

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Aivar Soome

**ERINEVATE RETSEPTORPREPARAATIDE
ISELOOMUSTAMINE
DOPAMIINI D₁ RETSEPTORI NÄITEL**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Anni Allikalt, MSc

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
2.1 Signaali ülekanne	6
2.2 G-valguga seotud retseptorid.....	6
2.3 Retseptori ja ligandi vahelised interaktsioonid	7
2.4 Dopamiini retseptorid	9
2.5 Dopamiini D ₁ retseptori ligandid.....	11
2.6 Bakuloviirustel ja Sf9 rakkudel põhinev ekspressioonisüsteem.....	12
3. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
3.1 Materjalid ja aparatuur.....	15
3.2 Retseptorite ekspresseerimine ja retseptorpreparaatide valmistamine	16
3.2.1 Sf9 rakud.....	16
3.2.2 Bakuloviirused	17
3.2.3 HEK293 rakud.....	17
3.3 Retseptorpreparaadi testimine	18
3.4 Küllastussidumine retseptorpreparaatidele	19
3.5 Väljatõrjumiskatsed	20
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
4.1 Retseptorpreparaadi testimine	21
4.2 Küllastussidumine retseptorpreparaatidele	23
4.3 Väljatõrjumiskatsed	25
KOKKUVÕTE	29
TÄNUAVALDUSED.....	29
KASUTATUD KIRJANDUS	31
SUMMARY.....	34

KASUTATUD LÜHENDID

A68930 – (1*R*,3*S*)-1-(aminometüül)-3-fenüül-3,4-dihüdro-1*H*-isokromeen-5,6-diool

AC – adenülaadi tsüklaas

APO – apomorfiin

cAMP – tsükliline adenosiin-3-5-monofosfaat

BV – bakuloviirus

DA – dopamiin

DMEM – Dulbecco modifitseeritud rakusööde

DPBS – Dulbecco sooladega fosfaatpuhver

DTT – ditiotreitol

IC₅₀ – ligandi kontsentratsioon, mis blokeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FBS – veiseloote seerum

G418 – antibiootikum genetitsiin

GDP – guanosiindifosfaat

GPCR – G-valguga seotud retseptorid

GTP – guanosiintrifosfaat

G-valk – guaniin nukleotiide siduv valk

³H – tritium

HEK293 – inimese embrüonaalsed neerurakud 293

K_i – inhibeerimiskonstant

K_D – radioligandi dissotsiatsioonikonstant

LE300 – 6,7,8,9,14,15-Heksahüdro-7-metüül-5H-indoolo[3,2-f][3]bensasetsiin

MOI – nakatuskordsus

MNPA – 2-metoksü-10,11-dihüdroksü-N-propüülnorapomorfiin hüdrokloriid

PD – Parkinsoni tõbi

SCH23390 – (R)-(+)-7-kloro-8-hüdroksü-3-metüül-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahydro-1 *H*-3-bensasepiin

SKF81297 – R-(+)-6-kloro-7,8-dihüdroksü-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-bensasepiin

TM – transmembraanne

SISSEJUHATUS

G-valguga seotud retseptorid (GPCR-id) on suurim inimese genoomi kodeeritud retseptorite perekond, mille erinevad liikmed osalevad signaaliülekanne protsessides. Neil on võime vahendada väljaspoolt rakku tulevaid signaale raku sisse. Häired GPCR-de vahendatud signaaliülekanne põhjustavad mitmesuguseid haigusi. Seetõttu on üle 50% tänapäeva retseptiravimites suunatud just G-valguga seotud retseptoritele. Antud töös keskenduti dopamiini retseptoritele, mis kuuluvad samuti G-valguga seotud retseptorite hulka.

Aastakümnete jooksul üheks usaldusväärseimaks retseptorite uurimismeetodiks on välja kujunenud radioaktiivsusel põhinev meetod. Selle meetodiga on võimalik uurida ja iseloomustada retseptori ja ligandi vahelisi interaktsioone. Käesolevas töös rakendatakse radioaktiivsusel põhinevat meetodit erinevate retseptorpreparaatide iseloomustamiseks. Antud töös võrreldi kolmes erinevas ekspresseerimissüsteemis toodetud dopamiini D₁ retseptoreid. Eesmärgiks oli välja selgitada, kas kõik retseptorpreparaadid sobivad D₁ retseptori ekspresseerimiseks ja uurimiseks. Lisaks traditsioonilistele ekspresseerimissüsteemidele (rakumembraanid) prooviti antud töö raames esimest korda rakendada bakuloviiruseid radioligandi sidumiskatsete läbiviimiseks. Antud ekspresseerimissüsteemis on valgu tootmine lihtne ja suhteliselt odav ning valku on võimalik toota suurtes kogustes. Lisaks on eeliseks valgupreparaadi pikaajaline stabiilsus.

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada välja, kas erinevad retseptorpreparaadid sobivad D₁ retseptorit uurimiseks radioaktiivsusel baseeruva meetodiga. Selleks viidi läbi erinevad katsed, mille tulemusena leiti mitmesuguseid retseptori ja ligandi vahelisi interaktsioone kirjeldavaid suurusid (radioligandi tasakaalukonstant, retseptorpreparaatide maksimaalne seostumiskohtade hulk, märgistamata ligandide inhibeerimiskonstandid). Nende põhjal on võimalik omavahel võrrelda erinevaid retseptorpreparaate.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Signaali ülekanne

Kõik elusorganismid koosnevad erinevatest rakkudest. Raku elutegevuse käigus toimub pidev informatsioonivahetus ümbritseva keskkonnaga ning sealt tulevad signaalid mõjutavad mitmesuguseid biokeemilisi reaktsioone rakus. Kui raku välispinnale jõuab mingisugune signaal, siis see käivitab keemiliste reaktsioonide raja, mida nimetataksegi signaali ülekandeks. On olemas mitmeid erinevaid bioloogilisi signaale nagu on ka erinevaid bioloogilisi vastuseid nendele signaalidele. [1]

Eukarüootsetel rakkudel on kuus peamist signaaliülekanne mehhanismi: ioonkanalid; retseptor-ensüümid; membraansed valgud, mis toimivad läbi G-valgu; tuumvalgud, mis seovad steroide ja aktiveerivad transkriptsiooni faktoreid; membraansed valgud, mis aktiveerivad proteiinkinaase; adhesiooni retseptorid, mis kannab informatsiooni rakuvälise maatriksi ja tsütoskeleti vahel. Erinevate signaaliülekanne mehhanismide tundmine lihtsustab uute ravimite väljatöötamist, sest selektiivsemad ravimid, mis mõjutavad kindlalt signaaliülekanne vahendajat, on patsientidele ohutumad. Antud töös keskendutakse G-valguga seotud retseptoritele, mille kaudu avaldavad oma mõju mitmesugused erinevad laialdaselt kasutusel olevad ravimid. [2]

1.2 G-valguga seotud retseptorid

G-valguga seotud retseptor on rakumembraani läbiv valk, mida iseloomustab seitsme hüdrofoobse transmembraanse (TM) alfa-heeliksi olemasolu. GPCR-id avaldavad oma mõju rakus G-valkude kaudu. G-valkude nimetus tuleneb asjaolust, et need seovad erinevaid guaniinukleotiide – puhkeolekus guanosiindifosfaati (GDP), mis retseptori aktiveerumisel asendub guanosiintrifosfaadiga (GTP). G-valgud on olulised närvisignaali ülekandmisel ja mõjutavad paljusid erinevaid rakuprotsesse, sealhulgas rakkude kasvu ja valkude sünteesi. Imetajate G-valgud jagunevad kahte põhikategooriasse: väiksed G-valgud ning heterotrimeersed G-valgud. Just heterotrimeersed G-valgud on seotud GPCR-dega.

Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest alaühikust alfa (α), beeta (β) ja gamma (γ). Enamus G-valgu omadusi on määratud α -alaühikuga ning üks rakk suudab ekspresseerida kuni kümme erinevat α -ühikut, kusjuures nende molaarmassid jäävad vahemikku 38-52 kDa. G-valgu alfa alaühikud jaotatakse nelja suuremasse rühma ($G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha s}$ ja $G_{\alpha i}$). $G_{\alpha q}$ -alaühik reguleerib ensüümi fosfolipaasi, mille tulemusel hakatakse tootma signaalmolekule. $G_{\alpha 12}$ -alaühik aktiveerib aga GTPaaside perekonda kuuluvaid guaniini nukleotiidide vahetusfaktoreid. $G_{\alpha s}$ -alaühik aktiveerib ensüümi adenülaadi tsüklaasi (AC), mis põhjustab tsükliilise adenosin-3-5-monofosfaadi (cAMP-i) kontsentratsiooni tõusu rakus. $G_{\alpha i}$ -alaühik toimib aga vastupidiselt ja inhibeerib ensüümi AC ning alandab cAMP-i kontsentratsiooni rakus. Kõik erinevate α -alaühikutega heterotrimeersed G-valgud on võimelised osalema mitmesugustes signaaliülekanne protsessides. [3-4]

GPCR-id on suurim inimese genoomis kodeeritud retseptorite perekond, mis on märklauaks paljudele tänapäeval kasutuses olevatele ravimitele. Üle 50% retseptiravimitest on suunatud just GPCR-dele [5]. G-valguga seotud retseptorid reageerivad tervele reale keemilistele efektoritele nagu näiteks valgus, lõhn, maitse, feromoonid, hormoonid ja neurotransmitterid. G-valguga seotud retseptorid kannavad närvisignaali väliskeskkonnast raku sisse, kus G-valkude kaudu aktiveeritakse juba järgnevaid signaaliradu. [6]

G-valguga seotud retseptorite perekonna täpne suurus on veel teadmata, kuid tänaseks on leitud üle 800 erineva liikme. Need jagunevad kolmeks põhiliseks perekonnaks (A, B ja C), millest perekond A (rodopsiinilaadsed) on suurim ja sisaldab retseptoreid paljudele erinevatele ligandidele (näiteks peptiididele, lipiididele, katehhoolamiinidele ja nukleotiididele). Rodopsiinilaadsete retseptorite alla kuuluvad ka antud töös käsitletud dopamiinergilised retseptorid. [7-8]

1.3 Retseptori ja ligandi vahelised interaktsioonid

Lisaks teadaolevatele endogeensetele ehk kehaomastele ligandidele võivad retseptorid olla interaktsioonis laias laastus kahe rühma ligandidega – antagonistide ja agonistidega. Antagonisti määratletakse molekulina, mis pärast retseptoriga seostumist takistab bioloogiliselt aktiivse molekuli (hormooni või agonisti) interakteerumist retseptoriga.

Antagonist ise ei suuda retseptorit aktiveerida. Agonist on aga molekul, mis seostub retseptoriga ning aktiveerib retseptori, andes bioloogilise efekti. [9]

Agonistid jagunevad omakorda täisagonistideks, osalisteks agonistideks ning pöördagonistideks. Erinevaid agoniste iseloomustatakse omadusega, mida nimetatakse efektiivsuseks. See omadus näitab agonistide võimet aktiveerida biokeemilisi protsesse. Osalised agonistid on molekulid, millel on biokeemilise protsessi aktiveerimisel väiksem efektiivsus, kui täisagonistil. On ka teisi agonisti-retseptori interaktsiooni teooriaid, näiteks kolmekordse kompleksse mudeli teooria [10]. Antud mudel eeldab, et retseptor eksisteerib kahes erinevas konformatsioonis – aktiivne (aktiveerib G-valku) ja inaktiivne. Agonist stabiliseerib retseptori aktiivset konformatsiooni, samas kui pöördagonist stabiliseerib inaktiivset. Kolmekordse kompleksse mudeli tuletised võimaldavad aga ka enamate konformatsioonide moodustamist.

Biokeemilised katsed on näidanud, et ühe ja sama retseptori erinevad agonistid võivad käivitada rakus erinevaid protsesse. Seda nimetatakse stiimuli nihkumiseks ehk kallutatud agonismiks. See tähendab, et võib olla mitu aktiivset retseptori konformatsiooni. Selle mudeli puuduseks on asjaolu, et seal ei arvestata tasakaalu guaniini nukleotiidide ja G-valkude vahel. Seetõttu rakendatakse sageli katalüütilist kineetilist mudelit, kus on arvestatud interaktsioone agonisti, retseptori, G-valgu ja nukleotiidi vahel. Selles mudelis muutub tasakaal aktiivsete ja inaktiivsete olekute vahel (mitte ainult agonisti, vaid ka G-valgu nukleotiidide vahel).

Paljudel retseptoritel on olemas mitu kohta, kuhu ligand saab seostuda. On olemas ortosteeriline sidumiskoht, kuhu ligand tavaliselt seostub. Lisaks teatakse ka retseptorite allosteerilisi sidumiskohti. Teadaolevalt seostub hulganiselt molekulid erinevate retseptorite allosteerilisele sidumiskohale ning paljud neist ühenditest on tuntud kui kõrge selektiivsusega ravimid. Allosteerilised sidumiskohad asuvad ortosteerilistest saidist eemal ja mõjutavad mõne teise ligandi seostumist ortosteerilisele saidile. Üldjuhul ei ole allosteerilistel ligandidel üksinda mõju biokeemilistele protsessidele, küll aga need kiirendavad või takistavad teiste ligandide toimet. Retseptorite allosteerilistest modulaatoritest on teada näiteks GABA. [11]

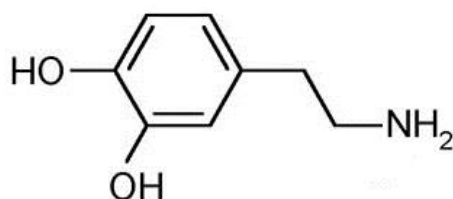
Ajalooliselt on radioaktiivsusel baseeruv meetod kõige levinum viis retseptori ja ligandi vaheliste interaktsioonide uurimiseks. Sidumiskatsetes kasutatakse kõige rohkem ^3H ja ^{125}I isotoobiga märgistatud ligande. Radioligandi sidumiskatsed annavad usaldusväärseid tulemusi, kuid sellel meetodil on ka mõningaid puudusi. Radioligandid on küllaltki kallid ning

mõndade radioligandide lühikese poolestusaja tõttu saab neid kasutada ainult lühikest aega. Samuti on ka katsete käigus tekkinud radioaktiivsete jäätmete käitlemine ja utiliseerimine keerukas protsess. Seetõttu kasutatakse aina rohkem mitteradioaktiivseid meetodeid, näiteks fluorestsentsil baseeruvaid katsesüsteeme. Ometi on radioaktiivsusel baseeruv meetod endiselt laialdaselt kasutusel retseptori ja ligandi vaheliste interaktsioonide kirjeldamiseks. [4]

On kolm erinevat laadi lähenemist selleks, et viia läbi sidumiskatseid: kineetilised eksperimendid, tasakaaluline küllastussidumine ja konkureeriva sidumise katsed. Kineetilistes katsetes jälgitakse erinevatel ajahetkedel radioligandi seostumist retseptorile (ühel või mitmel erineval radioligandi kontsentratsioonil) ja tulemusteks saadakse seostumise- või dissotsiatsiooni kiiruskonstandid. Tasakaalulise küllastussidumise katsetes uuritakse ligandi seostumise määra erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel, kusjuures oodatakse tasakaalu saabumiseni. Selle tulemusena on võimalik määrata radioligandi dissotsiatsioonikonstant ja sidumiskohtade hulk retseptorpreparaadis. Konkureerivate sidumiskatsete käigus hoitakse radioligandi kontsentratsioon konstantsena ja varieeritakse märgistamata ligandi kontsentratsiooni. Selliste katsete tulemusena saadakse märgistamata ühendi inhibeerimiskonstandi (K_i) väärtus, mis iseloomustab märgistamata ligandi afiinsust retseptorile. [12]

1.4 Dopamiini retseptorid

Dopamiin (DA) on oluline katehhoolamiinide perekonda kuuluv virgatsaine imetajate ajus, kus see reguleerib mitmesuguseid funktsioone, sealhulgas liikumist, tunnetust, emotsiooni ja toitumist. DA struktuur koosneb benseenist, mille küljes on kaks hüdroksüülrühma ja samuti ka etüülamiin või selle derivaat (Joonis 1) [3]. IUPAC-i nomenklatuuri järgi on DA 4-(2-aminoetüül)benseen-1,2-diool. Antud katehhoolamiin mängib tähtsat rolli ka väljaspool aju, näiteks südameveresoones, neerude funktsioneerimisel ning seedeelundite töös.

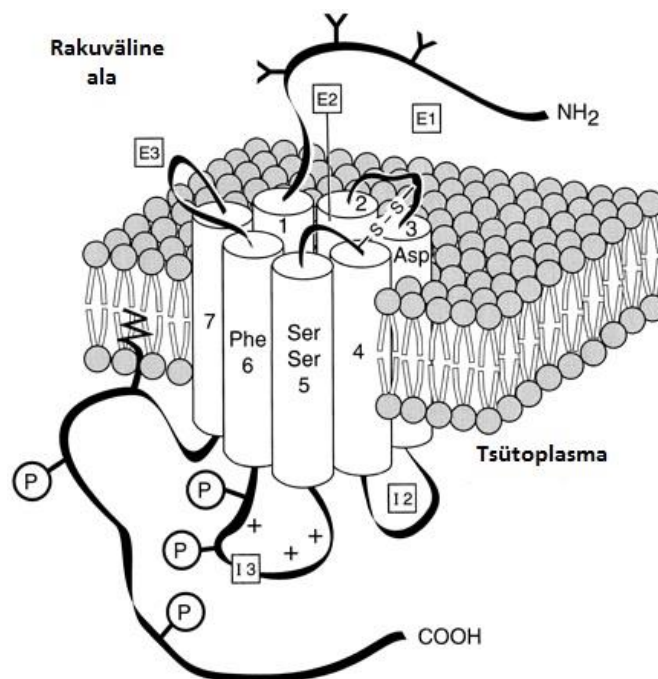


Joonis 1. Dopamiini struktuur

Dopamiinergilisi süsteeme on laialdaselt uuritud üle 30 aasta. Põhiliseks põhjuseks on see, et mitmesuguseid patoloogilisi seisundeid nagu Parkinsoni tõbe (PD), skisofreeniat ja Tourette'i sündroomi seostatakse dopamiinergilise süsteemi desüregulatsiooniga. Dopamiini retseptorite antagonistide kasutatakse ravimitena selleks, et leevendada hallutsinatsioone ja luulusid, mis esinevad skisofreeniahaigetel. Lisaks on DA retseptorite antagonistid efektiivsed Parkinsoni tõve sümptomi hüpokineesia leevendamisel. DA retseptorite blokeerimine võib aga omakorda kaasa tuua soovimatuid efekte, mis tähendab näiteks seda, et tekib dopamiini retseptorite alatalitus. Sellisel juhul saab liiga vähe dopamiini retseptoritele seostuda ning närvisignaali edasi kanda. Näiteks PD puhul manustatakse L-DOPA-t, mis muudetakse ajus dopamiiniks, mistõttu närvisignaali ülekande muutub efektiivsemaks. Suured doosid DA agoniste võivad aga põhjustada psühhoosi. Seega on dopamiinergilise süsteemi ala- või ületalitlusest tulenevate haiguste ravi seotud tõsiste kõrvalmõjudega. [13]

DA retseptorid kuuluvad G-valguga seotud retseptorite perekonda ja jagunevad D₁-tüüpi ja D₂-tüüpi retseptoriteks (Joonis 2) [9]. Need kaks perekonda on selgelt eristatavad nii struktuuri kui ka funktsionaalsuse poolest. D₁ ja D₂ klassifikatsioon töötati välja 1970. aastate lõpus ja see kehtib tänapäevani. D₅ ja D₁ retseptoreid loetakse D₁-tüüpi retseptoriteks, kuna nende transmembraansed alad on ligi 80% ulatuses sarnased, kuid kohad, kus neid ajus ekspresseeritakse on erinevad. D₂, D₃ ning D₄ kuuluvad D₂-tüüpi retseptorite perekonda ja nende transmembraane sarnasus D₂ ja D₃ retseptorite vahel on 75% ning D₂ ja D₄ vahel 53%. Kuna samasse perekonda kuuluvad dopamiini retseptorid on omavahel homoloogilise struktuuriga, siis on alatüüpspetsiifiliste ligandide leidmine keeruline.

D₁ ja D₂-tüüpi retseptorite funktsionaalne erinevus tuleb sellest, et need on seotud erinevate G-valgu alfa alaühikutega. Lisaks on D₁-tüüpi retseptorite perekonnal ligikaudu seitse korda pikem C-terminaalne domeen kui D₂-tüüpi retseptoritel. D₁-tüüpi retseptorid on seotud G_{as}-alaühikuga, mis stimuleerib ensüümi AC ja ka cAMP-i sünteesi rakus. D₂ tüüpi retseptorid on seotud G_{oi}-alaühikuga inhibeerides ensüümi AC, mistõttu cAMP-i sünteesi rakus on samuti inhibeeritud [3]. Erinevus D₂-tüüpi ning D₁-tüüpi retseptorite vahel on ka see, et D₁ ja D₅ retseptoreid kodeerivad geenid ei sisalda introneid oma kodeerimisregioonides. See on sarnane enamiku G-valguga seotud retseptoritega. [12-13]



Joonis 2. Dopamiini retseptorite üldstruktuur. Joonisel on näidatud D₁-tüüpi retseptorite struktuursed üksused. D₁-tüüpi retseptorite perekonna C-terminaalne domeen on umbes seitse korda pikem kui D₂ sarnastel retseptoritel. D₂-tüüpi retseptoritel on aga pikem kolmas rakuväline aas (E3). E1-E3 – rakuvälised aasad, 1-7 – transmembraansed domeenid, I2-I3 – rakusisesed aasad. Joonisel on välja toodud kohad, kust retseptor on tavaliselt fosforüleeritud (P) ning lisaks on näidatud glükosüleerimis kohad N-terminuses. [14]

1.5 Dopamiin D₁ retseptori ligandid

D₁ retseptori ligande hakati uurima tunduvalt varem kui teiste DA retseptorite ligande. D₁ ligandide terapeutilist potentsiaali hakati üha enam nägema 1990. aastatel. Arvukalt kõrge afiinsusega ligande D₁ retseptorile sünteesiti juba 1980. aastatel. Suurem osa uurimistööst piirdus ühe keemiliste ainete klassiga, milleks olid bensasepiinid. Antud klassist leiti mitmeid kõrge afiinsusega D₁ retseptori selektiivseid ligande, mille hulgas oli nii antagoniste, kui ka agoniste. Nende ligandide kõrge afiinsus ei olnud aga kooskõlas suure efektiivsusega – need ligandid seostusid retseptoritele hästi ent, ei tekitanud maksimaalselt bioloogilist efekti (aktivatsiooni või inhibeerimist).

Kõrge afiinsuse ja D₁ retseptori selektiivsuse tõttu on erinevaid bensasepiinide derivaate püütud rakendada Parkinsoni tõve sümptomite leevendamiseks või antipsühhootiliste ravimitena. Nende ravimite laialdast kasutamist piirab aga väike efektiivsus. Lisaks on probleemiks see, et nende suukaudne manustamine on raskendatud ning nende suhtes tekib kiiresti ka resistentsus. Ainsaks ravimiks, mis turule on jõudnud, on fenoldopaam. Kuigi D₁ retseptori selektiivsed ligandid võeti kasutusele juba enam kui kaks aastakümnet tagasi, on ravimitena efektiivsed D₁ retseptori selektiivsed ligandid pigem haruldased. Tänapäeval on enamik dopamiinergilisi ravimeid suunatud pigem D₂-tüüpi retseptoritele. Klassikalisi bensasepiini analooge kasutatakse aga laialdaselt farmakoloogiliste vahenditena D₁ retseptori uurimiseks. [15]

1.6 Bakuloviirustel ja Sf9 rakkudel põhinev ekspressioonisüsteem

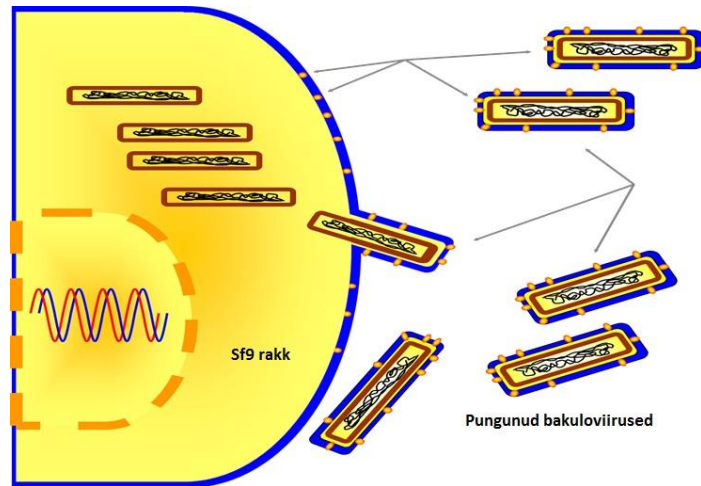
Ligandi ja G-valguga seotud retseptori vaheliste interaktsioonide uurimiseks on väga erinevaid lähenemisi, alustades loomse koe kasutamisest kuni puhastatud algupäraste või rekombineeritud valkudeni. Bakuloviirustel ja Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) rakkudel põhinevast ekspressioonisüsteemist on saanud üks laiemat kasutusala meetodeid rekombinantsete valkude tootmiseks. Selles ekspressioonisüsteemis toodetud rekombinantset valgud on inimese organismis leiduvatele valkudele sarnasemad, kui näiteks pärmides või bakterites toodetud valgud. Antud süsteemi eelis imetajarakkude ees on aga see, et valkude tootmine on tunduvalt odavam. Lisaks on võimalik toota vajalikku valku suurtes kogustes. Sf9 putukarakkudes saavad ka toimuda olulisemad posttranslatoorsed modifikatsioonid, mis on vajalikud G-valguga seotud retseptorite korrektseks funktsioneerimiseks. [17-18]

Bakuloviirusel ja Sf9 rakkudel põhinev ekspressioonisüsteem on tuntud kui ohutu tehnoloogia, mida on edukalt kasutatud paljude valkude ekspresseerimiseks ja mida võib kasutada ka selleks, et uurida valke bakuloviirusega nakatatud putukarakkude rakumembraanides. Sf9 rakuliin on liblika munasarja koest eraldatud ning neid rakke kasutatakse laialdaselt GPCR-de uurimisel. Sf9 rakke nakatatakse viirusega, millesse on kodeeritud soovitud transgeen efektiivse polühedriini promotori alla, mille abil hakatakse tootma rekombineeritud valku suurtes kogustes. Tänu mitmesugustele tehnoloogilistele uuendustele on vabanenud mitmest tülikast ja aeganõudvast etapist, mis olid varem vajalikud

rekombinantsete viirusosakeste identifitseerimiseks ja isoleerimiseks ning seetõttu on süsteemi populaarsus pidevalt kasvanud. [16-19]

Bakuloviirused on DNA viirused, mis pärinevad putukarakkudest ja on võimelised nakatama üle 500 erineva putukaliigi. Esialgsete tulemuste kohaselt arvati, et bakuloviirustega saab ekspresseerida valke ainult putukarakkudes. Hilisemate uuringute tulemusena jõuti järeldusele, et rekombinantsete valkude tootmine on võimalik siiski ka imetajarakkudes. Selleks on vaja viiruse genoomi viia peale soovitud geeni ka imetajaterakkudes efektiivselt töötav promootor. Bakuloviiruste kasutamine biotehnoloogias on ohutu, kuna nad ei paljune imetajarakkudes ja lagunevad rakkudes teatud aja jooksul. Samuti on nende kasutamise eeliseks see, et bakuloviiruste genoomi saab sisestada kuni 38 kbp suuruse geenijärjestuse. Seega on võimalik ekspresseerida suuri valke ning ka mitut valku korraga. [21]

Antud ekspressioonisüsteemi toimimiseks nakatatakse Sf9 rakk viirusega. Viirus hakkab rakus paljunema. Sellest tingituna hakkab rakk oma membraani tootma soovitud GPCR-i. Mõne aja möödudes hakkavad viirusosakesed rakust välja punguma, võttes tükikese rakumembraani endaga kaasa – nii saadaksegi rekombinantsed valgud viirusosakeste pinnale (Joonis 3). Antud ekspressioonisüsteemis saab valgupreparaadina kasutada nii Sf9 rakumembraane kui ka bakuloviiruseid. Sf9 rakumembraanide kasutamiseks kogutakse rakud siis, kui elumus ei ole märgatavalt langenud (elumus > 90%, ligikaudu 48 tundi pärast nakatamist). Bakuloviiruste kasutamiseks oodatakse seni kuni elumus on langenud alla 50% (enamus rakke on surnud, kuna nende rakumembraan saab viirusosakeste pungumisel kahjustada).



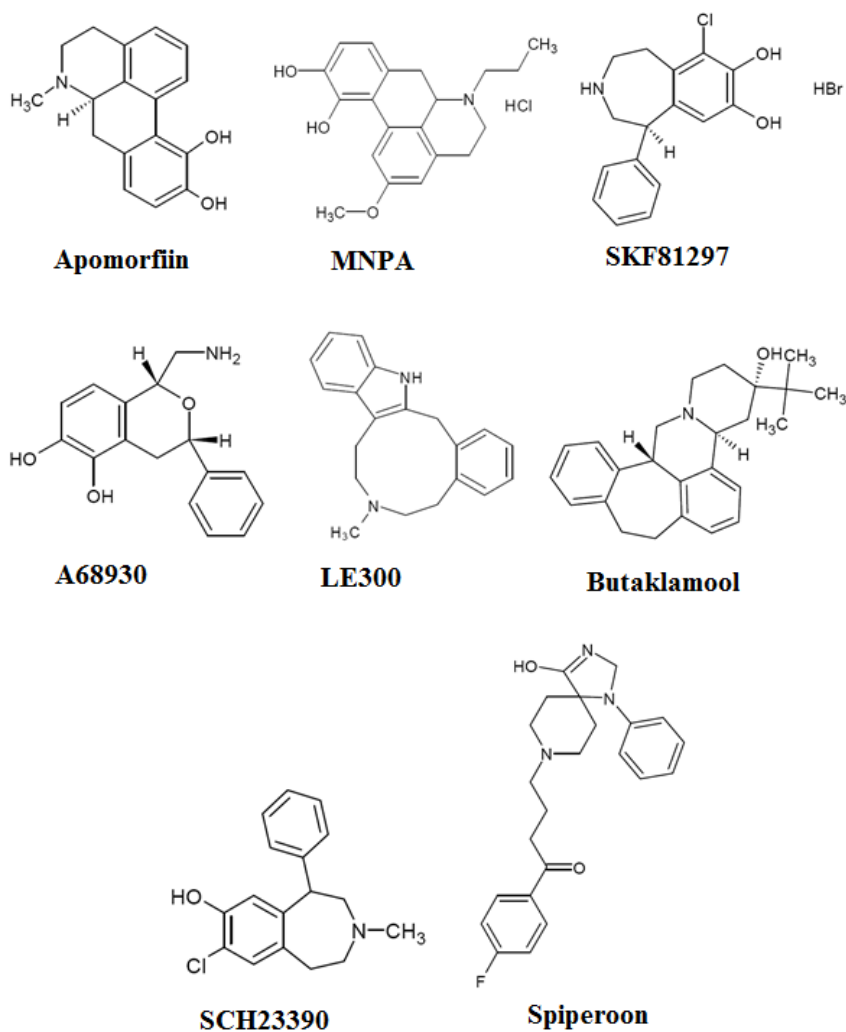
Joonis 3. Bakuloviiruste pungumine peremeesrakust. Joonisel on näidatud kuidas pungunud viirusosakesed väljuvad Sf9 rakust. Selle käigus võtavad need tükikesed peremeesraku membraani endaga kaasa, mistõttu on toodetud retseptoreid ka bakuloviiruste pinnal. Samuti on näha, et viirusosakesed on väga pisikesed võrreldes peremeesrakuga.

Bakuloviiruste kasutamise eeliseks on see, et viirusosakesed on väga stabiilsed (mõõtmisi võib teostada isegi 10 tunni vältel ja valk ei lagune). Bakuloviiruste stabiilsuse tõttu kasutatakse neid laialdaselt fluorestsentsanisotroopia meetodis. Bakuloviirused on pulgakujulised, kusjuures osakeste läbimõõt on 40-50 nm ja pikkus 200-400 nm [20]. Väikeste mõõtmete tõttu arvati, et need ei sobi radioligandi sidumiskatseteks, kuna filtreerimisetapi käigus tuleb eemaldada vaba radioligand retseptoriga seotud radioligandist. Bakuloviiruste väikeste mõõtmete tõttu võib see aga olla komplitseeritud, kuna retseptorpreparaat ei pruugi klaaskiudfiltrisse kinni jääda.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Materjalid ja aparatuur

G-valguga seotud retseptorite tootmiseks kasutati kolme erinevat ekspressioonisüsteemi: bakuloviiruseid, Sf9 rakke ja HEK293 rakke (American Type Culture Collection). Erinevate katsete läbiviimisteks ja lahjenduste tegemiseks kasutati 96-süvendiga U-kujulise põhjaga katseplaate (Nunc). Standardainetena kasutati nii agoniste (apomorfiin, dopamiin, MNPA, SKF81297 ja A68930) kui ka antagonistide (LE300, butaklamooli, SCH23390, spiperoon) (Joonis 4). Radioaktiivsetes katsetes kasutati tritiumiga märgistatud ligandi [³H]SCH23390, mille eriaktiivsus oli 84,3 Ci/mmol (kuni 05.02.15) või 81,9 Ci/mmol (alates 06.02.15). Radioligandid osteti firmalt Perkin Elmer.



Joonis 4. Dopamiinergiliste agonistide ja antagonistide struktuurid

Sidumiskatsetes kasutati reaktsiooni peatamiseks filtreerimissüsteemi FilterMate Harvester (Perkin Elmer), millega filtreeriti reaktsioonisegu läbi klaaskiudfiltermattide (GF/B, Perkin Elmer). Klaaskiudfiltermattide kuivatamiseks kasutati mikrolaineahju. Filtrisse tahke stsintillandi Meltilex™ B/HS (Perkin Elmer) sulatamiseks, kasutati kuumpressi Meltilex™ Heatsealer (Wallac). Luminesentsi mõõtmiseks kasutati loendurit Wallac Microbeta TriLux 1450 LSC Luminescence Counter firmalt Perkin Elmer.

Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks kasutati rakuloendurit TC10™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). Rakkude elumuse rutiinseteks määramiseks kasutati 0,4% trüpaansinist (Sigma-Aldrich). Rakuplaatide vaatamiseks kasutati mikroskoopi Olympus CKX31. Tsentrifugimine viidi läbi Sigma Laborzentrifugen mudeliga 3K30. Rakkude homogeniseerimiseks kasutati homogenisaatorit Parmer LabGen 125.

Kõikide andmete töötlemiseks kasutati programmi Graphpad Prism™ 5.00.

2.2 Retseptorite ekspresseerimine ja retseptorpreparaatide valmistamine.

2.2.1 Sf9 rakud

Sf9 putukarakke kasvatati Ex-Cell raku söötmes suspensioonikultuurina. Inkubaatori temperatuur hoiti 27 °C juures. Antud rakkude puhul ei lisatud söötmesse antibiootikume. Viiruse tootmiseks nakatati Sf9 rakke tiheduse juures 1,5 mln/ml. Viirusosakeste ja rakuarvu suhe oli 5 viirusosakest ühe raku kohta, ehk MOI=5. Rakke kasvatati 48 tundi (kuni elumus oli ligikaudu 90%). Järgmisena tsentrifugiti rakud 1000 g juures 5 minuti jooksul. Seejärel valati lahus pealt ära ning sadet hoiustati -80 °C juures kuni membraanpreparaadi valmistamiseni.

Membraanpreparaatide valmistamisel hoiti kõiki lahuseid jääl ning tsentrifugimised viidi läbi 4 °C juures. Sulatatud rakud resuspendeeriti jääkülmas pesupuhvril (50 mM Tris-HCl, pH=7,4) ning tsentrifugiti 800 g juures 5 minuti jooksul. Esimesel korral lisati puhvril ka EDTA-vaba proteaasi inhibiitorit (Roche Diagnostics GmbH). Saadud sade resuspendeeriti uuesti pesupuhvril ning homogeniseeriti mehaaniliselt vähemalt 30 sekundi jooksul (kuni lahus oli homogeenne). Järgmiseks viidi läbi tsentrifugimine 30 000 g juures 20 minuti

jooksul. Seejärel eemaldati supernatant ja sade resuspendeeriti uuesti jääkülmas pesupuhvrivis. Peale seda viidi taaskord läbi lahuse homogeniseerimine ning tsentrifuugimine 20 minuti jooksul 30 000 g juures. Viimane homogeniseerimine viidi läbi katsepuhvrivis (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4). Katsepuhvrivis lisati nii palju, et lõpp kontsentratsioon oleks 10 miljonit rakku/ml-s. Saadud lahus jagati 1 ml kaupa alikvootidesse ning hoiustati -80 °C.

2.2.2 Bakuloviirused

Sf9 putukarakke kasvatati tiheduseni 2,0 mln/ml. Viiruse tootmiseks oli MOI taaskord 5. Sf9 rakke kasvatati seni kuni elumus langes alla 50% (ligikaudu 72 tundi). Seejärel tsentrifuugiti rakud 1000 g juures 5 minuti jooksul. Järgmisena eraldati supernatant ning viiruse kontsentreerimiseks viidi läbi uus tsentrifuugimine (48 000 g, 40 minutit, temperatuur 4 °C). Seejärel eemaldati supernatant ning sade resuspendeeriti katsepuhvrivis nii, et lõpptulemuseks saadi 25 korda kontsentreeritud viirus. Saadud lahus jagati 500 µl kaupa alikvootidesse ning hoiti -80 °C juures kuni katseni.

2.2.3 HEK293 rakud

Meie töörühmas on välja töötatud püsiliin D₁ retseptori ekspresseerimiseks HEK293 rakkudes [22]. Antud rakke kasvatati Dulbecco modifitseeritud Eagle-i rakuõotmes (DMEM), millele oli lisatud 10% veiseloote seerumit (FBS), 100 IU/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomütsiini ja 400 µg/ml genetitsiini (G418). Neist viimane on oluline antibiootikum DA retseptorite geeni sisaldavate rakkude selekteerimiseks. Rakke kasvatati niiskuse-reguleeritud inkubaatoris temperatuuril 37 °C. Inkubaatoris oli lisaks ka 5 % CO₂. Membraanpreparaatide valmistamiseks kasvatati HEK293 rakke Petri tassidel konfluentsuseni 90-95%. Seejärel kontrolliti rakkude elumust ning määrati rakuarv (ühel Petri tassil). Rakkude lahti pipeteerimiseks teistelt Petri tassidelt kasutati automaatpipette. Selleks lisati 2 ml DPBS-i ühe plaadi kohta ning saadud raku suspensioon koguti 50 ml plasttuubidesse. Saadud suspensioonid tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 minuti jooksul 1000 g juures. Sadet hoiustati -

80 °C juures kuni membraanpreparaadi valmistamiseni. Rakumembraanide katseks ettevalmistamine viidi läbi samamoodi nagu Sf9 rakkude puhul.

2.3 Retseptorpreparaadi testimine

Retseptorpreparaatide testimine oli vaja läbi viia selleks, et leida edasiste katsete (küllastussidumise ja radioligandi väljatõrjumiskatsete) jaoks sobiv retseptorpreparaadi kogus. Soovituslik totaalne seostumine peaks olema vahemikus 800-1200 cpm ehk seostub <10% lahuses olevast vabast radioligandist. Samuti oli eesmärgiks uurida mittespetsiifilise seostumise osakaalu, mis võimaldab hinnata erinevate retseptorpreparaatide kvaliteeti. Katsed viidi läbi kolme erineva valgupreparaadiga: Sf9 ja HEK293 rakkudes toodetud D₁R-i ning bakuloviirustes ekspresseeritud D₁ retseptoriga. Katsetes varieeriti erinevate retseptorpreparaatide kontsentratsiooni ($5,0 \cdot 10^4$ - $4,0 \cdot 10^5$ rakku/süvendis rakumembraanide puhul ja $3,1 \cdot 10^5$ - $24,9 \cdot 10^5$ rakku/süvendis bakuloviiruste jaoks).

Katsete läbiviimiseks kasutati katsepuhvrit RIB (pH=7,4), mille valmistamiseks kasutati järgmisi aineid: 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5mM KCl ja 1 mM EDTA. (sobiva pH saamiseks kasutati HCl). Vahetult enne katsete läbiviimist lisati katsepuhvrile 1 mM DTT. Radioligandi kontsentratsiooni hoiti konstantsena (ligikaudu 1 nM). Radioligandi mittespetsiifilise seostumise määramiseks kasutati dopamiini retseptorite mitteselektiivset antagonistit butaklamooli, mille kontsentratsioon hoiti samamoodi konstantsena (1 µM). Totaalse seostumise määramiseks lisati katseplaadi süvenditesse butaklamooli asemel võrdne ruumala katsepuhvrit.

96-süvendiga katseplaatidele lisati järgnevad ained: 50 µl radioligandi, 50 µl butaklamooli või katsepuhvrit ja 150 µl membraanpreparaati või bakuloviirust (lõppruumala oli 250 µl). Katsed teostati triplicateides. Pärast ainete lisamist pandi katseplaat inkubeerima loksutile (60 minutit, 25 °C, 400 rpm), et püstituks tasakaal. Peale inkubeerimisaja lõppu eraldati lahuses olev vaba radioligand radioligand-retseptor kompleksist. Vaba radioligandi eemaldamine võimaldab detekteerida vaid seotud radioligandi hulka. Selleks filtreeriti reaktsioonisegu läbi klaaskiudfiltrit, kasutades selleks jääkülma filtreerimispuhvrit (20 mM K₃PO₄, 100 mM NaCl, pH=7,4). Filtri kuivatamine toimus mikrolaineahjus (2 minutit, 800W).

Radioligandiks kasutati triitiumiga (^3H) märgistatud bensasepiini derivaati [^3H]SCH23390. Kuna triitiumi tekitatava β -kiirguse detekteerimine on keeruline, siis kasutatakse seostunud radioligandi hulga määramiseks kaudset meetodit. Selleks sulatatakse filtrisse tahke stsintilleeruv aine MeltiLex B. Triitiumi lagunemisel interakteerub tekkinud β -kiirgus tahke stsintilleeruva ainega (sisaldab mitmesuguseid aromaatsed ühendeid). Stsintilleeruv aine annab oma energia mõne aja möödudes ära valguskiire sähvatusena, mida detekteeritakse stsintillatsiooniloenduris valgustundliku detektori abil. Filterile jäänud radioaktiivsus mõõdetakse cpm-des (*counts per minute*) ja iga süvendi mõõtmise toimub 4 minuti jooksul.

2.4 Küllastussidumine retseptorpreparaatidele

Antud katse eesmärgiks on uurida radioligandi seostumise määra erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel. Sellise katse käigus on võimalik määrata radioligandi afiinsust, (dissotsiatsioonikonstanti (K_D)) ja ühtlasi hinnata sidumiskohtade hulka retseptorpreparaadis (B_{\max}). Nende näitajate põhjal on võimalik iseloomustada ja võrrelda erinevaid retseptorpreparaate. Saadud radioligandi dissotsiatsioonikonstanti kasutatakse hiljem erinevate märgistamata ühendite inhibeerimiskonstantide (K_i) arvutamisel.

Katse viidi samamoodi läbi 96-süvendiga katseplaatidel. Katsepuhviks kasutati RIB (pH=7,4), millele vahetult enne katset lisati 1 mM DTT. Erinevate radioligandi kontsentratsioonide saamiseks tehti radioligandi seerialahjendused ja katsed viidi läbi duplikaatides. Katseid teostati 3-5 korda ($n=3-5$). Katseplaadile pandi 50 μl erinevate kontsentratsioonidega radioligandi, 50 μl puhvrit või mittespetsiifilise seostumise määramiseks butaklamooli (1 μM) ja 150 μl rakumembraane või bakuloviirust (lõppruumala 250 μl). Kõikide lahuste valmistamine ja hoidmine viidi läbi jääs. Peale seda pandi 96-kohaline katseplaat inkubeerima loksutile (60 minutit, 25 $^{\circ}\text{C}$, 400 rpm). Peale inkubeerimist viidi läbi filtreerimine jääkülma puhvriga (20 mM K_3PO_4 , 100mM NaCl, pH=7,4). Seejärel kuivatati filter mikrolaineahjus ja sellesse sulatati tahke stsintillant. Viimasena pandi filter stsintillatsiooniloendurisse, et mõõta filtrile jäänud radioligandi hulk cpm-des.

Määrati ka radioligandi seerialahjenduste kontsentratsioonid ehk vaba radioligandi kontsentratsioon. Radioligandi kontsentratsiooni määramiseks pipeteeriti 50 μl radioligandi

lahust vedelasse stsintilleeruvasse ainesse ($V=3$ ml). Saadud proovid lisati hiljem koos filtritega stsintillatsiooniloendurisse.

2.5 Väljatõrjumiskatsed

Väljatõrjumis- ehk konkureeriva sidumise katsete käigus hoitakse radioligandi kontsentratsioon konstantsena (ligikaudu 1 nM) ja varieeritakse märgistamata ligandi kontsentratsiooni. Katsete tulemusena saadakse märgistamata ühendi inhibeerimiskonstandi (K_i) väärtus, mille kaudu on võimalik hinnata märgistamata ühendi afiinsust vastavale retseptorile.

Katsetes kasutati taaskord RIB katsepuhvrit, millele on lisatud 1 mM DTT. Katsete tegemiseks kasutati U-põhjalisi katseplaate ning määramised teostati triplikaatides. Kõik katsed teostati vähemalt kahes korduses. Esialgu lisati plaadile 50 μ l radioligandi. Peale radioligandi pipeteerimist katseplaatidele lisati 50 μ l märgistamata ligandi erinevaid seerialahjendusi. Kõikide lahuste valmistamine toimus jääs. Testitavatest ligandidest tehti 8-kordsed seerialahjendused, mille käigus saadi seitse erinevat märgistamata ligandi kontsentratsiooni. Seejärel lisati 150 μ l rakumembraane või bakuloviirust (eelnevalt määratud kindlaks lahjendusega). Plaatidele kantud lahused pandi inkubeerima loksutile. Plaatide inkubeeriti 90 minutit 25 °C juures (loksutamiseks 400 rpm). Järgmisena eraldati vaba radioligand filtreerides jääkülma puhvriga, peale mida toimus filtrite kuivatamine mikrolaineahjus 2 minuti vältel. Klaaskiudfiltrisse sulatati kuumpressi abil MeltiLex B ja seejärel asetati filtrid stsintillatsiooniloendurisse.

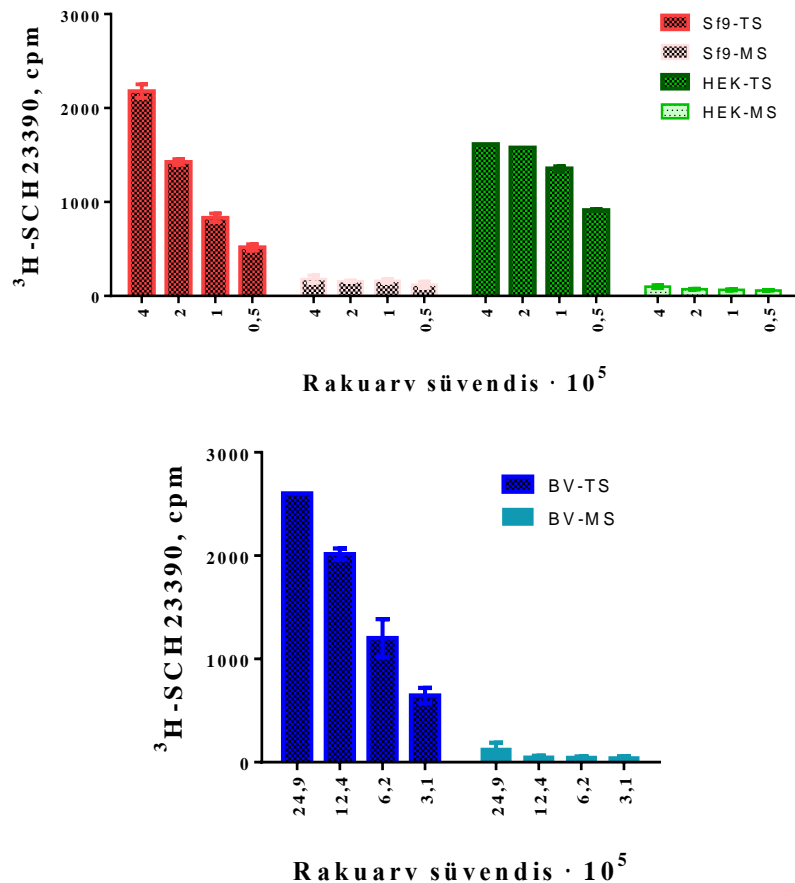
Katse lõpus määrati kindlaks katses kasutatud vaba radioligandi kontsentratsioon, mida rakendati hiljem inhibeerimiskonstantide arvutamisel.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Retseptorpreparaadi testimine

Radioligandi sidumiskatsete läbiviimiseks kasutati D₁ retseptori allikana bakuloviiruseid ja kahte erinevat membraanpreparaati (HEK293 ja Sf9). Alati peale uue retseptorpreparaadi valmistamist peaks teostama retseptorite olemasolu hindamise. Ühtlasi peaks selgitama välja küllastussidumise ja väljatõrjumiskatsete jaoks sobiliku retseptorpreparaadi koguse. Edasiste katsetes jaoks kõige sobilikum maksimaalne signaal on 800-1200 cpm-i ehk siis selles vahemikus peaks olema radioligandi totaalne seostumine.

Sobiva retseptorpreparaadi koguse testimiseks tehti viirustest ja rakumembraanidest erinevad lahjendused. Lahjendused teostati nii, et lõpplahuse kontsentratsioon oleks $5,0 \cdot 10^4$ - $4,0 \cdot 10^5$ rakku/süvendis rakumembraanide puhul ja $3,1 \cdot 10^5$ - $24,9 \cdot 10^5$ rakku/süvendis bakuloviiruste jaoks. Katse tulemusena leiti erinevate retseptorpreparaatide lahjendused, mille juures totaalne seostumine on ligikaudu 1000 cpm-i (Joonis 5).



Joonis 5. Retseptorpreparaatide testimise tulemused. Graafikul on välja toodud totaalse seostumise (TS) ja mittespetsiifilise sidumise (MS) keskmised väärtused \pm SD. Graafikult on näha, millise retseptorpreparaadi lahjenduse juures on totaalne seostumine ligikaudu 1000 cpm-i. Lisaks on võimalik näha mittespetsiifilise seostumise osakaalu.

Sf9 rakkude puhul on totaalne seostumine ligikaudu 1000 cpmi siis kui kasutatakse rakuarvu 150 000 rakku/punktis (totaalne seostumine = 1070 cpm-i). Sellise rakuarvu saamiseks oli vaja teha 10-kordne lahjendus algstockist. HEK rakkude arv peaks olema ligikaudu 50000 rakku/punktis (totaalne seostumine = 914 cpm-i) ehk siis 30-kordne lahjendus algstockist. Bakuloviiruste puhul peaks edasistes katsetes kasutama rakuarvu 580000 rakku/punktis (totaalne seostumine = 1125 cpm-i) mis tähendab 25-kordset lahjendust algstockist.

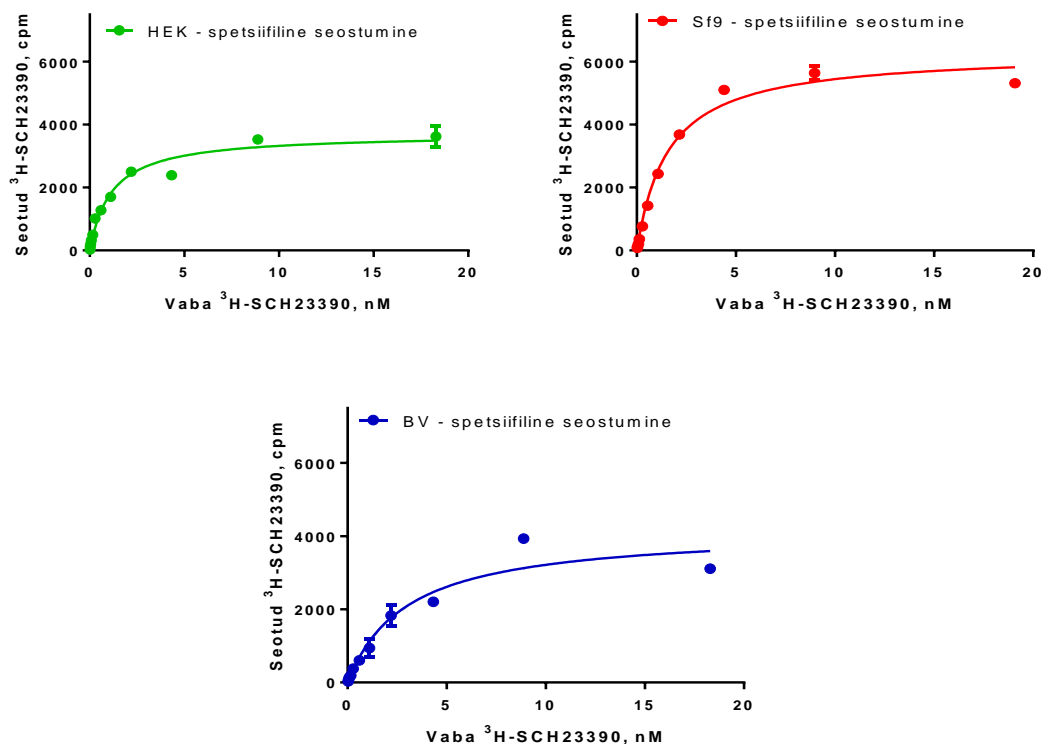
Samuti määrati iga retseptorpreparaadi kohta mittespetsiifiline seostumine. Sf9 puhul on mittespetsiifika rakuarvu 150 000 rakku/punktis juures 117 cpm-i (ehk 11% totaalsest seostumisest). Kui HEK rakkude jaoks kasutada lahjendust 50000 rakku/punktis siis on mittespetsiifiline seostumine 32 cpm-i (3% totaalsest seostumisest). Bakuloviiruste puhul on mittespetsiifika lahjendusel 580000 rakku/punktis 45 cpm-i (moodustab totaalsest

seostumisest 4%). Tulemustest on näha, et Sf9 rakumembraanide puhul on mittespetsiifiline seostumine kõige kõrgem. Bakuloviiruste ning HEK rakkude puhul on mittespetsiifilise seostumise osakaal ligikaudu sama madal (3-4%). Mida madalam on mittespetsiifiline seostumine võrreldes totaalse seostumisega, seda suurem on spetsiifiline seostumine. Madal mittespetsiifiline seostumine näitab seda, et kõik retseptorpreparaadid sobivad hästi radioligandi sidumiskatsete teostamiseks.

3.2 Küllastussidumine retseptorpreparaatidele

Küllastussidumise käigus vaadatakse radioligandi seostumist erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel. Selle katse tulemusena leiti radioligandi dissotsiatsiooni konstant (K_D), mida saab kasutada selleks, et arvutada erinevate märgistamata ühendite inhibeerimiskonstandid väljatõrjumiskatsetes. K_D iseloomustab ka radioligandi afiinsust D_1 retseptorile. Selles osas saadud andmete põhjal leitakse kõikide retseptorpreparaatide jaoks B_{max} , mis iseloomustab retseptorite hulka valgupreparaadis. Nii K_D kui ka B_{max} iseloomustavad erinevaid retseptorpreparaate, mistõttu nende parameetrite abil on võimalik erinevaid preparaate omavahel võrrelda.

Joonis 6 näitab radioligandi spetsiifilist seostumist D_1 retseptorile HEK ja Sf9 rakumembraanides ning bakuloviirustes. Joonisel on näha seostunud radioligandi hulk erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel. Spetsiifilise seostumise saamiseks lahutati totaalsest seostumisest mittespetsiifiline seostumine.



Joonis 6. Radioligandi spetsiifiline seostumine D₁ retseptorile HEK ja Sf9 rakumembraanides ning bakuloviirustes. Graafikutelt on näha, et katseteks kindlaks määratud retseptorpreparaatide lahjenduste korral on suurim signaal (cpm-des) Sf9 rakkudel. Bakuloviirustel ja HEK rakkudel on signaaliaken katses kasutatud lahjenduste korral sarnase suurusega.

Alltoodud tabelis on välja toodud küllastussidumise katsete tulemused (Tabel 1). Tabelis on selgelt näha, et radioligandi dissotsiatsioonikonstandid on rakumembraanides üksteisele suhteliselt sarnased. Sf9 rakkudes on radioligandi dissotsiatsioonikonstant $0,86 \pm 0,23$ nM ja HEK rakkudes on see $0,55 \pm 0,13$ nM (ligikaudu 1,6 kordne erinevus). HEK rakkudes leitud radioligandi K_D on sarnane ka Reet Reinart-Okugbeni poolt HEK rakkudes määratud K_D -ga (0,5 nM) [22]. Bakuloviirustes ekspresseeritud D₁ retseptori dissotsiatsioonikonstant $1,42 \pm 0,31$ nM on suurem, kui teistel retseptorpreparaatidel. Sf9 rakkudega võrreldes on bakuloviirustest määratud K_D ligikaudu 1,6 korda suurem ning HEK rakkudega võrreldes ligikaudu 2,6 korda suurem. Seda on võimalik näha ka jooniselt 6, kus bakuloviiruste puhul on kõvera tõus laugem kui Sf9 ning HEK rakkude puhul.

Tabel 1. Erinevaid retseptorpreparaate iseloomistavad suurused B_{max} ning K_D . Tabelis on väljatoodud Sf9 ja HEK rakkude ning bakuloviiruste B_{max} väärtused ning radioligandi K_D erinevates retseptorpreparaatides.

	Sf9 D1R	HEK D1R	Bakuloviirus D1R
K_D (nM) \pm SEM:	0,86 \pm 0,23	0,55 \pm 0,13	1,42 \pm 0,31
B_{max} (fmol/mln rakku) \pm SEM:	290,5 \pm 38,0	430,8 \pm 60,7	107,5 \pm 11,5

Hinnangu retseptorite sidumiskohtade hulgast annab B_{max} väärtus. Radioligandi sidumiskohtade hulk Sf9 rakkudes on 290,5 \pm 38,0 fmol/mln raku kohta, HEK rakkudes 430,8 \pm 60,7 fmol/mln rakku ja bakuloviirustes 107,5 \pm 11,5 fmol/mln rakku. Kõige suurem B_{max} väärtus on HEK rakkudes toodetud retseptorpreparaadil. Võrreldes Sf9 rakkudega on see ligikaudu 1,5 korda suurem. Võrreldes HEK rakke bakuloviirustega on erinevus ligikaudu 4 korda.

3.3 Väljatõrjumiskatsed

Retseptorpreparaatide iseloomustamiseks D_1 retseptori näitel testiti erinevaid dopamiinergilisi ligande. Erinevate preparaate kasutamise valideerimiseks ja võrdlemiseks on mõistlik kasutada laialdaselt kasutusel olevaid D_1 retseptori ligande. Nende ühendite afiinsused D_1 retseptorile on eelnevalt kirjanduses iseloomustatud. Nii on võimalik meie tulemusi võrrelda ka teistes laborites saadud tulemustega. Märgistamata ligandi afiinsuse iseloomustamiseks D_1 retseptorile kasutatakse inhibeerimiskonstandi väärtust. Selle leidmiseks on vaja kasutada Cheng-Prusoffi võrrandit, mille eelduseks on see, et on saavutatud tasakaal seotud ja vaba radioligandi vahel.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(L)}{K_D}} \quad (1)$$

K_i – inhibeerimiskonstant;

IC_{50} – ligandi kontsentratsioon, mis blokeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses;

(L) – radioligandi kontsentratsioon, mida kasutati katsetes;

K_D – radioligandi dissotsiatsioonikonstant;

Selleks, et kasutada seda võrrandit on vaja teada radioligandi kontsentratsiooni (määratakse igas katses). Radioligandi dissotsiatsioonikonstandi saab välja arvutada küllastussidumise katsest. IC_{50} saadakse väljatõrjumiskõveralt, ning see iseloomustab inhibeerimist 50% ulatuses. Väljatõrjumis katsetes kasutati erinevaid ligande (agoniste ja antagonistide) ja kõikide jaoks arvutati eraldi $\log IC_{50}$ ning K_i väärtused.

Tabel 2. Väljatõrjumiskatsetes saadud kolme erineva retseptorpreparaadi $\log IC_{50} \pm S.E.M$ väärtused erinevate agonistide ja antagonistidega.

	$\log IC_{50} \pm S.E.M$		
	Sf9 D1R	HEK D1R	Bakulo D1R
APO	-6,19 ± 0,15	-5,88 ± 0,19	-5,96 ± 0,11
DA	-4,76 ± 0,19	-4,09 ± 0,09	-4,99 ± 0,05
LE300	-8,08 ± 0,03	-7,74 ± 0,46	-8,22 ± 0,15
MNPA	-5,60 ± 0,06	-5,84 ± 0,52	-5,31 ± 0,06
Butaklamool	-9,00 ± 0,49	-8,70 ± 0,14	-8,78 ± 0,31
SKF81297	-6,81 ± 0,08	-7,60 ± 0,50	-6,93 ± 0,07
SCH23390	-8,90 ± 0,62	-8,72 ± 0,17	-8,75 ± 0,12
Spiperone	-6,15 ± 0,11	-5,76 ± 0,03	-6,29 ± 0,02
A68930	-7,86 ± 0,25	-7,16 ± 0,18	-7,59 ± 0,19

Tabelis 2 on näha, et $\log IC_{50}$ väärtused on kõigis kolmes preparaadis väga sarnased. Sarnased IC_{50} väärtused näitavad seda, et väljatõrjumiskõveralt leitud märgistamata ligandi kontsentratsioon, mille juures radioligandi seostumine on 50% ulatuses inhibeeritud, on kõigis retseptorpreparaadis sarnane. Kõige sarnasemad tulemused andis membraanpreparaatides ja viirustes antagonist SCH23390, kus Sf9 $\log IC_{50} = -8,90 \pm 0,62$, HEK $\log IC_{50} = -8,72 \pm 0,17$ ning bakuloviirustel $\log IC_{50} = -8,75 \pm 0,12$. Kõige suuremad erinevused esinevad dopamiini puhul. Sf9 $\log IC_{50} = -4,76 \pm 0,19$, HEK $\log IC_{50} = -4,09 \pm 0,09$ ja bakuloviirustel $\log IC_{50} = -4,99 \pm 0,05$.

HEK rakkudes on suuremad $\log IC_{50}$ väärtused (madalamad afiinsused), kuid on ka üks erand. Agonist MNPA on teistes retseptorpreparaatides pisut madalama afiinsusega, kui HEK rakkudes.

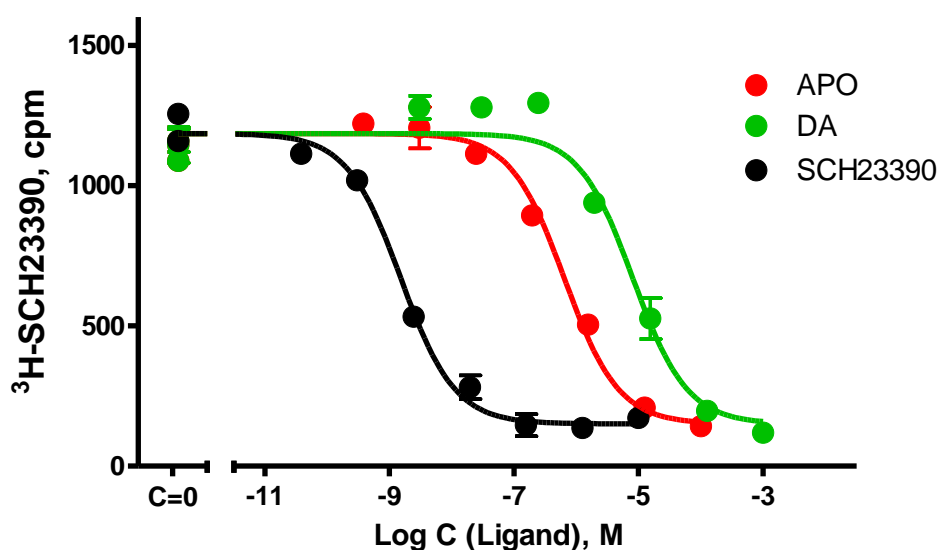
Tabel 3. Väljatõrjumiskatsetes saadud $K_i \pm S.E.M$ väärtused erinevate testainetega. Inhibeerimiskonstant iseloomustab nii agonistide kui ka antagonistide võimet inhibeerida radioligandi sidumist retseptorile ja annab informatsiooni erinevate ligandide afiinsuse kohta.

	$K_i \pm S.E.M$		
	Sf9 D1R	HEK D1R	Bakulo D1R
APO	360 ± 120	720 ± 220	780 ± 190
DA	9900 ± 3900	44000 ± 15000	7000 ± 800
LE300	4,4 ± 0,3	14 ± 9,9	4,4 ± 1,4
MNPA	1200 ± 160	1200 ± 980	3200 ± 300
Butaklamool	0,86 ± 0,71	0,91 ± 0,34	1,4 ± 0,87
SKF81297	76 ± 8,9	19 ± 16	77 ± 9,5
SCH23390	1,3 ± 1,1	0,85 ± 0,28	1,2 ± 0,27
Spiperone	370 ± 95	760 ± 53	330 ± 17
A68930	8,1 ± 4,2	33 ± 13	17 ± 7,7

Apomomorfiini afiinsus D_1 retseptorile on Sf9 rakumembraanides kõige parem $K_i = 360 \pm 120$ nM, kuid omavahel sarnasemad tulemused andsid HEK rakud ($K_i = 720 \pm 220$ nM) ja BV-d ($K_i = 780 \pm 190$ nM). Kirjanduses leiduv APO K_i väärtus ($K_i = 400$ nM) on sarnasem Sf9 rakkudes saadud tulemusega. Endogeense agonisti dopamiini (DA) inhibeerimiskonstandi puhul võib öelda, et HEK rakkudes saadud K_i (44000 ± 15000 nM) on mitmeid kordi suurem kui bakuloviirustes ($K_i = 7000 \pm 800$ nM) ja Sf9 ($K_i = 9900 \pm 3900$ nM) rakumembraanides saadud tulemused. Antud töös leitud DA K_i väärtusest on sarnasem kirjanduses leiduvate tulemustega ($K_i = 2500$ nM) bakuloviirustes saadud tulemused. [23]

Kõige sarnasemaid K_i tulemusi kõigi kolme retseptorpreparaadi kohta andis SCH23390 ühend. Sf9 rakkudes on K_i väärtus $1,3 \pm 1,1$ nM, HEK rakkudes $0,85 \pm 0,28$ nM ja bakuloviirustes $1,2 \pm 0,27$ nM ehk ligandi SCH23390 afiinsus on väga sarnane nii membraan- kui ka viiruspreparaadis. SCH23390 märgistamata ligand on kõige parema afiinsusega D_1 retseptorile ja selle K_i väärtus HEK rakkudes on samas suurus järgus kirjandusest leitud väärtusega ($K_i = 0,32$ nM). Sarnasemid inhibeerimiskonstantide tulemusi andis ka butaklamool, mille puhul Sf9 rakkude $K_i = 0,86 \pm 0,71$, HEK rakkudes $K_i = 0,91 \pm 0,34$ nM ning BV-s $K_i = 1,4 \pm 0,87$ nM. Need väärtused erinevad üle kahe korra kirjanduses antud väärtusega ($K_i = 3,2$ nM) [23]. Märgistamata ühenditest andsid antagonistid kolmes retseptorpreparaadis sarnasemaid tulemusi, kui agonistid. Üldjoontes langevad ühendite afiinsused kokku kirjandusest leitud andmetega.

Joonis 7 illustreerib seda, et bakuloviiruste kasutamisel on võimalik saada korralik värjatõrjumiskõver. See omakorda tähendab, et bakuloviiruseid saab kasutada radioaktiivsel baseeraval meetodil retseptorpreparaadina. Eelpool välja toodud tulemustest on näha, et bakuloviirustes leitud sidumiskonstandid on sarnased tulemusi võrreldes teistes retseptorpreparaatides saadud tulemustega. Joonisel 6 on näha, et apomorfiini ja dopamiini afiinsused (suuremad IC_{50} väärtused) on D_1 retseptorile tunduvalt madalamad, kui antagonistil SCH23390.



Joonis 7. Radioligandi väljatõrjumine märgistamata ligandidega APO, DA või SCH23390 bakuloviiruse preparaadis. Kõvera ülemine osa iseloomustab totaalset seostumist ehk siis seda, et märgistamata ligandi seal pole või selle kontsentratsioon on liiga väike, mistõttu märgistamata ligand ei suuda radioligandiga konkureerida. Alumine osa näitab mittespetsiifilist seostumist, kus on aga olukord vastupidine ja märgistamata ligand suudab radioligandi välja tõrjuda. Antagonist SCH23390 on kõrgema afiinsusega (väiksem IC_{50} väärtus) kui agonistid APO ja DA.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös võrreldi kolmes erinevas ekspresioonisüsteemis toodetud dopamiini D_1 retseptorit. Eesmärgiks oli selgitada välja, kas kõik kolm retseptorpreparaati sobivad D_1 retseptori ekspresseerimiseks ja uurimiseks. Võrdluste tegemiseks kasutati radioaktiivsusel baseeruvat meetodit, mille käigus leiti mitmesuguseid retseptori ja ligandi vahelisi interaktsioone kirjeldavaid suursi (radioligandi tasakaalukonstant, retseptorpreparaatide maksimaalne sidumiskohtade hulk ja märgistamata ligandide inhibeerimiskonstandid). Retseptorpreparaatideks kasutati bakuloviiruseid, Sf9 putukarakke ja HEK imetajarakke. Antud töös püüti esmakordselt rakendada bakuloviiruseid retseptorite allikana radioligandi sidumiskatsete läbiviimiseks.

Teoreetilises osas anti ülevaade G-valguga seotud retseptoritest, retseptori ja ligandi vahelistest interaktsioonidest ning dopamiini retseptoritest. Pikemalt peatuti dopamiini retseptori D_1 alatüübil ning selle ligandidel. Samuti käsitleti ka bakuloviirustel ja Sf9 rakkudel põhinevat ekspresioonisüsteemi. Eksperimentaalses osas kirjeldati retseptorite ekspresseerimist erinevates retseptorpreparaatides ning ka nende testimist. Samuti anti ka ülevaade erinevate katsete läbiviimisest.

Käesoleva töö tulemused näitasid, et bakuloviiruseid on võimalik rakendada D_1 retseptori uurimiseks radioligandi sidumiskatsetes. Märgistamata ühendeid uurides nähti, et erinevates retseptorpreparaatides leitud inhibeerimiskonstandid on sarnased.

Käesoleva töö tulemused on plaanis publitseerida ühe osana teadusartiklist.

TÄNUAVALDUSED

Täna kõiki, kes olid mulle selle töö valmistamisel abiks. Eriti suur tänu minu juhendajale Anni Allikaltile, kes oli alati abivalmis ja rõõmsameelne kogu meie koostöö vältel. Samuti tahaksin tänada Ago Rinkeid, kes aitas alati, kui mul tekkis mingisuguseid küsimusi. Suur tänu ka perele ja sõpradele, kellel oli usku minusse, et saan selle lõputöö kirjutamisega ilusasti hakkama. Aitäh Teile kõigile veelkord!

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Kilk, A. Signaali ülekanne ekaüootses rakus; http://www.ebc.ee/loengud/Ann_Kilk/signaali_ylekanne_rakus/signaali_ylekanne_eukaryootses_rakus.2007.pdf viimati alla laetud 26.05.2015
- [2] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005) Biosignaling, In: *Principles of Biochemistry*. W.H.Freeman and Company., New York
- [3] Siegel, G. J., Alberts, R. W., Brady, S. T., Price D. L. (2012) Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology. 8th edition. Elsevier Academic Press.
- [4] Zhang, R., Xie, X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 372-384.
- [5] Akermoun, M., Koglin, M., Zvalova-Iooss, D., Folschweiller, N., Dowell, S. J., Gearing, Katy. L. (2005) Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification*, 44, 65–74.
- [6] Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249–257.
- [7] A. Wise, S.C. Jupe, S. Rees, The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 43–46.
- [8] A. Christopoulos, Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1(2002) 198–210.
- [9] Neubig, R. R., Spending, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 55:597-606.
- [10] De Lean A., Stadel J. M., Lefkowitz R. J., (1980) A Ternary Complex Model Explains the Agonist-specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-coupled β -Adrenergic Receptor; *Journal Biol Chem*, 255(15), pp. 7108–7117.

- [11] Parkel, S. Ligand binding to 5-HT_{1A} receptors and its regulation by Mg²⁺ and Mn²⁺. (2009).
- [12] Hulme, E. C., Trevethick, M. A. (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British Journal of Pharmacology*. 161(6), 1219-1237.
- [13] Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R. (2011) The psychology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 1, 182-217.
- [14] Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*. 1, 189-225.
- [15] Zhang, J., Xiong, B., Zhen, X., Zhang, A. (2008) Dopamine D1 Receptor Ligands: Where Are We Now and Where and Where Are We Going. *Medicinal research Reviews*. 29(2), 272-275.
- [16] Kost, A. T., Condreay, P. J., Jarvis, L. D., (2005) baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23, 567 – 575.
- [17] Knight, P. J. K., Pfeifer, A. T., Grigliatti, A. T., (2003) et al., A functional assay for G-protein-coupled receptors using stably transformed insect tissue culture cell lines, *Analytical Biochemistry*, 320, 88-103.
- [18] Schneider, H. E. (2010) Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 128, 387-418.
- [19] Kost, A. T., Condreay P. J., Jarvis, L. D., (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 23, 5, 567-575
- [20] Mazina, O., Tõntson, L., Veskina, S., Kopanchuk, S., Rinken, A. (2013) Application of Baculovirus Technology for Studies of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Springer Proceedings in Physics*, 146, 339-348.
- [21] Hu, Y. C. (2008) Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr. Gene Ther.* 8, 1, 54-65.

[22] Reet Reinart-Okugbeni, Vonk, A., Uustare, A., Gyulai, Z., Sipos, A., Rincken, A. (2013) 1-substituted apomorphines as potent dopamine agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21, 14, 4143-4150.

[23] Tiberi, M., Caron, M. G. (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 269, 27925-27931.

Characterization of different receptor preparations - example of D₁ receptor

Aivar Soome

SUMMARY

In current thesis Dopamine D₁-receptors produced in three different expression systems were compared. The aim was to find out whether all three receptor sources are suitable for the expression of the D₁-receptor. Radioactivity-based method was used to compare these three expression systems. In this work a variety of different values, which describe receptor-ligand interactions were found (for example radioligand equilibrium dissociation constant, maximum number of binding sites and inhibition constants of different unlabelled ligands). Baculoviruses, Sf9 insect cells and HEK mammalian cells were used as receptor sources. For the first time baculoviruses were applied to carry out different radioligand binding experiments. An overview of receptors, receptor-ligand interactions and dopamine receptors was presented in the theoretical part. Dopamine receptor's subtype D₁ and its ligands were discussed at greater length. Expression system based on baculoviruses and Sf9-cells was also mentioned. Expression of receptors in different receptor preparations was described in experimental part, as well as testing of these receptor sources. Also, an overview of various binding experiments was given.

The results of this study showed that despite their small dimensions, baculoviruses could be applied to explore the D₁ receptor in radioligand binding assays. Experiments with unlabelled compounds showed that Sf9 and HEK cells as well as baculoviruses give similar results - inhibition constant values were comparable. Affinities obtained with three different receptor sources were compared with the values obtained from literature. Most of the values were in good agreement.

The results of this study will be published as a part of a scientific article.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina,

Aivar Soome

(autori nimi)

(sünnikuupäev 03.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Erinevate retseptorpreparaatide iseloomustamine dopamiini D1 retseptori näitel,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on

Anni Allikalt

(juhendaja nimi)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 03.06.2018 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **27.05.2015**