Radioligandi [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumine membraanidele

Varieerides α<sub>2A</sub>-spetsiifilise radioligandi kontsentratsiooni roti otsmikukoore membraan-suspensioonides saadi selle ligandi seostumise kõver membraanidele sõltuvalt lisatud radioligandi kogusest. Sidumine vastas hüperbooli võrrandile väärtustega B<sub>max</sub> = (8,16 ± 0,28) fmol/mg kudet, K<sub>D</sub> = (0,22 ± 0,03) nM (Graafik 7). Peab ära märkima, et radioligandi madala eriaktiivsuse (49 Ci/mmol) ja kõrge afiinsuse tõttu on saadud kõvera totaalne sidumine kõige madalamal kontsentratsioonil lisatud radioligandi kontsentratsioonist rohkem kui 10%, mis omakorda tähendab, et saadud tulemused ei ole kirjeldatavad päris täpselt pseudo-monomolekulaarse võrrandi järgi ja K<sub>D</sub> väärtus on ülehinnatud. Samas katsetingimusi konstantsena hoides on saadavad väärtused kõik sarnaselt ülehinnatud ja erinevusi selle radioligandi sidumises erinevate rottide ajudes saab hinnata. Seega saab neid tulemusi kasutada näiteks α<sub>2A</sub>-adrenoretseptori iseloomustamiseks eelnevalt

käitumuslikes katsetes mingi omaduse järgi gruppidesse jaotatud rottide vahel, mida ka järgnevalt tehti.

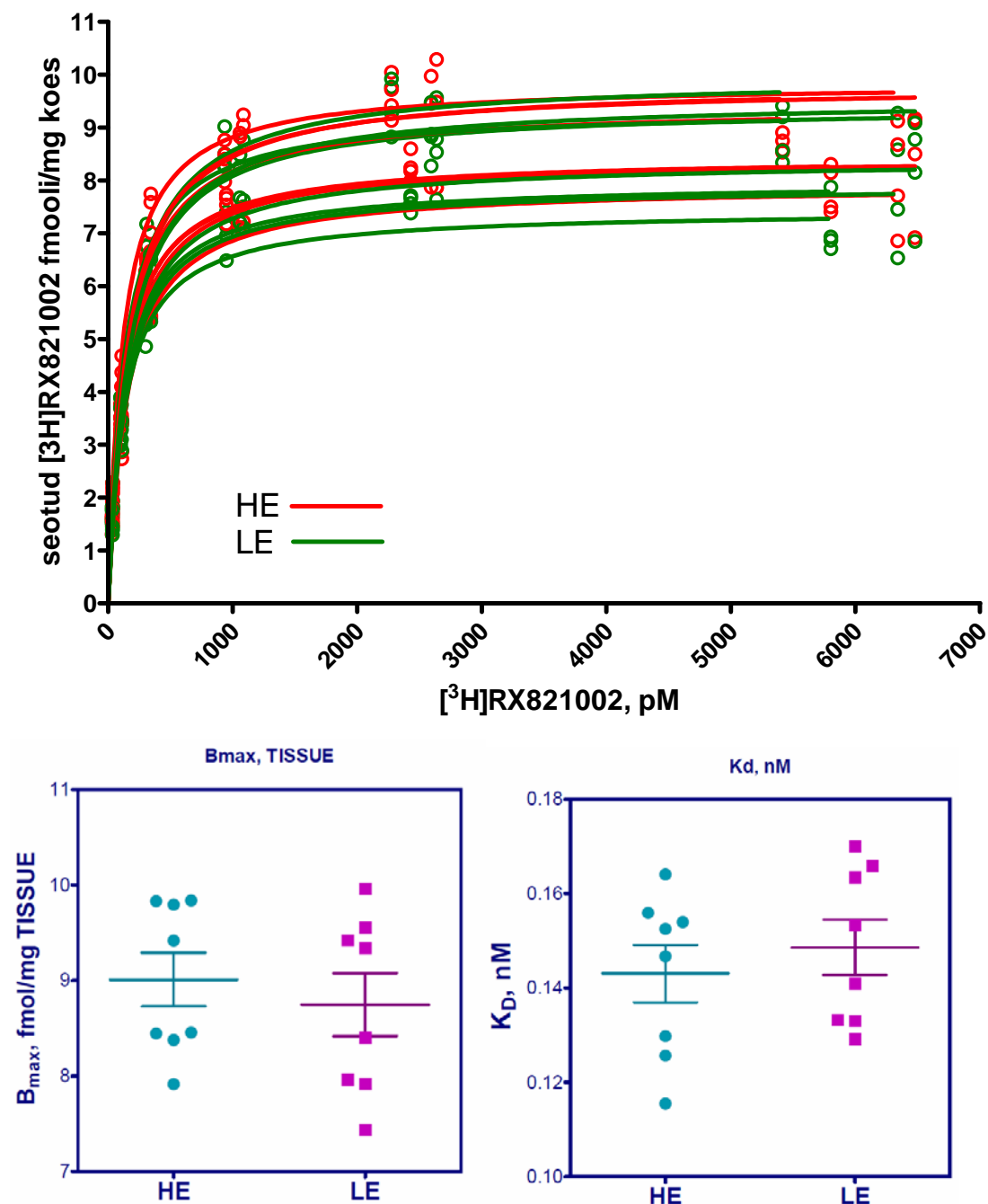


**Graafik 7.** [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumine roti otsmikukoore membraanidele. [<sup>3</sup>H]RX821002 spetsiifiline sidumine vastas hüperbooli võrrandile väärtustega  $B_{\max} = (8,16 \pm 0,28)$  fmol/mg kudet,  $K_D = (0,22 \pm 0,03)$  nM.

### 6.7 [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumine käitumiskatses

Käitumuslike mallide järgi olid rotid jaotatud kõrge uudistavusega (HE) ja madala uudistavusega (LE) rottideks Jaanus Harro töörühma poolt. Kontrollimaks, kas selline jaotus korreleerub ja  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori sidumiskohtade arvuga ( $B_{\max}$ ) või saadud sidumise  $K_D$  väärtustega võrreldi radioligandi [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumist rottide otsmikukoore membraan-suspensioonidele. Katsed teostati sarnaselt eelnevatele [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumise katsetele. Membraanide kontsentratsioon võeti (koe piiratud hulga ja ligandi eriaktiivsusest tingitud probleemide tõttu) kaks korda väiksem kui eelnevates katsetes, mis avaldus ka katsevigade suurenemisena.  $B_{\max}$  kõrge uudistavusega rottidel saadi  $9,0 \pm 0,8$  fmol/mg kudet ( $n=8$ ) ja madala uudistavusega rottidel  $8,7 \pm 0,9$  fmol/mg kudet ( $n=8$ ).  $K_D$  väärtused saadi kõrge uudistavuse korral  $0,14 \pm 0,2$  nM ja madala uudistavuse korral  $0,15 \pm 0,2$  nM. Saadud tulemused näitasid, et kõrge uudistavusega ja madala uudistavusega rottide vahel erinevusi ei leitud. Samas täheldati sidumiskohtade arvu ( $B_{\max}$ ) jaotumist kahte gruppi, mis

polnud korrelatsioonis rottide uudistamisaktiivsusega (Graafik 8) .  $K_D$  väärtustes erinevusi ei leitud.



**Graafik 8.** Radioligandi [<sup>3</sup>H]RX821002 sidumine rottide otsmikukoore membraan-suspensioonidele kõrge uudistavusega (HE) ja madala uudistavusega (LE) rottide puhul. Täheledatai sidumiskohtade arvus ( $B_{max}$ ) jaotumist kahte gruppi, mis polnud seotud roti uudistavusega .  $K_D$  väärtustes erinevusi ei leitud.

## 7 Arutelu

Käesolev töö keskendub  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori iseloomustamisele ja selle rakendustele roti aju otsmikukoores. GDP asendas [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumist kontsentratsioon-sõltuvalt ja G-valkudega seostuva  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori aktivatsioon vähendas GDP võimet välja tõrjuda [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-i. See muutus  $\Delta\text{pIC}_{50} = 0.18$  on küll väike kuid võrreldav teiste retseptorite poolt esilekutsutavate efektidega. See võimaldab kasutada seda meetodit  $\alpha_{2A}$ -retseptori iseloomustamiseks 0,1mM GDP kontsentratsioonil. [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise poolestusaeg saadi umbes 30 minutit ja maksimaalne stabiilne efekt saavutati 120 min inkubatsiooni järel. Basaalne sidumine saadi küllaltki kõrge ja membraanide pesemisel erinevate meetoditega polnud seda võimalik vähendada. Samas kirjanduses on näidatud, et adenosiin, mis on seotud adenosiin  $A_1$ -retseptorile, ja mis pesemisel ei tule süsteemist täielikult välja, võib aktiveerida [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumist ja tõsta seega basaalset taset [30-31]. Seega teostati katsed kus kasutati adenosiin  $A_1$ -spetsiifilist antagonistit DPCPX ja selgus, et ka antud süsteemis on see üheks basaalse kõrge taseme allikaks. Leiti et basaalset sidumist on võimalik vähendada oluliselt ja seeläbi vähendada vigu lisades süsteemi 1  $\mu\text{M}$  kontsentratsioonis DPCPX-i, kusjuures  $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste retseptorite ligandide esilekutsutud efekte see ei mõjuta.

Kirjanduses on viiteid  $\alpha_{2A}$ -adrenergilise süsteemi ristmõjudest erinevate teiste süsteemidega [11-12] ja seetõttu monoamiinide retseptorite antagonistide ei sõandatud kasutada. Kinnitust ristmõjudele leiti ka käesolevas töös. Nimelt kõik [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise analüüsides kasutatud  $\alpha_2$ -adrenergilised ligandid aktiveerisid [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumist kõrgematel kontsentratsioonidel. Kirjanduses on välja pakutud erinevaid võimalikke süsteeme millele  $\alpha_2$ -adrenergilised ligandid võivad mõjuda (5-HT $_{1A}$ , inositol  $I_1$ , jne.) kuid kindlat kinnitust nendele ja et sarnased mõjud ka mitte-ekspreseeritud süsteemides, seega ka antud töös tehtud uuringutes, avalduvad pole. Samas on kirjanduses näidatud, et  $\alpha_2$ -adrenoretseptori ligandide afiinsus sidumisel inimese  $\alpha_{2A}$ -adrenergilistele retseptoritele on oluliselt erinev (tihti kuni kaks suurusjärku parem) kui sidumisel roti  $\alpha_{2A}$ -adrenergilistele retseptoritele [9-11]. Seetõttu pole sellised ristmõjud osutunud segavaks katsetes mis on teostatud inimese otsmikukoores. Antud töö tulemustest võib järeldada, et erinevates katsetes saadud andmed, mis on teostatud roti otsmikukoores kasutades  $\alpha_{2A}$ -adrenergilisi ligande [33-

34], ei pruugi olla otseselt seotud ainult selle retseptoriga.  $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste ligandide mitte- $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste mõjude tagataust jääb siiski antud tulemustest selgusetuks. Võimalik oleks uurida signaaliülekande raja järgnevat etappi (näiteks ensüüm adenülaadi tsüklaasi aktivatsiooni), et selgitada kas nähtud efektid kanduvad piki signaaliülekanderada edasi. See võiks anda olulist informatsiooni nende efektide põhjuste kohta.

Katsetest erinevate agonistide ja antagonistidega selgus, et roti otsmikukoore membraanides on [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sidumise meetodiga võimalik iseloomustada  $\alpha_{2A}$ -adrenergilise retseptori aktivatsiooni temaga seostuvatele  $G_{i/o}$ -valkudele kui kasutada madalat  $\alpha_2$ -agonisti UK14304 kontsentratsiooni (kuni 1  $\mu$ M) ja selle poolt esilekutsutud aktivatsiooni inhibeerida  $\alpha_2$ -adrenergilise antagonistiga RS79948 koontsentratsioonidel alla 1  $\mu$ M. Saadav  $\alpha_{2A}$ -retseptorit kirjeldav efekt on samas suhteliselt väike ja vead seetõttu suured, mis teeb sellised analüüsid keerukaks ja aeganõudvaks. Lisaks võivad muutused mitte- $\alpha_{2A}$ -adrenergilistes süsteemides, mis omavad ristmõjusid  $\alpha_{2A}$ -adrenergilise süsteemiga, segada usaldusväärsete tulemuste saamist.

$\alpha_{2A}$ -spetsiifilise radioligandi [ $^3$ H]RX821002 sidumine membraanidele vastas seostumise hüperbooli võrrandile väärtustega  $B_{max} = (8,16 \pm 0,28)$  fmol/mg kudet,  $K_D = (0,22 \pm 0,03)$  nM. Antud radioligandi eriaktiivsus on suhteliselt madal ja sidumise afiinsus kõrge. Sellest tulenevalt ei ole võimalik realiseerida olukorda kus totaalne sidumine kõige madalamal kontsentratsioonil oleks lisatud radioligandi kontsentratsioonist vähem kui 10%. Vastasel juhul vaba radioligandi kontsentratsioon lahuses muutub lahuses seostumise tõttu oluliselt ja pseudo-monomolekulaarse seostumise mudeli (ligandi peab olema retseptori suhtes ülehulgas) kasutamine pole päris õigustatud. Tulemuseks on  $K_D$  väärtuste ülehindamine. Väheha koguse membraanide võtmine on ka samas ainult teatava piirini õigustatud, sest efekti absoluutväärtus väheneb ja seega vead suurenevad. Antud töös uuritud madala ja kõrge uudistavusega rottide analüüsil kasutatud koe kontsentratsioon 1 mg/ml oli väikseim võimalik kuna madalamal kontsentratsioonil oleks vead veelgi suurenenud ja võrdlemine poleks osutunud võimalikuks. Kuigi saadud  $K_D$  väärtused on tõenäoliselt ülehinnatud, siis samadel tingimustel saadud tulemused on sellegipoolest

omavahel võrreldavad. Lisaks on ka kirjanduses sarnastel tingimustel saadud tulemused suhteliselt hästi kokkulangevad siin saadutega [35-36].

Madala ja kõrge uudistavusega rottide analüüsil  $B_{max}$ -i ja  $K_D$  seost uudistavusega ei leitud. Samas täheldati kahetist jaotust saadud  $B_{max}$ -ides, mis ei korreleerunud ei uudistavuse ega ka teostatud katseseeriatega. Sarnaseid tulemusi on selliste rottide peal varemgi täheldatud, kuid selle käitumuslikku korrelaati, kui selline üldse eksisteerima peaks, ei teata.

## 8 Kokkuvõte

Antud töös otsiti võimalusi  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptori iseloomustamiseks radioligandide [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S ja [ $^3\text{H}$ ]RX821002 sidumise kaudu Wistari rottide otsmikukoore membraanidele. Seejuures leiti optimaalsed tingimused [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S seostumise  $\alpha_{2A}$ -adenoretseptori-spetsiifilise aktivatsiooni mõõtmiseks. Antud töös ilmnevad  $\alpha_2$ -adrenergiliste ligandide ristmõjud mitte- $\alpha_{2A}$ -adrenergilistele süsteemidele, näidates, et antud ligandide mõjude otsene seostamine  $\alpha_{2A}$ -adrenergiliste retseptoritega ei pruugi alati olla täielikult õigustatud. Leitakse, kõik ligandid UK14304, guafatsiin, klonidiin, johimbiin BRL44408 ja RS79948 aktiveerivad [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumist kõrgematel kontsentratsioonidel mitte- $\alpha_{2A}$ -spetsiifiliselt. Näidatakse, et roti otsmikukoore membraanides on [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S sidumise meetodiga võimalik iseloomustada  $\alpha_{2A}$ -adrenergilise retseptori aktivatsiooni temaga seostuvatele  $G_{i/0}$ -valkudele, kui kasutada madalat  $\alpha_2$ -agonisti UK14304 kontsentratsiooni (kuni  $1\mu\text{M}$ ) ja selle poolt esilekutsutud aktivatsiooni inhibeerida  $\alpha_2$ -adrenergilise antagonistiga RS79948 koontsentratsioonidel alla  $1\mu\text{M}$ .

[ $^3\text{H}$ ]RX821002 sidumisel membraanidele näidatakse, et selle meetodiga on võimalik iseloomustada  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorit ja ka rakendada meetodit näiteks käitumuslike katsete uuringutes erinevatel katseloomadel  $\alpha_{2A}$ -adrenoretseptorite ekspressiooni tasemete võrdlemiseks.

## 9 Summary

Current study focused on characterizing  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors with radioligands [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S and [ $^3\text{H}$ ]RX821002 in Wistar rat frontal cortex membranes. Optimal conditions for measuring the  $\alpha_{2A}$ -specific activation of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding were found. Cross-reactivity of  $\alpha_2$ -adrenergic ligands to non- $\alpha_{2A}$ -systems was revealed showing that the effects of  $\alpha_2$ -adrenoreceptor ligands might not be as directly connected to these receptors as expected. UK14304, guanfacine, clonidine, yohimbine BRL44408 and RS79948 show non- $\alpha_{2A}$ -specific activation of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S on higher concentrations in rat frontal cortex membranes. Current study reveals that using lower concentrations of  $\alpha_2$ -agonist UK 14304 (up to 1 $\mu\text{M}$ ) and antagonist RS 79948 (up to 0.1 $\mu\text{M}$ ) to inhibit this effect, allows filtrating out  $\alpha_{2A}$ -specific signal transduction in rat frontal cortex membranes.

Binding studies with [ $^3\text{H}$ ]RX821002 to  $\alpha_{2A}$ -receptors reveal that this method is applicable to characterizing the receptor and can also be implemented on pharmacological studies for screening  $\alpha_{2A}$ -expression levels in rat frontal cortexes.

## **10 Tänuavaldused**

Käesolev töö on valminud ETF grandi (6492) ja Eesti Haridus- ja Teadusministeeriumi grandi (0182734s06) toetusel.

Avaldan tänu juhendaja prof. Ago Rinkele ja doktorant Laura Hermile olulise panuse eest töö valmimise ja PhD Ain Uustarele ülioluliste suunavate nõuannete eest.

## 11 Kasutatud kirjandus

- [1] S. Sen, Functional Studies on alpha2-Adrenergic Receptor Subtypes. Academic dissertation, University of Helsinki (2005).
- [2] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P. More, Pharmacology, Vol. 5, Churchill Livingstone, 2003.
- [3] Wikipedia: adrenergic receptor, [http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor)
- [4] G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, P.B. Molinoff, Basic Neurochemistry. 5<sup>th</sup> ed. Raven Press, New York, 1994, p261.
- [5] V. Audinot, N. Fabry, J.P. Nicolas, P. Beauverger, A. Newman-Tancredi, M.J. Millan, A. Try, F. Bornancin, E. Canet, J.A. Boutin, Ligand modulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding at human α<sub>2A</sub>, α<sub>2B</sub>, α<sub>2C</sub> adrenoreceptors. Cellular Signaling 14 (2002) 829-837.
- [6] B.C. Calzada, A.A. Artinano, Alpha-Adrenoreceptor Subtypes. Pharmacological Research, 44 (2001) 195-208.
- [7] J. Gonzalez-Maeso, R. Rodriguez-Puertas, J.J. Meana, J.A. Garcia-Sevilla, J. Guimon. Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of α<sub>2A</sub>-adrenoreceptors, Molecular Psychiatry 7 (2002) 755-767.
- [8] T. Kenakin, A Pharmacology Primer: Theory, Application, and Methods. Elsevier Academic Press 2004.
- [9] J. Gonzalez-Maeso, R. Rodriguez-Puertas, A.M. Gabilondo, J.J. Meana. Characterization of receptor-mediated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to cortical membranes from postmortem human brain. European Journal of Pharmacology, 390 (2000) 25-36.
- [10] S. Gessi, F. Campi, K. Varani, P.A. Borea, α<sub>2</sub>-Adrenergic Agonist Modulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS Binding to Guanine-Nucleotide-Binding proteins in Human Platelet Membranes. Life Sciences 64 (1999) 1403-1413.

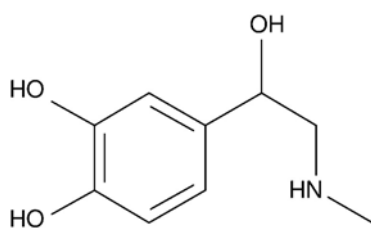
- [11] A. Newman-Tancredi, J.P. Nicolas, V. Audinot, S. Gavaudan, L. Verrièle, M. Touzard, C. Chaput, N. Richard, M.J. Millan, Actions of  $\alpha_2$  adrenoceptor ligands at  $\alpha_{2A}$  and 5-HT<sub>1A</sub> receptors: the antagonist, atipamezole, and the agonist, dexmedetomidine, are highly selective for  $\alpha_{2A}$  adrenoceptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 358 (1998) 197–206.
- [12] P.J. Pauwels, S. Tardif, F. Finana, T. Wurch, F.C. Colpaert, Ligand–Receptor Interactions as Controlled by Wild-Type and Mutant Thr<sup>370</sup>Lys  $\alpha_{2B}$ -Adrenoceptor–Ga<sub>15</sub> Fusion Proteins. *Journal of Neurochemistry*, 74 (2000) 375–384.
- [13] F. Gentili, M. Pignini, A. Piergentili, M. Giannella, Agonists and Antagonists Targeting the Different  $\alpha_2$ -Adrenoreceptor Subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7 (2007) 163-186.
- [14] V. Hann, P.L. Chazot, G proteins, *Current anaesthesia & critical care* 15 (2004) 79-81.
- [15] S. Parkel [<sup>3</sup>H]WAY 100635 sidumine roti hipokampuse membraanidele. Magistritöö, Tartu Ülikool, Tartu, 2004.
- [16] N.J. Neer, Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell*. 80 (1995) 249-257.
- [17] S. Offermanns, G proteins as transducers in transmembrane signaling, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 83 (2003) 101-130.
- [18] B. E. Staveley, Undergraduate and Graduate Teaching, <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/W2003/CellBio110/1004.JPG>, viimati alla laetud 01.05.2005.
- [19] A.G. Gilman, G protins: transducers of receptor-generated signals *Annual Review of Biochemistry*, 56 (1987) 615-649.
- [20] T. Weialnd and K.H. Jakobs, Measurement of Receptor-Stimulated Guanosine 5'-O-( $\gamma$ -Thio)triphosphate Binding by G Proteins, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., 237 (1994).

- [21] A. Rincken, U.B. Finnman, K. Fuxe, Pharmacological Characterization of Dopamine-stimulated [<sup>35</sup>S]-Guanosine 5'-( $\gamma$ -thiotriphosphate) ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) Binding in Rat Striatal Membranes. *Biochemical Pharmacology*. 57 (1999) 155-162.
- [22] H.K. Happe, D.B. Bylund, Murrin LC,  $\alpha_2$ -Adrenoreceptor stimulated GTP $\gamma$ S binding in rat brain: an autoradiographic study, *European Journal of Pharmacology*, 399 (2000) 17-27.
- [23] H.K. Happe, D.B. Bylund, L.C. Murrin, Alpha-2 Adrenergic Receptor Functional Coupling to G Proteins in Rat Brain During Postnatal Development, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288 (1999) 1134-1142.
- [24] A. Uustare, J. Nasman, K.E. Akerman, A. Rincken, Characterization of M<sub>2</sub> muscarinic receptor activation of different G protein subtypes. *Neurochemistry International*, 44 (2004) 119-124.
- [25] A. Alttoa, K. Koiv, M. Eller, A. Uustare, A. Rincken, J. Harro, Effects of Low Dose N-(2-Chloroethyl)-N-Ethyl-2-Bromobenzylamine Administration on Exploratory and Amphetamine-induced Behavior and Dopamine D<sub>2</sub> Receptor Function in Rats With High or Low Exploratory Activity, *Neuroscience*, 132 (2005) 979-990.
- [26] D.P McEwen, K.R. Gee, H.C. Kang, R.R Neubig, Fluorescent BODIPY-GTP Analogs: Real-Time Measurement of Nucleotide Binding to G Proteins, *Analytical Biochemistry* 291 (2001) 109–117.
- [27] A. Vonk, Adenülaadi tsüklaasi aktiivsuse moduleerimine D<sub>2</sub> ja A<sub>2A</sub> retseptorite poolt. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, Tartu, 2002.
- [28] R. Alvarez, D.V. Daniels, A Single Column Method for the Assay of Adenylate Cyclase. *Analytical Biochemistry*, 187 (1990) 98-103.
- [29] BIOMOL International, LP - Biomolecules for Research Success. [www.biomol.com](http://www.biomol.com), viimati alla laetud 10.05.2007.

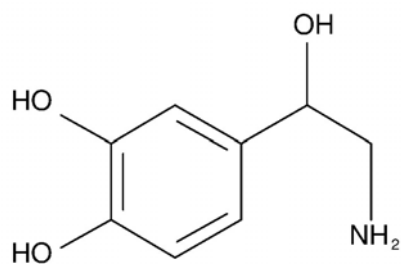
- [30] C. Bantel, J.C. Eisenach, F. Duflo, J.R. Tobin, S.R. Childers, Spinal nerve ligation increases  $\alpha_2$ -adrenergic receptor G-protein coupling in the spinal cord, *Brain Research* 1038 (2005) 76-82.
- [31] R.J. Moore, R. Xiao, L.J. Sim-Selley, S.R. Childers, Agonist-stimulated [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding in brain modulation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology* 39 (2000) 282-289.
- [32] A. Wise, I.C. Carr, D.A. Groarke, G. Milligan, Measurement of agonist efficacy using an  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor-G $_{i1}$  $\alpha$  fusion protein, *FEBS Letters*, 419 (1997) 141-146.
- [33] P. Kovacs, I. Hernadi, Yohimbine acts as a putative in vivo  $\alpha_{2A/D}$ -antagonist in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 402 (2006) 253-258.
- [34] B.A. Morrow, T.P. George, R.H. Roth, Noradrenergic  $\alpha$ -2 agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Research*, 1027 (2004) 173-178.
- [35] R. Häidkind, M. Eller, M. Harro, A. Kask, A. Rincken, L. Oreland, J. Harro, Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in rat, *European Neuro-Psychopharmacology* 13 (2003) 19-28.
- [36] J.D. Deupree, K.A. Hinton, D.R. Cerutis, D.B. Bylund. Buffers differentially alter the binding of [ $^3$ H]rauwolscine and [ $^3$ H]RX821002 to the alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278 (1996) 1215-27.

## 12 Lisad

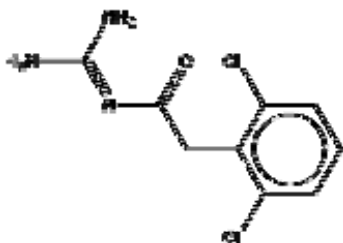
Adrenaliin



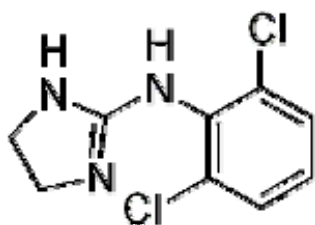
Noradrenaliin



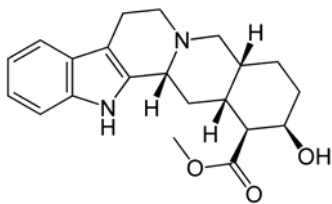
Guanfatsiin



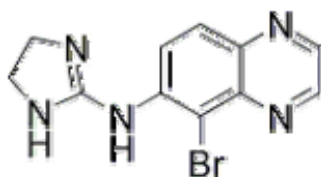
Klonidiin



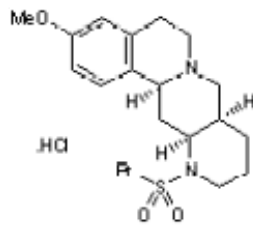
Johimbiin



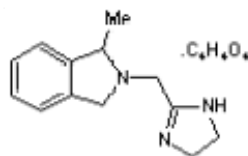
UK 14304



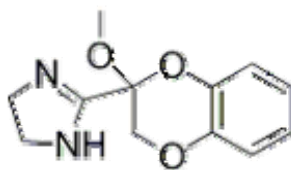
RS 79948  
hüdrokloriid



BRL 44408 maleaat



RX 821002



**Lisa1.** Adrenergilised ligandid.

**$\alpha_{2A}$ -Adrenoceptor-specific stimulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S  
binding to membrane preparations of rat frontal  
cortex**

Oliver Pulges and Ago Rinken<sup>1</sup>

Institute of Organic and Bioorganic Chemistry, University of Tartu,  
Jakobi 2, 51014 Tartu, Estonia;

**Running title:**  $\alpha_{2A}$ -Adrenoreceptor-specific activation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding

**<sup>1</sup>Corresponding author:** Ago Rinken  
Institute of Organic and Bioorganic Chemistry  
University of Tartu  
Jakobi Str. 2  
51014 Tartu  
ESTONIA  
Phone: +372 7 375 249  
Fax: +372 7 375 260  
E-mail: [ago.rinken@ut.ee](mailto:ago.rinken@ut.ee)

## Abstract

Functional activation of  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptors in the crude membranes from rat frontal cortex was studied by a [ $^{35}\text{S}$ ]-guanosine 5'-O-( $\gamma$ -thiotriphosphate) ([ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S) binding assay.  $\alpha_{2A}$  agonists UK14304 and guanfacine decreased the ability of GDP to compete with [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding to the membranes and 0.1mM GDP was found to be optimal for the following functional experiments. However, even after careful optimization of experimental conditions the specificity of ligands for rat  $\alpha_2$  adrenoceptors were not sufficient, as agonists as well as antagonists became activators of other signal transduction systems before achieving their maximal effect in the  $\alpha$ -adrenergic system. Only using compromising concentration of agonist (up to 1 $\mu\text{M}$  UK14304) and antagonist (up to 0.1 $\mu\text{M}$  RS79948) to inhibit agonists effect, allowed us to filtrate out  $\alpha_{2A}$  specific effect for characterization of signal transduction in rat frontal cortex membranes for the comparison efficacies of this system for different animals from behavioral experiments.

**Key words:** [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding;  $\alpha_2$  adrenoceptor; rat frontal cortex; signal transduction assay

## Introduction

$\alpha_{2A}$  -adrenoreceptor is a member of adrenergic receptor family, belonging to the superfamily of seven transmembrane spanning receptors which transduce their cellular signals mainly through heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins (G proteins) [1]. According to pharmacological and biochemical data, adrenergic receptors are classified into  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes, which in turn are classified into  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_{2A/D}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  and  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  subtypes [2, 3].  $\alpha$ -adrenoceptors are widely distributed in the mammalian body (including central nervous system and cardio-vascular system) and have roles in wide range of physiological and pathological processes. They are connected not only with regulation of cardiovascular systems, but also with the regulation of nociception, cognitive functions and processing of stressful stimuli [4]. It is shown that lesioning of adrenergic system in CNS have led to changes of animal behavior connected with stress and emotions [5], but the mechanism of this influence has remained open.

$\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes are coupled to diverse transduction pathways, but it has been shown that they signal mainly via pertussis toxin-sensitive  $G_{i/o}$  proteins [1]. One of the most direct approaches for characterizing the receptor-G protein signal transduction through this family of G proteins is measuring the agonist-dependent exchange of GDP for GTP at G proteins. Useful tools for these studies are the radiolabeled or fluorescently labelled non-hydrolysable analogues of GTP such as [ $^{35}$ S]-guanosine 5'-( $\gamma$ -thiotriphosphate) ([ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S) and BODIPY-GTP $\gamma$ S [6, 7]. The high fluorescence background of natural membranes does not allow widespread use of the fluorescently labelled ligands and therefore the radioactive method had to be customized for our samples. The assay of activation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding has

been successfully utilized for many G protein-coupled receptors ( e. g., adenosinergic, dopaminergic, muscarinergic, serotonergic and opioid receptors)[ 8–12 ] However the majority of this kind of experiments has been performed with receptors expressed in cell lines. For tissues the determination is significantly complicated, as the specific signal from a wide range of receptors and G proteins has to be filtered out. Autoradiographic approach has been found very useful, but the list of measurable receptors is considerably shorter than for cell lines [ 13 ]. And this list shortens even more, if we need the quantitative characterization of signal transduction in brain membranes. Fortunately, this list includes also  $\alpha$ -adrenergic receptors, for which activation has been determined in membranes of human platelets [ 14 ] and prefrontal cortex [ 15 ]. However, these approaches did not work for membranes from rat brain and therefore the aim of this study was to find the optimal conditions for characterization of signal transduction of  $\alpha_{2A}$  adrenoceptors in rat frontal cortex membranes, required for understanding of neurochemical mechanisms of animal behavior connected with emotions and stress.

## **Experimental procedure**

[<sup>35</sup>S]-guanosine 5'-O-( $\gamma$ -thiotriphosphate) ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, 1250 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer Life and Analytical Sciences. 5-Bromo-6-(2-imidazolin-2-ylamino)quinoxaline (UK14304), [(2,6-dichlorophenyl)acetyl]guanidine hydrochloride (guanfacine), 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino-2-imidazoline hydrochloride (clonidine), 17 $\alpha$ -Hydroxy-yohimban-16 $\alpha$ -carboxylic acid methyl ester hydrochloride (yohimbine), 2-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)methyl]-2,3-dihydro-1-methyl-1H-isoindole maleate (BRL44408), (8 $\alpha$ R,12 $\alpha$ S,13 $\alpha$ S)-

5,8,8a,9,10,11,12,12a,13,13a-dehydro-3-methoxy-12-(ethylsulfonyl)-6H-isoquino[2,1-g][1,6]naphthyridine hydrochloride (RS79948), 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) were purchased from Tocris Cookson Inc., ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) from Sigma, ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) from Merck, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride (Tris-HCl) from Naxo Ltd., 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) from AppliChem and dithiothreitol (DTT) from Reanal.

Membranes of frontal cortex were prepared as described earlier [16] with slight modifications. Frontal cortices from Wistar rats were homogenized in 5 ml vol. (ww/v) of homogenization buffer (50mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, 6.5mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.4) by Bandelin Sonopuls sonificator and centrifuged at 30 000g for 20 minutes at 4°C. The membrane pellet was washed by re-homogenization and centrifugation for two more times. The final pellet was homogenized in 150 volumes (ww/v) of incubation buffer (20mM K-Hepes, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 7.4) and stored at -70°C until use.

Unless otherwise indicated, [<sup>35</sup>S]GTPγS binding was assayed in a reaction mixture (final volume 300 μl) containing 20mM K-Hepes, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1μM DPCPX and 0.1mM GDP (pH 7.4). For the determination of receptor activation, the receptors were incubated with different concentrations of ligands and [<sup>35</sup>S]GTPγS (final concentration 0.26 nM) for 120 min at 30°C. The reaction was terminated and bound radioactivity was separated from free by rapid filtration through glass fibre filters (GF/B, Whatman Int. Ltd.) using Brandel cell harvester and washing three times with 3 ml of ice-cold phosphate buffer (20mM Na,K-phosphate, 100mM NaCl, pH 7.4). The radioactivity content of the filters was

counted in 5 ml of scintillation cocktail OptiPhase HiSafe<sup>®</sup> 3 (Wallac Perkin Elmer Life Sciences) by LKB Wallac 1219 Rackbeta scintillation counter. The specific binding was determined as the difference between total and non-specific binding, measured in the absence and presence of 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S.

In the case of kinetic studies, the reaction was started by rapid addition of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (final concentration 0.26 nM) to the suspension of membranes in the incubation medium with or without adrenergic agonists. At time intervals aliquots of the reaction mixture were taken and filtered on GF/B and bound radioactivity was measured as described above.

All data were analyzed by means of non-linear least squares regression method as described in [ 17 ] using a commercial program GraphPad PRISM<sup>™</sup> 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data are presented as mean  $\pm$  SEM of at least two independent determinations carried out in duplicates. Statistical significance of differences was determined by Student-Newman-Keuls test, where P<0.05 was taken as a criterion of significance.

## Results

The association of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S with membranes of rat frontal cortex was relatively fast and with high affinity and did not depend on the presence of adrenergic ligands (data not shown). Addition of GDP (0.2 mM) to the reaction medium considerably slowed down the radioligand binding to the association half life of 29 min ( $k_{\text{obs}}=(39.7\pm 2.9)\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ ). Activation of  $\alpha_2$  adrenoceptors with UK14304 (10  $\mu$ M) led to some acceleration of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding ( $k_{\text{obs}}=(43.2\pm 3.6)\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ ), which

caused significant increase in radioligand binding to these membranes. These kinetic constants indicate, that at least 2.5 h incubation is required to reach the equilibrium. However, with long incubation times we also have to take into account the inactivation of G proteins and the increase of basal radioligand binding. As a compromise between these different processes the incubation for 120 min was proposed for following experiments.

GDP displaced the binding of [<sup>35</sup>S]GTPγS in a concentration-dependent manner having value of  $pIC_{50} = 3.93 \pm 0.03$  (Fig. 1), which is very close to the values obtained earlier in rat striatum [18], but somehow lower than in human brain [15]. Activation of the  $\alpha_2$  adrenoceptors with UK14304 (10 μM) and guanfacine (10 μM) led to small but significant decrease in GDP affinity, turning the values to  $pIC_{50} = 3.75 \pm 0.04$  and  $pIC_{50} = 3.74 \pm 0.03$ , respectively (Fig.1). The maximal difference in [<sup>35</sup>S]GTPγS binding between agonist-activated and basal state was found at 0.1 mM GDP (Fig. 1) and therefore this concentration of GDP was used in following experiments.

Despite to the optimization of GDP concentration, the basal level of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding remained high and variation of salt composition in buffer did not give significant improvement (data not shown). However, it has been shown that A<sub>1</sub> adenosine system may have high signal tone in brain membranes [19] and we proposed that it may also influence the [<sup>35</sup>S]GTPγS binding. This assumption was true, as adenosine receptor antagonist DPCPX (1 μM) decreased the basal [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the presence of 0.1 mM GDP by 28%, without significant influence on the amount of radioligand binding activated by UK14304. Therefore all following

experiments (if not otherwise stated) were carried out in the presence of 1  $\mu$ M DPCPX.

UK14304, but also other agonists of  $\alpha_2$ -adrenoceptors like guanfacine and clonidine caused concentration-dependent activation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding. However, none of these activation curves could be characterized by the simple sigmoidal dose-response curves. Thus, for UK14304, at least two sites can be found with pEC<sub>50</sub> values  $6.96 \pm 0.11$  and  $4.3 \pm 0.2$  (Fig.2), from which only the high affinity site can be connected with  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptors [20]. Also dose-response curves for guanfacine and clonidine had two apparent affinities, from which only high-affinity values pEC<sub>50</sub> =  $7.67 \pm 0.21$  and pEC<sub>50</sub> =  $7.23 \pm 0.16$ , for guanfacine and clonidine, respectively could be effects of  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptors [21].

The finding that these agonists activate also other G<sub>i/o</sub>-coupled receptors was confirmed by the fact that the antagonist yohimbine could not fully inhibit their activating influence on [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding. Contrary, at concentrations above 0.1  $\mu$ M yohimbine appeared to be an activator of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding to the membranes of rat frontal cortex (Fig. 3). Therefore, the possibilities to filter out the  $\alpha_2$ -adrenoceptor effects in this system with yohimbine were complicated. In the case of antagonist BRL44408, similar activating effect was found. At concentrations above 1  $\mu$ M BRL44408 decreased the affinity of GDP to the level of pIC<sub>50</sub>= $3.86 \pm 0.04$ , hence causing the activation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding in the rat frontal cortex membranes. The situation was better with RS79948, which did not show [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding activation effect, at concentrations up to 1 $\mu$ M. At higher concentrations of this antagonist some activation appeared, limiting the upper concentration to 1 $\mu$ M., which worked well for inhibition of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding, activated by 0.1  $\mu$ M UK14304, but

remained only partly effective for 1  $\mu\text{M}$  UK14304 (Fig.4). Here the compromise has to be made. At 0.1  $\mu\text{M}$  UK14304 no full activation of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding could be achieved (Fig.2), but we can be quite certain, that this activation is connected specifically with  $\alpha_{2A}$  receptors. The concentration of 1  $\mu\text{M}$  of UK14304 seemed to be in the first part of the concentration-response curve, but the partial inhibition by RS79948 in this region indicates that other receptor systems were also involved. The fact that the amount of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding inhibited by RS79948 was similar at both agonist concentrations supported this idea. All this data allowed to confirm that activation of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding by UK14304 at concentrations up to 0.1  $\mu\text{M}$ , which can be inhibited by 0.1  $\mu\text{M}$  RS79948 is mediated by  $\alpha_{2A}$  receptors and can be used for characterization of this signal transduction system in frontal cortex of rat.

## Discussion

$\alpha_{2A}$  adrenergic receptors in frontal cortex have been shown being tightly related to cognitive functions, mood disorders and depression pathogenesis. Often animal models are used to study their biochemical background. It allows implementing post-mortem neurochemical and pharmacological methods of analysis. The radioligand binding assay has found wide utilization for this purpose, but it gives information only about the total number of receptors, but not about their functional states. The characterization of tissues on the level of transmitters and transmission would be a step ahead. Careful analysis of the levels of transmitters and their metabolites have also found wide usage and nowadays it can be monitored on-line using *in vivo* dialysis. The determination of the sensitivity of signal transduction by determination of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding has been used mainly for  $D_2$  receptors. Thus, it has been

shown that one important factor for the development of D<sub>2</sub> supersensitivity after 6-OHDA induced lesions of the striatal DA system is connected with increased activity of G proteins, which in turn is caused by decreased affinity of GDP [22]. Correlations between animal behavior and D<sub>2</sub>-specific signal transduction has also been found in the case of amphetamine-induced locomotion [23] and sucrose intake of animals [24]. However, the importance of adrenergic system in these models is proposed to be essential too, and it would be a challenge to characterize the sensitivity of signal transduction of this system. In the literature there are several papers describing  $\alpha_{2A}$ -specific activation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding in human tissues [14, 15, 25] taken as starting point. After optimization of reaction conditions we got clear influence of adrenergic agonists on the GDP affinity in displacement of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding to membranes of rat frontal cortex (Fig.1). The change found  $\Delta pIC_{50} = 0.18$  was small for radioligand experiments, but very similar to the value found in [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding assays in other systems [12, 14, 18], and sufficient for design of a reliable method.

The next problem we met was high basal level of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding, which could not be decreased with washing and changes of buffer composition. Change of effective GDP concentration led also to the loss of detectable effect. As we are using the membrane preparation of brain tissue, the basal level of activation of other receptors present in this system would be a reason of this kind of effects. It was confirmed by the finding that the antagonist of A<sub>1</sub> adenosine receptors DPCPX significantly decreased baseline level of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding and increased the accuracy of the measurements. Decrease of the baseline level has been found also with antagonists of 5-HT<sub>1A</sub> antagonists but this had also effect on the adrenergic response and therefore omitted in this study. The limited specificity of ligands is

common problem of pharmacology and this also has been discussed widely for the  $\alpha_{2A}$  adrenergic system [21, 26]. Unspecificity of ligands appeared in our study clearly, as  $\alpha_2$ -specific ligands activated other systems at higher concentrations (Fig. 2, 3). This problem did not appear in studies with human brain as the affinities of  $\alpha_2$ -ligands for this receptor are significantly higher in the human brain than in the rat brain [14, 15, 21] and therefore considerably lower concentrations of ligands could be used. Here we can conclude that some other  $G_{i/o}$ -coupled systems in addition to  $\alpha_2$  receptors are involved in the activation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding in rat frontal cortex. Therefore, care must be taken in interpretation of experimental data obtained with these ligands [27, 28]. It has remained an open question, which receptors are involved in these additional effects. Similar cross-reactivity in activation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding has also been found between serotonergic and dopaminergic systems, where serotonin is partial agonist for  $D_2$  dopamine receptors [29]. In the present system an even more complicated situation appeared, where both agonists and antagonists activate a third unknown system. Therefore we propose here using lower agonist concentrations to achieve the involvement of only  $\alpha_2$  receptor system. We understand that this leads to loss some of activation caused by these receptors, but on the other hand, we get more specific signal from  $\alpha_2$  receptors. As the [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding assay is already by its nature a transient process [6], the changes here may also appear without achieving the full activation.

In summary we can conclude that we have developed an assay for the specific characterization of  $\alpha_{2A}$  adrenoceptor signal transduction in membranes of rat frontal cortex, but the possible pitfalls, connected with the limited specificity of adrenergic ligands in rat brain, must also be pointed out for this assay.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Estonian Science Foundation (6492) by Estonian Ministry of Education and Science (0182734s06). We are grateful to Laura Herm for careful reading the manuscript and useful comments.

## References

### Reference List

1. Docherty JR (1998) Subtypes of functional [alpha]1- and [alpha]2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 361:1-15.
2. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP et al (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46:121-136.
3. Brede M, Philipp M, Knaus A et al (2004) [alpha]2-Adrenergic Receptor Subtypes - Novel Functions Uncovered in Gene-Targeted Mouse Models. *Biol. Cell* 96:343-348.
4. Ruffolo RR, Jr., Bondinell W, Hieble JP (1995) Alpha- and beta-adrenoceptors: From the Gene to the Clinic. 2. Structure-Activity Relationships and Therapeutic Applications. *J. Med. Chem* 38:3681-3716.
5. Haidkind R, Eller M, Harro M et al (2003) Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in the rat. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13:19-28.

6. Wieland T, Jakobs KH (1994) Measurement of receptor-stimulated guanosine 5'-O-( $\gamma$ -thio)triphosphate binding by G proteins. *Meth. Enzymol.* 237:3-13.
7. McEwen DP, Gee KR, Kang HC et al (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal. Biochem.* 291:109-117.
8. Cordeaux Y, Ijzerman AP, Hill SJ (2004) Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *Br. J. Pharmacol.* 143:705-714.
9. Terasmaa A, Finnman UB, Owman C et al (2000) Modulation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding to CHO cell membranes by D<sub>2(short)</sub> dopamine receptors. *Neurosci. Lett.* 280:135-138.
10. Uustare A, Nasman J, Akerman KE et al (2004) Characterization of M2 muscarinic receptor activation of different G protein subtypes. *Neurochem Int.* 44:119-124.
11. Traynor JR, Clark MJ, Remmers AE (2002) Relationship between rate and extent of G Protein activation: Comparison between full and partial opioid agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:157-161.
12. Watson J, Collin L, Ho M et al (2000) 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br. J Pharmacol* 130:1108-1114.
13. Sovago J, Dupuis DS, Gulyas B et al (2001) An overview on functional receptor autoradiography using [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. *Brain Res. Rev.* 38:149-164.

14. Gessi S, Campi F, Varani K et al (1999) Alpha2-adrenergic agonist modulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to guanine-nucleotide-binding-proteins in human platelet membranes. *Life Sci.* 64:1403-1413.
15. Gonzalez-Maeso J, Rodriguez-Puertas R, Gabilondo AM et al (2000) Characterization of receptor-mediated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to cortical membranes from postmortem human brain. *Eur. J. Pharmacol.* 390:25-36.
16. Parkel S, Rinken A (2006) Characteristics of binding of [<sup>3</sup>H]WAY100635 to rat hippocampal membranes. *Neurochem. Res.* 31:1135-1140.
17. Kopanchuk S, Veiksina S, Petrovska R et al (2005) Co-operative regulation of ligand binding to melanocortin receptor subtypes: Evidence for interacting binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 512:85-95.
18. Rinken A, Finnman UB, Fuxe K (1999) Pharmacological characterization of dopamine-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in rat striatal membranes. *Biochem. Pharmacol.* 57:155-162.
19. Odagaki Y, Fuxe K (1995) Functional coupling between A(1) adenosine receptors and G-proteins in rat hippocampal membranes assessed by high-affinity GTPase activity. *Br. J. Pharmacol.* 116:2691-2697.
20. Wise A, Carr IC, Milligan G (1997) Measurement of agonist-induced guanine nucleotide turnover by the G-protein G(i1)α when constrained within an α(2A)-adrenoceptor-G(i1)α fusion protein. *Biochem. J.* 325:17-21.
21. Newman-Tancredi A, Nicolas JP, Audinot V et al (1998) Actions of α2 adrenoceptor ligands at α2A and 5-HT1A receptors: the antagonist, atipamezole, and the agonist, dexmedetomidine, are highly selective for α2A adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358:197-206.

22. Terasmaa A, Andbjør B, Fuxe K et al (2000) Striatal dopamine denervation decreases the GDP binding affinity in rat striatal membranes. *Neuroreport* 11:2691-2694.
23. Alttoa A, Eller M, Herm L et al (2007) Amphetamine-induced locomotion, behavioral sensitization to amphetamine, and striatal D2 receptor function in rats with high or low spontaneous exploratory activity: differences in the role of locus coeruleus. *Brain Res.* 1131:138-148.
24. Tõnissaar M, Herm L, Rincken A et al (2006) Individual differences in sucrose intake and preference in the rat: circadian variation and association with dopamine D2 receptor function in striatum and nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 403:119-124.
25. Audinot V, Fabry N, Nicolas JP et al (2002) Ligand modulation of [35S]GTP[γ]S binding at human [α]2A, [α]2B and [α]2C adrenoceptors. *Cell. Signal.* 14:829-837.
26. Pauwels PJ, Tardif S, Finana F et al (2000) Ligand-receptor interactions as controlled by wild-type and mutant Thr<sup>370</sup>Lys α<sub>2B</sub>-adrenoceptor-G<sub>α15</sub> fusion proteins. *J. Neurochem.* 74:375-384.
27. Morrow BA, George TP, Roth RH (2004) Noradrenergic alpha-2 agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Res.* 1027:173-178.
28. Kovacs P, Hernadi I (2006) Yohimbine acts as a putative in vivo alpha2A/D-antagonist in the rat prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 402:253-258.
29. Rincken A, Ferré S, Terasmaa A et al (1999) Serotonergic agonists behave as partial agonists for D<sub>2</sub> dopamine receptor. *Neuroreport* 10:493-495.

## Legends for figures

**Figure 1.** Modulation of the ability of GDP to compete with the specific binding of [<sup>35</sup>S]GTPγS to the membranes of rat frontal cortex by adrenergic agonists. Binding of [<sup>35</sup>S]GTPγS (0.26 nM) to membranes of rat frontal cortex was measured after incubation with different concentrations of GDP for 120 min at 30°C in the presence of 10 μM UK14304 (○), 10 μM guanfacine (▽) or without adrenergic ligands (\*). Data are presented as percentage of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the absence of GDP from 3 independent experiments carried out in duplicate.

**Figure 2.** Activation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding by UK14304. Binding of [<sup>35</sup>S]GTPγS (0.26 nM) to membranes of rat frontal cortex was carried out in the presence of different concentrations of UK14304 and 0.1 mM GDP for 120 min at 30°C as described in *Experimental procedures*. Data presented as percentage of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the absence of agonist from 2 independent experiments carried out in duplicate.

**Figure 3.** Modulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding by yohimbine. Binding of [<sup>35</sup>S]GTPγS (0.26 nM) to membranes of rat frontal cortex was measured in the presence of different concentrations of yohimbine, 10μM UK14304 and 0.1 mM GDP for 120 min at 30°C as described in *Experimental procedures*. Data presented as percentage of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in the absence of agonist and antagonist from 3 independent experiments carried out in duplicate.

**Figure 4.** Modulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding by RS79948. Binding of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (0.26 nM) to membranes of rat frontal cortex was measured in the presence of different concentrations of RS79948, 10 $\mu$ M ( $\ast$ ) or 1  $\mu$ M ( $\circ$ ) UK14304 and 0.1 mM GDP for 120 min at 30°C as described in *Experimental procedures*. Data presented as percentage of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding in the absence of agonist and antagonist from 3 independent experiments carried out in duplicate.

Figure 1

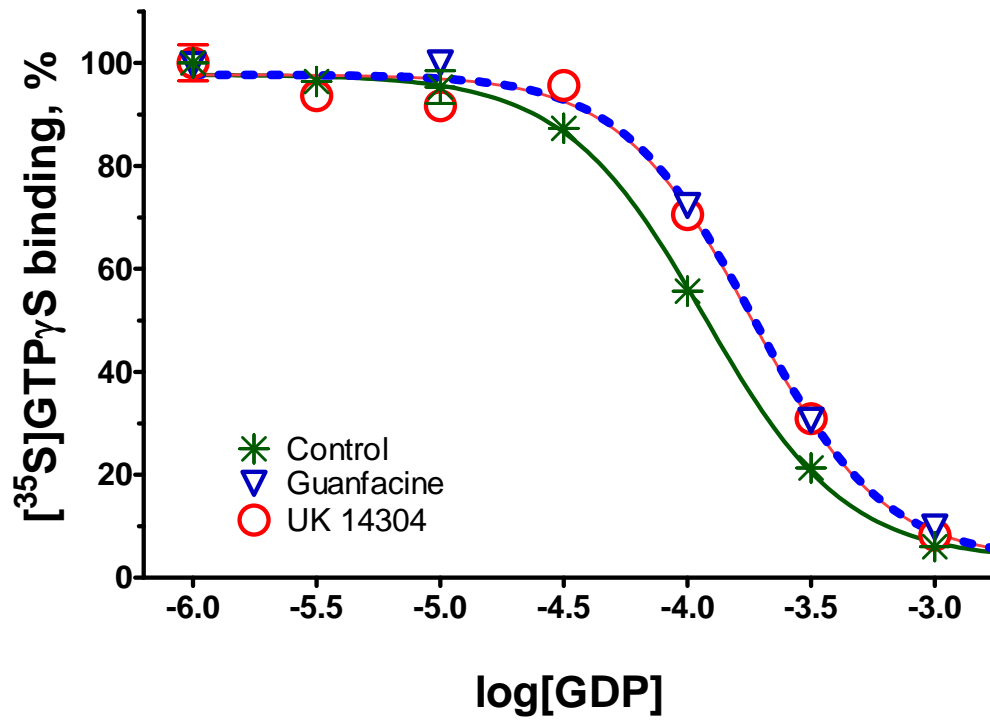


Figure 2

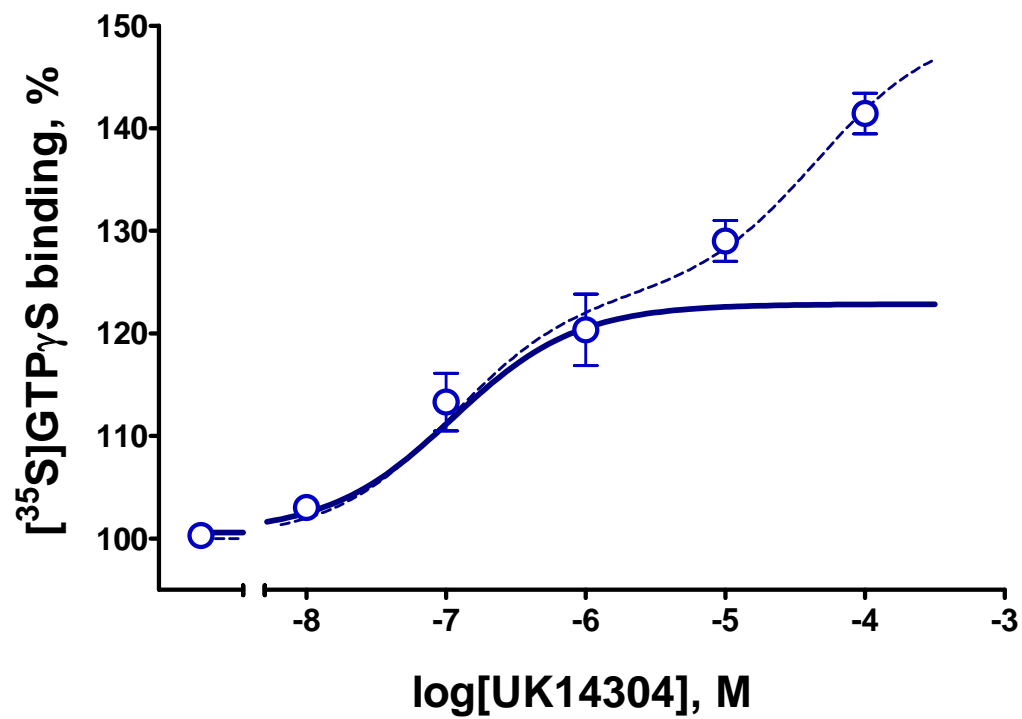


Figure 3

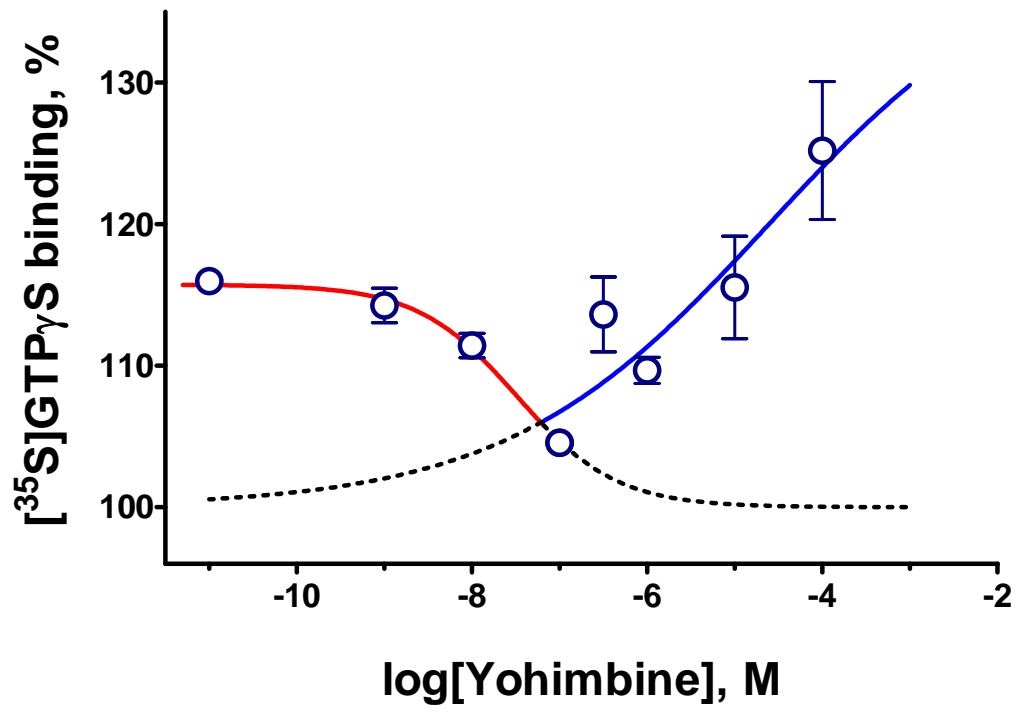


Figure 4

