



AGH

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Praca doktorska

Katarzyna Grymek

Badania *in-vitro* wpływu mutacji cichych na oligomeryzację receptorów błonowych z zastosowaniem technik fluorescencyjnych

Promotor: prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska

Instytut Farmakologii PAN, Kraków

Kraków, 2009

Składam serdeczne podziękowania

Prof. dr hab. Marcie Dzedzickiej-Wasylewskiej

za ogromną wiedzę i pasję do pracy, za aurę, którą rozciąga
w swoim otoczeniu oraz za wiarę w ludzi, która dodaje siły
w najtrudniejszych momentach.

Dziękuję również

dr Agnieszce Polit za cenne uwagi merytoryczne,

Pracownikom Zakładu Farmakologii Instytutu Farmakologii PAN
za prawdziwie naukowe rozmowy i dzielenie trudów pracy
laboratoryjnej

oraz Pracownikom Zakładu Biochemii Fizycznej WBBiB UJ
za pomoc i stworzenie przyjaznej atmosfery w pracy.

Dziękuję ***Moim Rodzicom i Siostrze,***

bez nich nie byłoby mnie tutaj.

Niniejsza praca została wykonana w Pracowni Farmakologii Biochemicznej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie oraz w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie.

Badania były prowadzone w ramach projektu badawczego finansowanego przez MNiSW, nr 2P05A 071 29, pt.:

Molekularne mechanizmy działania neuroleptyków na warianty genetyczne ludzkich receptorów dopaminowych D1 i D2 transfekowanych do komórek HEK 293.

oraz zostały częściowo sfinansowane z funduszy projektu:

“INNOGRANT – program wspierania innowacyjnej działalności doktorantów”

finansowanego ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego (umowa nr 13, działanie 2.6 ZPORR).



Grzegorzowi, za to że nigdy nie zwątpił...

PROLEGOMENA

Zaczynając przygodę z pomiarami fluorescencyjnymi sięgamy do lektury podstaw spektroskopii fluorescencji napisanej i rozszerzanej przez Lakowicza (Lakowicz 2006), która niewątpliwie należy do kanonu „lektur” obowiązkowych. Kiedy następnie dochodzimy do momentu, w którym przyzwoite opisanie uzyskanych wyników wymaga poszerzenia wiedzy własnej i wprowadzenia czytelnika w opowiadaną historię to ponownie zasiadamy do owej lektury. Wówczas następuje trudny moment wyboru tych zagadnień, które są nie tylko niezbędne, ale równocześnie ciekawe. To prawie tysiącstronicowe opracowanie szybko doprowadza nas do wniosku, że nasza praca musi pokonać barierę, która wydaje się niemożliwa do pokonania – czy to limitu słów w przypadku publikacji, czy też limitu zdrowego rozsądku w przypadku niniejszej pracy.

Przystępując do kolejnego ponad tysiącstronicowego opracowania, jakim jest podręcznik mikroskopii konfokalnej, jesteśmy już całkowicie pozbawieni złudzeń – czeka nas twardy orzech do zgryzienia. Niemożliwym jest poruszenie absolutnie wszystkich aspektów prezentowanego zagadnienia, które jest nie tylko skomplikowane w samej swej naturze, ale również w odniesieniu do innych obszernych zagadnień biologicznych (natura białek fluorescencyjnych, metody inżynierii genetycznej), biochemicznych (analiza saturacyjna wiązania receptor-ligand), nie wspominając o skomplikowanej istocie zagadnień z zakresu neuropsychiatrii, czy neurofarmakologii receptorów dopaminowych. Autorka podjęła jednak próbę zarysowania poruszanych aspektów z nadzieją zwięzłego i przystępnego przedstawienia tych zagadnień.

Zastosowane metody do pomiarów zjawiska FRET są wysoce precyzyjne, trzeba jednak być świadomym ich słabszych stron i eliminować je poprzez odpowiedni dobór warunków eksperymentu. W wielu przypadkach mikroskopia czasów życia fluorescencji, jak i mikroskopia konfokalna

uzupełniają się i przy uważnym zaplanowaniu doświadczeń potwierdzają wyniki uzyskane za pomocą każdej z tych metod z osobna. Należy zaznaczyć, że opisane badania mogą być prowadzone w układach modelowych in-vitro, ale często stanowią uzupełnienie, a niejednokrotnie i wyjaśnienie wyników uzyskanych innymi technikami.

Badania oligomeryzacji receptorów prowadzone in-vitro pozwalają na ocenę wpływu mutacji punktowych w obrębie badanych receptorów. Mutacje te można wprowadzać w celu identyfikacji reszt aminokwasowych biorących udział w samym procesie oligomeryzacji, albo też wprowadzać zmiany w tych miejscach, które znane są jako tzw. polimorfizmy receptorów (tym samym można określić osobnicze różnice w funkcjonowaniu receptorów). Ponieważ postuluje się korelację pewnych polimorfizmów ze zwiększoną podatnością na występowanie danego schorzenia lub odmienną wrażliwością na terapię, dlatego też wydaje się, że badanie wpływu polimorfizmów na oligomeryzację receptorów może pomóc w zrozumieniu mechanizmów tych zjawisk. W efekcie może przyczynić się do opracowania nowoczesnych, bardziej specyficznych czynników terapeutycznych, które będą działać poprzez stymulację bądź hamowanie powstawania heterooligomerów w obrębie określonych receptorów błonowych.

*Katarzyna Grymek
Kraków, 15. Lipca 2009 roku*

SPIS TREŚCI

PROLEGOMENA.....	5
WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WPROWADZENIE.....	13
1.1 Zjawisko fluorescencji.....	13
1.1.1 Diagram Jabłońskiego.....	14
1.1.2 Właściwości fluorescencji.....	14
1.2 Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji.....	16
1.3 Pomiary fluorescencji	20
1.4 Pomiar zaniku fluorescencji w czasie.....	21
1.4.1 Metoda skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów	21
1.4.2 Zastosowania pomiaru czasów życia fluorescencji.....	23
1.4.3 Analiza zaników fluorescencji.....	24
1.5 Białka fluorescencyjne w badaniach biologicznych	25
1.6 Sygnalizacja między komórkami	28
1.6.1 Receptory	30
1.6.2 Receptory związane z białkami G.....	31
1.6.3 Struktura receptorów sprzężonych z białkami G	31
1.6.4 Przekazywanie sygnału przez GPCR.....	33
1.7 Transmisja dopaminergiczna.....	36
1.7.1 Dopamina w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego..	36
1.7.2 Receptory dopaminowe.....	37
1.8 Oligomeryzacja receptorów sprzężonych z białkami G.....	41
1.8.1 Metody stosowane w badaniach oligomeryzacji GPCRs.....	45
2. CEL PRACY.....	47
3. MATERIAŁY	49
3.1 Plazmidy	49
3.2 Hodowla bakteryjna.....	50
3.2.1 Bufory i roztwory do hodowli bakteryjnej.....	50
3.2.2 Antybiotyki stosowane w hodowlach bakteryjnych	50
3.3 Hodowla komórkowa.....	51
3.3.1 Eukariotyczna linia komórkowa.....	51
3.3.2 Bufory do hodowli i transfekcji komórek HEK293.....	52
3.3.3 Bufory i roztwory do utrwalania preparatów i pomiarów fluorescencji.....	52

3.4	Bufory i roztwory do elektroforezy żelowej DNA	53
3.5	Mutageneza	54
3.5.1	Startery	54
3.5.2	Zestaw do wprowadzenia mutacji.....	54
3.5.3	Reakcje enzymatyczne	55
3.5.4	Zestawy do izolacji i oczyszczania DNA.....	55
3.6	Analiza saturacyjna.....	56
3.6.1	Bufory do analizy saturacyjnej	56
3.6.2	Radioligandy.....	56
3.6.3	Zestaw do oznaczania stężenia białka	57
3.7	Standardy fluorescencyjne.....	57
3.8	Inne związki	57
3.9	Aparatura.....	57
3.10	Oprogramowanie	59
4.	METODY.....	60
4.1	Metody inżynierii molekularnej.....	60
4.1.1	Zaprojektowanie starterów	60
4.1.2	Wprowadzenie mutacji punktowych – <i>Quick Change</i>	61
4.1.3	Wprowadzenie miejsc cięcia dla enzymów <i>NheI</i> i <i>XhoI</i>	63
4.1.4	Elektroforeza produktów PCR i izolacja DNA z żelu.....	64
4.1.5	Trawienie enzymami restrykcyjnymi <i>NheI</i> i <i>XhoI</i>	64
4.1.6	Ligacja.....	65
4.1.7	Analiza kolonii – metoda <i>Toothpick</i>	66
4.2	Hodowla komórek bakteryjnych.....	68
4.2.1	Wprowadzenie komórek w stan kompetencji	68
4.2.2	Transformacja komórek kompetentnych <i>DH5α</i>	68
4.2.3	Namnażanie plazmidów w płynnej hodowli komórek <i>DH5α</i>	69
4.2.4	Izolacja DNA plazmidowego	69
4.2.5	Pomiar stężenia plazmidowego DNA	69
4.2.6	Elektroforeza DNA	70
4.2.7	Sekwencjonowanie DNA	70
4.3	Hodowla komórek eukariotycznych.....	71
4.3.1	Hodowla linii komórkowej <i>HEK293</i>	71
4.3.2	Rozsiewanie komórek <i>HEK293</i>	71
4.3.3	Transfekcja komórek <i>HEK293</i>	71
4.4	Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand.....	72
4.4.1	Przygotowanie materiału biologicznego do analizy wiązania.....	73
4.4.2	Oznaczenie stężenia białka – metoda Lowry’ego.....	75
4.4.3	Przygotowanie radioligandów.....	75

4.4.4	Oznaczenie wiązania niespecyficznego	77
4.4.5	Oznaczenie parametrów wiązania receptor-ligand	77
4.4.6	Analiza wyników	78
4.4.7	Statystyczna analiza wyników	79
4.5	Metody fluorescencyjne	80
4.5.1	Przygotowanie preparatów	80
4.5.2	Pomiar zaniku fluorescencji w czasie	80
4.5.3	Analiza średnich czasów życia fluorescencji	82
4.5.4	Analiza składowych modelu multieksponencjalnego	84
4.5.5	Określenie lokalizacji na mikroskopie konfokalnym	86
5.	WYNIKI	88
5.1	Metody inżynierii molekularnej	88
5.1.1	Wprowadzenie mutacji punktowych w genie receptora dopaminowego DRD1	88
5.1.2	Wprowadzenie genów zmodyfikowanego receptora dopaminowego do plazmidu pEYFP-N1 (pECFP-N1)	89
5.1.3	Analiza kolonii bakteryjnych – metoda <i>Toothpick</i>	92
5.2	Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand	97
5.2.1	Pomiar parametrów wiązania [³ H]SCH23390 oraz [³ H]spiperonu w tkance mózgowej szczura (prążkowie)	97
5.2.2	Pomiar parametrów wiązania [³ H]SCH23390 do receptora dopaminowego D ₁ oraz wariantów D ₁ ^{G198A} i D ₁ ^{G1263A}	98
5.2.3	Pomiar parametrów wiązania [³ H]spiperonu do receptora dopaminowego D ₂	101
5.2.4	Pomiar parametrów wiązania [³ H]SCH23390 oraz [³ H]spiperonu w układzie kotransfekowanym	101
5.2.5	Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand – wpływ dołączonego białka fluorescencyjnego	103
5.2.6	Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand w układzie kotransfekowanym – wpływ dołączonego białka fluorescencyjnego	104
5.3	Pomiar czasów życia fluorescencji	108
5.3.1	Standardy fluorescencyjne	108
5.3.2	Czasy życia fluorescencji – heterodimeryzacja D ₁ -D ₂	110
5.3.3	Analiza składowych czasów życia fluorescencji	113
5.4	Określenie lokalizacji receptorów dopaminowych przy użyciu mikroskopii konfokalnej	115
6.	DYSKUSJA	119
6.1	Wybór obiektu badań	119
6.1.1	Czy efekty wywołane cichymi mutacjami powinny być pomijane?	120

6.1.2	Wpływ mutacji cichych na strukturę mRNA i spowolnienie rybosomów	121
6.2	Metody fluorescencyjne w biologii.....	126
6.2.1	Wybór pary fluoroforów do pomiarów FRET	127
6.3	Pomiar zaniku fluorescencji w czasie – wyznaczenie wydajności FRET.....	128
6.3.1	Standaryzacja pomiarów i analiza średnich czasów życia fluorescencji.....	130
6.3.2	Analiza składowych zaniku fluorescencji – określenie wydajności FRET	132
6.4	Mikroskopia konfokalna	135
6.4.1	Analiza kolokalizacji.....	135
6.5	Oddziaływania molekularne odpowiedzialne za tworzenie heterodimerów	137
7.	WNIOSKI KOŃCOWE	140
KODA.....		142
APPENDIX I		144
APPENDIX II.		146
APPENDIX III		148
APPENDIX IV		150
APPENDIX V		152
BIBLIOGRAFIA		153

WYKAZ SKRÓTÓW

5HT	(ang. <i>5-hydroxytryptamine</i>) – serotonina (5-hydroksytryptamina)
A	(ang. <i>adenine</i>) – adenina (6-aminopuryna)
AC	(ang. <i>Adenylate Cyclase</i>) – cyklaza adenyłowa
AMP	(ang. <i>adenosine monophosphate</i>) – 3'-5'-adenozynomonofosforan
BFP	(ang. <i>Blue Fluorescent Protein</i>) – niebieskie białko fluorescencyjne
BRET	(ang. <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>) – rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia bioluminescencji
BSA	(ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>) – albumina surowicy wołowej
C	(ang. <i>cytosine</i>) – cytozyna (4-amino-2-hydropirymidyna)
cAMP	(ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>) – 3'-5'-cykliczny adenzynomonofosforan
CFP	(ang. <i>Cyan Fluorescent Protein</i>) – jasnoniebieskie białko fluorescencyjne
cGMP	(ang. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>) – 3'-5'-cykliczny guanozynomonofosforan
CK1	(ang. <i>casein kinase 1</i>) – kinaza kazeinowa 1
DAG	(ang. <i>diacylglycerol</i>) – diacyloglicerol
DNA	(ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>) – kwas deoksyrybonukleinowy
dpm	(ang. <i>disintegrations per minute</i>) – liczba rozpadów na minutę
EBFP	(ang. <i>Enhanced Blue Fluorescent Protein</i>) – wzmocnione niebieskie białko fluorescencyjne
ec	(ang. <i>extracellular loop</i>) – pętla zewnątrzkomórkowa
ECFP	(ang. <i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>) – wzmocnione jasnoniebieskie białko fluorescencyjne
EGFP	(ang. <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) – wzmocnione zielone białko fluorescencyjne
ER	(ang. <i>endoplasmic reticulum</i>) – siateczka endoplazmatyczna
EYFP	(ang. <i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>) – wzmocnione żółte białko fluorescencyjne
FBS	(ang. <i>Foetal Bovine Serum</i>) – płodowa surowica bydlęca
FP	(ang. <i>Fluorescent Protein</i>) – białko fluorescencyjne
FRET	(ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>) – rezonansowe przeniesienie energii w mechanizmie Förstera
FRET	(ang. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) – rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji
G	(ang. <i>guanine</i>) – guanina (2-amino-6-oksypuryna)
GABA	(ang. <i>γ-aminobutyric acid</i>) – kwas γ-aminomasłowy
GFP	(ang. <i>Green Fluorescent Protein</i>) – zielone białko fluorescencyjne

GMP	(ang. <i>guanosine monophosphate</i>) – 3'-5'-guanozynomonofosforan
GPCR(s)	(ang. <i>G-Protein Coupled Receptor/s</i>) – receptor(y) sprzężone z białkiem G
HEK293	(ang. <i>Human Embryonic Kidney 293</i>) – ludzkie komórki embrionalne pochodzenia nerkowego, eukariotyczna linia komórkowa
ic	(ang. <i>intracellular loop</i>) – pętla wewnątrzkomórkowa
IP ₃	(ang. <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>) – 1,4,5-trifosforan inozytolu
mRNA	(ang. <i>messenger RNA</i>) – matrycowy RNA
NIR	(ang. <i>Near Infra Red</i>) – bliska podczerwień
NMDA	(ang. <i>N-Methyl-D-aspartic acid</i>) – kwas N-metylo-D-asparaginowy
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy
PBS	(ang. <i>phosphate buffered saline</i>) – bufor fosforanowy
PCR	(ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) – łańcuchowa reakcja polimerazy
PKA	(ang. <i>protein kinase A</i>) – kinaza białkowa A
PLC	(ang. <i>phospholipase C</i>) – fosfolipaza C
RNA	(ang. <i>ribonucleic acid</i>) – kwas rybonukleinowy
SNP	(ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
T	(ang. <i>thymine</i>) – tymina (5-metylo-2,4-dioksypirymidyna)
TCSPC	(ang. <i>Time-Related Single Photon Counting</i>) – skorelowane w czasie zliczanie pojedynczych fotonów
TM	(ang. <i>transmembrane domain</i>) – domena transbłonowa
UV	(ang. <i>ultraviolet</i>) – ultrafiolet
YFP	(ang. <i>Yellow Fluorescent Protein</i>) – żółte białko fluorescencyjne

1. WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich 20 lat znacząco wzrosło zainteresowanie metodami fluorescencyjnymi w szeroko pojętych naukach biologicznych. Metody fluorescencyjne pełnią istotną rolę w biologii molekularnej czy sekwencjonowaniu DNA. Olbrzymi postęp metod fluorescencyjnych można zauważyć zarówno w badaniach strukturalnych makromolekuł, jak i w technikach obrazowania komórek. Spektroskopia fluorescencji oraz fluorescencja rozdzielcza w czasie należą obecnie do podstawowych metod stosowanych w badaniach biochemicznych i biofizycznych. W niniejszej pracy zastosowano zaawansowane techniki pomiaru zaniku fluorescencji w czasie oraz fluorescencyjną mikroskopię konfokalną do zbadania oddziaływania receptorów dopaminowych D₁ i D₂, a także wpływu na to oddziaływanie polimorfizmów w obrębie receptora D₁.

1.1 Zjawisko fluorescencji

Zjawisko emisji światła przez dowolną substancję nazywane jest luminescencją. Natura stanu wzbudzonego, z którego zachodzi emisja, jest podstawą podziału zjawiska luminescencji na: fluorescencję i fosforescencję¹.

Fluorescencja to emisja fotonu przy przejściu elektronu z singletowego stanu wzbudzonego (S₁) do stanu podstawowego (S₀) (Lakowicz 2006). Przejście między stanami o tej samej multipletowości jest dozwolone przez kwantowo-mechaniczną regułę wyboru i emisja jest natychmiastowa (zachodzi z szybkością rzędu 10⁻⁸ s⁻¹), a typowy czas życia fluorescencji jest bliski 10 ns. Jako czas życia fluorescencji (ang. *fluorescence lifetime*) określa się średni czas przejścia między stanem wzbudzonym a podstawowym.

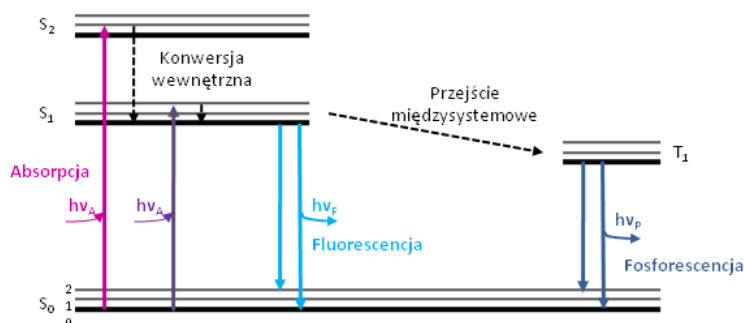
Fluorescencję wykazują m. in. cząsteczki licznych barwników; w tym rodamina B, fluoresceina czy chinina, która jest najczęściej spotykanym fluoroforem. Błado niebieską poświatę toniku wystawionego na słońce zaobserwował John Herschel w roku 1845. Co ciekawe, ten pierwszy poznany fluorofor przyczynił się do powstania pierwszego spektrofluorymetru (w latach 50-tych XX. wieku), który był efektem prac prowadzonych

¹ Fosforescencja to emisja fotonu przy przejściu z trypletowego stanu wzbudzonego (T₁), w którym orientacja spinu elektronu na orbitalu wzbudzonym jest taka sama jak elektronu w stanie podstawowym (S₀). Przejście między tymi stanami jest wzbronione, a czas zaniku fosforescencji jest stosunkowo długi, rzędu milisekund lub sekund (Lakowicz 2006). Po ekspozycji na światło substancje fosforyzują nawet kilka minut, a zjawisko to wykorzystano np. w zabawkach.

nad środkiem antymalarycznym – chininą. Własności fluorescencyjne wykazują cząsteczki aromatyczne, w tym antracen, wykorzystywany do badań zanieczyszczenia środowiska oraz molekuly biologiczne jak aromatyczne aminokwasy (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina) czy szeroko stosowane w badaniach biologicznych białka fluorescencyjne. Natomiast do molekuł niearomatycznych wykazujących fluorescencję należą lantanowce (np. europ czy terb) (Kawski 1992, Lakowicz 2006).

1.1.1 Diagram Jabłońskiego

Procesy molekularne zachodzące w stanie wzbudzonym między absorpcją a emisją światła ilustruje tzw. diagram Jabłońskiego (rycina 1.1-1).



Rycina 1.1-1. Diagram Jabłońskiego (wg Lakowicz 2006 zmodyfikowano).

W wyniku absorpcji światła następuje wzbudzenie fluoroforu do wyższego poziomu wibracyjnego stanu S_1 (lub S_2), przy czym – poza nielicznymi wyjątkami – molekuly natychmiast wracają do najniższego energetycznie poziomu wibracyjnego stanu S_1 , a proces ten nazywany jest konwersją wewnętrzną i zachodzi w czasie rzędu 10^{-12} s, zatem jest zakończony przed emisją fluorescencji (Lakowicz 2006, Kawski 1992).

Molekuly w stanie singletowym S_1 mogą ulec konwersji spinu do pierwszego stanu trypletowego (T_1), jest to tzw. konwersja międzysystemowa. Ponieważ przejście $T_1 \rightarrow S_0$ jest wzbronione to stała szybkości tego procesu jest kilka rzędów wielkości mniejsza niż dla fluorescencji (Lakowicz 2006).

1.1.2 Właściwości fluorescencji

Maksimum emisji fluorescencji jest przesunięte w kierunku niższych energii (bądź dłuższych fal) w stosunku do maksimum absorpcji, jest to tzw. przesunięcie Stokesa. George Stokes w roku 1852 po raz pierwszy zaobserwował, że energia emisji fluorescencji jest niższa od energii absorbowanego fotonu, a przyczyną strat energii są między innymi

procesy konwersji wewnętrznej (Lakowicz 2006). Dodatkowo dochodzą jeszcze straty związane z reakcjami stanów wzbudzonych, tworzeniem kompleksów czy transferem energii oraz innymi zjawiskami zachodzącymi w roztworach fluoroforów.

Ponadto, zgodnie z tzw. regułą Kash'a, widmo fluorescencji jest niezależne od długości fali wzbudzenia. Po wzbudzeniu do wyższych stanów elektronowych lub vibracyjnych nadmiar energii szybko ulega dyssypacji, a molekula fluoroforu przechodzi do najniższego poziomu vibracyjnego stanu S_1 (Lakowicz 2006). W wyniku nagłej relaksacji stanów widma emisyjne są zazwyczaj niezależne od długości fali wzbudzenia. Istnieją jednak wyjątki, jak np. fluorofory występujące w dwóch stanach jonizacji czy molekuly emitujące ze stanu S_2 .

Do najważniejszych parametrów charakteryzujących fluorofor należą wydajność kwantowa i czas życia fluorescencji. Wydajność kwantowa fluorescencji to stosunek liczby fotonów emitowanych do fotonów zaabsorbowanych i może być wyrażona jako frakcja fluoroforów wzbudzonych, które w wyniku emisji fluorescencji powracają do stanu podstawowego (Lakowicz 2006):

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

Równanie 1.1-1

gdzie: Q – wydajność kwantowa, Γ – szybkość emisji fluorescencji [s^{-1}],
 k_{nr} – szybkość przejścia bezpromienistego [s^{-1}].

Wydajność kwantowa jest bliska jedności jeżeli szybkość przejść bezpromienistych jest dużo mniejsza od szybkości przejść promienistych (fluorescencji), wówczas obserwowana emisja jest najjaśniejsza (jak np. w przypadku rodaminy). Przy czym, z uwagi na przesunięcie Stokesa, wydajność kwantowa jest zawsze mniejsza od jedności.

Czas życia stanu wzbudzonego jest definiowany jako średni czas spędzany przez molekulę w stanie wzbudzonym, zanim powróci do stanu podstawowego (Lakowicz 2006):

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

Równanie 1.1-2

gdzie: τ – czas życia stanu wzbudzonego [s], Γ – szybkość emisji fluorescencji [s^{-1}],
 k_{nr} – szybkość przejścia bezpromienistego [s^{-1}].

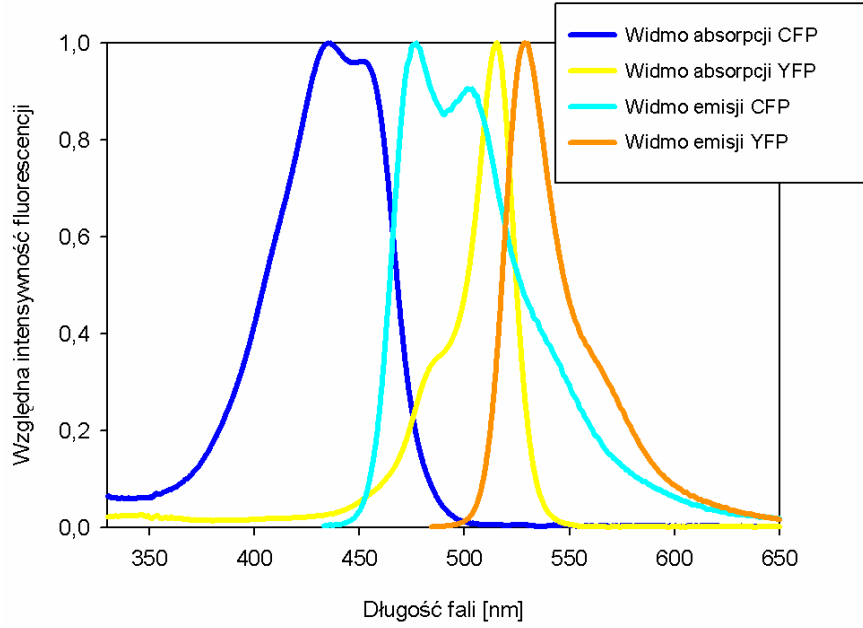
Fluorescencja jest zjawiskiem losowym i tylko pewne cząsteczki emitują fotony dokładnie w czasie τ . W przypadku zaniku monoeksponencjalnego 63% molekul emituje w czasie krótszym niż τ , a dla pozostałych 37% czas emisji jest większy od τ .

Procesy wygaszania (ang. *quenching*) powodują obniżenie intensywności fluorescencji i mogą zachodzić w oparciu o różne mechanizmy, do których zaliczane są m. in. zderzenia kolizyjne stanu wzbudzonego z cząsteczką tzw. wygaszacza. Szeroka gama molekuł może pełnić funkcję wygaszacza, należą do nich cząsteczki tlenu, halogenki czy aminy. Oprócz wygaszania kolizyjnego, obniżenie intensywności fluorescencji może wynikać z tworzenia niefluorescencyjnych kompleksów pomiędzy fluoroforem a cząsteczką wygaszacza lub pochłaniania emitowanych fotonów przez inne molekuly ośrodka.

1.2 Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji

Ponad 60 lat temu, w roku 1948, niemiecki naukowiec Teodor Förster zauważył, że bliskie sąsiedztwo dwóch chromoforów zmienia ich własności spektralne w przewidywalny sposób. Jeżeli zatem np. dwie molekuly biologiczne oddziałują ze sobą w żywej komórce, to spowoduje to zbliżenie chromoforów przyłączonych do tych molekuł. Teoria Förstera wyjaśnia zjawisko rezonansowego przeniesienia energii (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*), jako oddziaływania typu dipol-dipol pomiędzy molekułami znajdującymi się wystarczająco blisko siebie (w odległości rzędu 2-10 nm) (Lakowicz 2006). Dalsze prace nad zjawiskiem FRET oraz potencjalne zastosowania w biologii przy wykorzystaniu cząsteczek fluorescencyjnych pojawiły się w latach 90-tych (Clegg 1992, Tsien 1998). Zjawisko to nazywane jest również rezonansowym przeniesieniem energii wzbudzenia fluorescencji, jeżeli donor jest fluoroforem (FRET, ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). W niniejszej pracy skrót FRET będzie odnosił się do zjawisk fluorescencyjnych lecz należy pamiętać, iż opisywane procesy zachodzą w mechanizmie Förstera.

FRET zachodzi wówczas, gdy widmo emisji fluorofora (nazywanego donorem) pokrywa się z widmem absorpcyjnym drugiej molekuly (akceptora), obecność odpowiedniego akceptora skraca czas jaki donor spędza w stanie wzbudzonym na skutek bezpromienistego przekazania energii do akceptora (rycina 1.2-1).



Rycina 1.2-1. Przykładowe widma absorpcji i emisji pary fluoroforów CFP (ang. *Cyan Fluorescent Protein*) i YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*) stosowanych w metodzie FRET.

Szybkość przeniesienia energii (k_t) dla pary donor-akceptor znajdujących się w odległości r jest opisywana zależnością (Lakowicz 2006):

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^5} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Równanie 1.2-1

gdzie: Q_D – wydajność kwantowa donora w nieobecności akceptora, n – współczynnik załamania światła (dla biomolekuł w roztworze wodnym przyjmuje wartość 1,4), N_A – liczba Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ M}^{-1}$), τ_D – czas życia fluorescencji donora w nieobecności akceptora [ns], r – odległość między fluoroforami [nm], λ – długość fali [nm], $F_D(\lambda)$ – znormalizowana intensywność fluorescencji donora w przedziale długości fali od λ do $\lambda + d\lambda$, $\varepsilon_A(\lambda)$ – molowy współczynnik absorpcji [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], κ^2 – współczynnik orientacji dipoli przejścia donora i akceptora.

Efektywność przekazu energii zależy także od stopnia nałożenia widma emisji donora i widma absorpcji akceptora (Lakowicz 2006):

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Równanie 1.2-2

gdzie: $J(\lambda)$ – całka nałożenia widma emisji donora i absorpcji akceptora [$\text{nm}^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], λ – długość fali [nm], $F_D(\lambda)$ – znormalizowana intensywność fluorescencji donora w przedziale długości fali od λ do $\lambda + d\lambda$, $\varepsilon_A(\lambda)$ – molowy współczynnik absorpcji [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$].

W doświadczeniach biochemicznych częściej stosowany jest parametr określający odległość oddziałujących fluoroforów; wówczas równanie 1.2-1 można wyrazić przy pomocy odległości Förstera (R_0), przy której połowa molekuł donora przekazuje energię bezpromieniście w zjawisku FRET:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

Równanie 1.2-3

gdzie: Q_D – wydajność kwantowa donora w nieobecności akceptora, n – współczynnik załamania światła (dla biomolekuł w roztworze wodnym przyjmuje wartość 1,4), N_A – liczba Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ M}^{-1}$), λ – długość fali [nm], $F_D(\lambda)$ – znormalizowana intensywność fluorescencji donora w przedziale długości fali od λ do $\lambda + d\lambda$, $\varepsilon_A(\lambda)$ – molowy współczynnik absorpcji [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], κ^2 – współczynnik orientacji dipoli przejścia donora i akceptora.

Wyrażenie to pozwala na obliczenie odległości Förstera w oparciu o własności spektralne donora i akceptora oraz wydajność kwantową donora. Ponieważ wyrażenie 1.2-3 zawiera wiele stałych, można je uprościć do następującej postaci:

$$R_0 = 0,211 \sqrt[6]{\frac{\kappa^2 Q_D J(\lambda)}{n^4}}$$

Równanie 1.2-4

gdzie: κ^2 – współczynnik orientacji dipoli przejścia donora i akceptora, Q_D – wydajność kwantowa donora w nieobecności akceptora, $J(\lambda)$ – całka nałożenia widma emisji donora i widma absorpcji akceptora, n – współczynnik załamania światła (dla biomolekuł w roztworze wodnym przyjmuje wartość 1,4).

Współczynnik wzajemnej orientacji przestrzennej dipoli przejścia (κ^2):

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2$$

Równanie 1.2-5

gdzie: θ_T – kąt pomiędzy dipolem przejścia emisyjnego donora a dipolem przejścia absorpcyjnego akceptora, θ_D i θ_A – kąty między tymi dipolami i wektorem łączącym donor z akceptorem.

Współczynnik κ^2 może przyjmować wartości od 0 do 4. W praktyce określenie rzeczywistej orientacji jest trudne, przyjmuje się losową orientację białek fluorescencyjnych, nawet gdy są połączone z makromolekułami, wówczas uśredniona wartość κ^2 wynosi 2/3 (Majoul i wsp. 2006, Lakowicz 2006). Jednak wydaje się, że interpretując wyniki należy brać pod uwagę fakt, że fuzja donora i akceptora z białkami receptorowymi prawdopodobnie ogranicza swobodę ruchu, co może przekładać się na różnicę w wydajności zjawiska (Pfleger i Eidne 2005).

Znając wartość R_0 , szybkość przeniesienia energii $k_T(r)$ można obliczyć jako:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Równanie 1.2-6

gdzie: R_0 – odległość Förstera [nm], r – odległość między donorem a akceptorem [nm], τ_D – czas życia fluorescencji donora [ns].

Wydajność FRET (E) jest stosunkiem szybkości przeniesienia energii do całkowitego zaniku fluorescencji donora w obecności akceptora:

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)}$$

Równanie 1.2-7

gdzie: $k_T(r)$ – szybkość przeniesienia energii [s^{-1}], r – odległość między donorem a akceptorem [nm], τ_D – czas życia fluorescencji donora [ns].

A po uwzględnieniu zależności 1.2-6 wyrażenie to może przybrać następującą postać:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

Równanie 1.2-8

gdzie: E – wydajność przekazania energii, R_0 – odległość Förstera [nm], r – odległość między donorem a akceptorem [nm].

Zatem dla fluoroforów znajdujących się w odległości Förstera wydajność transferu energii będzie wynosiła 50%. Wydajność FRET bardzo silnie zależy od odległości pomiędzy cząsteczkami i – jak wynika z danych literaturowych – wydajne przekazanie energii zachodzi dla odległości rzędu 2-8 nm (Lakowicz 2006, Patterson i wsp. 2000). Ponieważ odległości Förstera są porównywalne z rozmiarami molekuł biologicznych, np. średnicą białek czy grubością błon lipidowych (3-6 nm), zatem FRET jest doskonałą „linijką spektroskopową” (Stryer 1978) znajdującą zastosowanie w układach biologicznych. Zjawisko to jest szeroko wykorzystywane do badania odległości między poszczególnymi domenami białek lub pomiędzy białkami a błoną komórkową. Dodatkowo umożliwia ono badanie zmian mikrootoczenia powodujących zmiany konformacyjne makrocząsteczki, a zatem i zmianę odległości między donorem i akceptorem.

Często wykorzystywanymi znacznikami fluorescencyjnymi są odmiany zielonego białka fluorescencyjnego (rozdział 1.5). Wykazują one stosunkowo niewielkie przesunięcie Stokesa, zatem obliczone wartości R_0 dla pewnych par białek fluorescencyjnych pozwalają na ich wykorzystanie w metodzie FRET (Patterson i wsp. 2000, 2001). Przykładowe wartości R_0 dla kilku par donor-akceptor pokazano w tabeli 1.2-1.

Tabela 1.2-1. Wartości odległości Förstera R_0 dla par donor-akceptor (wg. Patterson i wsp. 2000).

Donor	Akceptor		
	GFP	YFP	CFP
CFP	4,82 nm	4,92 nm	3,28 nm
GFP	4,65 nm	5,64 nm	1,93 nm
YFP	3,25 nm	5,11 nm	1,00 nm

Wydajność przeniesienia energii może być obliczona także na podstawie względnej intensywności fluorescencji lub czasów życia fluorescencji donora, odpowiednio w obecności (τ_{DA}) i nieobecności (τ_D) akceptora:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Równanie 1.2-9

Ponieważ monoeksponencjalne zaniki fluorescencji są stosunkowo rzadkie w przypadku cząsteczek biologicznych należy używać średniego czasu życia fluorescencji, który jest proporcjonalny do intensywności fluorescencji.

1.3 Pomiary fluorescencji

Pomiary fluorescencji można najogólniej podzielić na dwie klasy: pomiary stacjonarne (ang. *steady-state fluorescence*), w których próbka oświetlana jest ciągłą wiązką światła i rejestrowana jest intensywność fluorescencji lub widmo emisji oraz pomiary rozdzielcze w czasie (ang. *time-resolved fluorescence*), w których próbka wzbudzana jest impulsem światła i rejestrowany jest zanik intensywności (Lakowicz 2006). Podczas gdy pomiary stacjonarne są stosunkowo proste, to nanosekundowe pomiary rozdzielcze w czasie wymagają zaawansowanej technologicznie i kosztownej aparatury. Nasuwa się zatem pytanie co jest zaletą tak skomplikowanych badań? Okazuje się, że liczne istotne informacje molekularne mogą być tracone na skutek procesu uśredniania w czasie pomiaru stacjonarnego. Przykładowo, zanik intensywności może ujawnić dwa czasy życia fluorescencji odpowiadające dwóm odrębnym konformacjom molekuly, podczas gdy pomiar stacjonarny tej samej próbki pozwoli na pomiar jedynie pewnej średniej, a zatem informacja o stanach konformacyjnych zostanie utracona. Ponadto, w przypadku zjawiska przeniesienia energii, zaniki intensywności umożliwiają rozróżnienie między odmiennymi populacjami donorów o zbliżonych właściwościach absorpcyjnych i emisyjnych lecz różnych czasach życia fluorescencji. Ponadto, jeżeli nie jest znana charakterystyczna wydajność przekazu energii dla badanego oddziaływania, pomiary stacjonarne

intensywności fluorescencji nie umożliwią ilościowych pomiarów FRET nawet przy przeprowadzonej normalizacji (Hoppe i wsp. 2002).

Alternatywnym podejściem jest metoda fotowysbielania, w której wydajność FRET może być wyznaczona przez fotowysbielanie zarówno akceptora (ang. *acceptor-photobleaching FRET*) (Wouters i wsp. 1998), jak i donora (ang. *donor-photobleaching FRET*) (Bastiaens i Jovin 1996). W pierwszym przypadku mierzona jest intensywność fluorescencji akceptora przed i po fotowysbieleniu, w drugim wykorzystywana jest różnica w szybkości fotowysbielania donora w obecności i nieobecności akceptora.

Bezpośrednie pomiary wydajności FRET mogą być oparte o pomiary zaniku fluorescencji donora w czasie, które są niezależne od stężenia fluoroforu i nie wymagają dodatkowego pomiaru czasu życia fluorescencji akceptora. Technika ta została szeroko wykorzystana w niniejszej pracy i szerzej omówiona w jej dalszej części.

1.4 Pomiar zaniku fluorescencji w czasie

Powszechnie stosowane są dwie główne metody pomiaru fluorescencji rozdzielczych w czasie. Pierwszą jest metoda impulsowa (ang. *time-domain*), w której próbka wzbudzana jest możliwie krótkim impulsem światła (czas trwania impulsu jest krótszy niż czas życia fluorescencji próbki) (Lakowicz 2006). Następnie rejestrowany jest zanik intensywności fluorescencji $I(t)$, a czas życia fluorescencji (τ) oblicza się z nachylenia krzywej $\log I(t)$ lub z czasu, przy którym intensywność fluorescencji spada do wartości $1/e$ (tj. $\sim 37\%$ wartości początkowej).

Alternatywną jest metoda modulacji fazowej (ang. *frequency-domain* lub *phase-modulation*), w której próbka jest wzbudzana światłem o sinusoidalnie modulowanej intensywności (Gratton i wsp. 2003, Lakowicz 2006). Światło emitowane ma tę samą częstotliwość, a czas życia fluorescencji można obliczyć z przesunięcia fazowego. Czas życia fluorescencji użytego fluoroforu powoduje również obniżenie wysokości maksimum emisji w stosunku do modulowanego wzbudzenia, na tej podstawie także można go określić.

1.4.1 Metoda skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów

Metoda skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów TCSPC (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*) jest obecnie najczęściej stosowana w pomiarach metodą impulsową. Pomiar czasu opóźnienia pomiędzy detekcją pojedynczego fotonu

a emisją impulsu wzbudzającego jest prowadzony sekwencyjnie. Mierzony czas jest skorelowany z powrotem do stanu podstawowego puli fluoroforów wzbudzonych nieskończenie krótkim impulsem świetlnym. Metoda TCSPC jest czuła i wymaga bardzo niskiego poziomu wzbudzenia, dzięki czemu jest nieoceniona w badaniach żywych komórek, gdyż nie powoduje ich uszkodzenia w wyniku depozycji energii.

Impuls wzbudzający próbkę jest również sygnałem, który przechodzi przez dyskryminator (mierzący czas przybycia impulsu) i jest przesyłany do konwertera czasowo-amplitudowego (TAC, ang. *Time-to-Amplitude Converter*) generującego sygnał napięcia rosnący liniowo w czasie. Zatem przyrost napięcia jest proporcjonalny do czasu między wzbudzeniem a emisją fotonu i może być wzmocniony lub zamieniony na wartość liczbową przy pomocy konwertera analogowo-cyfrowego (ADC, ang. *Analogue-to-Digital Converter*). Odpowiedni histogram uzyskiwany jest poprzez wielokrotne powtórzenia opisanego procesu, a odczyty fałszywe redukowane są przy użyciu dyskryminatora (User Guide IBH 2000, Kawski 1992). W praktyce częściej stosowany jest tryb odwrócony, w którym impuls emisji startuje TAC, a impuls wzbudzenia zatrzymuje konwerter TAC, co wynika z wysokiej częstotliwości repetycji stosowanych źródeł światła i konieczności wyzerowania TAC przed każdym impulsem. Przykładowy schemat urządzenia wykorzystanego w niniejszej pracy przedstawiono na rycinie 4.5-1. Z czasem reakcji konwertera TAC, który przekształca przerwę czasową między sygnałem START i STOP na sygnał napięciowy, związany jest tzw. efekt *pile-up*. W ramach jednego cyklu urządzenie wykonuje jeden proces konwersji, co oznacza, że jeżeli dotrze do niego w tym czasie więcej niż jeden foton to zostanie on pominięty (Lakowicz 2006, User Guide IBH 2000). W konsekwencji przyczynia się do powiększenia rozrzutu, a tym samym skrócenia mierzonego czasu zaniku w stosunku do czasu rzeczywistego. Parametrem opisującym to zjawisko jest współczynnik α wyrażony wzorem:

$$\alpha = \frac{S_1}{S_0} \cdot 100\%$$

Równanie 1.4-1

Gdzie: S_0 – szybkość startowania TAC, S_1 – szybkość zatrzymywania TAC.

Podejmowanych jest wiele prób mających na celu wyeliminowanie lub korekcję tego zaburzenia, niemniej jednak powszechnie akceptowane jest, aby współczynnik α przyjmował wartości nie wyższe niż 2%.

Dodatkowo, aby zapewnić pomiar pierwszego fotonu przy danym wzbudzeniu, szybkość zliczeń musi być niższa niż 1% częstotliwości impulsów wzbudzających.

W przypadku nowoczesnych układów elektronicznych czas martwy został zredukowany nawet do 120 ns (Lakowicz 2006), lecz nadal jest on dużo dłuższy od mierzonych czasów życia fluorescencji, co zapobiega odbieraniu wielu fotonów z danego wzbudzenia, a w praktyce powoduje ograniczenie szybkości akwizycji danych.

W metodzie TCSPC wymagane jest wzbudzenie krótkim impulsem, którego szerokość byłaby zaniedbywalna w porównaniu z długością czasu zaniku fluorescencji. Do roku 2000 najczęściej stosowane były pikosekundowe lasery barwnikowe (Nd:YAG) lub lampy błyskowe (niska intensywność impulsu i mała częstotliwość repetycji 20-100 kHz przyczyniają się do wolnej akwizycji danych), obecnie zastępowane są femtosekundowymi laserami *Ti:sapphire*, które są prostsze w obsłudze i pomimo wysokiej ceny znajdują zastosowanie (Lakowicz 2006). Wprowadzenie na rynek diód laserowych LD (ang. *Laser Diode*) i LED (ang. *Light-Emission Diode*) przyczyniło się do zmniejszenia zużycia energii oraz ułatwienia obsługi urządzeń, co sprawiło, że stały się dostępne dla szerszego grona badaczy. Diody laserowe i LED pozwalają na szybką akwizycję danych (częstotliwość repetycji 40 MHz) i umożliwiają dokładniejszy pomiar czasów życia fluorescencji (szerokość impulsu diody LD wynosi ok. 70 ps) (Lakowicz 2006).

Przeprowadzono również doświadczenia, w których wykorzystano do wzbudzeń promieniowanie synchrotronowe, którego niewątpliwą zaletą jest szerokie spektrum uzyskiwanych długości fal o jednakowym rozkładzie czasowym. Okazało się, że użycie tego źródła światła jest wysoce niepraktyczne z uwagi na konieczność zainstalowania poszczególnych elementów omawianego układu w różnych punktach synchrotronu (Lakowicz 2006).

Jako detektory stosowane są fotopowielacze mikrokanalowe lub kompaktowe (ang. *microchannel plate photomultiplier tube* lub *compact photomultiplier tube*) czy fotodiody (ang. *photodiode*), które są szybsze i tańsze od fotopowielaczy mikrokanalowych, jednak mają mniejszą objętość czynną, a zatem i czułość (Lakowicz 2006).

1.4.2 Zastosowania pomiaru czasów życia fluorescencji

Nowoczesne urządzenia do pomiaru zaniku fluorescencji w czasie zapewniają uzyskanie wysokiej jakości danych w krótkim czasie, a dodatkowo mogą być zestawione ze standardowym mikroskopem fluorescencyjnym lub mikroskopem konfokalnym. Rozdzielcza w czasie mikroskopia fluorescencyjna umożliwia śledzenie zmian w układzie biologicznym zachodzących w nanosekundowych przedziałach czasowych. Dodatkową jej zaletą jest brak zależności czasu życia fluorescencji od stężenia samego fluoroforu, które

trudno byłoby kontrolować wewnątrz komórki (Lakowicz 2006). Metoda ta jest ponadto niezależna

od fotobłaknięcia samej próbki, mającego duże znaczenie w stacjonarnych pomiarach intensywności fluorescencji. Połączenie pomiaru czasów życia fluorescencji i FRET zapewnia wysoką rozdzielczość przestrzenną (nm) i czasową (ns) (Elangovan i wsp 2003).

Pomiary FRET przy użyciu metody TCSPC pozwalają na obserwację oddziaływania receptorów w pojedynczych komórkach. Wykorzystując pomiary czasów życia fluorescencji potwierdzono heterooligomeryzację receptorów dopaminowych D_1 i D_2 (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2004) oraz homo- i heterooligomeryzację receptorów: adenozynowego A_{2A} oraz serotoninowego $5HT_{1A}$ (Łukasiewicz i wsp. 2007, 2009), a co równie ważne – pokazano i oszacowano wpływ niektórych ligandów na ten proces (Faron-Górecka i wsp. 2008). Pomiar czasów życia fluorescencji wykorzystano do badania zmian wartości pH (Sanders i wsp. 1995) i stężenia jonów wapnia Ca^{2+} (Lakowicz i wsp. 1994), procesów proteolizy, zmian potranslacyjnych czy też fosforylacji (Bastiaens i Squire 1999).

1.4.3 Analiza zaników fluorescencji

Od lat 70-tych XX. wieku zaproponowano wiele metod analizy zaników fluorescencji, jak metoda najmniejszych kwadratów (Grinvald i Steinberg 1974) czy rzadko stosowane: metoda momentów (Small 1992), transformata Laplace’a (Ameloot i Hendrickx 1983), metoda maksimum entropii (Brochon 1994), a także transformacja sinusoidalna (Lopez i wsp. 1992) czy metoda fazowa (Novikov 1998).

W analizach biochemicznych i biofizycznych najczęściej stosowana jest metoda najmniejszych kwadratów, w której obierany jest określony model opisujący otrzymywane wyniki. Celem przeprowadzanej analizy jest sprawdzenie czy ten model jest spójny z uzyskanymi danymi oraz otrzymanie parametrów, które zapewnią najlepsze dopasowanie pomiędzy zanikiem fluorescencji zmierzonym $N(t_k)$, a oczekiwanym $N_c(t_k)$ (Lakowicz 2006). Jakość dopasowania jest uzyskiwana poprzez minimalizację zredukowanego parametru χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma^2} |N(t_k) - N_c(t_k)|^2$$

Równanie 1.4-2

gdzie: n – liczba kanałów, ν – liczba stopni swobody, σ^2 – odchylenie standardowe, $N(t_k)$ – zmierzony zanik fluorescencji, $N_c(t_k)$ – oczekiwany zanik fluorescencji.

Jeżeli niepewność związana jest jedynie ze statystyką zliczeń i gdy nie ma błędu systematycznego to, zgodnie z rozkładem Poisson’a, odchylenie standardowe można opisać następująco (Lakowicz 2006):

$$\sigma^2 = \sqrt{N(t_k)}$$

Równanie 1.4-3

gdzie: σ^2 – odchylenie standardowe, $N(t_k)$ – zmierzony zanik fluorescencji.

Prawo zaniku fluorescencji określa szybkość zaniku fluorescencji populacji fluorofora w stanie wzbudzonym $n(t)$ na skutek zaniku radiacyjnego z szybkością Γ oraz nieradiacyjnego z szybkością k_{nr} , który opisany jest równaniem (Lakowicz 2006):

$$\frac{dn(t)}{dt} = (\Gamma + k_{nr})n(t)$$

Równanie 1.4-4

gdzie: Γ – szybkość zaniku radiacyjnego, k_{nr} – szybkość zaniku nieradiacyjnego, $n(t)$ – populacja fluorofora w stanie wzbudzonym.

W modelu multieksponencjalnym intensywność fluorescencji $I(t)$ jest opisana jako suma pojedynczych eksponent:

$$I(t) = \sum_{i=0}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i}$$

Równanie 1.4-5

gdzie: α_i – amplituda składowa dla czasu $t = 0$, n – ilość składowych, τ_i – składowa czasu życia fluorescencji.

Model multieksponencjalny jest często stosowany, chociaż interpretacja poszczególnych parametrów może być różna w zależności od doświadczenia.

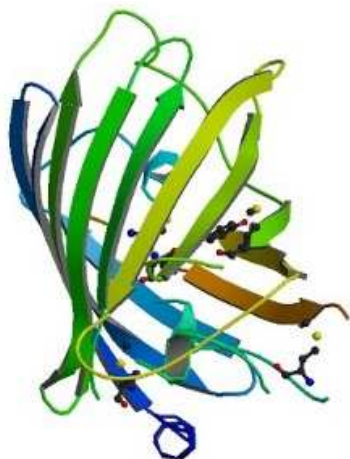
1.5 Białka fluorescencyjne w badaniach biologicznych

Fluorofory są jednym z ważniejszych narzędzi szeroko stosowanych technik fluorescencyjnych. Najogólniej można je podzielić na fluorofory wewnętrzne, czyli związki naturalnie fluorescencyjne (jak aminokwasy aromatyczne: tryptofan, tyrozyna,

fenyloalanina, kofaktory enzymów: NADH i NADPH czy chlorofil) i zewnętrzne, które są dodawane do próbki aby zmienić jej właściwości spektralne (np.: fluoresceina, rodamina i in.) (Lakowicz 2006). Własności fluorescencyjne wykazują również takie związki organiczne jak Cy3 czy Alexa568, jednak nie mogą one być wykorzystane do znakowania białek w procesie ich ekspresji w żywych komórkach (Tramier i wsp. 2005). Oprócz związków drobnocząsteczkowych (jak fluoresceina), znacznikami mogą być też białka fluorescencyjne (FPs, ang. *Fluorescent Proteins*), pochodne zielonego białka fluorescencyjnego (GFP, ang. *Green Fluorescent Protein*), które zrewolucjonizowało zastosowanie metod fluorescencyjnych w biologii.

Historia białek fluorescencyjnych rozpoczęła się od odkrycia i wyizolowania GFP z meduzy *Aequorea Victoria* (Shimomura i wsp. 1962, Shimomura 1995), lecz minęło około 30 lat do praktycznego zastosowania tego narzędzia w biologii komórki (Chalfie i wsp. 1994, Tsien 1998, Lippincott-Schwartz i Patterson 2003, Prasher i wsp. 1992). Doniosłość tych odkryć doceniono przyznając badaczom (Osamu Shimomura, Roger Y. Tsien i Martin Chalfie) nagrody Nobla w dziedzinie chemii w roku 2008. Zastosowanie GFP oraz możliwość obrazowania żywych komórek w połączeniu z FRET i innymi metodami biofizycznymi, pozwoliły na badanie rozległych biochemicznych szlaków sygnalizacyjnych na poziomie pojedynczej komórki (Miyawaki i wsp. 1999, Janetopoulos i wsp. 2001, Kusumi i wsp. 2005).

Białko GFP składa się z 11 tzw. struktur β , które układają się antyrównolegle i tworzą tzw. β -beczulkę osłaniającą umieszczony wewnątrz chromofor (rycina 1.5-1), który powstaje spontanicznie w procesie faldowania łańcucha polipeptydowego, co stanowi olbrzymią zaletę tego białka. Chromofor GFP ulega wzbudzeniu niebieskim światłem (395 nm) i w wyniku transferu wewnętrznego emituje zielone światło fluorescencyjne (508 nm) (Heim i Tsien 1996).



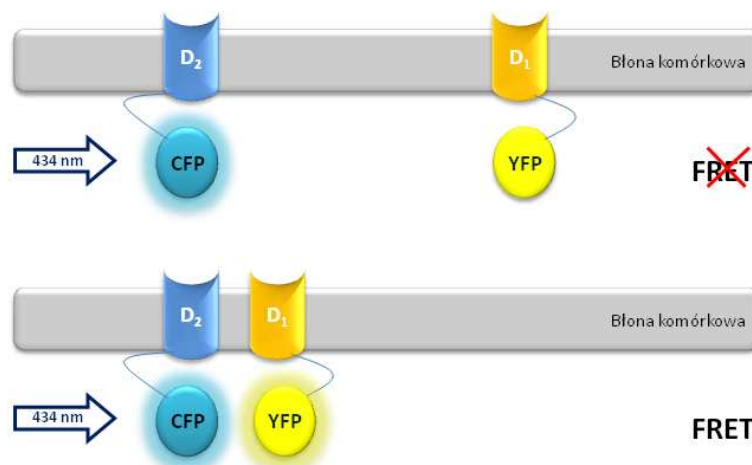
Rycina 1.5-1. Struktura białka fluorescencyjnego GFP. Rysunek wykonany w oparciu o współrzędne struktury zamieszczone w bazie *Protein Data Bank* (1EMA).

Wprowadzenie szeregu mutacji punktowych w białku GFP pozwoliło na uzyskanie nowych odmian o lepszych właściwościach spektralnych i fizykochemicznych, umożliwiając tym samym szersze ich zastosowanie (Shaner i wsp. 2005, Arun i wsp. 2005). Stworzenie EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) o większej wydajności fluorescencji oraz lepszej fotostabilności dało początek całej rodzinie białek fluorescencyjnych. Wprowadzono szereg odmian emitujących światło w różnym zakresie długości fal i o ulepszonych własnościach. W rezultacie powstały odmiany świecące na niebiesko BFP i EBFP (ang. *Enhanced Blue Fluorescent Protein*), żółto YFP i EYFP (ang. *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) oraz jasnoniebiesko CFP i ECFP (ang. *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) (Nagai i wsp. 2002, Arun i wsp. 2005). Emisja fluoroforów obejmuje zakres od nadfioletu (UV, ang. *ultraviolet*) do bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *Near Infra Red*) a dostępne znaczniki charakteryzują się zarówno krótkimi (ns), jak i długimi (ms) czasami życia.

Białko GFP wraz z dwoma wariantami, CFP i YFP, cieszy się szczególnym zainteresowaniem w badaniach lokalizacji różnych molekuł, jak i w pomiarach zjawiska FRET (Heim i Tsien 1996, Tsien 1998, Patterson i wsp. 2001). Białko CFP powstało przez wprowadzenie mutacji S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T oraz V163A w białku GFP (wykaz jednoliterowych skrótów aminokwasów zamieszczono w APPENDIX V). CFP ulega wzbudzeniu przy 434 nm, a maksimum emisji ma przy 474 nm. Drugi wariant, białko YFP różni się od GFP wprowadzonymi mutacjami S65G, V68L, S72A i T203Y. Ulega ono wzbudzeniu przy 514 nm, natomiast maksimum jego emisji przypada na 527 nm (Tsien 1998). Widma emisji i absorpcji białek CFP oraz YFP przedstawiono na rycinie 1.2-1.

Białka fluorescencyjne stanowią wsłupne narzędzie w badaniach biologicznych ze względu na możliwość tworzenia – technikami biologii molekularnej – białek fuzyjnych, tj. cząsteczek złożonych z białka badanego z dołączonym do niego określonym białkiem fluorescencyjnym. Wydajna ekspresja takich białek w komórce, przy równoczesnym braku efektów toksycznych, sprawia, że jest to bardzo dogodne narzędzie w badaniach. Duża liczba dostępnych obecnie białek fluorescencyjnych o różnych właściwościach fizykochemicznych umożliwia wybranie odpowiedniej do potrzeb eksperymentu pary fluoroforów (Karasawa i wsp. 2004, Griesbeck i wsp. 2001, Elslinger i wsp. 1999). Ponadto, w badaniach FRET szczególnie istotna jest wysoka wydajność kwantowa donora i duży współczynnik absorpcji akceptora, a sygnał emisji fluorescencji powinien być znacznie większy od autofluorescencji komórek (Shaner i wsp. 2005). W niniejszej pracy wykorzystano parę wzmocnionych białek fluorescencyjnych EYFP oraz ECFP sprzężonych z receptorami dopaminowymi D₁ i D₂ do zbadania oddziaływania między tymi

receptorami oraz wpływu cichych polimorfizmów w genie receptora dopaminowego D_1 na te oddziaływania. W dalszej części pracy posłużono się jedynie skrótami CFP i YFP do opisu stosowanych białek fluorescencyjnych w miejsce ECFP i EYFP. Schemat układu modelowego do badania tych interakcji metodą FRET przedstawiono na rycinie 1.5-2



Rycina 1.5-2. Schemat układu modelowego do badania heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D_1 i D_2 połączonych z białkami fluorescencyjnymi, odpowiednio YFP i CFP.

Para EYFP-ECFP jest jedną z częściej wykorzystywanych w badaniach oddziaływań białek receptorowych metodą FRET (Milligan 2004, Piston i Kremers 2007), chociaż obecnie podejmowane są badania z wykorzystaniem białek o wyższej wydajności kwantowej, jak mCerulean i mVenus czy ECFP-mCitrine (Shaner 2004, Millington i wsp. 2007, Rizzo i wsp. 2004, 2006).

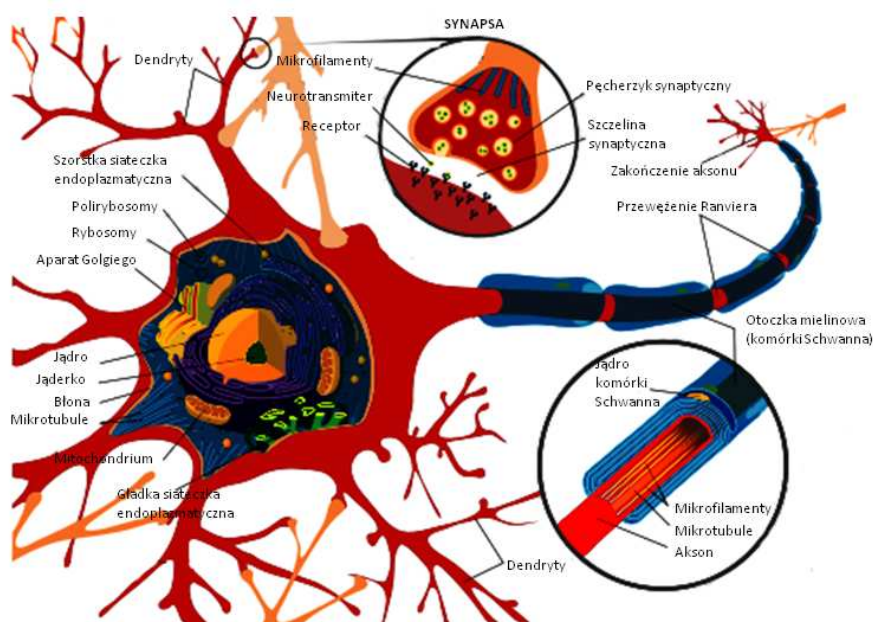
Licząca obecnie siedem klas rodzina białek fluorescencyjnych stanowi nieocenione narzędzie w molekularnej biologii komórki. Nie tylko umożliwia badanie układów żywych, ale również ulega w nich ekspresji. Stosując metody inżynierii genetycznej możliwe jest tworzenie białek fuzyjnych złożonych z GFP (lub pochodnych) i badanego białka, co pozwala na obserwacje lokalizacji w komórce określonej molekuly lub zmian konformacyjnych i jej aktywności wywołanych wpływem czynników środowiskowych, takich jak pH czy stężenie niektórych jonów.

1.6 Sygnalizacja między komórkami

Każda żywa komórka jest bardzo wrażliwa na obecność rozmaitych związków chemicznych w otoczeniu, może ona dostosowywać metabolizm lub korygować wzorce ekspresji genów w zależności od zmian środowiska zewnętrznego.

W przypadku organizmów wielokomórkowych bodźce chemiczne mają kluczowe znaczenie w procesach koordynacji różnych procesów fizjologicznych w nich zachodzących. Uwalnianie np. komórkowego czynnika wzrostu w odpowiedzi na zranienie stymuluje odpowiednie komórki do wzrostu i podziałów. Z kolei w sytuacji zagrożenia, nadnercza uwalniają adrenalinę, która – najogólniej rzecz ujmując – uruchamia zapasy energii i prowadzi do usprawnienia pracy układu krążenia. W tych przykładowych sytuacjach komórka otrzymuje informację o przekroczeniu stężenia progowego konkretnej cząsteczki w jej otoczeniu. Łańcuch zdarzeń, które zamieniają pierwotną informację na ostateczną reakcję fizjologiczną nazywany jest przekazywaniem sygnału.

Szlaki sygnalizacyjne są zazwyczaj bardzo rozgałęzione i zawierają wiele elementów, zatem mogą być wysoce skomplikowane. Tym bardziej, że pewne połączenia i molekuly mogą być wspólne dla różnych ścieżek sygnalizacyjnych. Badanie mechanizmów jakim podlegają elementy wspólne pozwala na poznanie zasad funkcjonowania istniejących szlaków sygnalizacyjnych (Krauss 2008, Berg i wsp. 2007). Podstawowym elementem nerwowych szlaków sygnalizacyjnych jest komórka nerwowa (neuron), którą schematycznie przedstawiono na rycinie 1.6-1.



Rycina 1.6-1. Komórka nerwowa – podstawowy element szlaków sygnalizacyjnych (wg. www.chemistry.ucsc.edu zmodyfikowano).

Większość cząsteczek sygnalizacyjnych nie wchodzi do komórki, natomiast istnieją szczególne białka błonowe, zwane receptorami, które rozpoznają i wiążą odpowiednie molekuly i przenoszą informację do wnętrza komórki. Receptory osadzone są w błonie komórkowej, w obrębie ich domeny zewnątrzkomórkowej znajdują się miejsca specyficznie

wiązące i rozpoznające cząsteczki sygnałowe (ligandy). Oddziaływanie receptor-ligand wywołuje zmiany konformacyjne w obrębie receptora, przenoszące się na jego domenę wewnątrzkomórkową.

1.6.1 Receptory

Receptory to wyspecjalizowane białka, które odbierają bardzo różne sygnały ze środowiska zewnętrznego. Sygnały niosące informację o zmianach mikrootoczenia mogą być w postaci chemicznej, np. hormony, neuroprzekaźniki, neuromodulatory, czynniki wzrostu, antygeny czy gazy (NO, CO i CO₂) lub mogą mieć charakter fizyczny, np. światło (Krauss 2008, Zawilska 2004). Ligandami receptorów mogą być zarówno związki endogenne, jak i strukturalnie do nich zbliżone związki egzogenne, które swoiście wiążą się z receptorem powodując pobudzenie lub blokadę receptora. Olbrzymia liczba leków działa właśnie w ten sposób. Substancje, których związanie powoduje zmianę konformacyjną receptora prowadzącą do wyzwolenia kaskady sygnalizacyjnej nazywa się agonistami. Natomiast związanie antagonisty nie wywołuje zmiany konformacyjnej białka receptorowego, a ponadto uniemożliwia przyłączenie innych substancji sygnalizacyjnych. Naturalne związki sygnalizacyjne to z reguły agoniści o wysokim stopniu powinowactwa do określonego typu receptora i niskim do pozostałych receptorów.

W oparciu o budowę białka receptorowego i przepływ sygnałów, receptory można podzielić na cztery nadrodziny:

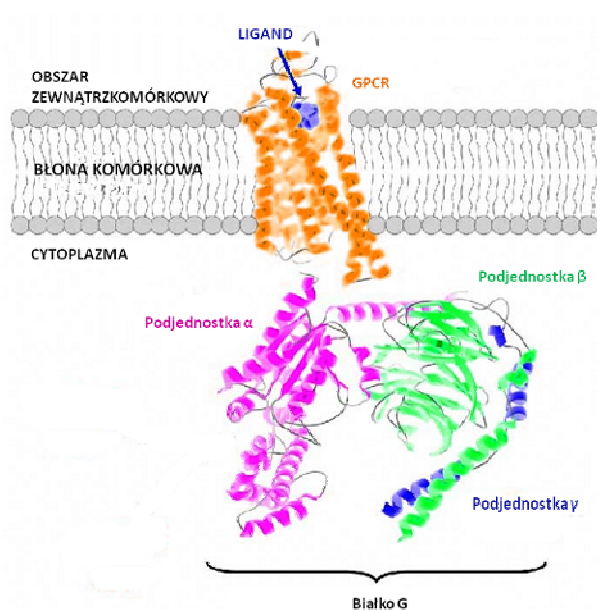
- receptory będące zarazem kanałem jonowym; mają złożoną budowę podjednostkową, a po aktywacji odpowiednim ligandem ulegają otwarciu umożliwiając przepływ jonów do wnętrza komórki (np. jonów Cl⁻ w przypadku receptora GABA_A albo jonów Ca²⁺ w przypadku receptora dla glutaminianu typu NMDA);
- receptory wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej Trk (np.: dla cytokin i czynników wzrostu);
- receptory jądrowe (np. receptory hormonów steroidowych czy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach);
- receptory związane z układem efektorowym przez białka G tzw. GPCRs (dla „powolnych” neuroprzekaźników i hormonów).

1.6.2 Receptory związane z białkami G

Receptory związane z białkami G (GPCRs, ang. *G-Protein Coupled Receptors*) stanowią największą nadrodzinę białek odbierających sygnały, których geny obejmują 3-5% całego genomu u zwierząt. U ssaków zidentyfikowano dotychczas ok. 800-1000 podtypów GPCR (Bouvier 2001, Kobilka 2007), do których należą receptory dla większości neuroprzekazników i neuromodulatorów (np. receptory adrenergiczne, dopaminowe, serotoninowe, opioidowe, cholinergiczne i in.), a także hormonów (np. glukagon czy oksytocyna) oraz receptory w nabłonku węchowym i rodopsyna (Kroeger i wsp. 2004).

1.6.3 Struktura receptorów sprzężonych z białkami G

Wspólną cechą poznanych GPCR jest homologia strukturalna pojedynczego łańcucha polipeptydowego tworzącego siedem hydrofobowych domen transbłonowych o strukturze α -helisy (rycina 1.6-2), stąd też ich alternatywna nazwa to 7TMRs (ang. *seven-transmembrane receptors*). Domeny TM połączone są hydrofilowymi pętlami zewnątrzkomórkowymi ec1-3 (ang. *extracellular loop*), które wraz z N-końcem łańcucha polipeptydowego odpowiadają za wiązanie liganda oraz pętlami wewnątrzkomórkowymi ic1-3 (ang. *intracellular loop*), które wraz ze zlokalizowanym w cytoplazmie C-końcem łańcucha polipeptydowego zapewniają interakcje z białkami G (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Kobilka 2007).



Rycina 1.6-2. Schemat receptora sprzężonego z białkiem G (zmodyfikowano wg Oldham i Hamm 2008).

O ile w obrębie domen błonowych receptory te wykazują wysoką homologię, o tyle rozmiar i struktura elementów zewnątrz- i wewnątrz-komórkowych zmieniają się w szerokim zakresie, od najbardziej „kompaktowego” białka jakim jest rodopsyna, aż po receptory z długą pętlą ic-3 (jak np. receptory dopaminowe D₂) czy długim C-końcem (jak np. receptory dopaminowe D₁). Poza głównymi elementami strukturalnymi do wspólnych cech receptorów 7TM należą:

- mostki disiarczkowe pomiędzy resztami cysteiny na pętlach zewnątrzkomórkowych, które umożliwiają rearanżację α helis odpowiednią dla związania danego przekaźnika;
- miejsce potranslacyjnej palmitylacji w obrębie C-końca;
- miejsca glikozylacji w rejonie N-końca;
- miejsca fosforylacji w obrębie pętli wewnątrzkomórkowych i C-końca, które pełnią funkcję w procesach desensytyzacji i internalizacji receptorów (Vauquelin i von Mentzer 2007).

W oparciu o homologię sekwencji receptory sprzężone z białkami G podzielono na trzy klasy (lub rodziny): A, B i C (Bouvier 2001, Minneman 2007, Vauquelin i von Mentzer 2007).

Klasa A (ang. *rhodopsin-like*) stanowi największą, bo obejmującą ok. 90% GPCRs, grupę receptorów wiążących małe molekuly i ligandy peptydowe w obszarze kieszeni hydrofobowej. Długość C-końca i pętli ic-3 są niezwykle zróżnicowane w tej klasie receptorów. W przypadku ok. 260 przedstawicieli w obrębie C-końca może występować motyw strukturalny, tzw. helisa VIII (Ballesteros i Palczewski 2001). W obrębie N-końca, pętli ic-3 oraz C-końca zidentyfikowano również wewnętrznie nieustrukturalnione regiony – *IUP-like* (ang. *intrinsically unstructured proteins*) (Jaakola i wsp. 2005). Kluczową rolę w wiązaniu ligandów przez receptory klasy A odgrywają obszary transbłonowe, bardziej szczegółowo opisane dla receptorów dopaminowych w rozdziale 1.7-2.

Do typowych przedstawicieli receptorów klasy A oprócz rodopsyny należą receptory dla amin biogennych, w tym receptory adrenergiczne α i β czy dopaminowe D₁ i D₂, receptory peptydów takich jak opioidy oraz receptory w nabłonku węchowym. Cząsteczka rodopsyny była pierwszym, i do niedawna jedynym, białkiem należącym do GPCR, dla którego zidentyfikowano strukturę krystaliczną (Palczewski i wsp. 2000, Kobilka 2007, Mustafi i Palczewski 2009), na podstawie której podejmowano liczne próby tworzenia modeli komputerowych pozostałych receptorów klasy A GPCR (Mobarec i Filizola 2008, Topiol i Sabio 2009). W ostatnim czasie opisano na poziomie atomowym cząsteczkę

receptora adrenergicznego β_2 (Cherezov i wsp. 2007, Rasmussen i wsp. 2007, Rosenbaum i wsp. 2007, 2009) oraz określono strukturę krystaliczną ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} (Jaakola i wsp. 2008). Określenie struktury przestrzennej receptorów 7TM, jak i innych białek zakotwiczonych w błonie jest niezwykle trudne, głównie z powodu trudności z uzyskaniem stabilnego, homogennego białka.

Klasa B to mała grupa receptorów dla dużych peptydów, takich jak cytokiny, glukagon czy parathormon. Receptory te mają relatywnie długi N-koniec łańcucha polipeptydowego, na którym zlokalizowane są domeny wiążące hormony. Zaliczane są tu też receptory kortykoliberyny (CRF, ang. *corticotropin releasing factor*).

Klasa C jest najmniej liczną grupą, którą tworzą receptory dla glutaminianu (mGlu) i GABA ($GABA_B$), receptory smakowe oraz receptory dla wapnia czy niektórych feromonów (Minneman 2007). Miejsce wiązania ligandów jest zlokalizowane na charakterystycznie długim N-końcu białka (Devi 2001, Pin i wsp. 2007).

Należy dodać, że dużą część receptorów sprzężonych z białkami G stanowią tzw. receptory sieroce o znanej strukturze aminokwasowej lecz o nieznanym, jak na razie, ligandzie.

1.6.4 Przekazywanie sygnału przez GPCR

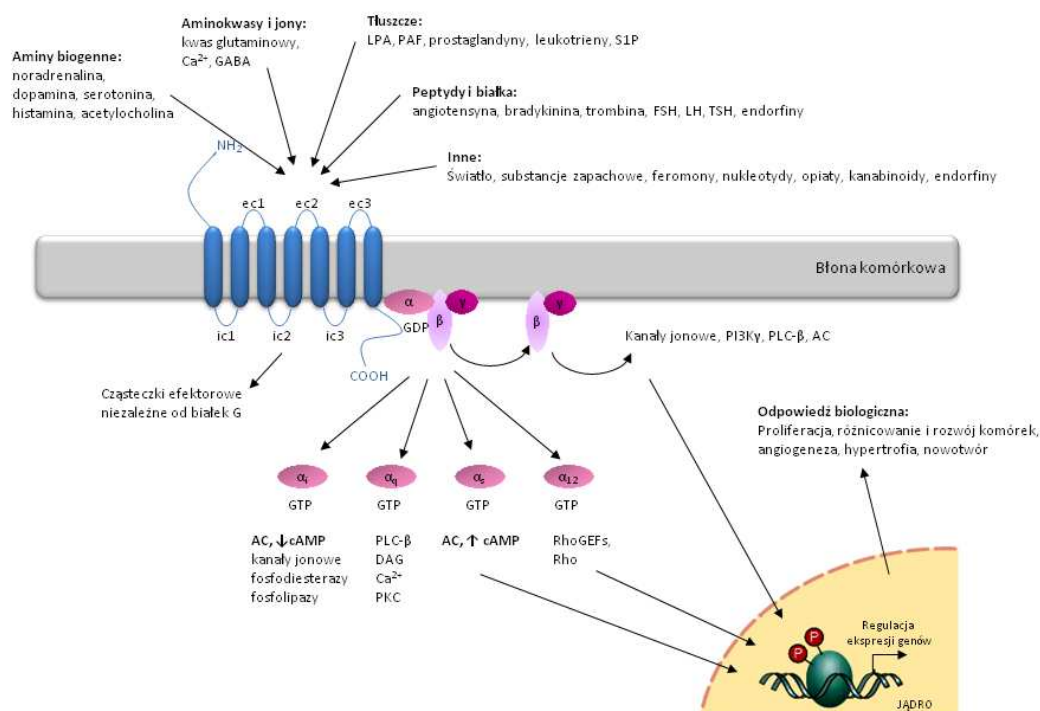
Pomimo różnorodności strukturalnej pierwszy etap sygnalizacji w przypadku wszystkich GPCRs jest jednakowy: po związaniu cząsteczki sygnałowej aktywny receptor (R^*) katalizuje wymianę nukleotydu GDP (ang. *guanosine diphosphate*) na GTP (ang. *guanosine triphosphate*) prowadzącą do dysocjacji heterotrimerycznego białka G na: podjednostkę α i kompleks $\beta\gamma$, które są zdolne do aktywacji lub blokady szerokiej gamy efektorów (Kobilka 2007) (rycina 1.6-3).

Białka G to rodzina związanych z błoną polipeptydów pośredniczących w przekazywaniu sygnału pomiędzy receptorem a efekтором (Johnston i Siderovski 2007). Zbudowane są z trzech podjednostek: podjednostki α (38-52 kDa) wiążącej nukleotyd guaninowy i stanowiącej element rozpoznawalny przez receptor, podjednostki β (35kDa) i podjednostki γ (8-10 kDa), które występują w postaci kompleksu β - γ pełniącego funkcję pomocniczą w stosunku do podjednostki α (Vauquelin i von Mentzer 2007). W oparciu o sekwencję aminokwasową podjednostki α , białka G zostały podzielone na cztery rodziny (Johnston i Siderovski 2007):

- G_s – zawierające podjednostkę α_s lub α_{olf} (występującą w nabłonku węchowym) stymulujące cyklazę adenylową (AC, ang. *adenylate cyclase*);

- $G_{i/o}$ – składające się z trzech odmiennych rodzajów podjednostek α_i (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} lub ich wariantów mieszanych) - hamujące AC, podjednostek α_o (α_{o1} i α_{o2}) - aktywujące kanały potasowe K^+ , dwóch α_t (α_{t1} i α_{t2}) - hamujące kanały wapniowe Ca^{2+} , podjednostki α_{gust} – występująca w nabłonku smakowym oraz podjednostki α_z - aktywująca fosfodiesterazę;
- $G_{q/11}$ – rodzina składająca się z następujących podjednostek α : α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} i α_{16} (przy czym dwie ostatnie podjednostki wydają się być ludzkim i mysim odpowiednikiem tego samego genu) - hamujące fosfolipazę C (PLC, ang. *phospholipase C*),
- $G_{12/13}$ – składająca się tylko z dwóch typów podjednostek α_{12} i α_{13} o nieznanej dokładnie funkcji, ale opisano ich oddziaływanie na wymiennik jonowy Na^+/H^+ (Cabrera-Vera i wsp. 2003).

Aktywny receptor podlega specyficznej fosforylacji przez kinazę białkową zależną od cAMP (PKA, ang. *protein kinase A*) lub rodzinę kinaz GRK (ang. *G-Protein Coupled Receptor Kinases*), co prowadzi do dezaktywacji receptora i preferencyjnego wiązania β -arestyny do aktywnej ufosforylowanej formy receptora, a w efekcie zapobiega dalszej aktywacji białka G (Gurevich i Gurevich 2004, Moore i wsp. 2007, Pflieger i wsp. 2007). Następuje wtedy internalizacja receptora, a w efekcie przekierowanie informacji na kaskadę wtórnych szlaków sygnalizacyjnych (rycina 1.6-3) (DeWire i wsp. 2007). Enzymy efektorowe, do których dociera sygnał od receptora poprzez odpowiednie białko G, prowadzą do powstania wtórnych przekźników, w tym: cAMP (cykliczny AMP), cGMP (cykliczny GMP), DAG (diacyloglicerol) i IP_3 (1,4,5-trifosforan inozytolu), które z kolei prowadzą m. in. do aktywacji kinaz, otwarcia kanałów Ca^{2+} i K^+ czy tworzenia kwasu arachidonowego (Vauquelin i von Mentzer 2007, Cabrera-Vera i wsp. 2003).



Rycina 1.6-3. Schemat transmisji sygnału GPCRów przez różnorodne szlaki przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, które regulują procesy komórkowe, jak: wzrost, różnicowania komórek czy angiogeneza. Użyte skróty: AC – cyklaza adenylova, DAG – diacylglicerol, FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*), GEF – czynnik wymiany nukleotydu guaninowego (ang. *guanine nucleotide exchange factor*), LH – hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*), LPA – kwas lizofosfatydowy (ang. *lysophosphatidic acid*), PAF – czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet activating factor*), PI3K – kinaza 3 fosfatydoloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), PKC – kinaza białkowa C, PLC – fosfolipaza C, S1P – fosforan sfingozyny (ang. *sphingosine-1-phosphate*); TSH – hormon tyreotropowy (ang. *thyroid-stimulating hormone*) (wg. Marinissen i Gutkind 2001 zmodyfikowano).

Warto zauważyć, iż nieprawidłowości w procesie zarówno aktywacji, jak i terminacji szlaków sygnalizacyjnych mogą prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, objawiających się często ciężkimi schorzeniami.

Receptory sprzężone z białkami G odpowiadają na różne bodźce zewnętrzne (światło, zapach), jak i wewnętrzne (hormony, neurotransmitery, zewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia Ca^{2+} i in.). Są one celem działania ponad połowy leków stosowanych obecnie w terapii (Milligan 2007, 2009; Johnston i Siderovski 2007), a ich znaczenie biologiczne uzasadnia olbrzymi wysiłek wkładany w wyjaśnienie mechanizmów funkcjonowania. Wydaje się to tym bardziej istotne w kontekście opisywanego udziału drobnych zmian w sekwencji genów kodujących GPCR w etiopatogenezie różnych schorzeń (Schöneberg i wsp. 2004), np. polimorfizmy w obrębie receptorów dopaminowych D_1 jak i D_2 wydają się mieć znaczenie w etiopatogenezie schizofrenii (Liu i wsp. 2003, Duan i wsp. 2003), dlatego też poznanie dokładnych mechanizmów

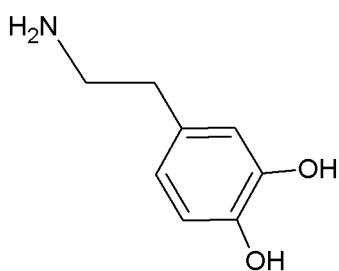
wpływających na działanie tych receptorów może być kluczowe dla znalezienia lepszych leków przeciwpsychotycznych.

1.7 Transmisja dopaminergiczna

Transmisja sygnału poprzez GPCR ma ogromne znaczenie w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami nerwowymi, gdyż poprzez te receptory działają m.in. aminy biogenne, które są głównymi – obok aminokwasów i peptydów – neuroprzekaznikami. Przedmiotem niniejszej pracy są badania dotyczące receptorów dopaminowych, dlatego też poniżej przedstawiono ich charakterystykę, poprzedzając ją krótkim omówieniem roli dopaminy w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

1.7.1 Dopamina w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego

Dopamina (3,4-hydroksyfenyloetyloamina) należy do amin katecholowych i podobnie jak noradrenalina i adrenalina pełni funkcję neuroprzekaznika w mózgu ssaków. Kontroluje ona aktywność lokomotoryczną, funkcje poznawcze, emocje, tzw. układ nagrody, pobieranie pokarmu oraz reguluje uwalnianie prolaktyny. Pełni również liczne funkcje obwodowe jako modulator funkcji naczyń krwionośnych czy nerek (Missale i wsp. 1998).



Rycina 1.7-1. Struktura chemiczna dopaminy (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diol). Struktura wykonana przy użyciu programu CHEMSKETCH V.12.

Początkowo jej rola była niedoceniana, dopiero pod koniec lat 50-tych Arvid Carlsson wykazał, że pełni ona rolę neuroprzekaznika niezależnie od noradrenaliny, a doświadczalnie wywołany jej niedobór w mózgu powoduje zaburzenia lokomotoryczne, analogiczne do objawów choroby Parkinsona. Badania nad tą aminą przyczyniły się w późniejszym czasie do sformułowania tzw. dopaminowej hipotezy schizofrenii (Seeman i wsp. 1987, Seeman 2009). Zaobserwowana przez Paula Greengarda inicjacja fosforylacji białek w komórkach postsynaptycznych wywołana aktywacją receptorów dopaminowych

oraz utrwalanie śladu pamięciowego udowodnione przez Erica Kandella przyczyniły się do przyznania wymienionej trójce naukowców Nagrody Nobla w roku 2000 w dziedzinie fizjologii i medycyny. Zainteresowanie układem dopaminergicznym w ciągu ostatnich 30 lat wynika z faktu, iż w pewnych stanach patologicznych, takich jak choroba Parkinsona, schizofrenia, syndrom Tourette'a czy hiperprolaktynemia zaobserwowano zaburzenia właśnie transmisji dopaminergicznej (Seeman 2009).

1.7.2 Receptory dopaminowe

Ogromny postęp w dziedzinie badań nad transmisją dopaminergiczną dokonał się po wprowadzeniu metod klonowania do badań nad receptorami, które – w przeciwieństwie do tego, co sądzono wcześniej – wykazały wysoki poziom złożoności. Wyizolowano DNA i scharakteryzowano pięć podtypów receptorów dopaminowych, co pozwoliło na określenie struktury białek receptorowych, ich lokalizację w OUN oraz umożliwiło ekspresję receptorów *in-vitro* i ich charakterystykę farmakologiczną. Podjęto również próby wyznaczenia możliwych korelacji zmian w obrębie sekwencji genów receptorów dopaminowych ze specyficznymi jednostkami chorobowymi. Zastosowanie metod hybrydyzacji *in-situ* i łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), przy użyciu poznanych sekwencji genów kodujących receptory, pozwoliło określić lokalizację receptorów dopaminowych we właściwych strukturach mózgu oraz tkankach obwodowych.

Zgodnie z ujęciem klasycznym określenie funkcji pojedynczego receptora jest możliwe na podstawie identyfikacji jego selektywnych agonistów oraz antagonistów (Missale i wsp. 1998). W ten sposób wyjaśniono częściowo rolę receptorów dopaminowych D₁ oraz D₂ w kontroli licznych funkcji organizmu a zarazem ich interakcji z innymi neuroprzekaźnikami. Wobec stosunkowo niskiej ekspresji receptorów typu D₃, D₄ i D₅ oraz braku wysoce selektywnych ligandów tych receptorów, trudne jest pełne poznanie ich funkcji. Wyciszenie ekspresji genów, przy użyciu homologicznych rekombinacji, do inaktywacji wybranego genu pozwoliło na nowe podejście do badania funkcji poszczególnych podtypów receptorów dopaminowych, co przyczyniło się do pokonania niedogodności związanej z brakiem selektywnych ligandów.

1.7.2.1 Klasyfikacja receptorów dopaminowych

W latach 70-tych zaobserwowano dwie populacje receptorów dopaminowych o odmiennych własnościach, a w roku 1979 Keibabian i Calne zaproponowali podział

receptorów dopaminowych na dwie podrodziny: jedna była dodatnio sprzężona z cyklazą adenylową AC (podrodzina D1), a druga wydawała się działać niezależnie od cAMP (podrodzina D2) (Kebabian i Calne 1979). Po wprowadzeniu i zastosowaniu metod klonowania wyodrębniono trzy nowe typy receptorów dopaminowych, które nazwano D₃ (Sokoloff i wsp. 1994), D₄ (Van Tol i wsp. 1991) oraz D₅ (Sunahara i wsp. 1991). Na podstawie zaawansowanych badań strukturalnych, farmakologicznych i biochemicznych zaobserwowano, że wszystkie typy receptorów dopaminowych można sklasyfikować zgodnie z zaproponowanym w roku 1979 podziałem na dwie podrodziny (Kebabian i Calne 1979). Obecnie wyróżniamy:

- **podrodzinę D1** (ang. *D1-like*) – która obejmuje receptory D₁ i D₅ kodowane przez geny o strukturze ciągłej, nie zawierające intronów w obrębie sekwencji kodującej. Oprócz pozytywnej stymulacji cyklazy adenylowej, mogą być one sprzężone z innymi drogami sygnalizacyjnymi: stymulacją PLC, produkcją IP₃ (Undie i wsp. 1994), regulacją kanałów wapniowych Ca²⁺, hamowaniem antyportu Na⁺/H⁺ i Na⁺/K⁺-ATPazy. Pośrednio uczestniczą również w aktywacji fosfolipazy A₂ i stymulacji kanałów potasowych typu GIRK (ang. *G-protein-dependent inward rectifier*) (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Missale i wsp. 1998);
- **podrodzinę D2** (ang. *D2-like*) – która obejmuje receptory D₂, D₃ i D₄ kodowane przez geny o strukturze nieciągłej, zawierające zmienną liczbę intronów. W przypadku receptora dopaminowego D₂ zidentyfikowano dwie izoformy różniące się odcinkiem długości 29 aminokwasów w obrębie pętli ic-3: krótką D_{2s} (ang. *short*) i długą D_{2L} (ang. *long*). Niedawno odkryto izoformę D_{2Longer}, która zawiera dodatkowo, w stosunku do D_{2L}, walinę i glutaminę (Liu i wsp. 2000). Podrodzina D2 charakteryzuje się ujemnym lub neutralnym wpływem na AC, receptory te mogą być sprzężone z hydrolizą fosfatydyloinozytolu, regulują aktywność kanałów jonowych i aktywują szlak kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein*). Podobnie jak podrodzina receptorów D1, hamują one Na⁺/K⁺-ATPazy i aktywują fosfolipazę A₂ (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Missale i wsp. 1998).

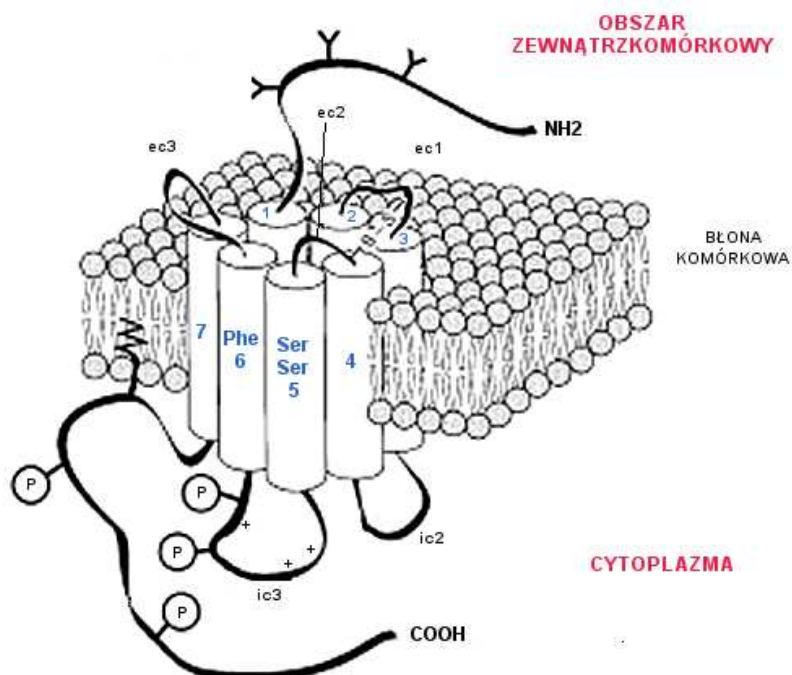
Tabela 1.7-1. Charakterystyka receptorów dopaminowych (na podstawie Missale i wsp. 1998).

	Podrodzina D1		Podrodzina D2			
	D ₁	D ₅	D ₂		D ₃	D ₄
			D _{2L}	D _{2S}		
Długość łańcucha	446aa	477aa	414aa	443aa	400aa	387-515aa
Długość pętli ic-3	57aa	50aa	134aa	443aa	120aa	101-261aa
Długość C-końca	113aa	116aa	16aa		16aa	18aa
Liczba intronów	-	-	6		5	3
Lokalizacja chromosomalna	5q35.1	4p15.1-16.1	11q22-23		3q13.3	11p15.5

1.7.2.2 Budowa receptorów dopaminowych

Receptory dopaminowe to glikoproteiny należące do klasy A GPCR, zbudowane z siedmiu domen transblonowych oznaczonych symbolami TMI-VII. Na podstawie analizy sekwencji wykazano wysoki stopień homologii domen dla różnych typów receptorów. Odcinki transblonowe są połączone ze sobą pętlami zewnątrzkomórkowymi ec1-3 oraz pętlami wewnątrzkomórkowymi ic1-3. N-koniec tych receptorów, zlokalizowany w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zawiera podobną liczbę aminokwasów i zmienną ilość miejsc glikozylacji (O'Dowd 1993). Budowa C-końca, umieszczonego w cytoplazmie, jest zasadniczo różna dla obu podrodzin: receptory D1 charakteryzują się siedmiokrotnie dłuższym C-końcem (rycina 1.7-2), bogatym w reszty seryny i treoniny oraz zawierającym resztę cysteiny, której palmitylacja wspomaga zakotwiczenie receptora w błonie. Kolejna różnica dotyczy długości pętli ic-3, która w przypadku receptorów D2 jest długa, co jest cechą charakterystyczną receptorów hamujących AC (poprzez białko G_i). Receptory dopaminowe D1 mają krótką pętlę ic-3, podobnie jak inne receptory sprzężone z białkiem G_s.

Ukierunkowana mutagenеза i metody modelowania białek wykazały, że hydrofobowe domeny TM biorą udział w wiązaniu agonistów, wysoce konserwatywne reszty aminokwasowe tworzą tzw. kieszeń hydrofobową (Mansour i wsp. 1992, Ballesteros i wsp. 2001). Szczególne znaczenie mają: reszta kwasu asparaginowego w TM III (wiązanie grupy aminowej do łańcucha bocznego dopaminy), dwie reszty seryny w TM V (wiązanie wodorowe z grupami hydroksylowymi układu katecholowego dopaminy (Cox i wsp. 1992, Tomic i wsp. 1993) oraz fenyloalanina w TM VI (stabilizuje oddziaływania z pierścieniem aromatycznym). Dodatkowo w aktywacji receptorów dopaminowych (D₁ i D₂) oraz w wiązaniu liganda uczestniczy reszta kwasu asparaginowego w TM II (Tomic i wsp. 1993, Neve i wsp. 1991).

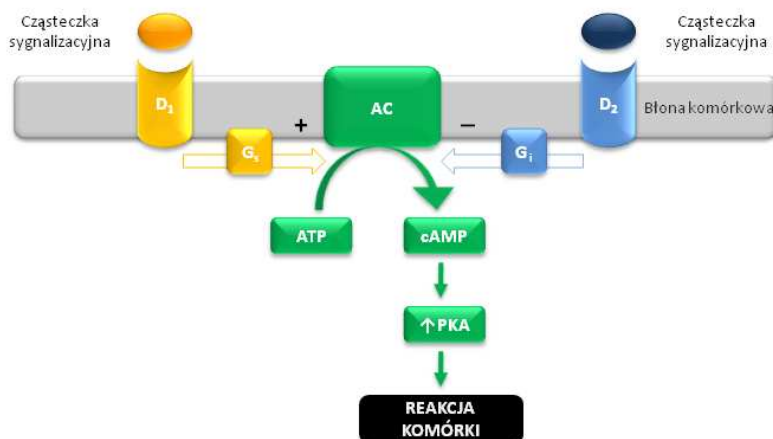


Rycina 1.7-2. Struktura receptora dopaminowego D₁ (wg Missale i wsp. 1998 zmodyfikowano).

1.7.2.3 Transdukcja sygnału przez receptory dopaminowe

Od momentu zidentyfikowania receptorów dopaminowych prowadzono liczne badania dotyczące połączeń szlaków dopaminergicznych z układami wtórnych przekazników. Pierwotnie doświadczenia wykonywane były na tkance mózgowej, a po sklonowaniu receptorów dopaminowych zastosowano linie komórkowe, w których można było prowadzić ekspresję odpowiedniego typu receptora. Zaletą takiego układu jest uzyskanie czystej populacji danego receptora, podczas gdy większość obszarów mózgu zawiera kombinację receptorów dopaminowych różnych typów. Niemniej jednak heterologiczny układ komórkowy posiada tę wadę, iż mogą nie występować w nim wszystkie potrzebne białka G lub wtórne przekazniki, co w efekcie może czasem przyczynić się do uzyskania sprzecznych wyników.

Pobudzenie receptorów dopaminowych D₁ i D₅ prowadzi do stymulacji AC (sprzężenie z podjednostką α białka G_s) i wzrostu produkcji cAMP. Receptory dopaminowe D₂ hamują aktywność AC (poprzez białko G_i), a tym samym obniżają podstawową i stymulowaną forskoliną syntezę cAMP. Pobudzenie receptora D₃ nie wpływa na aktywność AC lub tylko słabo hamuje syntezę cAMP stymulowaną forskoliną. Schemat regulacji aktywności AC przez receptory dopaminowe D₁ i D₂ przedstawiono na rycinie 1.7-3.



Rycina 1.7-3. Stymulacja aktywności cykazy adenylowej (AC) za pośrednictwem białek G. Pobudzenie receptorów D₁ prowadzi do stymulacji AC przez białka G_s. W rezultacie następuje odpowiednia stymulacja kinazy białkowej A (PKA). Receptory dopaminowe D₂ hamują AC przez białka G_i (w oparciu o Vauquelin i von Mentzer 2007).

Receptory dopaminowe (D₁ i D₂) wpływają na wewnątrzkomórkowy poziom wapnia poprzez hydrolizę fosfatydyloinozytolu prowadzącą do uwalniania Ca²⁺ z magazynów wewnątrzkomórkowych czy stymulację aktywności kanałów wapniowych (Missale i wsp. 1998). Ponadto pobudzenie receptorów D₂ prowadzi do stymulacji aktywności PLC (za pośrednictwem białek G_o/G_q). Wykazano nie tylko sprzężenie receptorów D₂ z kanałami potasowymi K⁺, ale opisano również aktywację wymiennika Na⁺/H⁺ (regulacja pH we wnętrzu komórki) i stymulację Na⁺/K⁺-ATPazy, która jest odpowiedzialna za pobudliwość komórek nerwowych oraz aktywację białek Ras i szlaku kinaz MAP (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Missale i wsp. 1998, Vauquelin i von Mentzer 2007). Należy jednak dodać, że wyniki przedstawiane w literaturze często są przeciwstawne, co wynika z prowadzenia badań na różnych tkankach i liniach komórkowych.

1.8 Oligomeryzacja receptorów sprzężonych z białkami G

Przez wiele lat uważano, że GPCR funkcjonują w postaci monomerów aktywujących serie wtórnych przekaźników w wyniku związania ligandu i aktywacji białek G, a pojawiające się już w latach 70-tych doniesienia dotyczące potencjalnej dimeryzacji GPCR (Limbird i Lefkowitz 1976) nie zostały powszechnie uznane. Początkowo GPCR opisywano jako przełączniki bimodalne między stanem podstawowym (R) a wzbudzonym (R*). Równowaga między tymi stanami warunkowała podstawową aktywność receptora, a efektywność ligandu związana była z jego zdolnością do przesunięcia tej równowagi.

Zgodnie z tym modelem ligand stabilizujący formę R^* to pełny agonista. Częściowi agoniści wykazują powinowactwo zarówno do formy R jak i R^* , natomiast odwrotni agoniści stabilizują formę R^* . Antagoniści nie mają wpływu na podstawową aktywność receptora, blokują dostęp innych ligandów do niego (Kobilka 2007, Vauquelin i von Mentzer 2007). Okazuje się jednak, że w przypadku większości GPCR transmisja jest dużo bardziej skomplikowana, a powyższy model stosunkowo dobrze opisuje jedynie rodopsynę. Model kompleksu potrójnego (ang. *ternary complex*) zakłada, że receptor może przyjmować konformację stanu aktywnego nawet gdy jest sprzężony z białkiem G oraz, że białko G może ulec sprzężeniu nawet w nieobecności agonisty. Obecnie najszerzej akceptowanym jest tzw. rozszerzony model kompleksu potrójnego (Samama i wsp. 1993), inaczej model dwóch stanów, w którym receptor w stanie R^* może przyjmować różne konformacje, gdy jest i, gdy nie jest związany z białkiem G. Opisano także teoretyczne modele transdukcji sygnału za pośrednictwem GPCR i białek G. Pierwszy to model dyfuzyjny, w którym związanie agonisty do receptora indukuje aktywację wielu białek G. Drugi model zakłada istnienie kompleksu tworzonego przez receptor, białka G i efekторы – model stechiometryczny. Liniowy model przekazywania sygnału obowiązywał do połowy lat 90-tych XX. wieku.

Ponieważ dimeryzacja receptorów została zaobserwowana w rekombinantowych systemach komórkowych (Maggio i wsp. 1993, Scarselli i wsp. 2001, Hebert i wsp. 1996, Zeng i Wess 1999), głównym zarzutem przeciwników tej koncepcji jest to, że proces ten może być wynikiem nadekspresji receptora i stąd też może nie mieć znaczenia fizjologicznego. Jednak obecnie hipoteza oligomeryzacji jest coraz powszechniej akceptowana, chociaż nadal nie wiadomo dokładnie, do jakiego stopnia zjawisko to jest powszechne (Pin i wsp. 2007). Wydaje się jednak, że zjawisko oligomeryzacji receptorów jest niezwykle ważne w wielu aspektach biogenezy i funkcji receptora takich jak: dojrzewanie, faldowanie, prawidłowa błonowa ekspresja, transdukcja sygnału, specyficzność czy desensytyzacja (Bulenger i wsp. 2005, Genedani i wsp. 2005, Lee i wsp. 2002, Terrillon i Bouvier 2004, Torvinen i wsp. 2005).

GPCRs, podobnie jak wszystkie białka, są syntetyzowane na szorstkiej siateczce endoplazmatycznej (RER, ang. *rough endoplasmic reticulum*). Powstający receptor musi przejść wiele etapów: syntezy i „kontroli jakości” w ER oraz modyfikacji potranslacyjnych, zanim zostanie przetransportowany do błony komórkowej. Nie wiadomo dotychczas czy receptory są dostarczane do błony w formie monomerycznej czy też jako oligomery, nie wiadomo również w jakiej formie występują one w kolejnych etapach procesu dojrzewania

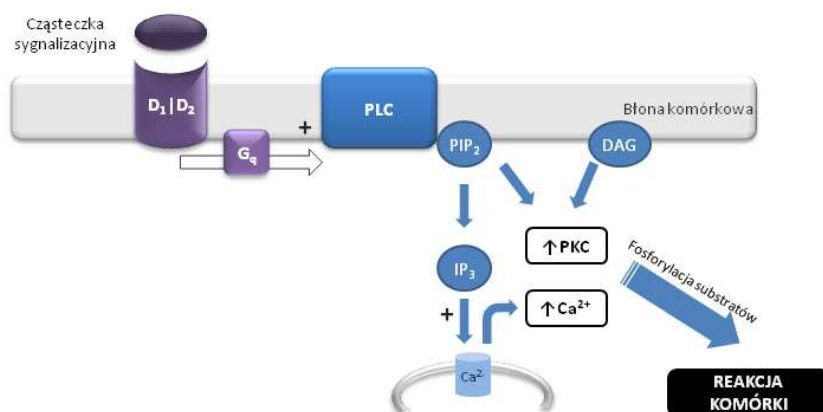
(Agnati i wsp. 2005, Devi 2001, Ferre i wsp. 2007, Fuxe i wsp. 2008, Hernanz-Falcón i wsp. 2004, Milligan 2007, 2009). Ponieważ jednak żadna ze stosowanych metod nie pozwala stwierdzić czy powstające kompleksy są dimerami, czy też oligomerami, w niniejszej pracy – jak i w literaturze – określenia te zastosowano zamiennie.

Dla wielu receptorów konstytutywne tworzenie homodimerów jest wymagane do prawidłowego transportu na powierzchnię komórki (White i wsp. 1998). Bez jednoznacznej odpowiedzi pozostaje jednak pytanie czy dimeryzacja jest zjawiskiem konstytutywnym czy też promowanym wiązaniem liganda. I o ile ta ostatnia koncepcja przeczyłaby oligomeryzacji w trakcie biosyntezy, tym niemniej w literaturze można znaleźć doniesienia ją potwierdzające (Kroeger i wsp. 2001). Należy jednak pamiętać, że z uwagi na szeroką gamę stosowanych metod badawczych i trudności interpretacyjne, uzyskiwane wyniki często są niespójne.

Podstawową funkcję jaką przypisuje się homooligomeryzacji receptorów jest tworzenie powierzchni formowania wielobiałkowych kompleksów funkcjonalnych (zawierających receptory, białka G, molekuly efektorów oraz białka adaptorowe). W tworzeniu powierzchni dimeryzacji sugerowany jest udział różnych domen GPCR, oddziaływań kowalencyjnych oraz niekowalencyjnych (Romano i wsp. 2001, Zhang i wsp. 2001). Zaproponowano dwa alternatywne modele przestrzennej organizacji dimerów GPCR. Pierwszy z nich, model tzw. wymiany domen (ang. *domain swapping*) zakłada, że każda podjednostka dimeru podzielona jest na dwie substrukтуры wymieniane między sobą przez dimeryzujące monomery, w obrębie których dochodzi do dużych zmian konformacyjnych (Gouldson i wsp. 2000). Drugi, model tzw. kontaktu domen (ang. *domain contact* lub *contact dimer*), formowanie dimeru tłumaczy oddziaływaniem powierzchni molekularnych bez dużych zmian konformacyjnych w strukturze monomeru (Fotiadis i wsp. 2003, Guo i wsp. 2003, Lee i wsp. 2003, Milligan 2008, Nemoto i Toh 2004). Dimeryzacja może być wymagana do aktywacji receptora, a konstytutywna dimeryzacja może wyjaśniać konstytutywną transmisję sygnału przez receptor (Gazi i wsp. 2003, Kroeger i wsp. 2001).

Oligomery GPCR niewątpliwie mogą pełnić funkcję kompleksu sygnałowego, a nabywanie odmiennej selektywności sprzęgania z białkiem G i odpowiednim efektem przez dimery stanowi bezpośredni efekt heterooligomeryzacji mogący zmieniać sygnał generowany wewnątrz komórki (Fuxe i wsp. 2008). Własność ta została opisana m. in. także dla receptorów dopaminowych D₁ i D₂. Okazuje się bowiem, że jednoczesna stymulacja obydwu receptorów tworzących heterodimery prowadzi do selektywnego

oddziaływania z białkiem G_q (rycina 1.8-1), podczas gdy każdy z receptorów stymulowany indywidualnie wchodzi w interakcję z białkiem G_s (D_1) lub G_i (D_2) (George i O'Dowd 2007, Lee i wsp. 2004, Rashid i wsp. 2007). W dalszych badaniach wykazano ponadto, że jednoczesna stymulacja obydwu wymienionych receptorów dopaminowych nasila proces heterodimeryzacji (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006), stąd można wysnuć wniosek, że to dimery D_1 - D_2 wchodzi w interakcje z białkiem G_q , chociaż na razie nie ma na to bezpośrednich dowodów.



Rycina 1.8-1. Schemat aktywacji alternatywnego szlaku białek G_q przy jednoczesnej stymulacji heterodimerów receptorów dopaminowych D_1 - D_2 prowadzi do aktywacji fosfolipazy C (PLC).

Znaczenie oligomeryzacji w procesie rozpoznawania ligandów i sygnalizacji dobrze ilustruje przykład receptora $GABA_B$, który jest funkcjonalny jedynie jako heterodimer utworzony z dwóch naturalnie występujących lecz osobno niefunkcjonalnych receptorów $GABA_{BR1}$ i $GABA_{BR2}$ (Ng i wsp. 1999, White i wsp. 1998), ponadto natywne receptory mGluR5 występują prawie wyłącznie jako homodimery (Romano i wsp. 1996, 2001).

Zjawisko dimeryzacji może mieć szczególne znaczenie w neurotransmisji zapewniając dodatkowy poziom regulacji (Fuxe i wsp. 2007, 2008, George i wsp. 2000, Milligan 2008), szczególnie z uwagi na fakt, że do tworzenia heterodimerów może dochodzić tylko wtedy, gdy określone receptory znajdują się na tym samym neuronie. Ostatnie doniesienia wyraźnie podkreślają istotną rolę tego zjawiska zarówno w mechanizmie działania leków przeciwpsychotycznych, jak i etiopatogenezie chorób o podłożu psychotycznym (González-Maeso i wsp. 2008, Fuxe i wsp. 2008, Seeman 2009). Opublikowane dane wskazują na wzajemną regulację receptora serotoninowego $5HT_{2A}$ i metabotropowego mGluR2 (Gonzalez-Maeso i wsp. 2008), a zaburzenie tej regulacji wydaje się być odpowiedzialne za zmiany procesów poznawczych obserwowane w schizofrenii. Wydaje się również, że niektóre leki ważne w terapii schizofrenii wpływają

na zjawisko heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D₁-D₂ (Faron-Górecka i wsp. 2008).

1.8.1 Metody stosowane w badaniach oligomeryzacji GPCRs

Coraz więcej prac pokazuje, że dimeryzacja GPCRs może wpływać na wiązanie ligandów zmieniając często ich profil farmakologiczny. Pierwszych dowodów na istnienie struktur wyższego rzędu w obrębie receptorów dostarczyły badania farmakologiczne. Kompleksowa analiza wiązania z użyciem agonistów, jak i antagonistów, wskazywała na dodatnią i ujemną kooperację pomiędzy ligandami, co tłumaczono jakimś rodzajem fizycznej interakcji monomerów (Limbird i Lefkowitz 1976, Mattera i wsp. 1985). Dodatkowych dowodów dostarczyły badania przeprowadzone techniką inaktywacji promieniowaniem (ang. *radiation inactivation*), w której przyjmuje się, że dawka promieniowania jonizującego prowadząca do inaktywacji molekuly jest odwrotnie proporcjonalna do rozmiaru tej molekuly. Metoda ta wykazała, że GPCR funkcjonują w większych kompleksach niż oszacowane na podstawie masy monomeru, a wyniki takie uzyskano m.in. dla receptorów dopaminowych D₂ (Lilly i wsp. 1983) i opioidowych typu delta (Ott i wsp. 1986).

Bardziej spektakularne dowody przemawiające za dimeryzacją GPCRs pochodzą z badań opartych na tzw. *transkomplementacji*. Maggio i wsp. (1993) wykazali, że koekspresja dwóch, osobno niefunkcyjnych białek chimerycznych, w których zamieniono odcinek C-końca (TM VI-TM VII) receptorów adrenergicznego α_2 i muskarynowego M₃, prowadzi do rekonstrukcji funkcjonalnej obu receptorów. Ostatnio przeprowadzono badania z udziałem chimery receptorów dopaminowych D₂/D₃ i również w tym przypadku koekspresja obu receptorów doprowadziła do odzyskania własności funkcjonalnych i farmakologicznych każdego z receptorów (Scarselli i wsp. 2001).

Wśród powszechnie stosowanych metod biochemicznych do badania oddziaływania między receptorami należy metoda *koimmunoprecypitacji*, w której do obu badanych receptorów przyłączane są odmienne epitopy. Tak skonstruowane receptory są następnie syntetyzowane w heterologicznych układach komórkowych. Do izolacji badanych receptorów stosowane są specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko wprowadzonym epitopom. Przeciwciała wobec jednego epitopu służą immunoizolacji całego kompleksu receptorów (pod warunkiem, że zachodzi dimeryzacja), który jest wizualizowany przy użyciu przeciwciał specyficznych wobec drugiego epitopu. Podstawową wadą tej techniki jest niespecyficzna agregacja GPCR w trakcie przygotowywania próbki (Gurevich

i Gurevich 2008, Kroeger i wsp. 2004, Vauquelin i Von Mentzer 2007). Metodę tę wykorzystano do uzyskania dowodów potwierdzających homodimeryzację receptorów dopaminowych D_1 (George i wsp. 1998) oraz D_2 (Lee i wsp. 2003), a także heterodimeryzację receptorów dopaminowych D_2 z adenozynowymi A_{2A} (Fuxe i wsp. 2008, Hillion i wsp. 2002).

Potężne narzędzie w badaniach oligomeryzacji receptorów stanowią techniki biofizyczne (Grymek i wsp. 2008), w tym szeroko stosowane metody oparte na zjawisku bioluminescencji (BRET, ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) lub fluorescencji (FRET, ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), w których badany receptor połączony jest z białkiem fluorescencyjnym (akceptorem). W przypadku metody BRET emisja światła następuje w procesie katalitycznej degradacji substratu przez odpowiedni enzym, a emitowane światło wzbudza akceptor. Metoda FRET (rozdział 1.2) wykorzystuje jako donor energii inne białko fluorescencyjne (najczęściej CFP), które po wzbudzeniu zewnętrznym źródłem światła, emituje promieniowanie wzbudzające molekuly akceptora (najczęściej YFP) (Marullo i Bouvier 2007, Milligan 2004). W obu przypadkach widmo emisji fluorescencji może być zmierzone, jeśli donor i akceptor są zlokalizowane wystarczająco blisko siebie (w odległości 2-10nm). W oparciu o tę technikę zbadano dimeryzację różnych typów GPCR, w tym również receptorów dopaminowych D_2 (O'Dowd i wsp. 2005, Wurch i wsp. 2001), heterodimerów D_1 - D_2 (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006, So i wsp. 2005) czy D_2 - A_{2A} (Canals i wsp. 2003).

Ponadto w badaniach oligomeryzacji receptorów ważne są badania krystalograficzne oraz wyniki uzyskiwane z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych (Fotiadis 2003, Lodowski i wsp. 2009, Topiol i Sabio 2009). Poznanie trójwymiarowej struktury kryształów może dostarczyć bezcennych informacji o konformacji przestrzennej białka w stanie podstawowym i wzbudzonym. Do niedawna jedyną dostępną strukturą receptora pełnej długości była struktura rodopsyny. Dane krystalograficzne (rozdzielczość 2,8Å) potwierdziły, że receptor ten ma budowę dimeryczną (Lodowski i wsp. 2009, Palczewski i wsp. 2000). Doświadczenia tego typu przeprowadzono również na fragmentach receptorów z uwagi na trudności z uzyskaniem kryształów GPCR. Struktura krystaliczna wiążącej ligand domeny zewnątrzkomórkowej receptora mGluR1 ujawniła obecność disiarczkowych połączeń między dimerami (Kunishima i wsp. 2000).

2. CEL PRACY

Celem pracy jest zbadanie wpływu dwóch mutacji punktowych (tzw. cichych, tzn. nie zmieniających sekwencji aminokwasów w białku) w obrębie receptora dopaminowego D₁ na interakcję z receptorem dopaminowym D₂. Mutacje te zostały wybrane ze względu na ich postulowany udział w etiopatogenezie schizofrenii. Istnieją dane potwierdzające, że pewne naturalnie występujące polimorfizmy w obrębie genów receptorów dopaminowych mogą wpływać na podatność na schizofrenię (Litt i wsp. 1991, Liu i wsp. 1995, Ohara i wsp. 1993) lub zmieniać indywidualną odpowiedź pacjenta na terapię (Ferreira i wsp. 2008, Glatt i Jönsson 2006, Jönsson i wsp. 2003, Kawanishi i wsp. 2000, O'Donovan i wsp. 2009, Wong i wsp. 2000).

W obrębie sekwencji kodującej genów (egzony) mogą spontanicznie pojawiać się zmiany pojedynczych nukleotydów tzw. polimorfizmy (SNPs, ang. *single nucleotide polymorphisms*), prowadzące do zmiany sekwencji aminokwasowej (mutacje zmiany sensu, ang. *missense*) lub takie, które z uwagi na tzw. degenerację kodu genetycznego nie zmieniają sekwencji aminokwasowej, dlatego też nazywane są one mutacjami cichymi lub synonimicznymi (ang. *silent* lub *synonymous*). Okazuje się, że prawie 99,8% zmian w sekwencji DNA nie zmienia sekwencji białek, a mutacje ciche występują zdecydowanie częściej od mutacji zmiany sensu² i polimorfizmów w obrębie sekwencji niekodującej (Duan i wsp. 2003, Schöneberg i wsp. 2004, Venter i wsp. 2001). Do niedawna uważano, że mutacje synonimiczne są funkcjonalnie neutralne, aczkolwiek ostatnio pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia literaturowe, które w sposób przekonujący pokazują, że mogą one przyczyniać się do zmiany funkcjonowania powstającego białka (Schöneberg i wsp. 2004, Duan i wsp. 2003). W świetle stosunkowo nowej koncepcji, że receptory dopaminowe D₁ tworzą heterodimery z receptorami dopaminowymi D₂ i proces ten może mieć znaczenie w mechanizmie działania leków przeciwpsychotycznych, w niniejszej pracy postanowiono sprawdzić czy mutacje ciche w obrębie receptora dopaminowego D₁ mają wpływ na jego oddziaływanie z receptorem D₂.

² Na przykład dla receptora dopaminowego D₂ zostały opisane liczne polimorfizmy, w tym cztery nieregularne mutacje zmiany sensu, skorelowane ze schizofrenią (V96A, V154I, P310S i S311C), a także polimorfizm (-141C Ins/Del) w regionie promotorowym genu kodującego receptor D₂ (Duan i wsp. 2003, Glatt i Jönsson 2006, Grandy i wsp. 1989, Itokawa i wsp. 1993, Jönsson i wsp. 2003, Wong i wsp. 2000). Zmiana powinowactwa leków przeciwpsychotycznych do receptorów dopaminowych D₂ z wprowadzonymi mutacjami typu *missense* została zbadana i zaanalizowana w literaturze (Cravchik i wsp. 1996, Cravchik i wsp. 1999, Itokawa i wsp. 1993, Faron-Górecka i wsp. 2008, Faron-Górecka 2009, Jones i Peroutka 1998).

Cel ten został zrealizowany poprzez następujące cele szczegółowe:

- konstrukcję wariantów genetycznych receptora D_1 i ich ekspresję w modelowych komórkach eukariotycznych (linia HEK293); zbadanie parametrów wiązania, także w obecności receptora dopaminowego D_2 ;
- konstrukcję białek fuzyjnych, tj. receptorów dopaminowych D_1 (i jego mutein) oraz D_2 , połączonych z białkami fluorescencyjnymi;
- zbadanie fizycznej interakcji receptorów dopaminowych D_1 z receptorami dopaminowymi D_2 poprzez pomiar zaniku fluorescencji w czasie metodą TCSPC i obliczenie wydajności FRET;
- doświadczalne zbadanie wpływu cichych polimorfizmów receptora dopaminowego D_1 na zjawisko heterodimeryzacji receptorów D_1 - D_2 i wyznaczenie wydajności FRET;
- zastosowanie zaawansowanej metody analizy składowych czasów życia fluorescencji do wyznaczenia wydajności FRET w pomiarach czasów życia fluorescencji;
- zbadanie wpływu mutacji na lokalizację w komórce powstałych wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 .

Cel pracy realizowano nowoczesnymi technikami z zakresu biologii molekularnej (mutageneza punktowa, konstrukcja białek fuzyjnych, ekspresja pożądaných białek receptorowych w modelowych komórkach eukariotycznych), biochemii (analiza wiązania receptor-ligand) oraz zaawansowanymi metodami biofizycznymi (pomiar rezonansowego przeniesienia energii) możliwymi do zastosowania dzięki aparaturze pozwalającej na pomiar czasów zaniku fluorescencji w pojedynczej komórce.

3. MATERIAŁY

3.1 Plazmidy

Charakterystykę plazmidów wykorzystanych w pracy przedstawiono w tabeli 3.1-1.

Tabela 3.1-1. Charakterystyka plazmidów.

Nazwa	Producent	Charakterystyka
pcDNA3.1(+)/DRD1	UMR cDNA Resource Center (University of Missouri-Rolla, MO, USA)	Plazmid ekspresyjny do komórek eukariotycznych z genem kodującym ludzki receptor dopaminowy D1
pcDNA3.1(+)/DRD2	UMR cDNA Resource Center (University of Missouri-Rolla, MO, USA)	Plazmid ekspresyjny do komórek eukariotycznych z genem kodującym ludzki receptor dopaminowy D2
pEYFP-N1	BD Biosciences, Clontech	Plazmid zawierający gen dla białka fluorescencyjnego EYFP
pECFP-N1	BD Biosciences, Clontech	Plazmid zawierający gen dla białka fluorescencyjnego ECFP

Charakterystykę plazmidów skonstruowanych w prezentowanej pracy przedstawiono w tabeli 3.1-2.

Tabela 3.1-2. Charakterystyka skonstruowanych plazmidów.

Nazwa	Charakterystyka
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A}	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₁ z wprowadzoną mutacją punktową (zamiana guaniny na adeninę w pozycji 198), skonstruowany w oparciu o plazmid pcDNA3.1(+)/DRD1 (tabela 3.1-1; rozdział 4.1.2).
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A}	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₁ z wprowadzoną mutacją punktową (zamiana guaniny na adeninę w pozycji 1263), skonstruowany w oparciu o plazmid pcDNA3.1(+)/DRD1 (tabela 3.1-1; rozdział 4.1.2).
pEYFP-N1/DRD1	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₁ z dołączonym do C-końca białkiem fluorescencyjnym EYFP, skonstruowany w oparciu o plazmid pEYFP-N1 oraz pcDNA3.1(+)/DRD1 (tabela 3.1-1).
pECFP-N1/DRD2	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₂ z dołączonym do C-końca białkiem fluorescencyjnym ECFP, skonstruowany w oparciu o plazmid pECFP-N1 oraz pcDNA3.1(+)/DRD2 (tabela 3.1-1).
pEYFP-N1/DRD1 ^{G198A}	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₁ (z wprowadzoną mutacją punktową w pozycji 198) z dołączonym do C-końca białkiem fluorescencyjnym EYFP, skonstruowany w oparciu o plazmid pEYFP-N1 oraz pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A} (rozdziały 4.1.3 – 4.1.7).

pEYFP-N1/DRD1 ^{G1263A}	Plazmid zawierający gen kodujący receptor dopaminowy D ₁ (z wprowadzoną mutacją punktową w pozycji 1263) z dołączonym do C-końca białkiem fluorescencyjnym EYFP, skonstruowany w oparciu o plazmid pEYFP-N1 oraz pcDNA3.1(+)/DRD1G1263A (rozdziały 4.1.3 – 4.1.7).
---------------------------------	---

Wykorzystane w pracy plazmidy zawierały białka fluorescencyjne o ulepszonych właściwościach fotochemicznych EYFP i ECFP (APPENDIX IV), jednak dla przejrzystości do opisu syntezowanych białek, w niniejszej pracy została użyta notacja YFP – zamiast EYFP i CFP – zamiast ECFP.

3.2 Hodowla bakteryjna

Plazmidy namnażano w komórkach *Escherichia coli* szczep DH5α(Dam+) z firmy Novagen. Hodowlę bakteryjną prowadzono na pożywce LB (*Luria Bertani*) w zawiesinie lub na podłożu stałym na szalkach Petriego (tabela 3.2-1) z odpowiednim czynnikiem selekcyjnym (tabela 3.2-2).

3.2.1 Bufory i roztwory do hodowli bakteryjnej

Poszczególne bufory i roztwory przygotowano na wodzie uzdatnianej w systemie *Millipore*, a następnie filtrowano je przez filtry o średnicy porów 0,22 μm oraz 0,45 μm (*Millipore*) i przechowywano w temperaturze 4°C lub zamrażano w temperaturze -20°C.

Tabela 3.2-1. Skład buforów do hodowli i transformacji bakterii.

Nazwa	Skład	Producent
Pożywka LB ³	10% pepton (<i>Bacto-tryptone</i>)	BD
	10% NaCl	POCH
	5% ekstrakt drożdżowy (<i>Bact Yeast Extract</i>)	DIFCO Laboratories
LB-agar	10% pepton (<i>Bacto-tryptone</i>)	BD
	10% NaCl	POCH
	5% ekstrakt drożdżowy (<i>Bact Yeast Extract</i>)	DIFCO Laboratories
	15% agar	DIFCO Laboratories
Bufor NSS	0,2 M NaOH	POCH
	20% sacharoza	POCH
	0,5% SDS (siarczan dodecyłu sodu)	Sigma

3.2.2 Antybiotyki stosowane w hodowlach bakteryjnych

W zależności od plazmidu do pożywki bakteryjnej dodawano odpowiedni antybiotyk, jako czynnik selekcyjny (tabela 3.3-3).

³ pH 7,0 w temperaturze pokojowej

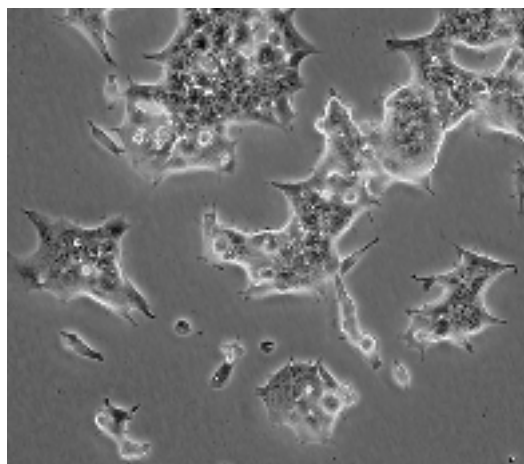
Tabela 3.2-2. Antybiotyki w hodowlach bakteryjnych.

Plazmid	Antybiotyk	Stężenie w pożywce	Producent
pcDNA3.1(+)/DRD1 pcDNA3.1(+)/DRD2	Ampicylina	100 µg/µl	Sigma
pEYFP-N1 pECFP-N1	Kanamycyna	30 µg/µl	Jelfa

3.3 Hodowla komórkowa

3.3.1 Eukariotyczna linia komórkowa

Do ekspresji białek rekombinowanych wykorzystano linię komórkową HEK293 (ang. *Human Embryonic Kidney 293*) pochodzącą z banku linii komórkowych ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) w Manassas, VA, USA (rycina 3.3-1). Hodowlę prowadzono na suplementowanej pożywce MEM (ang. *Modified Essential Medium*) (tabela 3.3-1) w inkubatorze INNOVA-CO2 (37°C, 5% CO₂) w butelkach plastikowych. Do eksperymentów rozsiewano komórki na szalki Petriego Ø100 mm (*Nunc*) lub na szkiełka nakrywkowe Ø24 mm (*Manzèl*) jak opisano w rozdziale 4.3.2.

Rycina 3.3-1. Komórki HEK293 (<https://www.atcc.org>).

3.3.2 Bufory do hodowli i transfekcji komórek HEK293

Do hodowli, rozsiewania i transfekcji komórek HEK293 stosowano bufor o składzie podanym w tabeli 3.3-1.

Tabela 3.3-1. Skład buforów i roztworów do hodowli eukariotycznej linii komórkowej.

Nazwa	Skład	Producent
Pożywka hodowlana	89%	MEM
	10%	FBS (<i>Foetal Bovine Serum</i>) plodowa surowica bydlęca
	1%	L-glutamina (200 mM)
HBS ⁴	280 mM	NaCl
	50 mM	HEPES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
PBS ⁵	137 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCl
	2 mM	KH ₂ PO ₄
Roztwór trypsyny ⁶	137,5 mM	NaCl
	10 mM	NaHCO ₃
	6 mM	KCl
	5,6 mM	Glukoza
	4 mM	HEPES
	0,7 mM	EDTA
	0,25%	Trypsyna
Mieszanina do pomiarów w komorze Bürkera	180 µl	Trypan Blue
	20 µl	Zawiesina komórek HEK293

3.3.3 Bufory i roztwory do utrwalania preparatów i pomiarów fluorescencji

Skład roztworów do utrwalania preparatów komórkowych oraz buforów do pomiarów podano w tabeli 3.3-2.

⁴ pH 7,05 w temperaturze pokojowej

⁵ pH 7,4 w temperaturze pokojowej

⁶ pH 7,6 w temperaturze pokojowej

Tabela 3.3-2. Skład buforów do preparatyki i pomiarów.

Nazwa	Skład		Producent
PBS ⁷	137 mM	NaCl	POCh
	10 mM	Na ₂ HPO ₄	POCh
	2,7 mM	KCl	Sigma
	2 mM	KH ₂ PO ₄	Merck
Bufor H ⁷	137,5 mM	NaCl	POCh
	10 mM	HEPES	Sigma
	6 mM	KCl	Sigma
	5,6 mM	Glukoza	POCh
	1,3 mM	MgCl ₂	POCh
	1,3 mM	CaCl ₂	Sigma
	0,4 mM	NaH ₂ PO ₄	POCh
roztwór PA ⁸	4%	Paraformaldehyd	Sigma
	40 ml	H ₂ O	
	50 ml	PBS	
	200 mM	NaCl	POCh
Roztwór do zatapiania szkiełek	7 g	Żelatyna	Sigma
	42 ml	H ₂ O	POCh
	50 ml	Gliceryna	POCh

3.4 Bufory i roztwory do elektroforezy żelowej DNA

Rozdział elektroforetyczny DNA prowadzono w 0,8% żelu agarozowym, którego skład podano w tabeli 3.4-1. Standard masowy *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* zakupiono w firmie Fermentas (APPENDIX IV).

Tabela 3.4-1. Skład buforów i żelu do elektroforezy DNA.

Nazwa	Skład		Producent
Bufor TAE ⁹	40 mM	Tris-HCl	Sigma
	20 mM	CH ₃ COOH	POCh
	1 mM	EDTA	Sigma
Bufor obciążający I	25%	Błękit bromofenyłu	POCh
	30%	Glicerol	POCh
		H ₂ O	
Bufor obciążający II		Blue Juice 10x	GibcoBRL
Żel agarozowy	1x	TAE	
	0,8%	Agaroza	Sigma
	4 µl	Bromek etydyny	Invitrogen

⁷ pH 7,4 w temperaturze pokojowej⁸ pH 7,3 w temperaturze pokojowej⁹ pH 8,0 w temperaturze pokojowej

3.5 Mutageneza

3.5.1 Startery

Startery do modyfikacji genu DRD1 zaprojektowano przy pomocy programu PRIMER v.1.01 (tabela 3.5-1). Sekwencje oligonukleotydów zakupiono w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA, IBB PAN w Warszawie.

Tabela 3.5-1. Sekwencje starterów.

Startery wykorzystane przy wprowadzaniu mutacji punktowych w genie DRD1		
G198Afor	5'-TCATCTCCT TTA GCTGTGTCAGATCT-3'	Wprowadza mutację punktową w DRD1 – zamiana guaniny na adeninę w pozycji 198.
G198Arev	5'-ATCTGACACAGCT TA AGGAGATGACA-3'	
G1263Afor	5'-GCCCTA TC AGTCATATTGG-3'	Wprowadza mutację punktową w DRD1 – zamiana guaniny na adeninę w pozycji 1263.
G1263Arev	5'-CCAATATGACT TGA TAGGGC-3'	
Startery wykorzystane przy wklonowaniu zmodyfikowanego genu DRD1 do plazmidu zawierającego geny dla białek fluorescencyjnych: pECFP i pEYFP		
pcDNAfor	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCC-3'	Uniwersalny starter dla plazmidu pcDNA3.1(+).
d1revxho	5'-CCG CTCGAG GGTTGGGTGCTGAC-3'	Wprowadza miejsce cięcia dla restryktazy XhoI i jednocześnie usuwa kodon stop w DRD1.

3.5.2 Zestaw do wprowadzenia mutacji

Do modyfikacji genu receptora dopaminowego D₁ zastosowano metodę ukierunkowanej mutagenezy przy użyciu zestawu *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene), który pozwala na wprowadzenie mutacji punktowych w podwójnej nici DNA. W niniejszej pracy dokonano zamiany pojedynczych aminokwasów: guaniny (G) na adeninę (A) w pozycji 198 oraz w pozycji 1263 genu DRD1.

Tabela 3.5-2. Zestaw do ukierunkowanej mutagenazy (*Quick Change*).

Enzym	Charakterystyka
PfuTurbo	polimeraza, która powiela obie nici DNA z wysokim stopniem odwzorowania
DpnI	endonukleaza, która rozpoznaje specyficznie metylowane i hemimetylowane DNA (5'-Gm6ATC-3').

3.5.3 Reakcje enzymatyczne

W reakcjach enzymatycznych użyto enzymów oraz buforów firmy Fermentas.

Tabela 3.5-3. Reakcje enzymatyczne.

Reakcja	Enzym	Bufor	Producent
PCR	polimeraza <i>Pfu</i>	bufor Pfu	Fermentas
Ligacja	ligaza faga T4	bufor T4	Fermentas
Trawienie DNA	DpnI	bufor DpnI	Fermentas
	NheI	bufor TANGO 1x	Fermentas
	XhoI	bufor TANGO 2x lub bufor R	Fermentas

3.5.4 Zestawy do izolacji i oczyszczania DNA

DNA plazmidowe oczyszczano przy pomocy komercyjnie dostępnych zestawów (tabela 3.5-4) zgodnie z zaleceniami producentów.

Tabela 3.5-4. Zestawy do izolacji i oczyszczania DNA.

Zastosowanie	Nazwa	Producent
Izolacja ultraczystego plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnej (1,5 – 3 ml)	Plasmid Mini	A&A Biotechnology
Izolacja ultraczystego plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnej (50 – 100 ml)	Plasmid Midi AX	A&A Biotechnology
	Plasmid Midi	Qiagen
Izolacja DNA z żelu agarozowego	Gel-Out	A&A Biotechnology
Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	Clean-Up	A&A Biotechnology

3.6 Analiza saturacyjna

3.6.1 Bufory do analizy saturacyjnej

Bufory do analizy saturacyjnej wiązania radioligandów sporządzono na wodzie uzdatnianej w systemie *Millipore*.

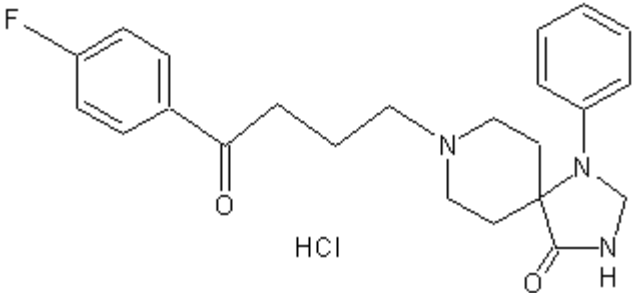
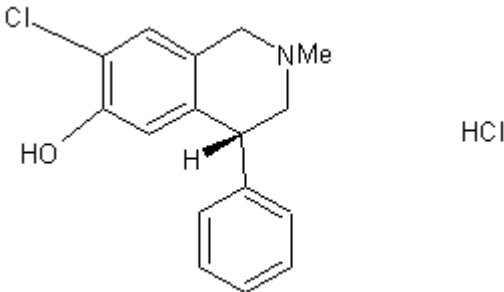
Tabela 3.6-1. Skład buforów do analizy saturacyjnej.

Nazwa	Skład		Producent
Bufor Tris-HCl ¹⁰	42 mM	Tris-HCl	Sigma
	8 mM	Trisma Base	Sigma
Bufor Tris-HCl wzbogacony	50 mM	Tris-HCl	Sigma
	120 mM	NaCl	POCh
	5 mM	KCl	Sigma
	4 mM	MgCl ₂	POCh
	1,5 mM	CaCl ₂	Sigma
	1 mM	EDTA	Sigma

3.6.2 Radioligandy

W pracy stosowano ligandy receptorów dopaminowych znakowane trytem [³H].

Tabela 3.6-2. Radioligandy.

Radioligand	Budowa chemiczna
[³H]spiperon [Benzen-3H] (Perkin Elmer) <i>8-[4-(4-Fluorophenyl)-4-oxobutyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one hydrochloride</i> Aktywność specyficzna: 15 Ci/mM (555 MBq/mM)	
[³H]SCH23390 [N-metyl-3H] (Perkin Elmer) <i>(R)-(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride</i> Aktywność specyficzna: 85 Ci/mM (3145 MBq/mM)	

¹⁰ pH 7,4 w temperaturze pokojowej

3.6.3 Zestaw do oznaczania stężenia białka

Zawartość białka oznaczano metodą Lowry'ego przy pomocy zestawu firmy Sigma (tabela 3.6-3).

Tabela 3.6-3. Zestaw do oznaczania stężenia białka.

Zestaw do oznaczania ilości białka (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit)		
Reagent A	<i>Bicinchoninic Acid Solution</i>	4900 µl
Reagent B	<i>Copper (II) Sulfate Pentahydrate 4%</i>	100 µl
Standard	<i>Protein Standard Solution (BSA - Bovine Serum Albumin)</i>	25 µl

3.7 Standardy fluorescencyjne

Erytrozyna B (ang. *erythrosine B*, Sigma)

p-terfenyl (ang. *p-terphenyl*, Sigma)

3.8 Inne związki

Woda do wstrzykiwań	<i>Aqua pro injectione</i>	POLPHARMA SA
Chlorowodorek butaklamolu	<i>(+) butaclamol hydrochloride</i>	Sigma
cis-flupentiksol	<i>cis(Z)-flupentixol</i>	Lundbeck
Płyn scyntylacyjny	<i>Aquascynt</i>	BioCare
Etanol		POCH
Izopropanol		POCH
Metanol		POCH

3.9 Aparatura

Autoklaw MLS 3781-L	Sanyo
Autoklaw	Prestige Medical
Aparat do elektroforezy DNA Agagel Mini	Biometra
Aparat do elektroforezy DNA PAC 300	BioRad
Blok filtrów dichroicznych 458/514 RPC	Chroma
Blok filtrów BV-2A	Nikon
Blok filtrów UV-2A	Nikon
Blok filtrów 41028 YEL GFP C57111	Nikon
Blok VHS 510 DCLP	Chroma
Dioda laserowa NanoLed N10	Horiba Jobin Yvon
Filtr interferencyjny (wzbudzenie) FF01-438/24	Semrock, Rochester
Filtr interferencyjny (emisja) FF01-438/32	Semrock, Rochester
Filtr odcięcia >475 nm	Endower Corp.
Homogenizator Ultra Turrax T25	IKA-Labortechnik

Inkubator CO ₂ Innova CO-170	New Brunswick Scientific
Inkubator laboratoryjny	Termaks
Inkubator z wytrząsaniem INNOVA 43	New Brunswick Scientific
Komora laminarna	ESCO Biotech
Lampa rtęciowa 100W T-DH	Nikon
Laser argonowy 100mW	ILT
Licznik scyntylacyjny LS 650	Beckman
Łaźnia wodna z wytrząsaniem SW 20	Julabo Labortechnik GmbH
Łaźnia wodna z wytrząsaniem SW 22	Julabo Labortechnik GmbH
Łaźnia wodna	JWElectronic
Mieszadło laboratoryjne LME-1	DHN
Mikroskop fluorescencyjny odwrócony Eclipse 2000 TE	Nikon
Mikroskop konfokalny Nikon Diaphot z systemem MRC1024	Nikon/Bio-Rad
Mikroskopy optyczne <i>Eclipse</i> TS100	Nikon
Moduł detekcyjny TBX-4	Horiba Jobin Yvon
Obiektyw immersyjny PlanApo 60x, NA 1,4	Nikon
Pipetor automatyczny	HTL
pH-metr	Elmetron
Spektrofotometr Cary 300	Varian
Spektrofotometr UV1202	Shimadzu
Spektrofotometr płytkowy UV/Vis	Thermo Scientific
Spektrofotometr NanoDrop ND1000	NanoDrop Technologies
Termoblok TB1	Biometra
Termoblok Red-Hot 35	DNA Gdańsk II s.c.
Termocykler Gradient	Biometra
Transiluminator UV 953	JWElectronic
Transiluminator UV T2201	Sigma
Waga analityczna	Sigma
Waga analityczna ONYX OX-610	Fawag S.A.
Waga analityczna AC 210 S	Sartorius
Wirówka laboratoryjna 1-15	Sigma
Wirówka laboratoryjna 2-16PK	Sigma
Wirówka laboratoryjna 3K30	Sigma
Wirówka laboratoryjna 6K15	Sigma
Wirówka laboratoryjna MiniSpin	Eppendorf
Wirówka laboratoryjna 5424	Eppendorf
Worteks Reax Top	Heidolph GmbH
Zasilacz do aparatu do elektroforezy DNA E833	Consort
Zasilacz do aparatu do elektroforezy DNA Z-5001	INCO
Zestaw do filtracji próżniowej	Brandel
Zestaw filtrów interferencyjnych: CFP 480/20 nm	Semrock, Rochester
Zestaw filtrów: HQ 540/30M oraz 485/30M	Chroma
Zestaw rejestrujący: Data Station Hub	Horiba Jobin Yvon
Zestaw do wizualizacji żeli Bio-Capt MW	Vilber-Lourmat
Zestaw do wizualizacji żeli Fuji LAS-1000	Fujifilm Corporation
Inne	
Butelka plastikowa do hodowli komórkowej 75 cm ²	TPP
Butelka plastikowa do hodowli komórkowej 25 cm ²	TPP

Filtry GF/C	Whatmann
Filtry 0,22 µm	Millipore
Filtry 0,45 µm	Millipore
Końcówki do pipet laboratoryjnych	Eppendorf
Papierki lakmusowe (<i>pH strips</i>)	Sigma
Pipety serologiczne (2 ml, 5 ml i 10 ml)	BD Biosciences
Szalka Petriego Ø 100 mm	Nunc
Szalka 6-dolkowa	Nunc
Szalka 96-dolkowa	TPP
Szkiełko podstawowe 76x26 mm ²	Manzel GmbH & Co. KG
Szkiełko nakrywkowe Ø 24 mm	Manzel GmbH & Co. KG
Zestaw pipet laboratoryjnych (10, 20, 100, 200 i 1000 µl oraz 5 ml)	Eppendorf

3.10 Oprogramowanie

BioCaptMW	Vilber-Lourmat
ChemSketch	Advanced Chemistry Development Inc.
Clone 4	Scientific & Educational Software
Finch TV 1.4.0	Geospiza, Inc.
GCUA 2.0	http://gcua.schoedl.de
GIMP 2.6	GIMP Development Team
IBH Data Station	IBH, Horiba Jobin Yvon
IBH Decay Analysis System DAS 6	IBH, Horiba Jobin Yvon
Image Gauge 4.0	Fujifilm Corporation
Image J	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Image Pro+ (v. 4.5)	Media Cybernetics Inc.
mFOLD	http://mfold.bioinfo.rpi.edu
Multiscan Spektrum/ScanIt	Thermo Scientific
Microsoft Office 2000	Microsoft Corporation
Microsoft Office Visio 2007	Microsoft Corporation
Primer 1.01	Scientific & Educational Software
Prism 4.0	GraphPad Software Inc.
SigmaPlot 8.0	Systat Software Inc.

4. METODY

4.1 Metody inżynierii molekularnej

W oparciu o metody inżynierii genetycznej uzyskano:

- plazmidy zawierające warianty polimorficzne receptora D₁: D₁^{G198A} oraz D₁^{G1263A};
- konstrukty fuzyjne w/w z genami białek fluorescencyjnych CFP i YFP.

Otrzymane DNA używano następnie do transfekcji przejściowej komórek linii HEK293, w której ulegało ono ekspresji, prowadząc do powstania białek receptorowych, których interakcje stanowią przedmiot niniejszej pracy.

4.1.1 Projektowanie starterów

W celu wprowadzenia mutacji punktowych w genie receptora dopaminowego DRD1 zaprojektowano w oparciu o jego sekwencję nukleotydową odpowiednie startery, G198Afor/G198Arev oraz G1263Afor/G1263Arev. W tym celu użyto programów PRIMER v.1.01 oraz CLONE v.4 (tabela 3.5-1). Długość starterów dobrano tak, aby ich właściwości fizyczne były zbliżone do właściwości startera uniwersalnego, pcDNAfor. Parametry starterów wyliczono w programie OLIGO CALCULATOR v.4.20 (tabela 4.1-1).

W pracy wykorzystano również startery zaprojektowane wcześniej w Zakładzie Biochemii Fizycznej WBBiB UJ, których parametry zebrano w tabeli 4.1-2.

Tabela 4.1-1. Właściwości zaprojektowanych starterów.

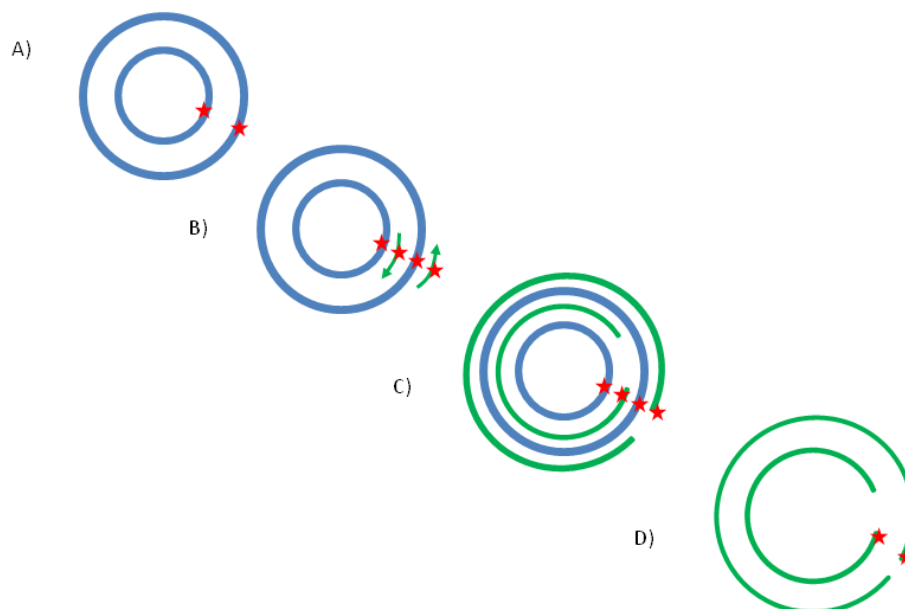
Nazwa	Sekwencja	Długość [bp]	T _m [°C]	GC [%]
G198Afor	5'-TCATCTCCTTAGCTGTGTCAGATCT-3'	25	56	44
G198Arev	5'-ATCTGACACAGCTAAGGAGATGACA-3'	25	56	44
G1263Afor	5'-GCCCTATCAGTCATATTGG-3'	19	68	47
G1263Arev	5'-CCAATATGACTGATAGGGC-3'	19	68	47

Tabela 4.1-2. Właściwości pozostałych użytych starterów.

Nazwa	Sekwencja	Długość [bp]	T _m [°C]	GC [%]
pcDNAfor	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACCC 3'	26	58,0	46,2
d1revxho	5' CCGCTCGAGGGTTGGGTGCTGAC 3'	23	64,2	69,6

4.1.2 Wprowadzenie mutacji punktowych – *Quick Change*

Do modyfikacji genu receptora dopaminowego D₁ zastosowano metodę ukierunkowanej mutagenazy przy użyciu zestawu *Quick Change* (tabela 3.5-2), który pozwala na wprowadzenie mutacji punktowych w podwójnej nici DNA i został użyty do zamiany pojedynczych aminokwasów w obrębie genu DRD1: guaniny (G) na adeninę (A) w pozycji 198 oraz w pozycji 1263. Proces przebiega w kilku etapach, które opisano poniżej i schematycznie przedstawiono na rycinie 4.1-1.



Rycina 4.1-1. Schemat metody *QuickChange*. A) Plazmid z genem wyizolowany z bakterii DH5α (dam⁺) z zaznaczonym miejscem wprowadzenia mutacji. B) Startery wprowadzające mutację są komplementarne względem siebie. C) Powielenie obu nici plazmidowego DNA i wprowadzenie mutacji. D) Trawienie DNA bakteryjnego, usunięcie nici nie zawierających mutacji.

4.1.2.1 Synteza zmutowanego plazmidu – reakcja PCR

W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) do powielenia plazmidu pcDNA3.1(+)/DRD1 oraz wprowadzenia mutacji punktowych G198A i G1263A w obrębie genu DRD1. W tym celu użyto polimerazy DNA *PfuTurbo*, która replikuje obie nici plazmidu z wysokim stopniem

odwzorowania. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze dla trzech stężeń matrycowego DNA w stosunku 2,5:5:10, aby ustalić optymalne warunki reakcji (tabela 4.1-3). Kontrolę negatywną prowadzono dla stężenia środkowego bez obecności polimerazy. Reakcje prowadzono w całkowitej objętości 50 μ l, a profil temperaturowy przedstawiono w tabeli 4.1-4.

Tabela 4.1-3. Skład mieszanin do reakcji PCR – wprowadzenie mutacji punktowych.

Reagent	1	2	3	kontrola
dH ₂ O	do 50 μ l			
bufor <i>Pfu</i>	5,00 μ l	5,00 μ l	5,00 μ l	5,00 μ l
matryca: pcDNA3.1(+)/D1	0,25 μ l	0,5 μ l	1,00 μ l	0,50 μ l
starter FOR: G198Afor	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l
starter REV: G198Arev	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l
dNTP mix (10 mM)	1,00 μ l	1,00 μ l	1,00 μ l	1,00 μ l
polimeraza <i>Pfu Turbo</i>	2,00 μ l	2,00 μ l	2,00 μ l	-

Tabela 4.1-4. Profil temperaturowy reakcji PCR – wprowadzenie mutacji punktowych.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	120	1
Denaturacja	95	30	
Hybrydyzacja starterów	55	60	18
Wydłużanie starterów	68	390	
Końcowe wydłużanie produktu	72	600	1

4.1.2.2 Trawienie DpnI i namnażanie produktu

Do strawienia matrycowego DNA i wyselekcjonowania zsyntetyzowanego DNA, które zawierało pożądaną mutację, zastosowano endonukleazę DpnI (tabela 3.5-2). Po dodaniu enzymu DpnI (5U/reakcję), próbki delikatnie wymieszano i zwirowano 1min/11000g. Reakcję prowadzono przez 1 h w 37°C, następnie – w celu weryfikacji – przeprowadzono rozdział elektroforetyczny poszczególnych próbek.

4.1.2.3 Transformacja komórek DH5 α

Plazmid po reakcji enzymatycznej oczyszczono przy użyciu zestawu *Clean-Up* (A&A Biotechnology), transformowano nim komórki kompetentne DH5 α i wysiano na szalki LB-agar z ampicyliną (rozdział 4.2.2). Następnie wyrosłe kolonie poddano analizie, namnożono je w hodowli płynnej i wyizolowano DNA. Po ponownej elektroforezie wybrane plazmidy wysłano do sekwencjonowania do Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA, IBB PAN w Warszawie.

4.1.3 Wprowadzenie miejsc cięcia dla enzymów NheI i XhoI

Reakcję PCR przeprowadzono w celu wprowadzenia w plazmidzie zawierającym zmutowany gen DRD1 miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych NheI i XhoI oraz usunięcia kodonu STOP. W tym celu wykorzystano startery pcDNAfor oraz d1revxho, a jako matryca posłużył plazmid zmutowanego genu receptora dopaminowego D₁ – pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}. Reakcje prowadzono w całkowitej objętości 100 µl, a skład mieszaniny oraz profil temperaturowy reakcji PCR podano odpowiednio w tabelach 4.1-5 oraz 4.1-7.

Tabela 4.1-5. Skład mieszaniny reakcji PCR – wprowadzenie miejsc cięcia dla enzymów NheI i XhoI (matryca pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}).

Reagent	Objętość [µl]
dH ₂ O	do 100
bufor (NH ₄) ₂ SO ₄	10
MgCl ₂ (25 mM)	5,0
dNTP mix (10 mM)	2,0
matryca: pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A}	2,0
starter FOR: pcDNAfor	2,5
starter REV: d1revxho	2,5
polimeraza <i>Pfu</i>	4,0

W przypadku wprowadzenia miejsc cięcia dla enzymów NheI i XhoI w plazmidzie pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A} reakcję prowadzono na dwóch matrycach o różnym stężeniu początkowym. Pierwszą był plazmid oryginalny (matryca 1), drugą – plazmid świeżo oczyszczony z hodowli bakteryjnej (matryca 2). Ilość DNA plazmidowego dobrano doświadczalnie, a ostateczny skład mieszanin reakcyjnych podano w tabeli 4.1-6.

Tabela 4.1-6. Skład mieszanin reakcji PCR - wprowadzenie miejsc cięcia dla enzymów NheI i XhoI (matryca pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A}).

Reagent	Matryca 1	Matryca 2
dH ₂ O	Do 100µl	Do 100µl
bufor (NH ₄) ₂ SO ₄	10 µl	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5,0 µl	5,0 µl
10 mM dNTP mix	2,0 µl	2,0 µl
matryca: pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A}	1,0 µl	2,0 µl
starter FOR: pcDNAfor	2,5 µl	2,5 µl
starter REV: d1revxho	2,5 µl	2,5 µl
polimeraza <i>Pfu</i>	4,0 µl	4,0 µl

Tabela 4.1-7. Profil temperaturowy reakcji PCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja	95	30	25
Hybrydyzacja starterów	55	30	
Elongacja	72	45	
Końcowe wydłużanie produktu	72	300	1

4.1.4 Elektroforeza produktów PCR i izolacja DNA z żelu

Rozdział elektroforetyczny mieszaniny poreakcyjnej przeprowadzono w celu oddzielenia produktu PCR od matrycowego DNA oraz starterów i nukleotydów, które nie przereagowały. Przed nałożeniem na żel próbkę DNA mieszano z buforem obciążającym (tabela 3.4-1). Elektroforezę prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w buforze TAE przy napięciu 70 V. Przy pomocy transiluminatora oceniono położenie pożądanego prążka o długości ok. 1 kbp, a następnie skalpelem wycięto z żelu fragment zawierający namnożone DNA. Do izolacji DNA z żelu agarozowego użyto zestawu *Gel-Out* (A&A Biotechnology).

4.1.5 Trawienie enzymami restrykcyjnymi *NheI* i *XhoI*

Do trawienia plazmidowego DNA wykorzystano enzymy restrykcyjne *NheI* i *XhoI*. Plazmid pEYFP-N1 oraz zmodyfikowany gen receptora dopaminowego D₁ (z usuniętym kodonem STOP i wprowadzonym miejscem cięcia dla enzymu *XhoI*) strawiono restrykcyjnie w dwóch etapach, gdyż enzymy wymagały buforu w różnym stężeniu. Zgodnie ze specyfikacją producenta enzym *NheI* uzyskuje 100% efektywności w buforze TANGO 1x stężonym, natomiast restryktaza *XhoI* w buforze TANGO 2x stężonym (tabela 3.5-5). Odpowiedni stosunek ilości plazmidu pEYFP do produktu PCR dobrano na podstawie intensywności prążków po rozdziale elektroforetycznym. Skład mieszanin reakcyjnych oraz czas i temperaturę przebiegu reakcji trawienia podano w tabelach 4.1-8 i 4.1-9.

Tabela 4.1-8. Trawienie enzymami NheI i XhoI (matryca pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A} i pEYFP).

Etap I. Trawienie enzymem NheI 5h/37°C		
	1	2
dH ₂ O	do 50 µl	
bufor TANGO 10x	5,0 µl	5,0 µl
pEYFP-N1	7,5 µl	-
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A} (produkt PCR)	-	15 µl
NheI (10 U/µl)	5,0 µl	5,0 µl

Etap II. Trawienie enzymem XhoI cała noc/25°C		
objętość reakcji	48 µl	48 µl
bufor TANGO 10x	5,0 µl	5,0 µl
XhoI (10 U/µl)	5,0 µl	5,0 µl

Tabela 4.1-9. Trawienie enzymami NheI i XhoI (matryca pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A} i pEYFP).

Etap I. Trawienie NheI 2,5h/37°C			
	1	2	3
dH ₂ O	do 50 µl		
TANGO 10x	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
pEYFP	4,0 µl	-	-
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A} (produkt PCR, matryca 1)	-	10 µl	-
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A} (produkt PCR, matryca 2)	-	-	20 µl
NheI (10 U/µl)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl

Etap II. Trawienie XhoI 4h/37°C			
objętość reakcji	45 µl	45 µl	45 µl
TANGO 10x	4,5 µl	4,5 µl	4,5 µl
XhoI	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl

Jakość trawienia kontrolowano przeprowadzając elektroforezę próbek każdej z mieszanin. Produkty reakcji trawienia oczyszczano zestawem *Clean-Up* (A&A Biotechnology) i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny, aby dobrać odpowiednie warunki kolejnych reakcji.

4.1.6 Ligacja

Reakcje ligacji prowadzono dla równych objętościowo ilości wstawki (zmodyfikowanego genu pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}_{NheI,XhoI}) oraz wektora (pEYFP-N1_{NheI,XhoI}) z uwagi na stosunek stężeń plazmidów użytych do reakcji trawienia enzymatycznego, molowo uzyskano więc dwukrotnie większą ilość wstawki (tabela 4.1-10).

W przypadku ligacji plazmidu pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A}_{NheI,XhoI} z wektorem pEYFP-N1_{NheI,XhoI} reakcje prowadzono w stosunku 1:1 oraz 2:1, jak podano w tabeli 4.1-11. Reakcje prowadzono przez noc w temperaturze 25°C, a następnie enzym inaktywowano przez 10 minut w temperaturze 65°C.

Tabela 4.1-10. Skład mieszaniny ligacyjnej I (pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}_{NheI,XhoI}).

Składnik	Ilość [μl]
bufor <i>T4</i> (10x)	2,5
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A} _{NheI,XhoI}	10,0
pEYFP-N1 _{NheI,XhoI}	10,0
ligaza DNA <i>T4</i> (1 U/μl)	2,5
objętość reakcji	25,0

Tabela 4.1-11. Skład mieszaniny ligacyjnej II (pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A}_{NheI,XhoI}).

Składnik	Ilość [μl]	
bufor <i>T4</i> (10x)	2,5	4,0
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A} _{NheI,XhoI}	10,0	20,0
pEYFP-N1 _{NheI,XhoI}	10,0	10,0
ligaza DNA <i>T4</i> (1 U/μl)	2,5	4,0
dH ₂ O	-	2,0
objętość reakcji	25,0	40,0

4.1.7 Analiza kolonii – metoda *Toothpick*

Mieszaninę po ligacji transformowano ok. 100 μl zawiesiny komórek kompetentnych, przygotowanych zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.2.1, a następnie wysiewano na szalki LB-agar z kanamycyną (tabela 3.2-2) i hodowano przez noc w temperaturze 37°C. Po upływie doby wybierano z każdej szalki po ok. 30 kolonii i przeprowadzano ich analizę zmodyfikowaną metodą *Toothpick* (Sambrook i wsp. 1985). Wybrane kolonie numerowano i kopiowano sterylną końcówką na nową szalkę LB-agar, a resztę przenoszono do podpisanych probówek typu Eppendorf. Szalki inkubowano przez całą noc w 37°C, po czym przechowywano w lodówce do uzyskania wyników analizy.

Do eppendorfów natomiast dodano 50 μl sterylnego 10 mM EDTA (pH 8,0) i 50 μl roztworu NNS (tabela 3.2-1), po czym worteksowano 30 s i inkubowano 5 minut w 70°C. Następnie schładzano do temperatury pokojowej, dodawano 1,5 μl 4M KCl i worteksowano 30 s. Po 5-minutowej inkubacji na lodzie, mieszaniny wirowano 3min/14000g, a supernatant odbierano do nowej probówki i prowadzono rozdział elektroforetyczny.

Na podstawie analizy położenia prążków w żelu elektroforetycznym wybrano kolonie, które zawierały pożądany plazmid i namnożono je w hodowli płynnej przez noc w 37°C. Plazmidy wyizolowano (rozdział 4.2.4) i przeprowadzono analizę restrykcyjną klonów. W tym celu wyizolowane plazmidy pocięto enzymem restrykcyjnym XhoI. Reakcje prowadzono w całkowitej objętości 10 µl (tabela 4.1-12 i 4.1-13).

Jako kontrolę trawiono plazmid pEYFP-N1 nie zawierający wstawki. Reakcję dla konstruktu D₁^{G198A}-YFP prowadzono przez 1 h w temperaturze 37°C, natomiast dla konstruktu D₁^{G1263A}-YFP czas reakcji wydłużono do 100 minut w temperaturze 37°C.

Tabela 4.1-12. Skład mieszaniny do kontrolnego trawienia plazmidowego DNA (D₁^{G198A}-YFP).

Reagent	Kolonia 2	Kolonia 3	Kolonia 7	Referencja
dH ₂ O	6,0 µl	6,0 µl	6,0 µl	6,5 µl
D ₁ ^{G198A} -YFP	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	-
pEYFP-N1	-	-	-	0,5 µl
bufor TANGO 10x	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
XhoI	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
objętość reakcji	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabela 4.1-13. Skład mieszaniny do kontrolnego trawienia (D₁^{G1263A}-YFP).

Reagent	Kolonia A4	Kolonia B1	Kolonia C1	Kolonia D1	Referencja
dH ₂ O	4,5 µl	4,5 µl	4,5 µl	4,5 µl	7,0 µl
D ₁ ^{G1263A} -YFP	3,5 µl	3,5 µl	3,5 µl	3,5 µl	-
pEYFP-N1	-	-	-	-	1,0 µl
bufor R 10x	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
XhoI	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
objętość reakcji	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

4.2 Hodowla komórek bakteryjnych

Do namnażania plazmidów wykorzystano komórki *E. coli*, które hodowano na podłożu LB odpowiednio w hodowli płynnej w kolbach Erlenmajera lub na podłożu stałym LB-agar na szalkach Petriego. Medium LB, którego skład podano w tabeli 3.2-1, było sterylizowane przez autoklawowanie w temperaturze 120°C przez 15 minut.

4.2.1 Wprowadzenie komórek w stan kompetencji

Komórki bakteryjne DH5 α wprowadzano w stan kompetencji metodą chemiczną. W tym celu 10 ml pożywki LB zaszczipiano pojedynczą kolonią bakteryjną pobraną z szalki. Hodowlę prowadzono przez noc w łaźni wodnej z wytrząsaniem 240-250 rpm w temperaturze 37°C. Po tym czasie zawiesinę bakterii przenoszono do świeżej pożywki i hodowano przez ok. 6 h do osiągnięcia gęstości optycznej OD₆₀₀=0,4.

Po schłodzeniu kolby na lodzie, zawiesinę wirowano 10 min/4°C/5000g, a nadsącz zlewano. Powstały osad zawieszano w 50 ml schłodzonego 50 mM roztworu CaCl₂ i inkubowano 10 minut na lodzie. Po tym czasie ponownie wirowano, a osad zawieszano w 5 ml 50 mM CaCl₂ z 10% dodatkiem glicerolu. Przygotowane w ten sposób komórki porcjowano do sterylnych probówek typu *Eppendorf* po 100-200 μ l i zamrażano w ciekłym azocie. Tak przygotowane banki przechowywano w temperaturze -80°C.

4.2.2 Transformacja komórek kompetentnych DH5 α

Do 100 μ l kompetentnych komórek DH5 α dodawano około 50 ng plazmidowego DNA lub całość mieszaniny ligacyjnej i delikatnie mieszano, a następnie inkubowano przez 30 minut na lodzie. Po inkubacji probówki umieszczano na 45 s w termobloku w temperaturze 42°C i natychmiast przenoszono na lód. Po upływie 5 minut dodawano 1 ml LB ogrzanego do temperatury 37°C i inkubowano przez 45-60 minut w temperaturze 37°C. Następnie komórki wirowano 3 min/3000g, a osad zawieszano w 200 μ l LB. Na szalkę LB-agar z antybiotykiem: (tabela 3.2-2) wysiewano całość zawiesiny bakteryjnej i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C do wzrostu kolonii bakteryjnych.

4.2.3 Namnażanie plazmidów w płynnej hodowli komórek DH5α

Plazmidy wykorzystywane w pracy namnażano w hodowlach płynnych stransformowanych kompetentnych komórek DH5α. W tym celu pojedynczą kolonią komórek DH5α wyrosłą na szalce LB-agar zaszczepiano 10 ml podłoża LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. Tak przygotowaną hodowlę wstępną prowadzono w cieplarni lub łaźni wodnej z wytrząsaniem 6 h/37°C/240 rpm. Po tym czasie zakładano hodowlę właściwą poprzez przeniesienie 100 µl zawiesiny do 100 ml LB z odpowiednim antybiotykiem. 200-500 ml zawiesiny hodowano w cieplarni lub łaźni wodnej z wytrząsaniem 24 h/37°C/240 rpm. Po upływie doby hodowlę bakteryjną porcjowano po 50-100 ml i wirowano 20 min/4°C/5000g. Powstały osad oczyszczano od razu lub zamrażano do późniejszego oczyszczenia.

4.2.4 Izolacja DNA plazmidowego

Do izolacji plazmidowego DNA z małych objętości płynnych hodowli bakteryjnych stosowano zestaw *Plasmid Mini* zgodnie z zaleceniami producenta (tabela 3.5-4). Do rozbicia komórek stosowana była liza alkaliczna, a po usunięciu zanieczyszczeń takich jak białka czy błony komórkowe, plazmidowe DNA zawieszone w roztworze o wysokim stężeniu soli chaotropowych było wiązane do złoża krzemionkowego. Wolne od zanieczyszczeń DNA wypłukiwano z kolumnienek wodą.

Do izolacji większych ilości plazmidowego DNA z hodowli płynnej 50-100 ml stosowano zestawy *Plasmid Midi* lub *Plasmid Midi AX* (tabela 3.5-4). Zestawy te opierają się na wykorzystaniu membran jonowymiennych, które bardzo wydajnie wiążą DNA. Wszelkie zanieczyszczenia przechodzą przez kolumnę nie ulegając związaniu. Następnie DNA jest wymywane roztworem o wysokiej sile jonowej, odsalane i zagęszczane przez precypitację alkoholową. Zestaw *Plasmid Midi AX* zawiera dodatkowo barwny system *LjSee*, który pozwala kontrolować kolejne etapy lizy alkalicznej.

4.2.5 Pomiar stężenia plazmidowego DNA

Stężenie oczyszczonego DNA mierzono na spektrofotometrze NanoDrop, dodatkowo oznaczano stosunek absorbancji fali o długości 260 nm (A_{260}) do absorbancji fali o długości 280 nm (A_{280}). Dla dobrze oczyszczonego DNA stosunek A_{260}/A_{280} był nie mniejszy niż 1,89, a na obrazie elektroforetycznym widoczny był wyraźny prążek.

4.2.6 Elektroforeza DNA

Rozdział elektroforetyczny DNA plazmidowego przeprowadzano na 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w buforze TAE (tabela 3.4-1). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 70-90 V, przy czym czas trwania rozdzielania zależał od wielkości rozdzielanych fragmentów. Jako obciążenie stosowano zamiennie *Blue Juice* lub bufor obciążający sporządzony zgodnie z opisem w tabeli 3.4-1. Natomiast skład próbek podano w tabeli 4.2-1.

Tabela 4.2-1. Skład próbek do elektroforezy żelowej DNA.

Reagent	Próbka	Referencja
DNA	50-150 ng	-
Standard masowy	-	3-5 μ l
Bufor obciążający	1x	-

4.2.7 Sekwencjonowanie DNA

Plazmidy potencjalnie zawierające wprowadzane mutacje w genie receptora dopaminowego D₁ zostały wysłane do Pracowni Sekwencjonowania i Analizy DNA, IBB w Warszawie. Wyniki analizy zostały dostarczone w postaci elektronicznej. Na podstawie tej analizy potwierdzono, że mutacje zostały wprowadzone prawidłowo, a plazmidy mogły być użyte do dalszych prac.

4.3 Hodowla komórek eukariotycznych

4.3.1 Hodowla linii komórkowej HEK293

Hodowlę komórek eukariotycznych linii HEK293 prowadzono w inkubatorze INNOVA CO-170 (*New Brunswick Scientific*) w temperaturze 37°C i 5% CO₂. Komórki hodowano na pożywce MEM, do której dodawano 10% termicznie inaktywowanej płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz 1% L-glutaminy (tabela 3.3-1). Hodowlę zakładano poprzez rozbankowanie komórek przechowywanych w ciekłym azocie, a następnie prowadzono w butelkach. Do kolejnych doświadczeń komórki rozsiewano odpowiednio na plastikowych szalkach o średnicy 100 mm, 30 mm lub na szalce 6-dółkowej.

4.3.2 Rozsiewanie komórek HEK293

Komórki hodowano w butelkach do osiągnięcia przez nie ok. 80% konfluencji, a następnie pasażowano. W tym celu usuwano z butelek pożywkę i przepłukiwano 5 ml PBS ogrzanego do temperatury pokojowej, którego skład podano w tabeli 3.3-1. Następnie dodawano 5 ml 0,25% roztworu trypsyny, którą usuwano po 30 s, a butelkę inkubowano w temperaturze 37°C przez ok. 2 minuty. Po tym czasie dodawano suplementowaną pożywkę zatrzymując proces trypsynizacji i dokładnie rozpipetowywano. Komórki przeliczano przy użyciu komory Bürkera i przenoszono do nowej butelki lub rozsiewano do dalszych doświadczeń (tabela 4.4-1). Komórki pasażowano regularnie, przy czym maksymalna całkowita liczba pasaży nie przekraczała 30.

Tabela 4.3-1. Liczba komórek wysiewanych do doświadczeń.

	Zastosowanie	Liczba wysiewanych komórek
Butelka 75 cm ²	Hodowla	2,0·10 ⁶
Szalka Ø100 mm	Analiza parametrów wiązania receptor-ligand	3,5·10 ⁶
Szkiełko nakrywkowe Ø24 mm	Preparaty do pomiarów fluorescencyjnych	0,2·10 ⁶

4.3.3 Transfekcja komórek HEK293

Komórki transfekowano, gdy były w fazie logarytmicznego wzrostu i osiągnęły konfluencję około 60%. Godzinę przed planowaną transfekcją zmieniano pożywkę na świeżą. Komórki transfekowano metodą koprecypitacji (wytrącania) DNA z chlorkiem

wapnia w buforze HBS 2x (tabela 3.3-1) (Sambrook i wsp. 1985). Mieszaninę transfekcyjną (tabela 4.4-2) przygotowywano przez zawieszenie odpowiedniej ilości DNA w wodzie i dodanie 2,5 M CaCl_2 , całość delikatnie pipetowano do buforu HBS 2x i inkubowano 15 minut. Po tym czasie mieszaninę ostrożnie wkraplano na szalkę z komórkami lub szkiełko nakrywkowe umieszczone w szalce 6-dółkowej. Po minimum 6 h zmieniano pożywkę na świeżą, a po upływie ok. 48 h prowadzono pomiary lub zbierano komórki w buforze PBS, odwirowywano 5 min/25°C/160g i zamrażano do czasu dalszych doświadczeń.

Tabela 4.3-2. Skład mieszaniny do transfekcji przejściowej.

Składnik	Szalka Ø 100 mm	Szkiełko Ø 24 mm
DNA	15 µg	2-3 µg
H ₂ O	540 µl	45 µl
2,5M CaCl_2	60 µl	5 µl
HBS 2x	600 µl	50 µl

4.4 Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand

Metoda wiązania znakowanych ligandów do receptorów jest stosowana do określania powinowactwa różnych związków do receptora (analiza kompetycyjna), jak i określania gęstości receptorów w badanej tkance (analiza saturacyjna).

W pracy zastosowano metodę analizy saturacyjnej do oznaczenia parametrów wiązania receptor-ligand, w tym do określania stałej dysocjacji K_d [nM] oraz gęstości receptorów B_{max} [pM/mg białka]. Do pomiaru wykorzystano znakowane trytem [³H] ligandy receptorów dopaminowych D₁ i D₂ (tabela 3.6-2) w odpowiednich zakresach stężeń, dla każdego oznaczano w duplikacie wiązanie całkowite (T) oraz wiązanie niespecyficzne (NS). Zastosowane procedury oparto o schematy doświadczeń opisanych w literaturze (Armstrong i Strange 2001, Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006, Jackson i wsp. 2000, Seeman i wsp. 1992, So i wsp. 2005). Wyniki doświadczeń analizowano przy użyciu programu PRISM 4.0 (GraphPad Software).

4.4.1 Przygotowanie materiału biologicznego do analizy wiązania

Do oznaczenia parametrów wiązania receptor-ligand wykorzystano komórki HEK293, które w tym celu rozsiewano w liczbie $3,5 \cdot 10^6$ komórek na 100 mm szalkę Petriego zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.3.2. Transfekcję przeprowadzano, gdy komórki osiągnęły 60-70% konfluencji (rozdział 4.3.3). Skład mieszaniny transfekcyjnej oraz ilość DNA użytego do transfekcji podano w tabelach 4.4-1 i 4.4-2.

Tabela 4.4-1. Skład mieszaniny do transfekcji przejściowej (analiza saturacyjna).

Reagent	Ilość
DNA	15 µg
H ₂ O	540 µl
2,5M CaCl ₂	60 µl
HBS 2x	600 µl

Do analizy wykorzystano komórki HEK293, w których ekspresji ulegały receptory dopaminowe: D₁ i D₂, jak i warianty receptora dopaminowego D₁ z wprowadzonymi mutacjami punktowymi: D₁^{G198A} i D₁^{G1263A}. Doświadczenia prowadzono również na komórkach kotransfekowanych plazmidami zawierającymi receptory dopaminowe D₂ i D₁ lub D₂ i jeden z wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₁: D₁^{G198A} lub D₁^{G1263A} (tabela 4.5-3). Analogiczne eksperymenty prowadzono dla receptorów dopaminowych połączonych z białkami fluorescencyjnymi: D₁-YFP i D₂-CFP.

Po upływie 48 h od transfekcji komórki zbierano i odwirowywano w buforze PBS 5min/160g. Następnie zlewano nadsącz, a osad zamrażano w temperaturze -30°C do dalszej analizy.

Tabela 4.4-2. Ilość plazmidowego DNA użyta do transfekcji komórek HEK293 (analiza saturacyjna).

Plazmid	Ilość DNA [µg]
pcDNA3.1(+)/DRD1	15
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A}	15
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A}	15
pEYFP-N1/DRD1	15
pEYFP/DRD1 ^{G198A}	15
pEYFP/DRD1 ^{G1263A}	15
pcDNA3.1(+)/DRD2	15
pECFP-N1/DRD2	15

Tabela 4.4-3. Ilość plazmidowego DNA użyta do kotransfekcji komórek HEK293 (analiza saturacyjna).

Plazmid	Ilość DNA [μ g]
pcDNA3.1(+)/DRD1	7,5
pcDNA3.1(+)/DRD2	7,5
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G198A}	7,5
pcDNA3.1(+)/DRD2	7,5
pcDNA3.1(+)/DRD1 ^{G1263A}	7,5
pcDNA3.1(+)/DRD2	7,5
pEYFP-N1/DRD1	7,5
pECFP-N1/DRD2	7,5
pEYFP-N1/DRD1 ^{G198A}	7,5
pECFP-N1/DRD2	7,5
pEYFP-N1/DRD1 ^{G1263A}	7,5
pECFP-N1/DRD2	7,5

Po sporządzeniu buforów (skład podano w tabeli 3.6-1) przystępowano do przygotowania tkanki. Dla prawidłowego oznaczenia istotne jest dokładne wypłukanie ligandów endogennych i innych molekuł, które potencjalnie mogłyby zaburzać wiązanie radioligandu.

W tym celu zamrożone osady komórek HEK293 zawieszano w 3 ml suplementowanego buforu Tris-HCl o temperaturze 4°C. Następnie komórki homogenizowano i odwirowywano 15 min/4°C/16500g, aby uzyskać frakcję błonową. Homogenizację i wirowanie powtarzano dwukrotnie. Osad komórkowy zawieszano w 6 ml suplementowanego buforu Tris-HCl i oznaczano stężenie białka (rozdział 4.4.3). Frakcję błonową zawieszano w suplementowanym buforze Tris-HCl, tak aby ostateczna ilość białka w próbce wynosiła 10-20 μ g dla receptora dopaminowego D₁ i 30-40 μ g dla receptora dopaminowego D₂.

W celu porównania wyników uzyskanych w układzie modelowym *in-vitro* (komórki HEK293, w których doszło do ekspresji receptorów dopaminowych) z wynikami uzyskanymi w układzie natywnym, pomiary parametrów wiązania receptor-ligand przeprowadzono także dla tkanki pobranej z mózgu szczura (samiec rasy Wistar). Pobrane prążkowie (*striatum*) ważono i zawieszano w 10 ml buforu Tris-HCl. Następnie również dwukrotnie homogenizowano i odwirowywano 15 min/4°C/16500g. Ostatecznie tkankę zawieszano w buforze Tris-HCl w stężeniu 5 mg/ml. Zawiesinę komórek oraz tkanki inkubowano na lodzie do czasu dodania pozostałych substratów reakcji.

4.4.2 Oznaczenie stężenia białka – metoda Lowry’ego

Zawartość białka w uzyskanej frakcji błonowej komórek oznaczano przy użyciu zestawu *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma) (tabela 3.6-3). Metoda pomiaru opiera się na opisanej przez Lowry i wsp. (1951) reakcji tworzenia barwnego kompleksu jonów miedzi Cu^{2+} z wiązaniem peptydowym w białku w środowisku alkalicznym, a następnie redukcją jonów miedzi Cu^{2+} do Cu^{1+} . Ilość zredukowanych jonów miedzi Cu^{1+} , z którymi BCA tworzy barwny kompleks jest proporcjonalna do ilości białka w roztworze. Zatem mierzona spektrofotometrycznie zmiana barwy, czyli gęstości optycznej badanej próbki, w odniesieniu do wyznaczonej krzywej standardowej, pozwala na oznaczenie stężenia białka w zawiesinie. Metoda ta jest bardziej czuła niż reakcja biuretowa lub standardowa procedura Lowry’ego, ponadto jest łatwa i szybka w użyciu.

Tło zmierzono dla 25 μl wody sterylnej, natomiast krzywą standardową wyznaczono przy użyciu znanych stężeń albuminy surowicy wołowej BSA: 100 mg/ml, 200 mg/ml, 400 mg/ml, 600 mg/ml, 800 mg/ml i 1000 mg/ml. Próbkę o nieznanym stężeniu białka oznaczano w duplikatach. Do wszystkich dołków na płytce pomiarowej dodawano 200 μl aktywnego reagenta BCA przygotowanego zgodnie z opisem w rozdziale 3.6-3. Skład poszczególnych dołków pomiarowych podano w tabeli 4.4-4. Całość inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie mierzono na spektrofotometrze płytkowym.

Tabela 4.4-4. Oznaczenie stężenia białka we frakcji błonowej komórek HEK293 - metoda Lowry’ego.

Kolejność dołków		Reagent [μl /dołek]			
		H_2O	BSA	Zawiesina komórek	BCA
0	BLANK	25	-	-	200
1	BSA 100	-	25	-	200
2	BSA 200	-	25	-	200
3	BSA 400	-	25	-	200
4	BSA 600	-	25	-	200
5	BSA 800	-	25	-	200
6	BSA 1000	-	25	-	200
7 - 8	TEST 1	-	-	25	200
9 - 10	TEST 2	-	-	25	200

4.4.3 Przygotowanie radioligandów

Radioligand powinien wykazywać wysokie powinowactwo do badanego typu receptora oraz niskie powinowactwo do receptorów innego typu i stosunkowo wysoką aktywność właściwą. Dlatego na ogół stosowane radioligandy to antagoniści receptorów,

w tym antagoniści receptorów dopaminowych (rozdział 3.6-2). Do wyznaczenia krzywej wiązania receptorów dopaminowych D₁ oraz D₂ użyto 12 stężeń (sześciu poniżej stałej K_d oraz pięciu powyżej) odpowiednio:

- [³H]SCH23390 w zakresie 0,12 – 8 nM dla receptora dopaminowego D₁,
- [³H]spiperonu w zakresie 0,03 – 3 nM receptora dopaminowego D₂.

Do znanej objętości buforu Tris-HCl dodawano obliczoną z równania 4.4-1 objętość radioligandu, aby uzyskać najwyższe jego stężenie. Końcowa objętość próbek wynosiła 0,5 ml, a aktywności właściwe podano w tabeli 3.6-2.

$$V_{buf} = \frac{V_{RL}}{SA \cdot V \cdot c_{RL}^{max}}$$

Równanie 4.4-1

gdzie: V_{buf} – znana objętość buforu [ml], V_{RL} – objętość radioligandu [μl],
 SA – aktywność właściwa radioligandu [Ci/mM], V – końcowa objętość badanej próbki [ml], c_{RL}^{max} – oczekiwane najwyższe stężenie radioligandu [nM].

Obliczoną objętość radioligandu dodawano do buforu Tris-HCl i worteksowano, aby dokładnie wymieszać składniki. Następnie pobierano odpowiednio 200 μl najwyższego stężenia [³H]SCH23390 lub 50 μl [³H]spiperonu, zalewano płynem scyntylacyjnym i mierzono aktywność na liczniku scyntylacyjnym. Uzyskany wynik wyrażony w liczbie rozpadów na minutę, dpm (ang. *disintegrations per minute*), przeliczano na stężenie [nM] zgodnie z równaniem:

$$c_{RL} = \frac{A}{2200 \cdot V \cdot SA}$$

Równanie 4.4-2

gdzie: c_{RL} – rzeczywiste stężenie radioligandu w próbce [nM], A – zmierzona aktywność próbki [dpm], V – końcowa objętość badanej próbki [ml], SA – aktywność właściwa radioligandu [Ci/mM].

Po uzyskaniu najwyższego stężenia radioligandu (#12) przygotowano kolejne połowiczne rozcieńczenia w buforze Tris-HCl, aż do uzyskania stężenia najniższego (#1). Przygotowane w ten sposób rozcieńczenia pipetowano analogicznie w duplikatach po 200 μl w przypadku [³H]SCH23390 i 50 μl w przypadku [³H]spiperonu do plastikowych naczynek, zalewano płynem scyntylacyjnym i mierzono w liczniku scyntylacyjnym. Uzyskano w ten sposób punkty pomiarowe krzywej saturacyjnej wiązania receptor-ligand.

4.4.4 Oznaczenie wiązania niespecyficznego

W celu wyznaczenia stałej dysocjacji K_d oraz gęstości receptorów B_{max} konkretnego typu receptora, określano specyficzne wiązanie radioznacznika do tego typu receptora. Z uwagi na potencjalną obecność w zawiesinie komórek i tkanki innych struktur mogących wiązać radioligand, istotne było określenie ilości tych tzw. miejsc niespecyficznego wiązania. W tym celu dla każdego stężenia oznaczano również wiązanie niespecyficzne poprzez dodanie 50 μl odpowiednio:

- cis(Z)-flupentiksolu w stężeniu 50 μM , blokującego wiązanie do receptora dopaminowego D_1 ;
- (+)butaklamolu w stężeniu 50 μM , blokującego wiązanie do receptora dopaminowego D_2 .

Ilość radioligandu związanego z receptorem przy braku liganda nieznakowanego określa się jako wiązanie całkowite (ang. *total binding*), a po odjęciu wiązania niespecyficznego (ang. *non-specific binding*) uzyskuje się wiązanie właściwe dla badanego receptora (ang. *specific binding*) zgodnie z równaniem:

$$T = NS + S$$

Równanie 4.4-3

gdzie: T – wiązanie całkowite [dpm], NS – wiązanie niespecyficzne [dpm],
 S – wiązanie właściwe [dpm].

4.4.5 Oznaczenie parametrów wiązania receptor-ligand

Po przygotowaniu wszystkich substratów przystępowano do pipetowania. Dla każdego stężenia przygotowywano w duplikacie próbki do oznaczenia wiązania całkowitego (od T1 do T12) oraz, również w duplikacie, oznaczano wiązanie niespecyficzne (od N1 do N12).

Tabela 4.4-5. Skład mieszanin do oznaczenia parametrów wiązania receptor-ligand.

Typ receptora	Wiązanie całkowite		Wiązanie niespecyficzne	
D_1	200 μl	$[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ (#1,2,3,...,12)	200 μl	$[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ (#1,2,3,...,12)
	200 μl	bufor Tris-HCl	150 μl	bufor Tris-HCl
	100 μl	zawiesina komórek/tkanki	100 μl	zawiesina komórek/tkanki
			50 μl	cis(Z)-flupentiksol
D_2	50 μl	$[^3\text{H}]\text{spiperon}$ (#1,2,3,...,12)	50 μl	$[^3\text{H}]\text{spiperon}$ (#1,2,3,...,12)
	200 μl	bufor Tris-HCl	150 μl	bufor Tris-HCl
	250 μl	zawiesina komórek/tkanki	250 μl	zawiesina komórek/tkanki
			50 μl	(+)butaklamol

Całkowita objętość mieszaniny wynosiła 0,5 ml (tabela 4.4-5). Próbki inkubowano do osiągnięcia stanu równowagi przez 2 h w temperaturze 25°C w przypadku receptora D₁ lub 30 minut w temperaturze 37°C w przypadku receptora D₂. Po tym czasie, w celu oddzielenia niezwiązanego radioligandu od puli związanej, próbki filtrowano przez filtry Whatman GF/C, przepłukiwano kilka razy buforem Tris-HCl o temperaturze 4°C, a krawki filtrów z osadzonymi na nich frakcjami receptor-ligand przenoszono do naczynek scyntylacyjnych i zalewano płynem scyntylacyjnym. Zestaw do filtracji próżniowej (Brandel) został zaprojektowany tak, aby jednocześnie filtrować 48 próbek. Tym samym zapewnia on nie tylko powtarzalność procedury, lecz przede wszystkim skraca czas filtracji, co zapobiega ewentualnemu oddysocjowaniu radioligandu z kompleksu receptor-ligand. Doświadczenia powtórzono co najmniej 4-krotnie.

4.4.6 Analiza wyników

W przypadku pomiaru parametrów wiązania receptor-ligand metodą analizy saturacyjnej różne stężenia radioligandu c_{RL} są inkubowane z receptorem, a ilość powstającego kompleksu receptor-ligand (B [pM/mg białka]) opisana jest hiperbolą o równaniu:

$$B \left[\frac{pM}{mg \text{ białka}} \right] = \frac{B_{max} \cdot c_{RL}}{(K_d + c_{RL})}$$

Równanie 4.4-4

gdzie: c_{RL} – kolejne stężenia radioligandu [pM], B_{max} – zmierzona aktywność, czyli ilość kompleksu receptor-ligand w próbce [dpm], K_d – stała dysocjacji radioligandu [nM].

Aktywność filtrów mierzono na liczniku scyntylacyjnym, a uzyskany wynik analizowano przy pomocy programu PRISM v. 4.0 (GraphPad Software). Po odjęciu wiązania niespecyficznego od frakcji całkowitej, uzyskano wartość wiązania właściwego (równanie 4.4-3). W wyniku analizy uzyskano wartości B_{max} wyrażone w [dpm] które przeliczano na [pM/mg białka] przy pomocy równania:

$$B_{max} \left[\frac{pM}{mg \text{ białka}} \right] = \frac{B_{max} [dpm]}{2200 \cdot SA \cdot m_{białka}}$$

Równanie 4.4-5

gdzie: B_{max} – zmierzona aktywność, czyli ilość kompleksu receptor-ligand w próbce [dpm], $m_{białka}$ – ilość dodanego białka [mg], SA – aktywność właściwa radioligandu [Ci/mM].

Otrzymano w ten sposób krzywe wiązania receptor-ligand (B) w funkcji stężenia radioligandu c_{RL} dla receptora dopaminowego D_1 , jego wariantów genetycznych D_1^{G198A} oraz D_1^{G1263A} , jak i receptora D_2 . W oparciu o model pojedynczego miejsca wiązania obliczono stałą dysocjacji K_d oraz gęstość receptorów B_{max} (równanie 4.4-4).

4.4.7 Statystyczna analiza wyników

Doświadczenia powtarzano w kilku seriach, a następnie obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe parametrów B_{max} oraz K_d . Znamienności statystyczne uzyskano w teście jednoczynnikowej analizy wariancji (*one-way* ANOVA) i porównano testem *post-hoc* Dunnett'a, w którym wartości parametrów B_{max} oraz K_d uzyskane dla wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 porównano z wartościami uzyskanymi dla receptora natywnego.

Dla układów, w których jedna z odmian polimorficznych receptora dopaminowego D_1 (D_1^{G198A} lub D_1^{G1263A}) ulegała ekspresji wraz z receptorem dopaminowym D_2 policzono średnie wartości B_{max} oraz K_d zarówno dla wiązania [3 H]SCH23390, jak i [3 H]spiperonu. Znamienności statystyczne uzyskano ponownie w teście jednoczynnikowej analizy wariancji (*one-way* ANOVA) i porównano testem *post-hoc* Dunnett'a względem parametrów uzyskanych dla układu D_1 - D_2 . Analogicznie postępowano dla komórek, w których ulegały ekspresji receptory dopaminowe sprzężone z białkami fluorescencyjnymi.

4.5 Metody fluorescencyjne

W pomiarach fluorescencyjnych wykorzystano komórki HEK293 przejściowo kotransfekowane plazmidami zawierającymi gen białka fluorescencyjnego YFP lub CFP dołączony do C-końca receptora dopaminowego odpowiednio D₁ lub D₂, jak również plazmidami kodującymi warianty genetyczne receptora D1 z dołączonym do ich C-końca białkiem fluorescencyjnym YFP (D₁^{G198A}-YFP oraz D₁^{G1263A}-YFP). Charakterystykę użytych plazmidów przedstawiono w tabelach 3.1-1 i 3.1-2.

4.5.1 Przygotowanie preparatów

Do pomiarów fluorescencyjnych wykorzystano komórki HEK293, które rozsiewano na szkiełka podstawowe zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.3-2. Szkiełka umieszczano na szalce 6-dółkowej. Ilość DNA użytego do kotransfekcji oraz skład mieszaniny do transfekcji przejściowej podano poniżej.

Tabela 4.5-1. Ilość plazmidowego DNA użytego do transfekcji komórek - pomiary fluorescencyjne.

Plazmid	Ilość DNA [μg]
pEYFP-N1/DRD1	1
pECFP-N1/DRD2	2
pEYFP-N1/DRD1 ^{G198A}	1
pECFP-N1/DRD2	2
pEYFP-N1/DRD1 ^{G1263A}	1
pECFP-N1/DRD2	2

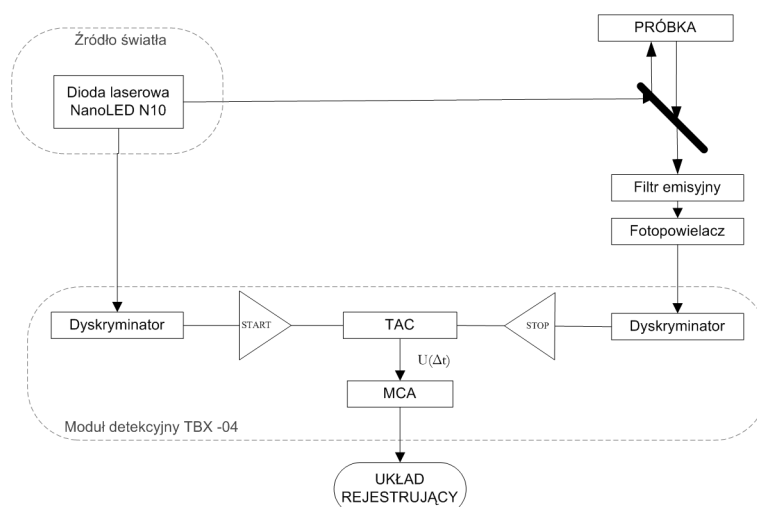
Tabela 4.5-2. Skład mieszaniny transfekcyjnej - pomiary fluorescencyjne.

Reagent	Ilość
DNA	3 μg
H ₂ O	45 μl
2,5M CaCl ₂	5 μl
HBS 2x	50 μl

4.5.2 Pomiar zaniku fluorescencji w czasie

Do pomiarów czasów życia fluorescencji zastosowano metodę skorelowanego w czasie pojedynczego zliczania fotonów TCSPC (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*) przy użyciu odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse TE-2000 (Nikon).

Pomiary przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Fizycznej WBBiB UJ. Schemat użytego zestawu przedstawiono na rycinie 4.5-1.



Rycina 4.5-1. Schemat zestawu do rozdzielczych w czasie pomiarów zaniku fluorescencji. Użyte skróty: TAC – konwerter czasowo-amplitudowy (ang. *Time to Amplitude Converter*), MCA – analizator wielokanałowy (ang. *Multi Channel Analyzer*). Schemat wykonany przy użyciu programu Microsoft Office Visio 2007).

Jako źródło światła użyto impulsowej diody laserowej NanoLed N10 (Horiba Jobin Yvon), dla której długość fali wzbudzenia (λ_{ex}) wynosiła 434 nm, częstotliwość repetycji 1 MHz, a czas trwania impulsu 70 ps (max 200 ps). Moduł detekcyjny TBX-04 był zintegrowany z fotopowielaczem, stabilizatorem wysokiego napięcia, przedwzmacniaczem i dyskryminatorem pikosekundowym. Dane zbierano przy pomocy układu DATA STATION HUB (Horiba Jobin Yvon). Rozdzielczość czasowa układu wynosiła 0,0567 ns/kanał. Poprzez regulację ustawienia filtrów neutralnych oraz napięcia przykładanego do fotopowielacza utrzymywano stały (nie większy niż 1,8%) stosunek fotonów docierających do detektora i emitowanych z próbki.

W celu przeprowadzenia pomiaru czasów życia fluorescencji szkiełka z komórkami mocowano na pierścieniu i uszczelniano silikonem, a następnie zalewano ogrzanym do temperatury 37°C buforem H. Po upływie 48 h od transfekcji prowadzono pomiar na pojedynczej komórce, w której ulegały ekspresji białka fuzyjne, odpowiednio D₁-YFP, D₁^{G198A}-YFP i D₁^{G1263A}-YFP wraz z białkiem D₂-CFP. Natomiast jako odniesienie stosowano komórki, w których syntezie ulegało jedynie białko D₂-CFP. Obserwacje prowadzono na obiektywie CF160 o 40-krotnym powiększeniu przy użyciu zestawu filtrów BV-2A (Nikon) wyposażonych w lustro dichroiczne (455 nm) oraz dwa filtry interferencyjne FF01-438/24 (wzbudzenie) i FF01-438/32 (emisja). Do wizualizacji białek CFP i YFP stosowano lampę rtęciową T-DH 100 W. W przypadku fluorescencji białka

YFP dodatkowo zmieniano blok filtrów 41028YEL GFP C57111. Pomiar profilu rozproszenia lampy/diody laserowej prowadzono przed każdą serią w wodnym roztworze glikogenu lub ludoksu (koloidalny tlenek krzemu SiO_2 o bardzo dobrej rozpuszczalności w porównaniu do sproszkowanego glikogenu) przy użyciu bloku filtrów UV-2A (Nikon), w skład którego wchodziło tylko lustro dichroiczne (400 nm).

Wszystkie pomiary przeprowadzono w temperaturze 37°C utrzymywanej przez odpowiednio opracowany system regulacji temperatury. Czas życia fluorescencji dla danej serii pomiarowej uśredniano z ok. 15-20 niezależnych pomiarów z czterech niezależnych transfekcji.

Dane zmierzonego zaniku fluorescencji z analizatora wielokanałowego (MCA) były następnie analizowane przy użyciu programu DAS6, w którym po dekonwolucji zmierzonego zaniku fluorescencji z profilem diody dopasowano model multieksponencjalny opisany równaniem:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i}$$

Równanie 4.5-1

gdzie: $I(t)$ – intensywność fluorescencji w czasie [liczba zliczeń/s], α_i – cząstkowa amplituda [%], τ_i – czas życia fluorescencji i -tego składnika [ns].

4.5.3 Analiza średnich czasów życia fluorescencji

W dalszej analizie posłużono się modelem dwueksponencjalnym, opisany równaniem:

$$I(t) = A + B_1 e^{-t/T_1} + B_2 e^{-t/T_2}$$

Równanie 4.5-2

gdzie: A – tło [liczba zliczeń/s], B_i – amplitudy cząstkowe [%], T_i – składowe czasu zaniku fluorescencji [ns].

Oraz modelem trójeksponencjalnym, opisany równaniem:

$$I(t) = A + B_1 e^{-t/T_1} + B_2 e^{-t/T_2} + B_3 e^{-t/T_3}$$

Równanie 4.5-3

gdzie: A – tło [liczba zliczeń/s], B_i – amplitudy cząstkowe [%], T_i – składowe czasu zaniku fluorescencji [ns].

Jakość dopasowania danych doświadczalnych i wybranego modelu określano na podstawie parametru χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \left(\frac{N(t_k) - N_c(t_k)}{\sigma} \right)^2$$

Równanie 4.5-4

gdzie: $N(t_k)$ – zmierzony zanik fluorescencji, $N_c(t_k)$ – oczekiwany zanik fluorescencji (funkcja dopasowania), σ – odchylenie standardowe, n – liczba analizowanych kanałów.

Dokładność dopasowania oceniano na podstawie rezyduów (ang. *residuals*), wyrażonych jako stosunek rzeczywistego do oczekiwanego rozrzutu danych pomiarowych i opisanych równaniem:

$$R(t) = \left(\frac{N(t_k) - N_c(t_k)}{\sigma} \right)$$

Równanie 4.5-5

gdzie: $N(t_k)$ – zmierzony zanik fluorescencji, $N_c(t_k)$ – oczekiwany zanik fluorescencji (funkcja dopasowania), σ – odchylenie standardowe.

Rezydua są istotnym czynnikiem pozwalającym określić jakość dopasowania, gdyż pokazują gdzie rozbieżności między uzyskanym doświadczalnie zanikiem a dopasowanym modelem są największe. Z kolei ich normalizacja pozwala na porównanie jakości dopasowania z różnych serii, gdyż kompensuje rozrzut między kolejnymi pomiarami lub seriami pomiarowymi. Dodatkowo wyrażenie rezyduów $R(t)$ poprzez odchylenia standardowe umożliwia bezpośrednie obliczenie wartości χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_n [R(t)]^2$$

Równanie 4.5-6

Na podstawie analizy rezyduów wyselekcjonowano najdokładniejsze pomiary, dla których obliczono średni czas życia fluorescencji jako:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^n B_i \cdot \tau_i$$

Równanie 4.5-7

Pomiar czasu życia fluorescencji donora pozwala na obliczenie wydajności transferu energii wzbudzenia w mechanizmie Förstera (FRET) w układzie, w którym odległość pomiędzy donorem i akceptorem wynosi 1-10 nm. Czas życia fluorescencji donora (CFP) ulega skróceniu w obecności akceptora (YFP), w stosunku do czasu mierzonego w układzie

bez akceptora, czyli takim, w którym nie zachodzi przekazanie energii. Powyższe zagadnienia omówiono szerzej w rozdziale 2.4 oraz w dyskusji 6.3.

Wydajność zjawiska rezonansowego przekazania energii wzbudzenia w mechanizmie Förstera (FRET) liczoną dla średnich czasów życia donora w obecności akceptora (τ_{DA}) oraz przy jego braku (τ_D) obliczano z zależności:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Równanie 4.5-8

gdzie: E – wydajność rezonansowego przeniesienia energii [%], τ_D – średni czas życia fluorescencji donora [ns], τ_{DA} – średni czas życia fluorescencji donora w obecności akceptora [ns].

Wartość niepewności wydajności transferu FRET ($u(E)$) obliczono z prawa przenoszenia niepewności pomiarowej, jako:

$$\begin{aligned} u(E) &= \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[\frac{\partial E}{\partial \tau_i} u(\tau_i) \right]^2} = \sqrt{\left[\frac{\partial E}{\partial \tau_D} u(\tau_D) \right]^2 + \left[\frac{\partial E}{\partial \tau_{DA}} u(\tau_{DA}) \right]^2} \\ &= \sqrt{\left[-\frac{\tau_{DA} \cdot u(\tau_D)}{\tau_D^2} \right]^2 + \left[-\frac{u(\tau_{DA})}{\tau_D} \right]^2} \end{aligned}$$

Równanie 4.5-9

gdzie: $u(E)$ – niepewność wyznaczenia wydajności przeniesienia energii [ns], $u(\tau_D)$ – odchylenie standardowe czasu życia fluorescencji donora [ns], $u(\tau_{DA})$ – odchylenie standardowe czasu życia fluorescencji donora w obecności akceptora [ns].

Znamienność statystyczną uzyskano w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) wraz z testem *post-hoc* Dunnett’a. Natomiast niepewności średnich czasów zaniku obliczono jako odchylenie standardowe.

4.5.4 Analiza składowych modelu multieksponeńcjalego

Analogicznie do modelu zaproponowanego przez Millingtona i wsp. (2007) obliczono wydajności rezonansowego przekazania energii pomiędzy oddziałującymi konformacjami fluoroforów. W tym celu przyjęto, że chromofor białka CFP może występować w dwóch konformacjach różniących się czasami życia fluorescencji, opisanymi odpowiednimi składowymi modelu dwueksponeńcjalego, czyli T_1 i T_2 , wraz z odpowiadającymi im amplitudami (B_1 oraz B_2). Właściwość ta wynika z oddziaływania z aminokwasami otaczającymi bezpośrednio chromofor w tym białku (Bae 2003).

Z pomiarów NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) wynika dodatkowo, że następuje konwersja pomiędzy obiema konformacjami w czasie rzędu milisekund, znacząco dłuższym od czasów życia fluorescencji (Seifert i wsp. 2002). W konsekwencji obie konformacje mogą niezależnie oddziaływać z białkiem YFP, a zatem każdą z nich należy uwzględnić w pomiarach wydajności FRET. W przypadku białka YFP wykazano, że występuje ono w konformacji uprotonowanej oraz nieuprotonowanej, z których tylko ta druga może być akceptorem fluorescencji (Elsiger i wsp. 1999).

Wartości średnie każdej składowej odpowiedniego zaniku obliczono jako:

$$\bar{T}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{1i} \cdot \tau_1 \quad \text{Równanie 4.5-10}$$

$$\bar{T}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{2i} \cdot \tau_2 \quad \text{Równanie 4.5-11}$$

$$\bar{T}_3 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{3i} \cdot \tau_3 \quad \text{Równanie 4.5-12}$$

Z uzyskanych zaników obliczono także średnie wartości amplitud każdej składowej:

$$\bar{B}_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{1i} \quad \text{Równanie 4.5-13}$$

$$\bar{B}_2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{2i} \quad \text{Równanie 4.5-14}$$

$$\bar{B}_3 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \alpha_{3i} \quad \text{Równanie 4.5-15}$$

gdzie: n – liczba pomiarów, α_i – amplituda cząstkowa składowej czasowej zaniku fluorescencji.

Do dalszej analizy wykorzystano modele „3 τ ” oraz „4 τ ”. W pierwszym dochodzi do oddziaływania pomiędzy donorem reprezentowanym przez długą składową oraz aktywną konformacją akceptora (rozdział 2.4). Model „4 τ ” zakłada natomiast oddziaływanie obu konformacji CFP z aktywną konformacją fluorofora YFP. W oparciu o te założenia obliczono czasy życia fluorescencji donora uzyskane z dopasowania dwueksponencjalnego (τ_{D1} oraz τ_{D2}) (równanie 4.5-2) oraz czasy życia fluorescencji w układzie donor-akceptor uzyskane z dopasowania trójeksponencjalnego (τ_{DA1} , τ_{DA2} oraz τ_{DA3}) (równanie 4.5-3). Na podstawie tych obliczeń wyznaczono wydajność FRET (równanie 4.5-8) i niepewność $u(E)$ (równanie 4.5-9). Znamienność statystyczną uzyskano w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) wraz z testem *post-hoc* Dunnett’a.

4.5.5 Określenie lokalizacji na mikroskopie konfokalnym

Po upływie 48 h od transfekcji przeprowadzano procedurę utrwalania komórek na szkiełkach. W tym celu każde szkiełko przepłukiwano 1 ml PBS i dodawano 2 ml 4% PA (tabela 3.3-2). Całość inkubowano przez 20 minut, a następnie przepłukiwano dwukrotnie wodą i po odwróceniu montowano na szkiełkach podstawowych przy pomocy roztworu do zatapiania szkiełek ogrzanego do temperatury 37°C. Tak przygotowane preparaty mikroskopowe umieszczano w temperaturze 4°C i przechowywano do czasu pomiarów, lecz nie dłużej niż dwa tygodnie.

Obrazy uzyskano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego (mikroskop odwrócony Nikon Diapoth 300 sprzężony z systemem BioRad MRC1024) wyposażonego w obiektyw immersyjny PlanApo x60 1,4NA oraz 100 mW laser argonowy chłodzony powietrzem (ITL). Białko CFP wzbudzano falą o długości 457 nm natomiast białko YFP – falą 514 nm przy użyciu bloku filtrów dichroicznych z458/514rpc (Chroma). Blok filtrów VHS oraz filtry emisyjne HQ485/30 i GQ540/30 użyto do oddzielenia fluorescencji pochodzącej od białek CFP i YFP. Obrazy analizowano przy pomocy programu LASER SHARP v.3.2. Współczynnik Pearson’a obliczono na podstawie analizy obrazów w programie IMAGE PRO+.

Kolokalizacja jest miarą współwystępowania dwóch lub więcej cząsteczek fluorescencyjnych w tym samym obszarze. Połączenie białek receptorowych z białkami fluorescencyjnymi pozwoliło na obserwację lokalizacji receptorów dopaminowych w komórce, jak i na pomiary stopnia kolokalizacji receptora dopaminowego D₁ z receptorem dopaminowym D₂ oraz wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₁ (D₁^{G198A} i D₁^{G1263A}) z receptorem D₂. Do pomiaru stopnia kolokalizacji użyto współczynnika Pearson’a:

$$R = \frac{\sum_i (R_i - R_{av}) \cdot (G_i - G_{av})}{\sqrt{\sum_i (R_i - R_{av})^2 \sum_i (G_i - G_{av})^2}}$$

Równanie 4.5-16

gdzie: R_i, G_i – intensywności kanału, odpowiednio, czerwonego (R) i zielonego (G),
R_{av}, G_{av} – średnie intensywności odpowiednio R_i i G_i.

Współczynnik ten jest używany do określenia korelacji rozkładu intensywności pomiędzy składową czerwoną i zieloną obrazu dwukanałowego. Dla każdego obrazu wyznaczono tło poprzez pomiar średniej intensywności sygnału fluorescencji w obrębie zdefiniowanego obszaru AOI (ang. *Area Of Interest*) wolnego od komórek. Następnie wartość tę odejmowano od obrazu właściwego. Współczynnik Pearson’a został obliczony

dla dowolnie wybranych obszarów obrazu pojedynczej kotransfekowanej komórki, dla których intensywności fluorescencji CFP i YFP były porównywalne.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (*one-way* ANOVA) oraz testu *post-hoc* Dunnett’a.

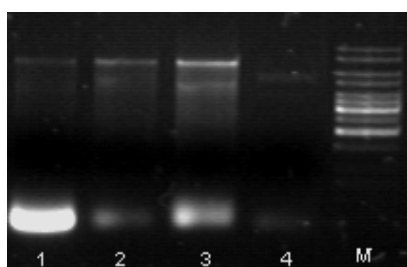
5. WYNIKI

5.1 Metody inżynierii molekularnej

5.1.1 Wprowadzenie mutacji punktowych w genie receptora dopaminowego DRD1

Do wprowadzenia mutacji punktowych w genie receptora dopaminowego D₁ zastosowano metodę ukierunkowanej mutagenazy (*QuickChange*) (rozdział 4.1.2), która pozwala na szybką modyfikację plazmidów poprzez wprowadzenie mutacji, delecji lub insercji. Dlatego też zastosowano ją do stworzenia dwóch polimorficznych odmian receptora dopaminowego D₁, w obu zamieniono nukleotyd guaninowy (G) na adeninowy (A), uzyskując odpowiednio zmodyfikowane receptory dopaminowe: D₁^{G198A} i D₁^{G1263A}.

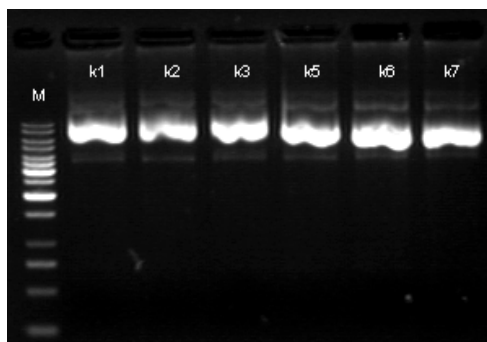
Plazmid zawierający gen receptora dopaminowego D₁, pcDNA3.1(+)/DRD1, użyto jako matrycę. Startery zaprojektowano tak, aby były komplementarne do matrycy, a w części środkowej zawierały zamieniony nukleotyd (rozdział 4.1.1). Oba warianty genetyczne receptora dopaminowego D₁ uzyskano metodą opisaną w rozdziale 4.1.2, a przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR *Quick Change* przeprowadzonej dla trzech stężeń matrycowego DNA (0,25 µl, 0,5 µl i 1 µl) przedstawiono na rycinie 5.1-1.



Rycina 5.1-1 Elektroforeza DNA po reakcji *Quick Change* – DRD1^{G198A}. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*), 1 – 0,25 µl matrycy, 2 – 0,5 µl matrycy, 3 – 1 µl matrycy, 4 – kontrola bez polimerazy 0,5 µl matrycy.

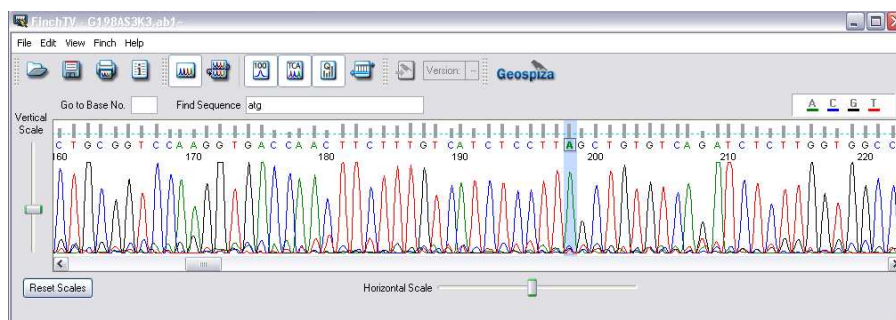
W kolejnym etapie produkt reakcji PCR poddano trawieniu enzymem DpnI, aby po strawieniu matrycowego DNA wyselekcjonować zsyntetyzowane DNA zawierające pożądaną mutację. Plazmid oczyszczono i stransformowano nim komórki kompetentne DH5α, a następnie rozsiano na szalki LB-agar. Wyrosłe kolonie analizowano metodą

Toothpick pod kątem obecności w nich plazmidów z mutacją (rozdział 4.1.7). Wybrano siedem kolonii, z których wyizolowano DNA i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (rycina 5.1-2).



Rycina 5.1-2 Analiza kolonii bakteryjnych po transformacji. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*), k1-k7 – DNA wyizolowane z kolejnych kolonii bakteryjnych (1 μ l oczyszczonego DNA + 4 μ l buforu).

Próbki zostały zsekwencjonowane w Pracowni Syntezy i Sekwencjonowania DNA IBB PAN. Przykładowy wynik sekwencjonowania przedstawiono na rycinie 5.1.3.



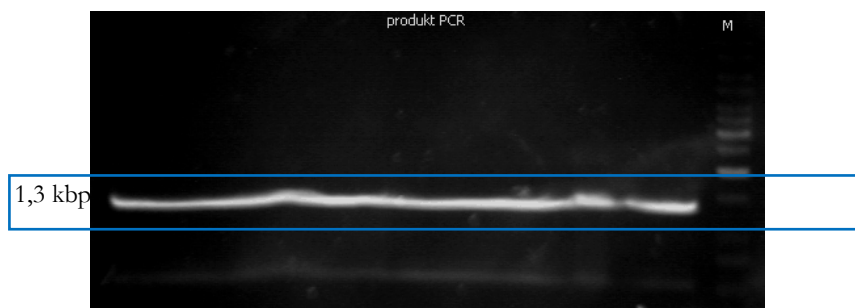
Rycina 5.1-3 Przykładowy wynik sekwencjonowania: DNA wyizolowane z kolonii k3, chromatogram uzyskany przy użyciu programu FINCH TV.

Nie powiodła się próba sekwencjonowania DNA z kolonii k7. Natomiast pozostałe kolonie zawierały DNA z wprowadzoną mutacją, ale jedynie DNA z kolonii k3 (rycina 5.1-3) nie zawierało innych zmian punktowych niż planowana mutacja D_1^{G198A} . Tego DNA użyto do dalszej pracy.

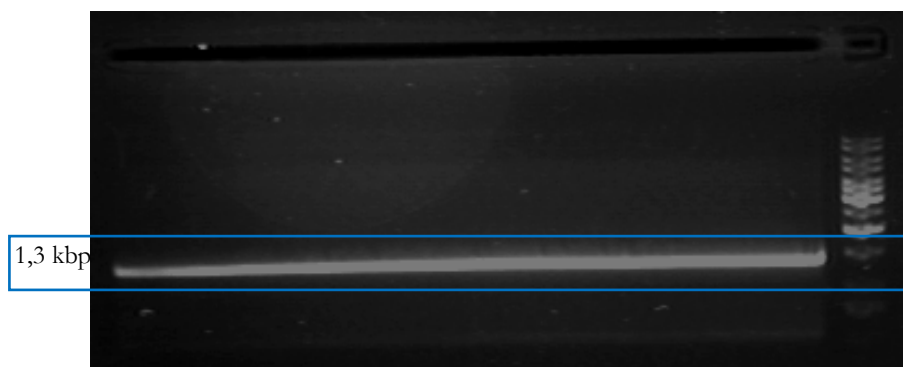
5.1.2 Wprowadzenie genów zmodyfikowanego receptora dopaminowego do plazmidu pEYFP-N1 (pECFP-N1)

Przy użyciu programu CLONE 4 sprawdzono czy w genie DRD1 nie ma więcej miejsc cięcia dla enzymów NheI i XhoI. Na tej podstawie zdecydowano się na wprowadzenie przy ich użyciu zmodyfikowanego genu DRD1 (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}) do pEYFP-N1 (oraz pECFP-N1). W wyniku reakcji PCR w genie DRD1 (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}) wprowadzono miejsce cięcia

dla enzymu XhoI przy jednoczesnym usunięciu kodonu STOP (rozdział 4.1.3). Otrzymano specyficzny produkt o wielkości ok. 1,3 kbp, która odpowiada spodziewanej długości namnażanego fragmentu. Wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiono na rycinach 5.1-4 i 5.1-5.



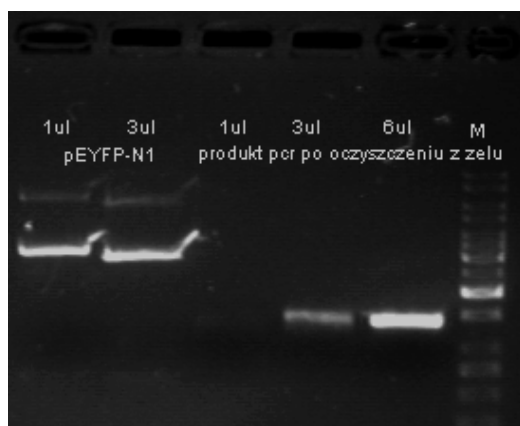
Rycina 5.1-4 Rozdział elektroforetyczny produktu PCR. Reakcja PCR prowadzona przy 2,5 mM stężeniu jonów magnezu Mg^{2+} . Matryca – pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).



Rycina 5.1-5. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR. Reakcja PCR prowadzona przy 2,5 mM stężeniu jonów magnezu Mg^{2+} . Matryca - pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A}. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).

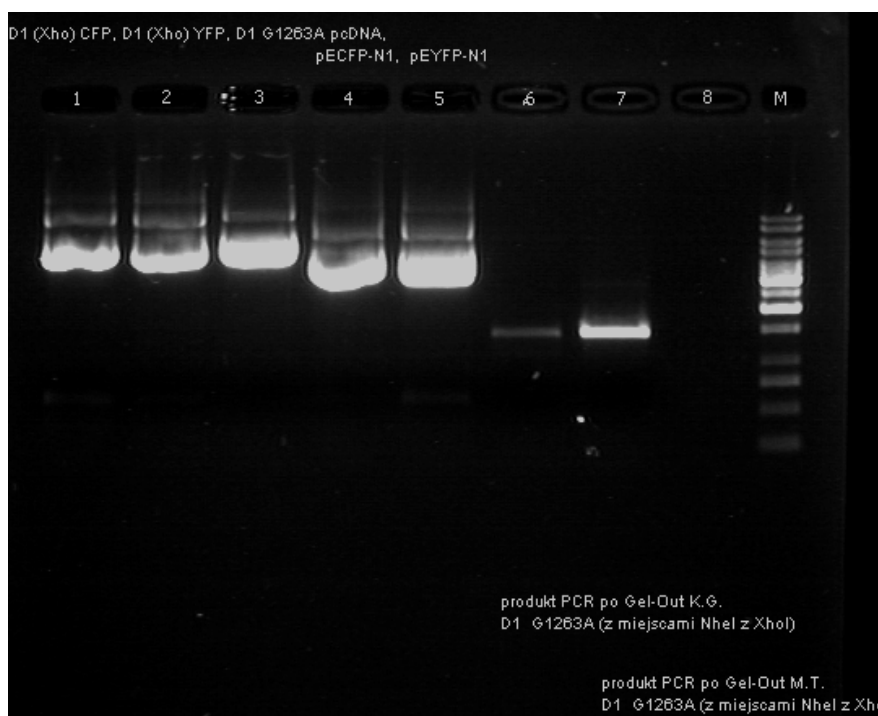
Następnie wyizolowano z żelu produkt reakcji (rozdział 4.1.4) i pocięto namnożoną wstawkę (zmodyfikowany gen DRD1) oraz plazmid pEYFP-N1 (lub pECFP-N1) enzymami NheI i XhoI (rozdział 4.1.5).

Aby dobrać warunki reakcji trawienia przeprowadzono rozdziel elektroforetyczny plazmidu pEYFP-N1 oraz produktu PCR oczyszczonego z żelu (pcDNA3.1(+)/DRD1^{G198A}). Na podstawie intensywności prążków zdecydowano przeprowadzić reakcję dla 2-krotnie większego stężenia wstawki (D_1^{G198A}) do plazmidu pEYFP (rycina 5.1-6).



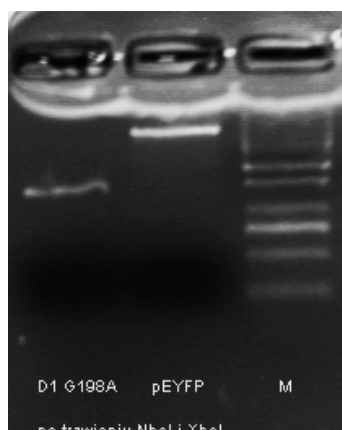
Rycina 5.1-6. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR oczyszczonego z żelu i plazmidu pEYFP - dobranie warunków trawienia. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).

Analogicznie dobrano warunki trawienia restrykcyjnego dla plazmidu pEYFP-N1 (pECFP-N1) oraz produktu PCR oczyszczonego z żelu (pcDNA3.1(+)/DRD1^{G1263A}). W tym przypadku zwiększono 2,5-krotnie ilość wstawki w stosunku do wektora pEYFP-N1 (pECFP-N1) na podstawie intensywności prążków, które dla obu wektorów są dużo jaśniejsze (rycina 5.1-7).

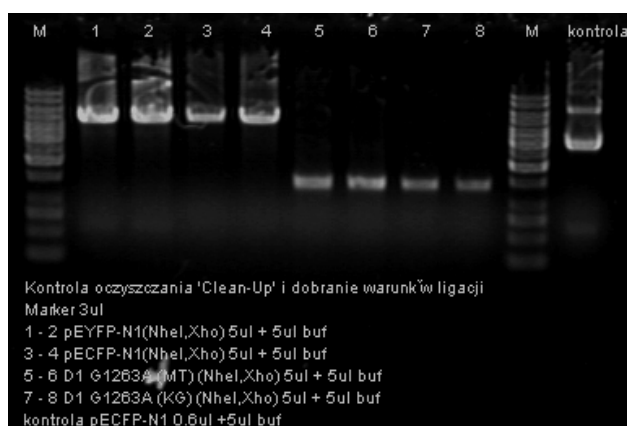


Rycina 5.1-7. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR oczyszczonego z żelu - dobranie warunków trawienia. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).

Skuteczność trawienia kontrolowano na żelu. Zgodnie z oczekiwaniami uzyskano fragment odpowiadający genowi DRD1, ok. 1,3 kbp, oraz pusty liniowy plazmid pcDNA3.1(+) o długości ok. 5,5 kbp (rycina 5.1-8).



Rycina 5.1-8. Kontrolny rozdział elektroforetyczny. Produkty trawienia enzymami NheI i XhoI. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).



Rycina 5.1-9. Kontrolny rozdział elektroforetyczny. Produkty trawienia enzymami NheI i XhoI. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).

W przypadku drugiego z wariantów genetycznych (D_1^{G1263A}) po oczyszczeniu strawionych plazmidów przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w celu dobrania odpowiednich warunków ligacji (rycina 5.1-9).

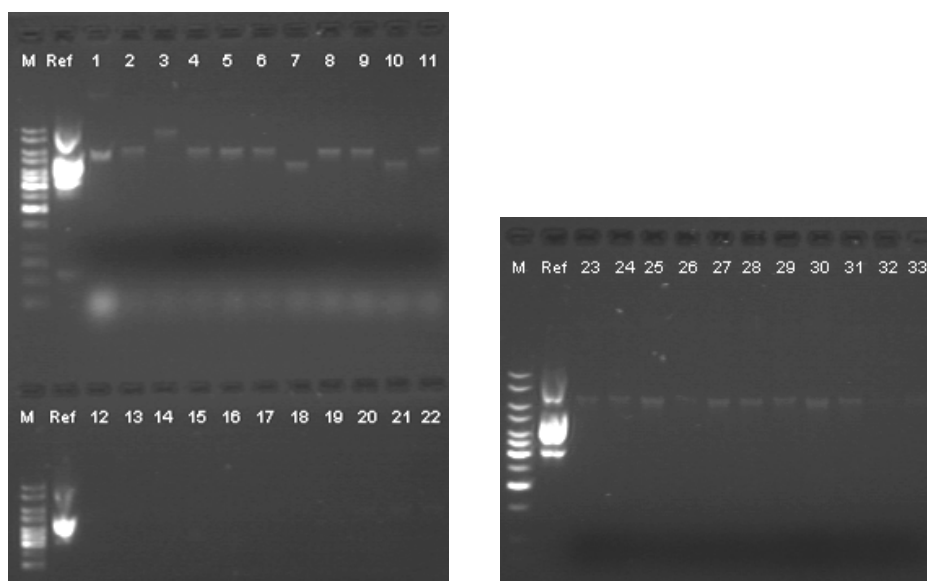
Następnie przeprowadzono reakcję ligacji plazmidów z wstawką (rozdział 4.1.6). Otrzymano białka fuzyjne, w których do C-końca białka receptorowego z wprowadzoną mutacją punktową (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}) dołączone jest białko fluorescencyjne YFP (lub CFP).

5.1.3 Analiza kolonii bakteryjnych – metoda *Toothpick*

Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne DH5α i rozsiano na szalki LB-agar, a wyrosłe kolonie analizowano metodą *Toothpick* pod kątem obecności w nich plazmidów z wstawką (rozdział 4.1.7).

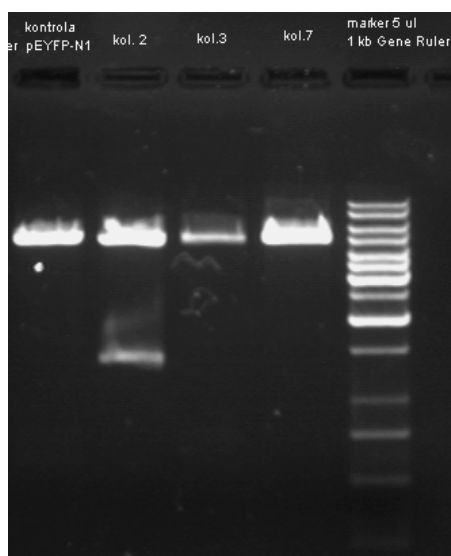
5.1.3.1 Analiza kolonii bakteryjnych – D₁^{G198A}-YFP

Rozdział elektroforetyczny plazmidów wyizolowanych z wybranych 33 kolonii przedstawiono na rycinie 5.1-10.



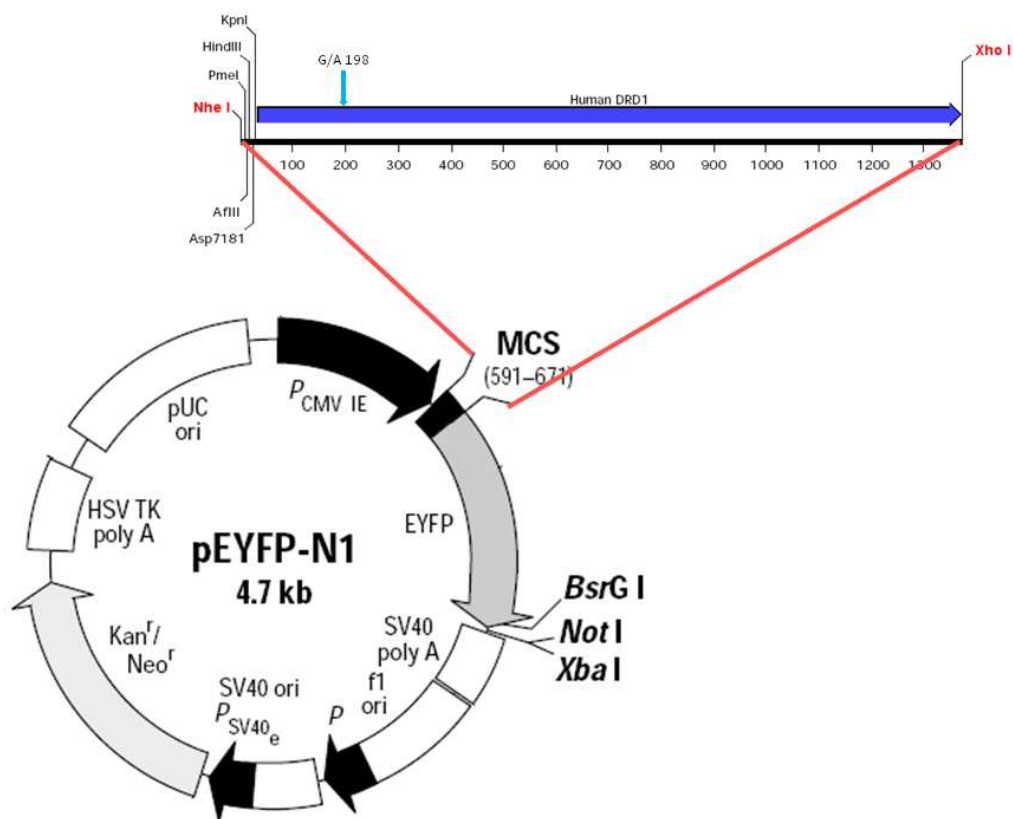
Rycina 5.1-10 Analiza kolonii bakteryjnych po transformacji. Rozdział elektroforetyczny DNA plazmidowego po ligacji plazmidu pEYFP ze zmodyfikowanym genem DRD1^{G198A}. Kolejne numery odpowiadają koloniom wyrosłym na szalce. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*), Ref – plazmid pEYFP bez wstawki.

Na podstawie różnic w wielkości prążków do analizy restrykcyjnej wybrano trzy kolonie (oznaczone jako 2, 3 i 7) i zastosowano enzymy NheI i XhoI. Dla plazmidu wyizolowanego z koloni 2 zaobserwowano po trawieniu dwa fragmenty (rycina 5.1-11): prążek długości ok. 1,3 kbp odpowiadający DRD1^{G198A} oraz liniowe DNA długości ok. 5 kbp odpowiadające plazmidowi pEYFP-N1 (4,7 kbp).



Rycina 5.1-11. Analiza restrykcyjna klonów 2, 3 i 7. DNA wyizolowane z kolonii 2, 3 i 7 trawiono enzymami NheI i XhoI. Kontrola – plazmid pEYFP-N1 nietrawiony. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).

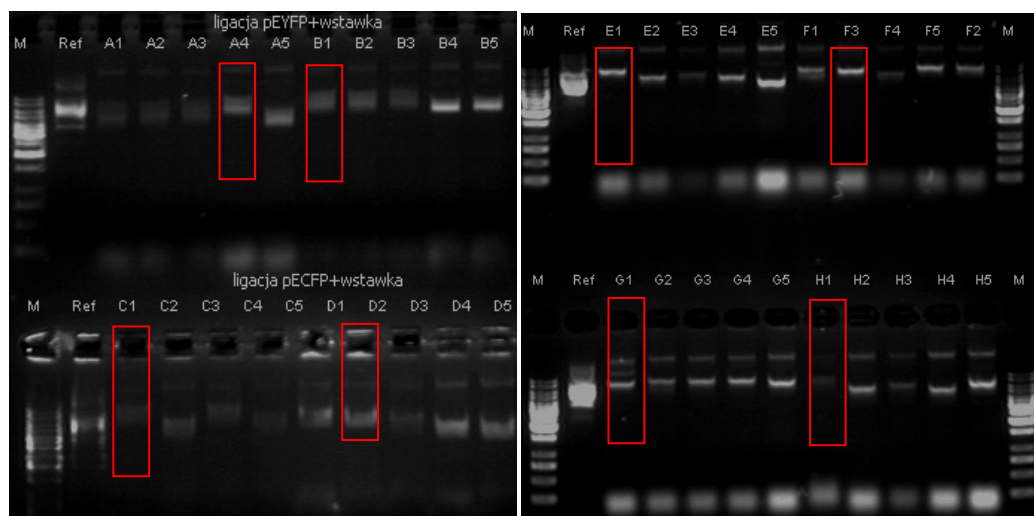
Rezultat ten wskazuje, że otrzymano pożądaný konstrukt D_1^{G198A} -YFP (rycina 5.1.11). Dodatkowe potwierdzenie uzyskano po zsekwencjonowaniu uzyskanego plazmidu.



Rycina 5.1-12. Schematyczna mapa konstruktów D_1^{G198A} -YFP. Wynik fuzji zmodyfikowanego genu receptora dopaminowego DRD1 z plazmidem zawierającym żółte białko fluorescencyjne YFP przy użyciu enzymów NheI i XhoI.

5.1.3.2 Analiza kolonii bakteryjnych – D_1^{G1263A} -YFP

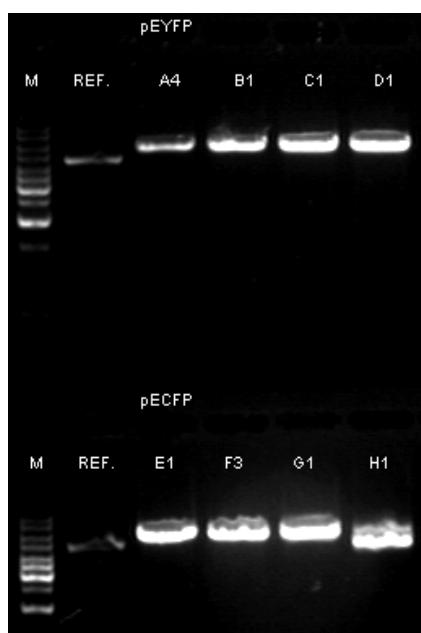
Dla każdej transformacji wybrano po 5 kolonii na szalkę i wyizolowano z nich DNA plazmidowe, którego rozdział elektroforetyczny przedstawiono na rycinie 5.1-13.



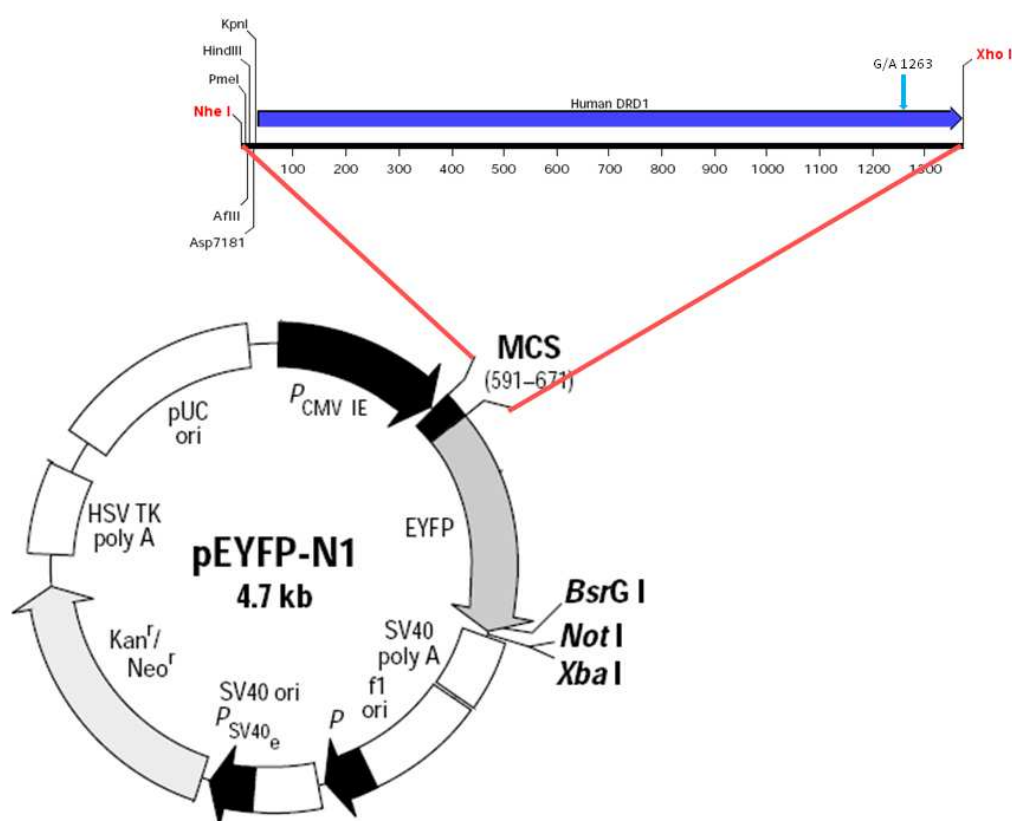
Rycina 5.1-13. Analiza kolonii bakteryjnych po transformacji. Rozdział elektroforetyczny DNA plazmidowego po ligacji plazmidu pEYFP oraz pECFP ze zmodyfikowanym genem $DRD1^{G1263A}$. Kolejne numery odpowiadają koloniom wyrosłym na szalkach. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*), Ref – plazmid pEYFP bez wstawki.

Na podstawie różnic w wielkości prążków do analizy restrykcyjnej wybrano kolonie oznaczone jako: A4, B1, C1, D1, E1, F3, G1 i H1, które poddano trawieniu enzymem XhoI (rozdział 4.1.5). Wynik trawienia kontrolnego (rycina 5.1-14) wskazywał na obecność pożądanej wstawki w plazmidzie pEYFP w przypadku kolonii C1 oraz w kolonii E1 w przypadku plazmidu pECFP. W celu potwierdzenia uzyskanego wyniku zsekwencjonowano obie próbki.

Wynik sekwencjonowania potwierdził obecność wprowadzonej mutacji punktowej w genie receptora $DRD1$ wklonowanego do plazmidu pEYFP (i pECFP). W dalszej części pracy wykorzystano konstrukt D_1^{G1263A} -YFP, który schematycznie przedstawiono na rycinie 5.1-15.



Rycina 5.1-14. Analiza restrykcyjna klonów A4, B1, C1, D1, E1, F3, G1 i H1. DNA wyizolowane z kolonii trawiono enzymem XhoI. Ref – plazmid pEYFP-N1 nie trawiony. M – standard masowy (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*).



Rycina 5.1-15. Schematyczna mapa konstruktu D₁^{G1263A}-YFP. Wynik fuzji zmodyfikowanego genu receptora dopaminowego DRD1 z plazmidem zawierającym żółte białko fluorescencyjne YFP przy użyciu enzymów NheI i XhoI.

5.2 Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand

Metodą analizy saturacyjnej przy użyciu znakowanych radioligandów (rozdział 4.4) wyznaczono parametry wiązania receptor-ligand receptorów dopaminowych D_1 i D_2 w układzie *in-vitro* (transfekowane komórki HEK293) (rozdziały 5.2.2 i 5.2.3) oraz w układzie natywnym (tkanka mózgowa szczura) (rozdział 5.2.1). Analogicznie uzyskano parametry wiązania dla wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 : D_1^{G198A} oraz D_1^{G1263A} (rozdział 5.2-2)

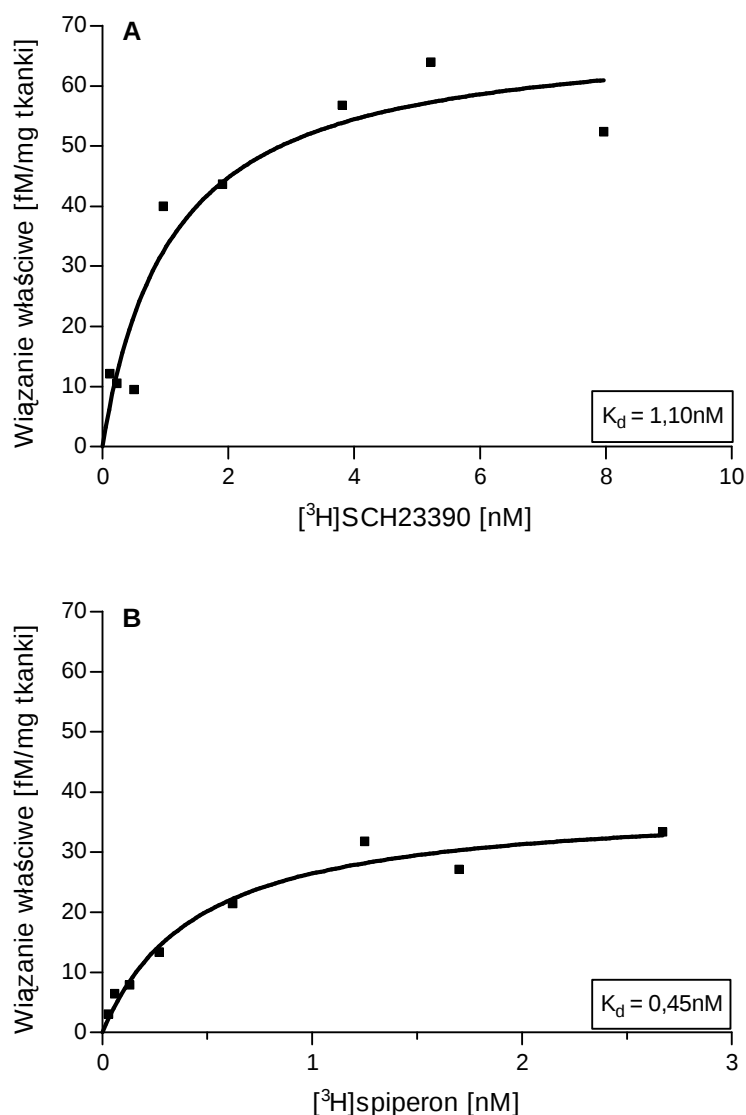
Następnie zbadano wpływ koekspresji receptora dopaminowego D_1 (lub jednej z jego mutein) z receptorem dopaminowym D_2 . Analizę saturacyjną przeprowadzono przy użyciu [3 H]SCH23390 oraz [3 H]spiperonu i ponownie wyznaczono stałe B_{max} i K_d (rozdział 5.2.4).

W ostatnim etapie doświadczeń biochemicznych sprawdzono wpływ przyłączonego białka fluorescencyjnego na parametry wiązania receptor-ligand, dla układu w którym syntezie ulegały niezależnie D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP lub D_1^{G1263A} -YFP (rozdział 5.2.5) oraz dla układu kotransfekowanego, w którym występowało również białko fuzyjne D_2 -CFP (rozdział 5.2.6).

Znamiennosć statystyczną uzyskanych wyników wyznaczono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (*one-way* ANOVA) oraz testu *post-hoc* Dunnett'a.

5.2.1 Pomiar parametrów wiązania [3 H]SCH23390 oraz [3 H]spiperonu w tkance mózgowej szczura (prążkowie)

W pierwszym etapie zmierzono parametry wiązania znakowanych radioligandów do receptorów dopaminowych w tkance mózgowej szczura (prążkowie). Uzyskane wyniki (tabela 5.2-1) oraz przykładowe krzywe saturacyjne wiązania [3 H]SCH23390 do receptora D_1 oraz [3 H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2 pokazano poniżej (rycina 5.2-1)



Rycina 5.2-1. Przykładowy wynik analizy saturacyjnej. A) wiązanie $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ do receptora dopaminowego D_1 w tkance mózgowej szczura. B) wiązanie $[^3\text{H}]\text{spiperonu}$ do receptora dopaminowego D_2 w tkance mózgowej szczura.

Tabela 5.2-1. Parametry wiązania receptor-ligand w tkance mózgowej szczura ($n=4-6$).

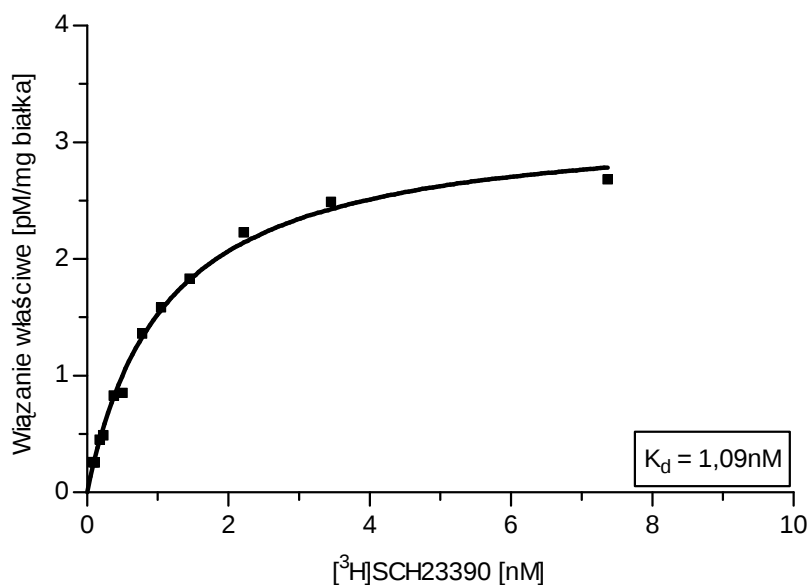
Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [fM/mg tkanki]
D_1	$1,08 \pm 0,01$	60 ± 2
D_2	$0,45 \pm 0,04$	33 ± 4

5.2.2 Pomiar parametrów wiązania $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ do receptora dopaminowego D_1 oraz wariantów $\text{D}_1^{\text{G198A}}$ i $\text{D}_1^{\text{G1263A}}$

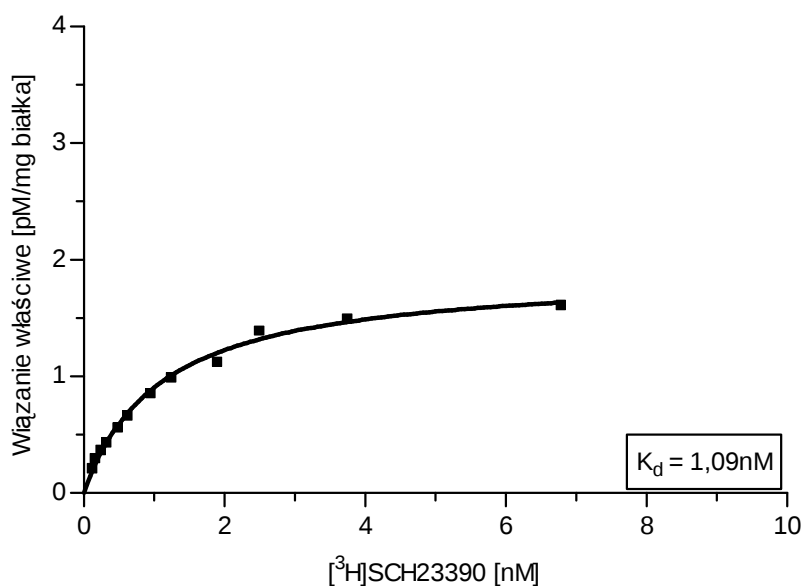
W metodzie wiązania radioligandu $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ w modelowym układzie HEK293 zaobserwowano specyficzne wiązanie tego związku do receptora dopaminowego D_1 . Doświadczalnie uzyskana średnia wartość B_{max} , charakteryzująca gęstość receptorów D_1

wyniosła 4,19 pM/mg białka, a przykładowy wynik doświadczenia przedstawiono na rycinie 5.2-2. Wartość stałej dysocjacji K_d wyniosła 1,17 nM, a zatem nie różni się od podawanej w literaturze (So i wsp. 2005) i wyznaczonej dla prążkowie wartości 1 nM.

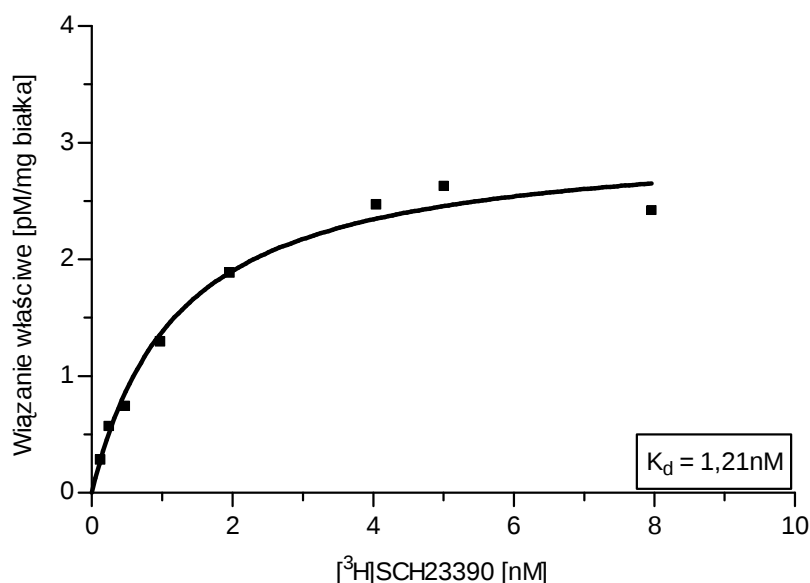
Poniżej przedstawiono uzyskane doświadczalnie krzywe saturacyjne wiązania [^3H]SCH23390 do receptora dopaminowego D_1 (rycina 5.2-2) oraz do polimorficznych wariantów receptora dopaminowego D_1 : $\text{D}_1^{\text{G198A}}$ lub $\text{D}_1^{\text{G1263A}}$ (ryciny 5.2-3 i 5.2-4), które ulegały biosyntezie w modelowym układzie komórkowym HEK293.



Rycina 5.2-2. Przykładowa krzywa wiązania [^3H]SCH23390 do receptora dopaminowego D_1 w modelowym układzie komórkowym HEK293.



Rycina 5.2-3. Przykładowa krzywa wiązania [^3H]SCH23390 do receptora dopaminowego $\text{D}_1^{\text{G198A}}$ w modelowym układzie komórkowym HEK293.



Rycina 5.2-4. Przykładowa krzywa wiązania [³H]SCH23390 do receptora dopaminowego D₁^{G1263A} w modelowym układzie komórkowym HEK293.

Uzyskane wartości stałej dysocjacji K_d dla obu wariantów receptora D₁ nie różnią się znacząco od wartości zmierzonej w tkance mózgowej szczura (1,08 nM) ani od wartości uzyskanej dla receptora natywnego D₁ (1,17 nM) i wynoszą 1,31 nM oraz 1,1 nM odpowiednio dla D₁^{G198A} i D₁^{G1263A} (tabela 5.2-2). W tabeli 5.2-2 podano również wartości uzyskanej gęstości receptorów B_{max} we frakcji błonowej przejściowo transfekowanych komórek HEK293. Uzyskane wyniki wskazują na znamienne niższą ekspresję polimorficznego wariantu receptora dopaminowego D₁^{G198A} w stosunku do receptora D₁ ($p < 0,001$), jak i drugiego wariantu polimorficznego D₁^{G1263A} ($p < 0,05$). Gęstość receptorów w przeliczeniu na miligram białka w przypadku wariantu D₁^{G1263A} jest niższa w stosunku do receptora natywnego D₁, ale wyższa od gęstości uzyskanej dla wariantu D₁^{G198A}.

Tabela 5.2-2. Parametry wiązania [³H]SCH23390 do receptora dopaminowego D₁ i jego wariantów genetycznych w modelowym układzie komórkowym HEK293. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D₁^{G198A} vs D₁ $p < 0,001$; * D₁^{G1263A} vs D₁ $p < 0,05$, (#) D₁^{G1263A} vs D₁^{G198A} $p < 0,05$ ($n = 5-9$).

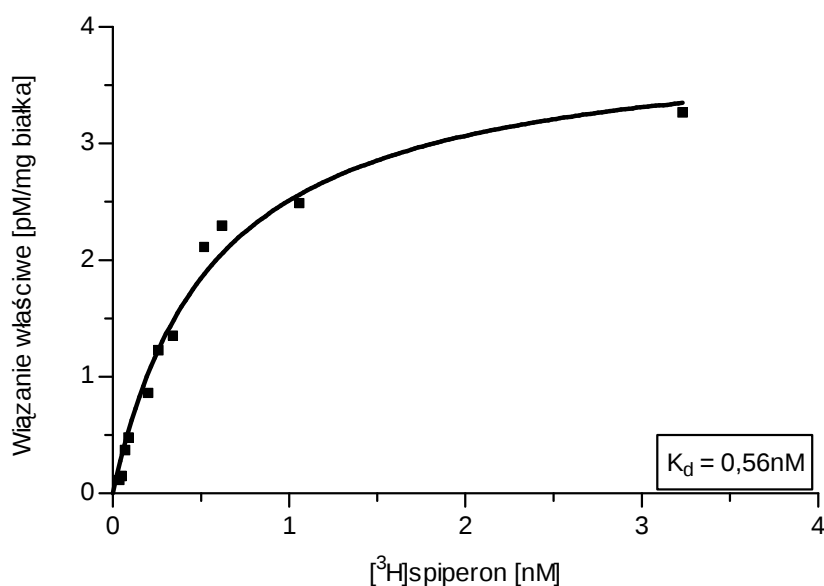
Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D ₁	$1,17 \pm 0,04$	$4,19 \pm 0,39$
D ₁ ^{G198A}	$1,31 \pm 0,14$	$2,18 \pm 0,24$ (**, #)
D ₁ ^{G1263A}	$1,10 \pm 0,05$	$3,20 \pm 0,20$ (*)

5.2.3 Pomiar parametrów wiązania [^3H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2

Metodą analizy saturacyjnej uzyskano parametry wiązania [^3H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2 we frakcji błonowej komórek HEK293. Wyznaczona doświadczalnie wartość stałej K_d wyniosła 0,51 nM i nie różni się znacząco od wartości uzyskanej dla prądkowia (tabela 5.2-1). Gęstość receptora dopaminowego D_2 syntetyzowanego w modelowym układzie HEK293 wyniosła 2,54 pM/mg białka (tabela 5.2-3). Przykładowy wynik analizy saturacyjnej przedstawiono na rycinie 5.2-5.

Tabela 5.2-3. Parametry wiązania [^3H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2 w modelowym układzie komórkowym HEK293.

Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D2	$0,51 \pm 0,05$	$2,54 \pm 0,48$



Rycina 5.2-5. Przykładowa krzywa wiązania [^3H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2 w modelowym układzie komórkowym HEK293.

5.2.4 Pomiar parametrów wiązania [^3H]SCH23390 oraz [^3H]spiperonu w układzie kotransfekowanym

W kolejnym etapie zbadano wpływ obecności receptora D_2 w układzie, w którym ulegały ekspresji również receptory D_1 , $\text{D}_1^{\text{G198A}}$ lub $\text{D}_1^{\text{G1263A}}$. Zmierzono parametry wiązania [^3H]SCH23390 do receptora dopaminowego D_1 oraz [^3H]spiperonu do receptora

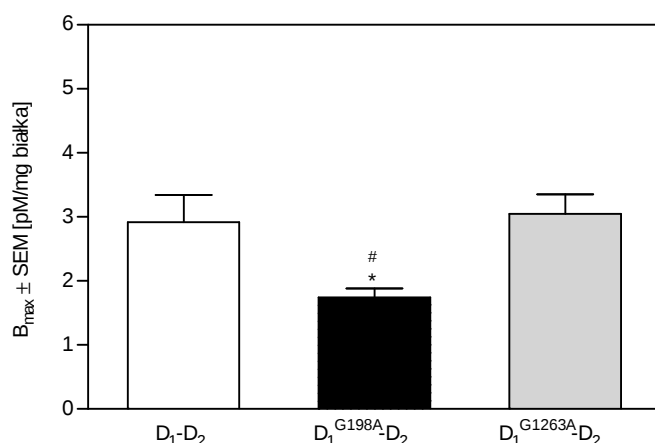
dopaminowego D₂. Uzyskane wartości stałej dysocjacji K_d oraz gęstości receptorów B_{max} dla [³H]SCH23390 zebrano w tabeli 5.2-4, natomiast dla [³H]spiperonu w tabeli 5.2-5.

Tabela 5.2-4. Parametry wiązania [³H]SCH23390 do receptora dopaminowego D₁, D₁^{G198A} oraz D₁^{G1263A} w układach, w których występował on razem z receptorem D₂. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (*) D₁^{G198A}-D₂ vs D₁-D₂ p<0,05 (n=3-5).

Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D ₁ -D ₂	1,25 ± 0,20	2,92 ± 0,43
D ₁ ^{G198A} -D ₂	1,00 ± 0,06	1,74 ± 0,14 (*)
D ₁ ^{G1263A} -D ₂	1,06 ± 0,08	3,04 ± 0,30

Tabela 5.2-5. Parametry wiązania [³H]spiperonu do receptora dopaminowego D₂ w układach, w których występował on razem z receptorem D₁ lub jednym z wariantów genetycznych: D₁^{G198A} albo D₁^{G1263A}.

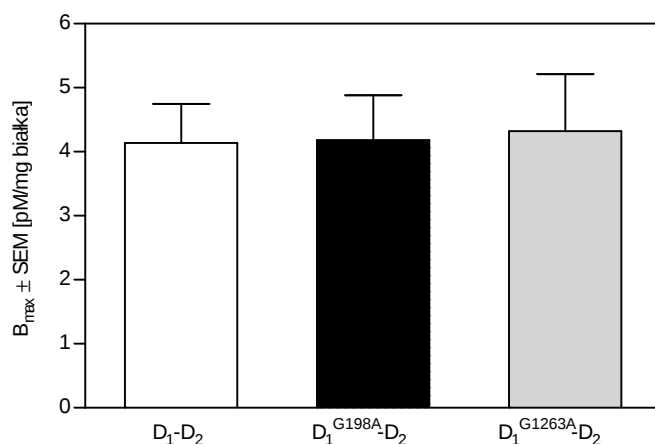
Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D ₁ -D ₂	0,60 ± 0,06	4,14 ± 0,61
D ₁ ^{G198A} -D ₂	0,57 ± 0,08	4,19 ± 0,69
D ₁ ^{G1263A} -D ₂	0,49 ± 0,09	4,32 ± 0,89



Rycina 5.2-6. Gęstość receptorów dopaminowych D₁ wyznaczona metodą wiązania [³H]SCH23390 w modelowym układzie komórkowym HEK293, w którym występował receptor dopaminowy D₂ wraz z receptorem D₁ lub receptor D₂ wraz z wariantem genetycznym D₁. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (*) D₁^{G198A}-D₂ vs D₂-D₁ p<0,05, (#) D₁^{G198A}-D₂ vs D₁^{G1263A}-D₂ p<0,05 (n=3-5).

Ponownie zaobserwowano niższą ekspresję polimorficznej odmiany receptora dopaminowego D₁^{G198A} w stosunku do receptora natywnego D₁ w układzie kotransfekowanym (rycina 5.2-6) przy jednakowym poziomie ekspresji receptora D₂ w badanych układach (rycina 5.2-7). Jednocześnie nie stwierdzono zmiany wartości stałej dysocjacji K_d , co pozwala sądzić, iż obecność receptora dopaminowego D₂ nie powoduje

zmiany właściwości receptora dopaminowego D_1 ani jego odmian genetycznych: D_1^{G198A} oraz D_1^{G1263A} .



Rycina 5.2-7. Gęstość receptorów D_2 wyznaczona metodą wiązania [3H]spiperonu w modelowym układzie syntetyzującym receptor dopaminowy D_2 wraz z receptorem D_1 lub receptor D_2 wraz z wariantem genetycznym D_1 .

5.2.5 Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand – wpływ dołączonego białka fluorescencyjnego

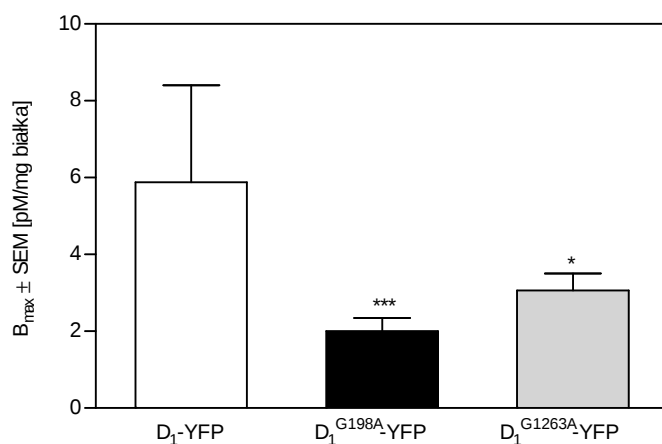
W kolejnym etapie zbadano wpływ dołączonego białka fluorescencyjnego, odpowiednio CFP lub YFP na parametry wiązania receptor-ligand. W tabeli 5.2-6 przedstawiono wyniki uzyskane dla wiązania [3H]spiperonu do D_2 -CFP oraz [3H]SCH23390 do D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP lub D_1^{G1263A} -YFP.

Tabela 5.2-6. Parametry wiązania [3H]spiperonu do receptora dopaminowego D_2 połączonego z białkiem fluorescencyjnym (D_2 -CFP) oraz [3H]SCH23390 do receptora: D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP i D_1^{G1263A} -YFP. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D_1^{G198A} -YFP vs D_1 -YFP $p < 0,001$; (°) D_1^{G1263A} -YFP vs D_1 -YFP $p < 0,05$ ($n=3-5$).

Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D_2 -CFP	$0,60 \pm 0,03$	$3,13 \pm 0,59$
D_1 -YFP	$1,27 \pm 0,13$	$5,88 \pm 2,52$
D_1^{G198A} -YFP	$1,16 \pm 0,13$	$2,04 \pm 0,35$ (***)
D_1^{G1263A} -YFP	$1,15 \pm 0,23$	$3,07 \pm 0,44$ (°)

Dołączenie białka fluorescencyjnego do C-końca receptora dopaminowego, zarówno D_1 jak i D_2 , nie zmienia wartości stałej K_d , jak wykazano w analizie saturacyjnej. Podobnie nie zaobserwowano zmiany wartości stałej dysocjacji K_d dla wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 połączonych z białkiem fluorescencyjnym YFP. Pozwala to wnioskować, że nie uległy zmianie właściwości funkcjonalne badanych receptorów.

Zaobserwowano natomiast obniżenie ekspresji wariantów: D_1^{G198A} -YFP i D_1^{G1263A} -YFP w stosunku do receptora D_1 -YFP (rycina 5.2-8).



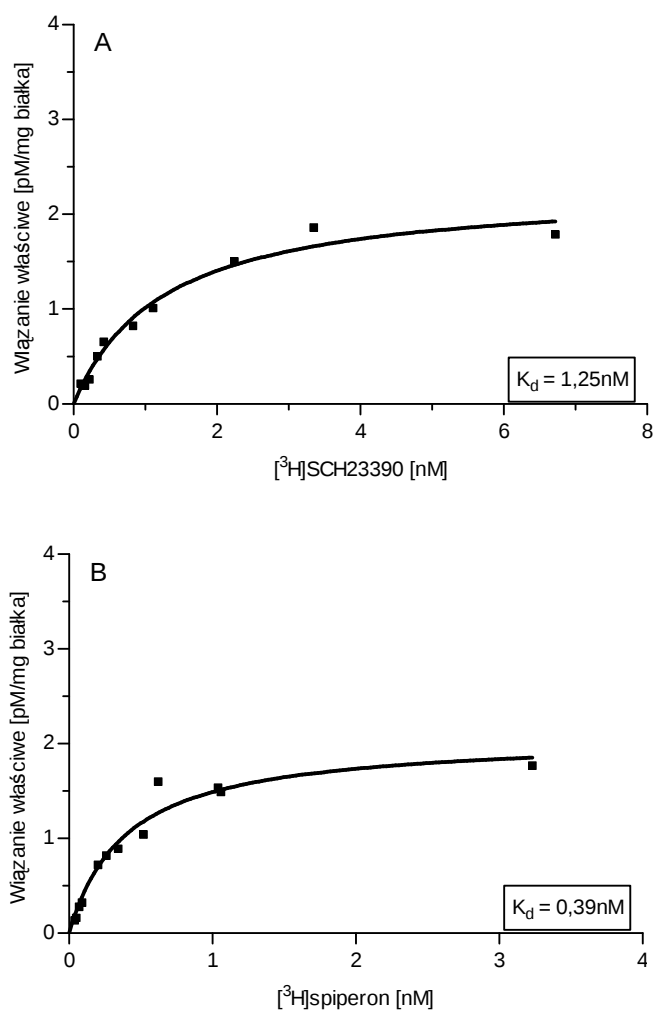
Rycina 5.2-8. Gęstość receptorów dopaminowych połączonych z białkiem fluorescencyjnym: D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP lub D_1^{G1263A} -YFP wyznaczona metodą wiązania [3 H]SCH23390 w modelowym układzie komórkowym. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D_1^{G198A} -YFP vs D_1 -YFP $p < 0,001$, (*) D_1^{G1263A} -YFP vs D_1 -YFP $p < 0,05$ ($n=3-5$).

5.2.6 Pomiar parametrów wiązania receptor-ligand w układzie kotransfekowanym – wpływ dołączonego białka fluorescencyjnego

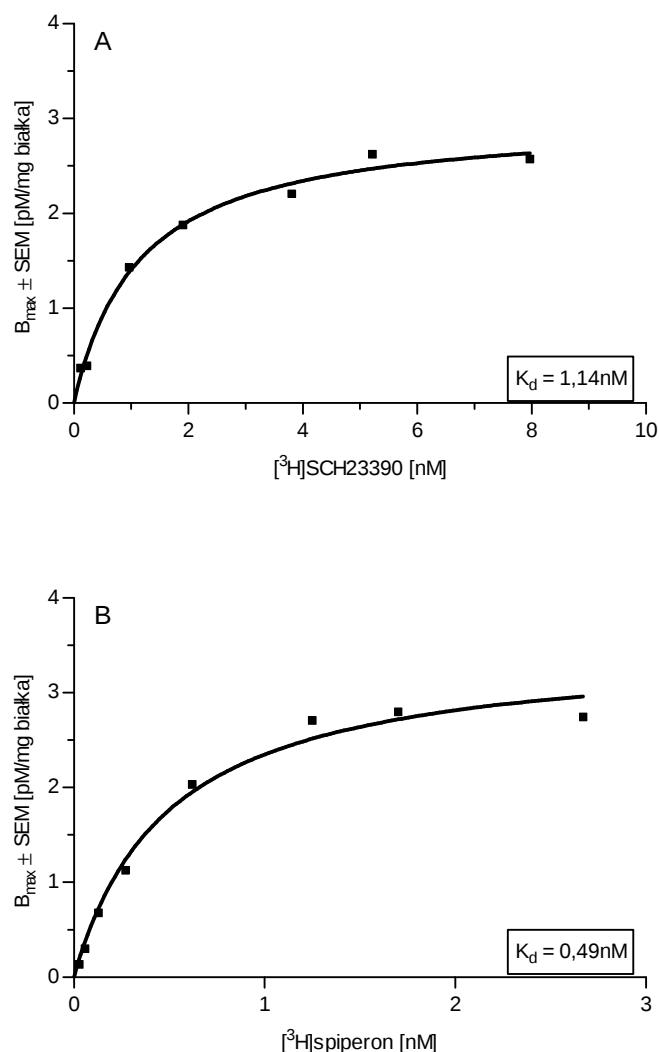
W dalszym etapie pracy określono parametry wiązania [3 H]SCH23390 oraz [3 H]spiperonu do receptorów dopaminowych w układzie, w którym obok receptora D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP lub D_1^{G1263A} -YFP występował receptor D_2 -CFP. Przykładowe krzywe wiązania radioligandów przedstawiono na rycinach 5.2-9 oraz 5.2-10. Natomiast uzyskane wartości stałej dysocjacji K_d oraz gęstości receptorów B_{max} dla [3 H]SCH23390 zebrano w tabeli 5.2-7, natomiast dla [3 H]spiperonu w tabeli 5.2-8.

Tabela 5.2-7. Parametry wiązania [3 H]SCH23390 do receptora dopaminowego D_1 -YFP, D_1^{G198A} -YFP oraz D_1^{G1263A} -YFP w układach, w których występował on razem z receptorem D_2 -CFP. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (**) D_1 -YFP vs D_1^{G198A} -YFP $p < 0,01$, (###) D_1^{G1263A} -YFP vs D_1^{G198A} -YFP $p < 0,01$ ($n=4-7$).

Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D_1 -YFP D_2 -CFP	$1,18 \pm 0,11$	$3,76 \pm 0,42$
D_1^{G198A} -YFP D_2 -CFP	$1,39 \pm 0,12$	$1,57 \pm 0,28$ (**,###)
D_1^{G1263A} -YFP D_2 -CFP	$1,26 \pm 0,11$	$3,57 \pm 0,53$

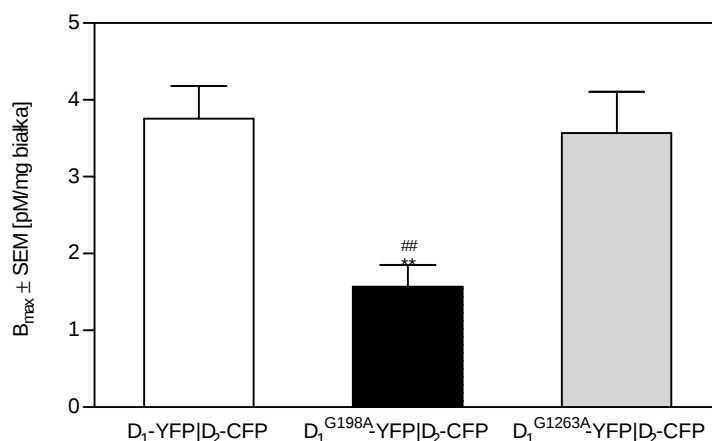


Rycina 5.2-9. Przykładowa krzywa wiązania radioligandu w układzie D₂-CFP|D₁-YFP: A) [³H]SCH23390, B) [³H]spiperon.



Rycina 5.2-10. Przykładowa krzywa wiązania radioligandu w układzie $\text{D}_2\text{-CFP} | \text{D}_1^{\text{G1263A}}\text{-YFP}$:
A) $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$, B) $[^3\text{H}]\text{spiperon}$.

Uzyskane gęstości receptorów, B_{max} , dla wiązania $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ (rycina 5.2-11) potwierdzają wcześniejsze obserwacje znacząco obniżonej ($p < 0,01$) ekspresji wariantu genetycznego $\text{D}_1^{\text{G198A}}\text{-YFP}$, także w obecności receptora dopaminowego $\text{D}_2\text{-CFP}$. Jednocześnie nie wykazano różnicy wartości stałej dysocjacji K_d , a zatem dołączenie białka fluorescencyjnego także w układzie kotransfekowanym nie powoduje zmiany własności badanych białek receptorowych (tabela 5.2-7).

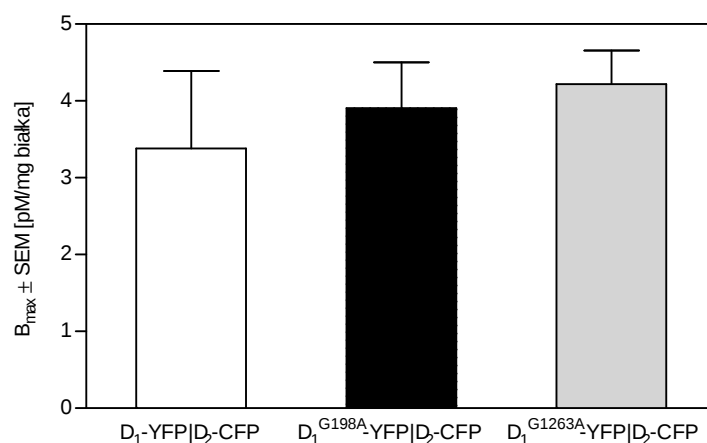


Rycina 5.2-11. Gęstość receptorów D₁-YFP wyznaczona metodą wiązania [³H]SCH23390 w modelowym układzie syntetyzującym receptor dopaminowy D₂-CFP wraz z D₁-YFP lub receptor D₂-CFP wraz ze zmutowaną odmianą D₁-YFP. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (**) D₁-YFP vs D₁^{G198A}-YFP $p < 0,01$, (##) D₁^{G1263A}-YFP vs D₁^{G198A}-YFP $p < 0,01$ (n=4-7).

W przeprowadzonej analizie saturacyjnej nie wykazano znamiennych statystycznie różnic parametrów wiązania [³H]spiperonu do receptora dopaminowego D₂-CFP, który ulegał ekspresji w komórkach linii HEK293 wraz z receptorem: D₁-YFP, D₁^{G198A}-YFP lub D₁^{G1263A}-YFP względem układu kotransfekowanego, w którym receptory te nie były połączone z białkami fluorescencyjnymi (tabela 5.2-4 i 5.2-5). Pozwala to wnioskować, że przyłączone białka fluorescencyjne nie wpływają na wiązanie receptor-ligand (rycina 5.2-12).

Tabela 5.2-8. Parametry wiązania [³H]spiperonu do receptora dopaminowego D₂-CFP w układach, w których występował on razem z receptorem D₁-YFP lub jednym z wariantów genetycznych D₁^{G198A}-YFP oraz D₁^{G1263A}-YFP (n=3-5).

Układ	$K_d \pm SEM$ [nM]	$B_{max} \pm SEM$ [pM/mg białka]
D ₁ -YFP D ₂ -CFP	0,52 ± 0,06	3,38 ± 1,01
D ₁ ^{G198A} -YFP D ₂ -CFP	0,65 ± 0,05	3,91 ± 0,59
D ₁ ^{G1263A} -YFP D ₂ -CFP	0,53 ± 0,02	4,22 ± 0,44



Rycina 5.2-12. Gęstość receptorów D₂-CFP wyznaczona metodą wiązania [³H]spiperonu w modelowym układzie syntetyzującym receptor dopaminowy D₂-CFP wraz z receptorem D₁-YFP lub receptorem D₂-CFP wraz ze zmutowaną odmianą D₁-YFP.

5.3 Pomiar czasów życia fluorescencji

5.3.1 Standardy fluorescencyjne

Standardy fluorescencyjne, czyli związki chemiczne o znanych czasach życia fluorescencji, wykorzystano do sprawdzenia czułości układu pomiarowego i powtarzalności uzyskanych wyników. W pracy wykorzystano dwa standardy fluorescencyjne o różnych czasach życia fluorescencji: erytrozynę B oraz p-terfenyl (rozdział 3.7). Pomiary przeprowadzono w temperaturze 22°C dla skali czasowej 100 ns, a uzyskane wyniki zebrano poniżej.

Tabela 5.3-1. Czasy życia fluorescencji zmierzone dla standardów - skala czasowa 100 ns. Dane literaturowe w oparciu o Boens i wsp. (2007).

Standard	Zmierzone czasy życia fluorescencji	Dane literaturowe
	$\tau \pm SD$ [ps]	$\tau \pm SD$ [ps]
p-terfenyl/cykloheksan	938 ± 3,6	980 ± 30
erytrozyna B/MeOH	444 ± 3,5	470 ± 20
erytrozyna B/MeOH	79 ± 5	89 ± 3

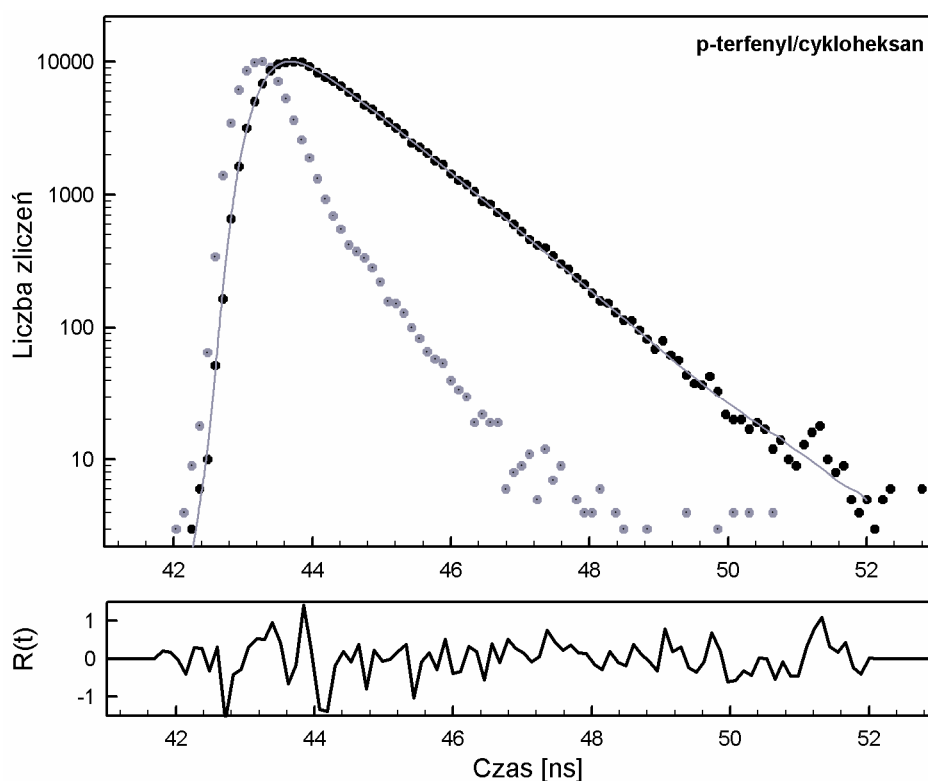
Uzyskane doświadczalnie czasy życia fluorescencji użytych standardów nie różnią się od wartości dostępnych w literaturze (Boens i wsp. 2007), a zmierzone zaniki fluorescencji mają charakter monoeksponencjalny, zgodnie z oczekiwaniami. Na rycinach 5.3-1 oraz 5.3-2 przedstawiono przykładowy wynik pomiaru zaniku fluorescencji w czasie

z dopasowanym modelem monoeksponencjalnym dla obu standardów oraz uzyskany rozkład rezyduów.

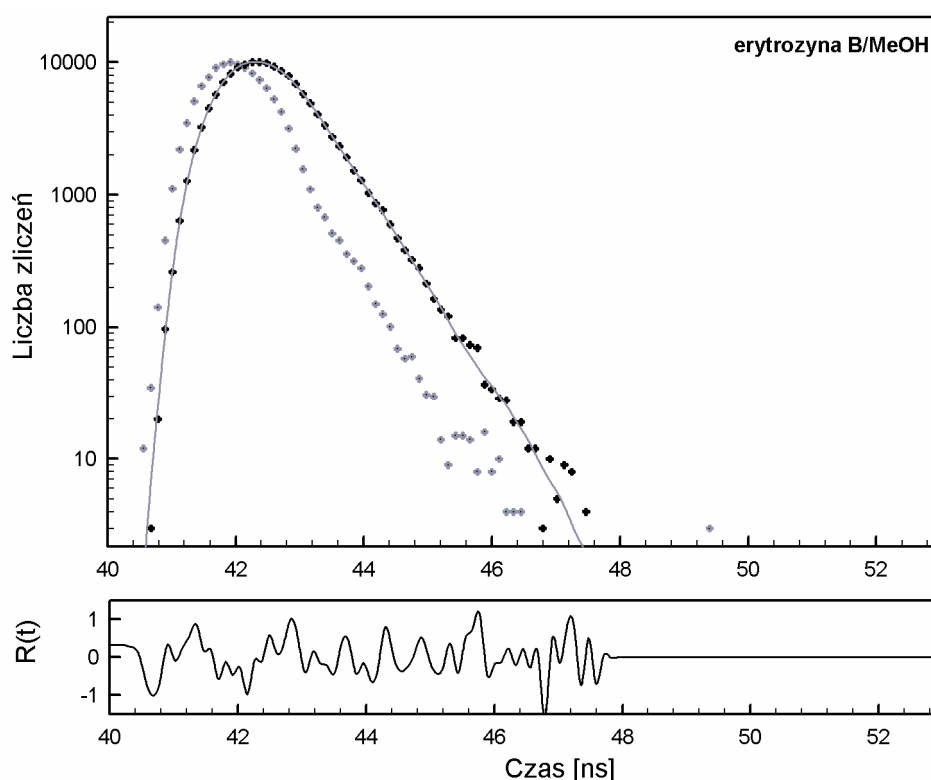
Następnie zmierzono zanik fluorescencji erytrozyny B w metanolu – ze względu na czas życia fluorescencji ok. 450 ps najbliższy najkrótszej składowej czasu życia fluorescencji donora stosowanego w niniejszej pracy (D_2 -CFP) – dla skali czasowej 50 ns. Pomiary przeprowadzono po wzbudzeniu diodą laserową (długości fali wzbudzenia 434 nm, czas trwania impulsu 70 ps) oraz diodą LED (długość fali wzbudzenia 465 nm, czas trwania impulsu 1,3 ns). Uzyskane wartości porównano z pomiarami uzyskanymi dla skali czasowej 100 ns (tabela 5.3-2).

Tabela 5.3-2. Czasy życia fluorescencji zmierzone dla erytrozyny B w metanolu dla dwóch skali czasowych.

Standard	Wzbudzenie	Skala czasowa	Czas życia fluorescencji [ps]
			$\tau \pm SD$
erytrozyna B/MeOH	465 nm	100 ns	$444 \pm 3,5$
erytrozyna B/MeOH	434 nm	50 ns	$424 \pm 4,4$
erytrozyna B/MeOH	465 nm	50 ns	$448 \pm 1,8$



Rycina 5.3-1. Przykładowy wynik dopasowania modelu monoeksponencjalnego (szara linia) do doświadczalnego pomiaru zaniku fluorescencji w czasie dla p-terfenylu w cykloheksanie (czarne punkty) wraz z rozkładem rezyduów. Szare punkty reprezentują zmierzony profil diody.



Rycina 5.3-2. Przykładowy wynik dopasowania modelu monoeksponencjalnego (szara linia) do zmierzzonego zaniku fluorescencji w czasie dla erytrozyny B w metanolu (czarne punkty) wraz z rozkładem rezyduów. Szare punkty reprezentują zmierzony profil diody.

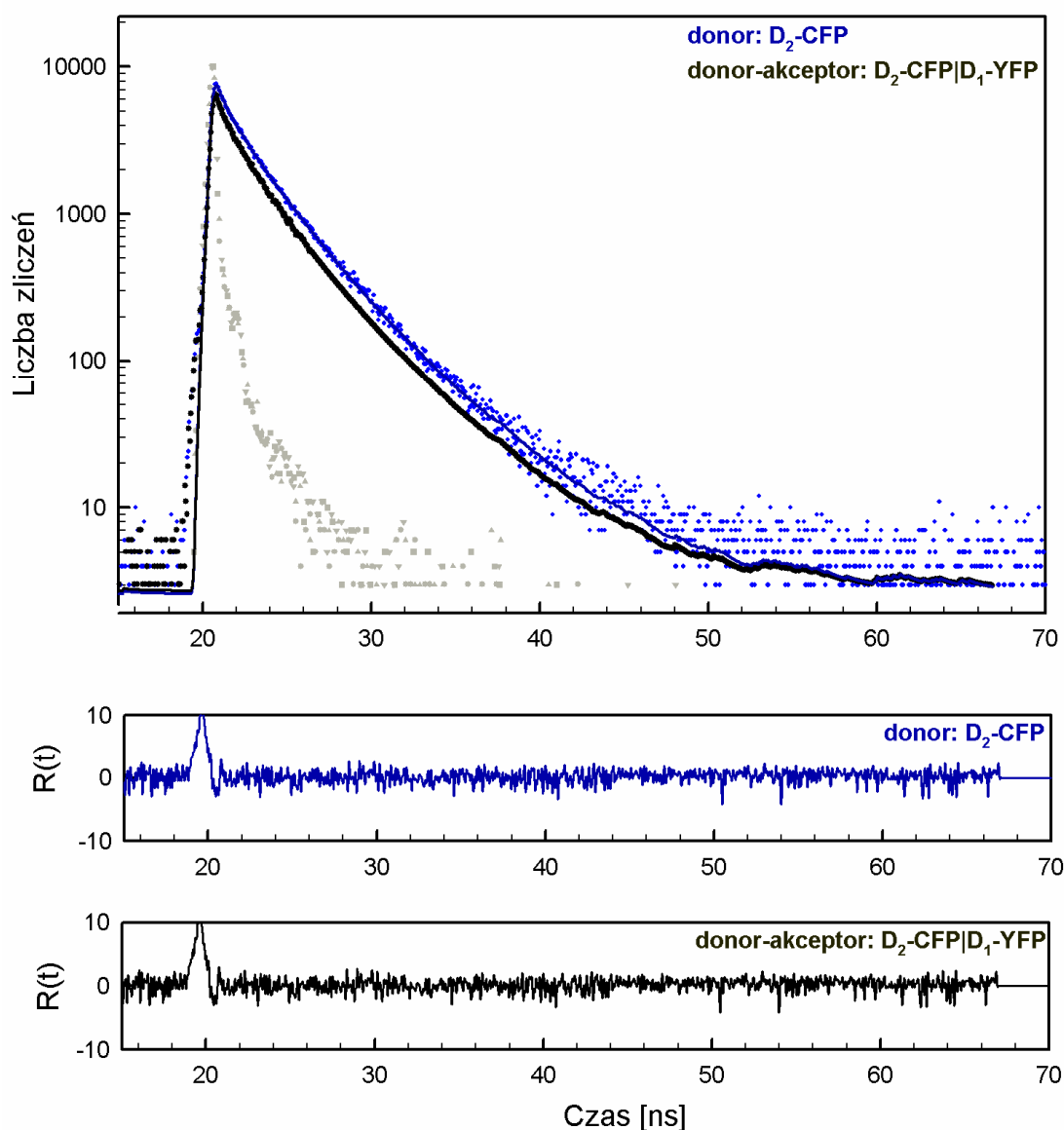
Nie zaobserwowano różnicy w uzyskanych wartościach czasu życia fluorescencji dla erytrozyny B rozpuszczonej w metanolu w funkcji zastosowanej skali czasowej. Ponadto dla wzbudzenia diodą LED, której szerokość impulsu (1,3 ns) jest większa od mierzonego czasu życia (ok. 0,44 ns) uzyskano wartości zgodne z danymi literaturowymi, co pozwala stwierdzić, że stosowany układ pomiarowy jest odpowiednio czuły do przeprowadzenia dalszych doświadczeń, a uzyskane wyniki są powtarzalne.

5.3.2 Czasy życia fluorescencji – heterodimeryzacja D_1 - D_2

Pomiar zaniku fluorescencji w czasie użyto do oszacowania stopnia heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D_1 i D_2 oraz receptora dopaminowego D_2 i wariantów polimorficznych receptora D_1 : D_1^{G198A} oraz D_1^{G1263A} . Na podstawie zmian długości czasu życia fluorescencji donora (D_2 -CFP), w obecności i przy braku akceptora (D_1 -YFP), obliczono wydajność rezonansowego przeniesienia energii FRET.

Zaniki fluorescencji w czasie zmierzono metodą pojedynczego zliczania fotonów TCSPC szczegółowo opisaną w rozdziale 4.5.2. Odpowiednio przygotowane komórki (rozdział 4.5.1) wzbudzano światłem o długości fali 434 nm. Pomiary wykonano w kilku

seriach na komórkach linii HEK293, w których doszło do ekspresji donora energii wzbudzenia (białko fuzyjne D₂-CFP) oraz w komórkach, w których ekspresji ulegały zarówno donor, jak i akceptor energii wzbudzenia (D₂-CFP|D₁-YFP). Następnie zmierzono czasy życia fluorescencji dla komórek HEK293, w których koekspresji ulegały badane warianty genetyczne receptora dopaminowego D₁ z wprowadzonymi mutacjami: D₁^{G198A}-YFP lub D₁^{G1263A}-YFP oraz białko fuzyjne D₂-CFP (układ donor-akceptor). Przykładowy zanik fluorescencji w czasie zmierzony w układzie *in-vitro* przedstawiono na rycinie 5.3-3.



Rycina 5.3-3. Przykładowy wynik pomiaru zaniku fluorescencji w czasie wraz z rozkładem rezyduów: donor (D₂-CFP – linia niebieska) oraz układ donor-akceptor (D₂-CFP|D₁-YFP – linia czarna). Zmierzony profil diody pokazano jako szare punkty.

Pomiary przeprowadzono w kilku niezależnych seriach dla ok. 15-20 komórek, a następnie obliczono wartość średnią czasu życia fluorescencji donora przy braku

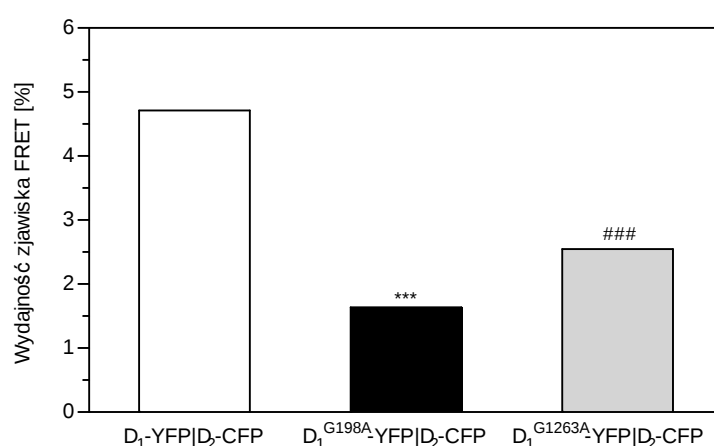
akceptora (τ_D) i w jego obecności (τ_{DA}), zarówno w oparciu o model dwueksponencjalny (tabela 5.3-3), jak i trójeksponencjalny (tabela 5.3-4). Na podstawie uzyskanych średnich czasów życia fluorescencji obliczono wydajność rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia (E), jak opisano w rozdziale 4.5-4, a wyniki przedstawiono na rycinie 5.3-4.

Tabela 5.3-3. Wartości średnie zmierzonych czasów życia fluorescencji uzyskane w modelu dwueksponencjalnym i odpowiadające im wydajności FRET. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D₂-CFP|D₁^{G198A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$, (###) D₂-CFP|D₁^{G1263A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$ (n=18-30).

Układ	Średni czas życia fluorescencji [ns]		Wydajność FRET [%]
	$\tau_D \pm SD$	$\tau_{DA} \pm SD$	$E \pm u(E)$
D ₂ -CFP	2,51 ± 0,02	-	-
D ₂ -CFP D ₁ -YFP	-	2,38 ± 0,05	5,22 ± 0,02
D ₂ -CFP D ₁ ^{G198A} -YFP	-	2,46 ± 0,04	2,22 ± 0,02 ***
D ₂ -CFP D ₁ ^{G1263A} -YFP	-	2,43 ± 0,03	3,02 ± 0,01 ###

Tabela 5.3-4. Wartości średnie zmierzonych czasów życia fluorescencji uzyskane w modelu trójeksponencjalnym i odpowiadające im wydajności FRET. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D₂-CFP|D₁^{G198A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$, (###) D₂-CFP|D₁^{G1263A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$ (n=18-30).

Układ	Średni czas życia fluorescencji [ns]		Wydajność FRET [%]
	$\tau_D \pm SD$	$\tau_{DA} \pm SD$	$E \pm u(E)$
D ₂ -CFP	2,52 ± 0,02	-	-
D ₂ -CFP D ₁ -YFP	-	2,40 ± 0,05	4,71 ± 0,02
D ₂ -CFP D ₁ ^{G198A} -YFP	-	2,47 ± 0,05	1,64 ± 0,02 ***
D ₂ -CFP D ₁ ^{G1263A} -YFP	-	2,45 ± 0,03	2,55 ± 0,01 ###



Rycina 5.3-4. Wydajność FRET obliczona w oparciu o dopasowanie trójeksponencjalne. Znamienność statystyczna uzyskana w jednoczynnikowej analizie wariancji (*one-way* ANOVA) oraz w teście *post-hoc* Dunnett'a: (***) D₂-CFP|D₁^{G198A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$, (###) D₂-CFP|D₁^{G1263A}-YFP vs D₂-CFP|D₁-YFP $p < 0,001$ (n=18-30).

Z porównania zaników intensywności fluorescencji dla komórek, w których ekspresji ulegał sam donor (D_2 -CFP) oraz donor w obecności akceptora (D_2 -CFP| D_1 -YFP) zaobserwowano skrócenie średniego czasu życia fluorescencji donora, który wynosił 2,51 ns w układzie bez akceptora oraz 2,41 ns w układzie, w którym był obecny akceptor (odpowiednio 2,52 ns oraz 2,42 ns dla modelu trójeksponencjalnego). Skrócenie czasu życia fluorescencji, jest interpretowane jako wynik interakcji receptorów dopaminowych – ich heterodimeryzacji. W układach, w których białko D_2 -CFP obecne było z jednym z wariantów polimorficznych receptora dopaminowego D_1 : D_1^{G1263A} -YFP lub D_1^{G1263A} -YFP również zaobserwowano skrócenie czasu życia fluorescencji donora. Odpowiednie średnie czasy życia fluorescencji wynoszą 2,46 ns (2,47 ns) dla D_1^{G198A} -YFP| D_2 -CFP oraz 2,43 ns (2,45 ns) dla D_1^{G1263A} -YFP| D_2 -CFP. Zmiany czasów życia fluorescencji przekładają się na zmianę wydajności przeniesienia energii wzbudzenia – wydajności FRET (tabela 5.3-3). Uzyskane wyniki pokazują dobrą zgodność obu modeli, lecz w obu przypadkach obliczone wydajności transferu energii wydają się niewielkie. Należy jednak zauważyć, iż wydajność FRET w układzie CFP-YFP, czyli dwóch białek połączonych łącznikiem aminokwasowym, obliczona tą metodą wynosi ok. 36%, co jest traktowane jako wartość maksymalna, która odpowiada oddziaływaniu białek połączonych ze sobą (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006, Łukasiewicz 2008).

5.3.3 Analiza składowych czasów życia fluorescencji

W kolejnym etapie pracy zastosowano metodę analizy poszczególnych składowych oraz ich amplitud zaproponowaną przez Millingtona i wsp. (2007) (rozdziały 2.4 oraz 4.5.4). Na podstawie dopasowania dwueksponencjalnego przeanalizowano zaniki fluorescencji donora, natomiast do analizy układu donor-akceptor posłużono się dopasowaniem trójeksponencjalnym, z uwagi na pojawiającą się dodatkową składową czasową zaniku fluorescencji w układzie donor-akceptor (rozdział 2.4). Uśrednione wartości składowych czasowych oraz odpowiadające im amplitudy obliczone dla donora fluorescencji (D_2 -CFP) przedstawiono w tabeli 5.3-5, natomiast dla układu donor-akceptor w tabeli 5.3-6.

Analiza uzyskanych czasów życia fluorescencji wykazała, że model dwueksponencjalny dobrze dopasowuje się do zmierzonego zaniku fluorescencji donora D_2 -CFP, a składowe czasy życia fluorescencji T_1 i T_2 wynoszą odpowiednio $3,15 \pm 0,03$ ns oraz $0,84 \pm 0,04$ ns. Natomiast odpowiadające im amplitudy B_1 i B_2 : $72,4 \pm 0,9\%$ i $27,6 \pm 0,9\%$ (tabela 5.3-5). Dłuższa składowa czasu życia fluorescencji D_2 -CFP tylko

nieznacznie różni się od wartości uzyskanej dla białka CFP, natomiast składowa T_2 jest znacząco krótsza, w stosunku do wartości uzyskanej dla CFP, lecz autorzy nie podają niepewności wyznaczonych czasów życia fluorescencji (Millington i wsp. 2007).

Dla komórek, w których ekspresji ulegał donor i akceptor (D_2 -CFP i D_1 -YFP), uzyskano dobre dopasowanie przy użyciu modelu trójeksponencjalnego, z czasami T_1 , T_2 i T_3 (tabela 5.3-6) i odpowiadającymi im amplitudami B_1 , B_2 i B_3 .

Tabela 5.3-5. Wartości średnie składowych czasów życia fluorescencji donora D_2 -CFP i odpowiadające im amplitudy – dwueksponencjalny model zaniku fluorescencji (wyniki dla białka CFP na podstawie Millington i wsp. 2007).

Układ	Wartości średnie składowych [ns]		Amplitudy odpowiednich składowych [%]	
	$T_1 \pm SD$	$T_2 \pm SD$	$B_1 \pm SD$	$B_2 \pm SD$
CFP	3,04	1,36	62 ± 6	38 ± 6
D_2 -CFP	$3,15 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,04$	72 ± 1	28 ± 1

Tabela 5.3-6. Wartości średnie składowych czasów życia fluorescencji i ich amplitud w układzie donor-akceptor – trójeksponencjalny model zaniku fluorescencji (wyniki dla białka fuzyjnego CFP-YFP na podstawie Millington i wsp. 2007).

Układ	Wartości średnie składowych [ns]			Amplitudy [%]		
	$T_1 \pm SD$	$T_2 \pm SD$	$T_3 \pm SD$	$B_1 \pm SD$	$B_2 \pm SD$	$B_3 \pm SD$
CFP-YFP	3,11	1,65	0,65	30 ± 10	50 ± 7	20 ± 9
D_2 -CFP D_1 -YFP	$3,79 \pm 0,36$	$1,96 \pm 0,16$	$0,46 \pm 0,05$	37 ± 8	49 ± 6	14 ± 2
D_2 -CFP D_1^{G198A} -YFP	$3,93 \pm 0,52$	$1,99 \pm 0,19$	$0,42 \pm 0,02$	38 ± 9	50 ± 7	14 ± 2
D_2 -CFP D_1^{G1263A} -YFP	$3,85 \pm 0,35$	$1,90 \pm 0,17$	$0,41 \pm 0,05$	39 ± 10	47 ± 7	14 ± 5

Z powyższego porównania wynika, że wartość komponenty o długim czasie życia fluorescencji (ok. 3 ns) zasadniczo nie uległa zmianie, podczas gdy jej amplituda zmalała o ok. 40% w stosunku do uzyskanej dla D_2 -CFP. Zmianie tej towarzyszy pojawienie się trzeciej składowej czasowej T_3 o amplitudzie B_3 , która równoważy spadek amplitudy B_2 .

W oparciu o uzyskane wartości czasów życia fluorescencji obliczono wydajność rezonansowego przeniesienia energii (E) w oparciu o model „3 τ ” i „4 τ ”, szczegółowo opisane w rozdziałach 2.4 i 4.5.4, a uzyskane wyniki zebrano w tabeli 5.3-7.

Tabela 5.3-7. Wydajność FRET obliczona w oparciu o zaproponowane modele „3 τ ” oraz „4 τ ”.

Układ	Czas życia fluorescencji [ns]					Wydajność FRET [%]	
		$\tau_{D1} \pm SD$	$\tau_{DA1} \pm SD$	$\tau_{D2} \pm SD$	$\tau_{DA2} \pm SD$	$E_1 \pm u(E)$	$E_2 \pm u(E)$
D ₂ -CFP	3 τ	3,15 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,04	-	85,5 $\pm$ 0,02	-
D ₁ -YFP	4 τ	3,15 $\pm$ 0,03	1,96 $\pm$ 0,16	0,84 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,05	37,7 $\pm$ 0,05	45,5 $\pm$ 0,06
D ₂ -CFP	3 τ	3,15 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,04	-	70,6 $\pm$ 0,01	-
D ₁ ^{G198A} -YFP	4 τ	3,15 $\pm$ 0,03	1,99 $\pm$ 0,19	0,84 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,02	37,0 $\pm$ 0,06	50,3 $\pm$ 0,03
D ₂ -CFP	3 τ	3,15 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,04	-	60,9 $\pm$ 0,02	-
D ₁ ^{G1263A} -YFP	4 τ	3,15 $\pm$ 0,03	1,90 $\pm$ 0,17	0,84 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,05	39,8 $\pm$ 0,05	50,7 $\pm$ 0,06

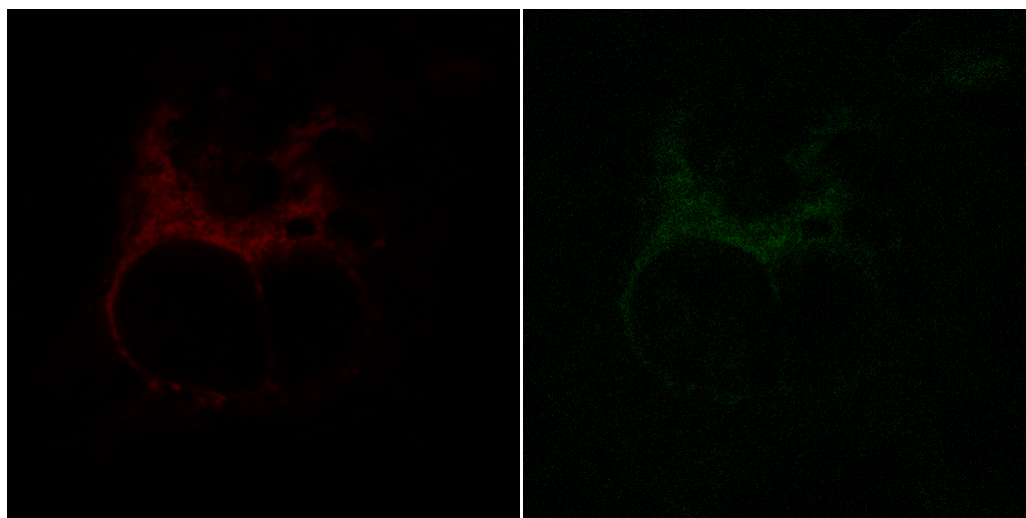
W oparciu o składowe czasów życia fluorescencji oraz model uwzględniający oddziaływanie tylko jednej konformacji donora uzyskano wydajność przeniesienia energii dla pary D₁-YFP|D₂-CFP równą 85,5 $\pm$ 0,02%, natomiast w układzie, w którym doszło do ekspresji wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₁ oraz receptora dopaminowego D₂-CFP wydajności transferu okazały się niższe i wyniosły odpowiednio 70,6 $\pm$ 0,01% dla D₁^{G198A}-YFP|D₂-CFP oraz 60,9 $\pm$ 0,02% dla D₁^{G1263A}-YFP|D₂-CFP, co potwierdziło wyniki uzyskane w metodzie średnich czasów życia. Zmniejszona wydajność FRET może świadczyć o obniżonej heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D₁^{G198A}-D₂ i D₁^{G1263A}-D₂ na skutek zmian wywołanych wprowadzoną mutacją w genie DRD1, co zostało szerzej omówione w dyskusji (rozdział 6.3).

Z powyższego porównania wynika ponadto, że czas życia fluorescencji obu konformacji donora we wszystkich badanych układach donor-akceptor nie ulega zmianie w porównaniu z układem, w którym obecny był jedynie donor D₂-CFP. Zaobserwowano natomiast skrócenie czasu życia fluorescencji w oddziaływaniach donora z konformacją AC1 akceptora w układzie z wariantami genetycznymi receptora dopaminowego D₁^{G198A}-YFP|D₂-CFP oraz D₁^{G1263A}-YFP|D₂-CFP w stosunku do układu natywnego D₁-YFP|D₂-CFP. Może zatem wprowadzone mutacje mogą wpływać na równowagę przejść między konformacją aktywną (nieuprotonowaną – AC1) i nieaktywną (uprotonowaną – AC2) chromofora białka YFP.

5.4 Określenie lokalizacji receptorów dopaminowych przy użyciu mikroskopii konfokalnej

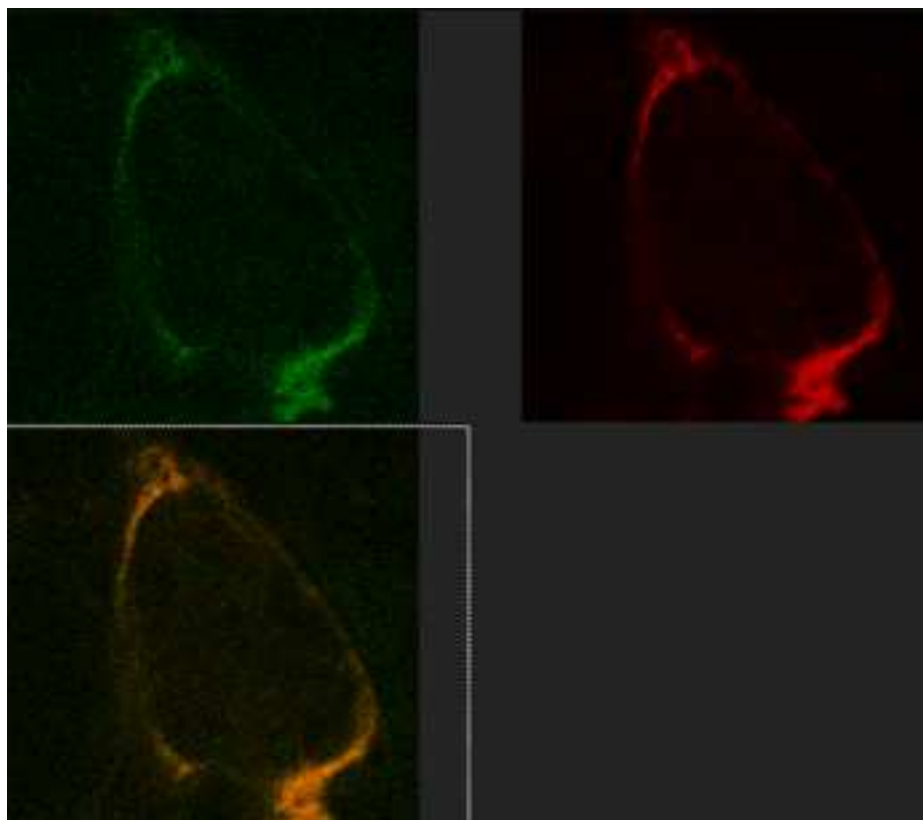
Kolejnym etapem pracy było sprawdzenie lokalizacji w komórce receptorów dopaminowych D₁ oraz D₂ oraz mutein receptora D₁ sprzężonych z odpowiednimi białkami fluorescencyjnymi. W tym celu komórki HEK293 rozsiano na szkiełka nakrywkowe i przejściowo transfekowano wyznakowanymi fluorescencyjnie plazmidami

zawierającymi gen receptora dopaminowego D₂-CFP oraz D₁-YFP, D₁^{G198A}-YFP lub D₁^{G1263A}-YFP (rozdział 4.5.5). Przykładowy obraz komórek HEK293 kotransfekowanych D₁-YFP|D₂-CFP uzyskany na mikroskopie konfokalnym przedstawiono poniżej.



Rycina 5.4-1. Przykładowy obraz mikroskopowy komórek linii HEK293, w których doszło do syntezy wyznakowanego fluorescencyjnie receptora dopaminowego D₁-YFP (czerwony) wraz wyznakowanym receptorem D₂-CFP (zielony).

W oparciu o uzyskane obrazy mikroskopowe obliczono współczynnik kolokalizacji Pearsona (równanie 4.5-16). W tym celu dla każdego obrazu wyznaczano tło poprzez pomiar intensywności w wybranym obszarze AOI, wartości te odejmowano następnie od całego obszaru (rozdział 4.5.4). Obszar błony z wyznakowanymi fluorescencyjnie receptorami D₁-YFP oraz D₂-CFP poddawano dalszej analizie. W obszarze błony komórkowej, w obrębie której intensywności świecenia były porównywalne, zaznaczano ponownie obszary AOI, dla których liczono współczynniki Pearsona. Przykładowy wynik nałożenia dwóch obrazów D₁-YFP (czerwony) i D₂-CFP (zielony) przedstawiono na rycinie 5.4-2 oraz 5.4-3. Widoczny żółty obszar jest wizualnym potwierdzeniem współwystępowania obu typów receptora dopaminowego, co wyznaczono również w oparciu o pomiar współczynnika kolokalizacji Pearsona.



Rycina 5.4-2. Obraz mikroskopowy komórek linii HEK293, w których doszło do syntezy wyznakowanych fluorescencyjnie receptorów dopaminowych: D₁-YFP (czerwony) i D₂-CFP (zielony) oraz ich złożenie (żółty).

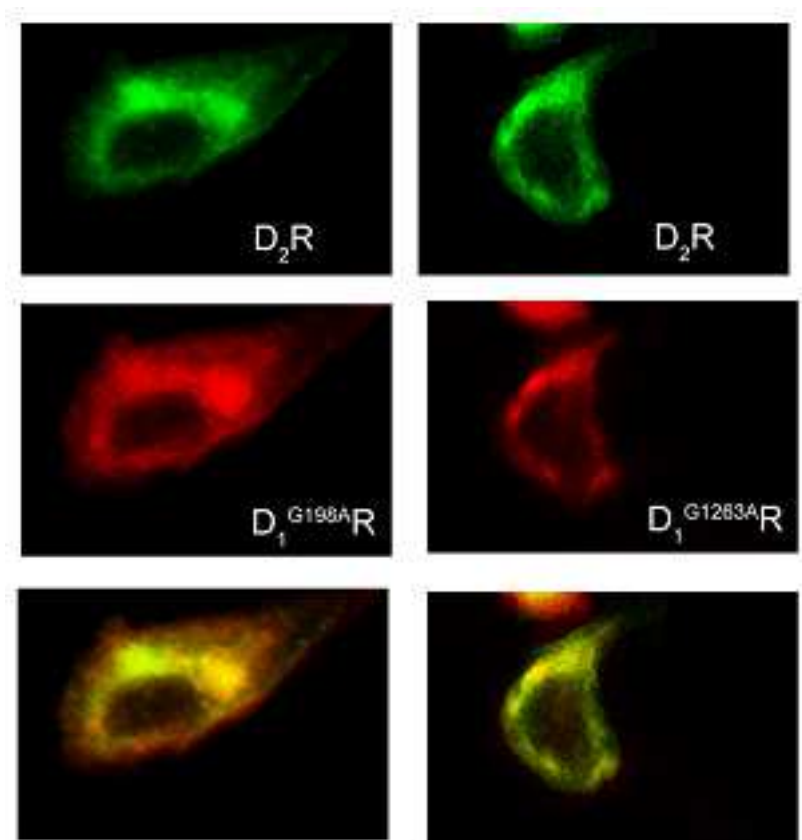
Obliczone wartości współczynnika Pearsona, który jest miarą stopnia kolokalizacji zestawiono w tabeli 5.4-1. Jednoczynnikowa analiza wariancji (*one-way* ANOVA) oraz test *post-hoc* Dunnett'a nie wykazały znamiennych statystycznie różnic wartości obliczonych współczynników Pearsona.

Tabela 5.4-1. Wartości współczynnika kolokalizacji Pearson'a (n=9-15).

Układ	Współczynnik Pearsona $\pm$ SEM
D ₂ -CFP D ₁ -YFP	0,85 $\pm$ 0,04
D ₂ -CFP D ₁ ^{G198A} -YFP	0,77 $\pm$ 0,07
D ₂ -CFP D ₁ ^{G1263A} -YFP	0,82 $\pm$ 0,05

Rezultaty pomiaru kolokalizacji nie wykazały, aby warianty polimorficzne receptora dopaminowego D₁: D₁^{G198A} lub D₁^{G1263A} miały odmienną lokalizację od receptora natywnego D₁. Ponadto potwierdzono współwystępowanie w błonie komórkowej obu wariantów receptora dopaminowego D₁ z receptorem dopaminowym D₂, co uwidoczniło przy użyciu mikroskopii konfokalnej i przedstawiono na poniższych rycinach. Wyniki te wskazują, że wprowadzone mutacje w obrębie genu DRD1 nie powodują odmiennej

(np. cytoplazmatycznej) lokalizacji receptora, która mogłaby powodować obniżenie wydajności FRET uzyskane w pomiarach czasów życia fluorescencji (rozdział 5.3).



Rycina 5.4-3. Obraz mikroskopowy komórek linii HEK293, w których doszło do syntezy wyznakowanych fluorescencyjnie receptorów dopaminowych: D₁^{G198A}-YFP lub D₁^{G1263A}-YFP (czerwony) i D₂-CFP (zielony) oraz ich złożenie (żółty).

6. DYSKUSJA

6.1 Wybór obiektu badań

Dysfunkcje układu dopaminergicznego w mózgu odgrywają kluczową rolę w wielu istotnych zaburzeniach, jak choroba Parkinsona, schizofrenia, zespół Tourette'a czy uzależnienia, dlatego też receptory dopaminowe są często celem działania leków stosowanych w terapii. Jednocześnie, możliwa korelacja między występowaniem polimorfizmów (SNPs) w obrębie genów kodujących receptory dopaminowe a chorobami neuropsychiatrycznymi jest przedmiotem licznych badań od czasu wprowadzenia do powszechnego użycia metod biologii molekularnej. Oprócz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych rozpoznawanych przez enzym EcoR1 (Grandy i wsp. 1990) i TaqI (Litt i wsp. 1991), trzy inne polimorfizmy receptora dopaminowego D₁ zostały opisane przez Liu i wsp. (1995) w tym: -48A/G w regionie 5' egzonu 2 oraz zamiana nukleotydów w części kodującej: 198G/A i 1263G/A. Chociaż żaden z tych polimorfizmów nie wpływa na zmianę sekwencji aminokwasowej, to w badaniach genotypowania zostały one skorelowane z występowaniem schizofrenii (Ohara i wsp. 1993). Badania te nie były jednak kontynuowane, gdyż powszechnie uznawano, że tzw. ciche mutacje nie zmieniają aktywności biologicznej lub profilu farmakologicznego receptora. Z drugiej strony, niedawno ukazały się dane poddające w wątpliwość to założenie i podkreślające rolę takich cichych mutacji w biosyntezie białek (Chamary i Hurst 2005, Duan i wsp. 2003, Fung i wsp. 2009, Iida i Akashi 2000, Kimchi-Sarfaty i wsp. 2007, Komar 2007, Parsons i wsp. 2004, Sauna i wsp. 2007a, Sauna i wsp. 2007b, Shen i wsp. 1999, Tsai i wsp. 2008, Xie i Ding 1998). Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu dwóch cichych polimorfizmów w obrębie sekwencji kodującej receptor dopaminowy D₁ (D₁^{G198A} oraz D₁^{G1263A}) na parametry wiązania i heterodimeryzację z receptorem dopaminowym D₂. Ten drugi aspekt jest niezwykle istotny w świetle coraz powszechniej akceptowanej koncepcji oligomeryzacji GPCRs, która może mieć duże znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmu działania leków. Pokazano ostatnio, że przynajmniej część receptorów dopaminowych D₁ i D₂ tworzy heterodimery, a ligandy specyficzne wobec obu typów tych receptorów mają wpływ na ten proces (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006, Łukasiewicz i wsp. 2009). Dodatkowo, koekspresja

obu receptorów w tej samej komórce ma silny wpływ na powinowactwo leków przeciwpsychotycznych (Faron-Górecka i wsp. 2008) oraz na tworzenie wtórnych przekaźników informacji w komórce (Lee i wsp. 2003), co wskazuje, że fizyczne oddziaływania między receptorami mogą mieć istotne znaczenie w mechanizmie działania leków, dlatego są istotne w procesie poszukiwania nowych związków o potencjale terapeutycznym.

Do zbadania dimeryzacji receptorów D_1 i D_2 zastosowano metody farmakologiczne (analizę wiązania receptor-ligand, rozdział 4.4) oraz techniki fluorescencyjne (rozdział 4.5), w tym mikroskopię czasów życia fluorescencji oraz mikroskopię konfokalną, które pozwoliły na badanie oddziaływania białek receptorowych w pojedynczych żywych komórkach. Badane receptory zostały wyznakowane fluorescencyjnie (rozdział 4.1) przy użyciu żółtego (YFP) i jasnoniebieskiego (CFP) białka fluorescencyjnego i ulegały ekspresji w komórkach linii HEK293. Opierając się na pomiarach wydajności fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii oszacowano heterodimeryzację receptorów dopaminowych.

6.1.1 Czy efekty wywołane cichymi mutacjami powinny być pomijane?

Obserwacje kliniczne rozpoczęte w latach 50-tych XX. wieku wykazały szerokie różnicowanie odpowiedzi poszczególnych pacjentów na terapię, a dodatkowo zauważono, że taka odmienna reakcja może być również dziedziczona. Liczne badania prowadzone w następnych latach potwierdziły wpływ czynników genetycznych na heterogeniczność indywidualnej odpowiedzi na terapię w aspekcie zarówno toksyczności leków, jak i efektywności ich działania (Evans i Johnson 2001). I chociaż wykazano, że standardy postępowania terapeutycznego oparte na danych populacyjnych często posiadają niską skuteczność w indywidualnych przypadkach (Haselden i Nicholls 2006), to jednak trudności związane ze skojarzeniem czynników genetycznych z wrażliwością na leki i ewentualnymi efektami toksycznymi w przypadku danego osobnika były prawie nie do pokonania (Evans i Johnson 2001).

Olbrzymi postęp w genomice funkcjonalnej, bioinformatyce i w tzw. badaniach przesiewowych (ang. *screening*), jaki dokonał się po zakończeniu projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu (HGP, ang. *Human Genome Project*) skłonił grono naukowców do urzeczywistnienia marzeń o spersonalizowanej terapii. Analiza sekwencji ludzkiego genomu wykazała, że zmienność genetyczna w obrębie populacji jest dużo większa niż uprzednio szacowano (Sachidanandam i wsp. 2001), a do najpowszechniej występujących zmian

należą polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs). Jak się okazuje, SNPs są głównym wyznacznikiem odmiennej podatności na pewne choroby, odpowiedzi na terapię i efekty toksyczne (Risch 2000). Podjęto więc dodatkowe prace, których celem było racjonalne zmniejszenie liczby zidentyfikowanych SNPs, które należało zbadać. Risch podzielił SNPs na pięć typów zgodnie z hierarchią ważności. Niestety jedną z „ofiara” tego systemu były polimorfizmy ciche. Opierając się na założeniu, że nie zmieniają one sekwencji aminokwasowej, uznano, że nie mogą wpływać na ekspresję białka ani na jego funkcje. Badania genetyczne prowadzone od kilku lat wskazują jednak, że mutacje synonimiczne mogą mieć znaczne konsekwencje oraz, że zauważalna jest pewna tendencja w użyciu zbędnych kodonów przez organizmy żywe „wspomagana” przez ewolucję (Parmley i Hurst 2007). Na przykład niedawno wykazano, że ciche SNPs zmieniają oddziaływanie transportera ABCB1 – inaczej zwany ludzkim białkiem oporności wielolekowej MDR1 – z jego substratami i inhibitorami w wyniku przerw w procesie translacji wywołanych występowaniem rzadkich kodonów wynikających właśnie z cichych mutacji (Kimchi-Sarfaty i wsp. 2007). Badania te wydają się sugerować, że wykluczanie cichych polimorfizmów z analiz farmakogenetycznych może być zbytnim uproszczeniem.

W niniejszej pracy wykazano, metodą analizy saturacyjnej przy użyciu znakowanych radioligandów, znacznie obniżoną ekspresję polimorficznego wariantu receptora dopaminowego D_1^{G198A} w stosunku do jego formy natywnej. Drugi z wariantów genetycznych, D_1^{G1263A} , ulegał obniżonej ekspresji w stosunku do receptora natywnego, jednocześnie jednak jego ekspresja była wydajniejsza niż wariantu D_1^{G198A} . Wyniki te wskazują, że oba polimorfizmy w obrębie sekwencji kodującej – choć ciche, jako że nie zmieniają sekwencji aminokwasowej – wydają się mieć znaczenie, zmieniając liczbę receptorów obecnych w błonie komórkowej.

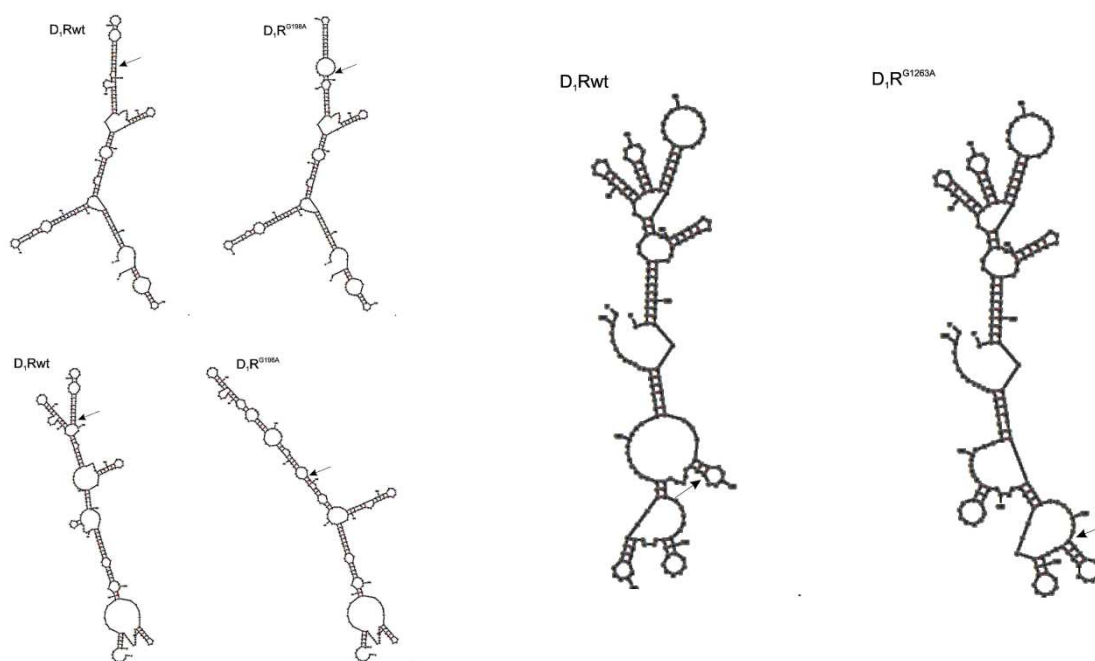
Na podstawie przedstawionych wyników intrygujące wydaje się pytanie w jaki sposób białka o identycznej strukturze pierwszorzędowej, czyli jednakowej sekwencji aminokwasów, mogą być „produkowane” przez komórki z różną wydajnością?

6.1.2 Wpływ mutacji cichych na strukturę mRNA i spowolnienie rybosomów

Przydomek „ciche” opisujący mutacje lub SNPs wywodzi się z reguły Anfinsena, zgodnie z którą jedynie sekwencja aminokwasów (tzw. struktura pierwszorzędowa) determinuje trójwymiarową strukturę białka, a zatem i jego funkcje. Badania zarówno genetyczne, jak i biochemiczne, sugerowały jednak, że podejście takie może być zbytnim

uproszczeniem. Istnieją bowiem dane doświadczalne świadczące o nieprzypadkowym użyciu kodonów synonimicznych: preferowane kodony silnie korelują ze względnym rozpowszechnieniem odpowiednich typów transportującego RNA (tRNA), a mutacje synonimiczne wydają się elementem selekcji naturalnej (Sauna i wsp. 2007b). Ustawicznie poszerza się lista cichych polimorfizmów, które prowadzą do licznych zaburzeń (Chamary i wsp. 2006). Wykazano między innymi, że ciche mutacje w genie apoE są skorelowane z podwyższonym ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's Disease*) (Laws i wsp. 2003), a ostatnie badania łączą SNPs w genie białka związanego z receptorem LDL (ang. *low-density lipoprotein*) z występowaniem tej choroby (De Ferrari i wsp. 2007).

Równocześnie ukazały się wyniki badań, z których wynika, że synonimiczne SNPs wpływają na ekspresję białka, a zatem jego funkcje, poprzez zmiany stabilności mRNA (Nackley i wsp. 2006). Na podstawie danych uzyskanych przy użyciu programu MFOLD (Zuker 2003) w niniejszej pracy sprawdzono wpływ cichych polimorfizmów na drugorzędową strukturę mRNA kodującego receptor dopaminowy D₁, co pozwoliło przypuszczać, że ewentualne zmiany mogą mieć wpływ na proces translacji. Model faldowania struktury drugorzędowej mRNA zbudowano w oparciu o sekwencję mRNA długości ok. 200 bp zawierającą osobno każdą z badanych mutacji. Uzyskano jedenaście różnych struktur dla polimorfizmu G198A, z których każda wykazywała zmiany wynikające z podstawienia guaniny w miejsce adeniny w pozycji 198 oraz sześć różnych struktur dla polimorfizmu G1263A, ale wprowadzona mutacja zmieniała strukturę mRNA tylko w jednym przypadku. Zatem pierwszy z polimorfizmów wydaje się indukować znamienne zmiany w strukturze drugorzędowej mRNA w porównaniu z receptorem natywnym. Przykładowe struktury drugorzędowe mRNA uzyskane dla wariantów receptora dopaminowego D₁ przedstawiono na rycinie 6.1-1.

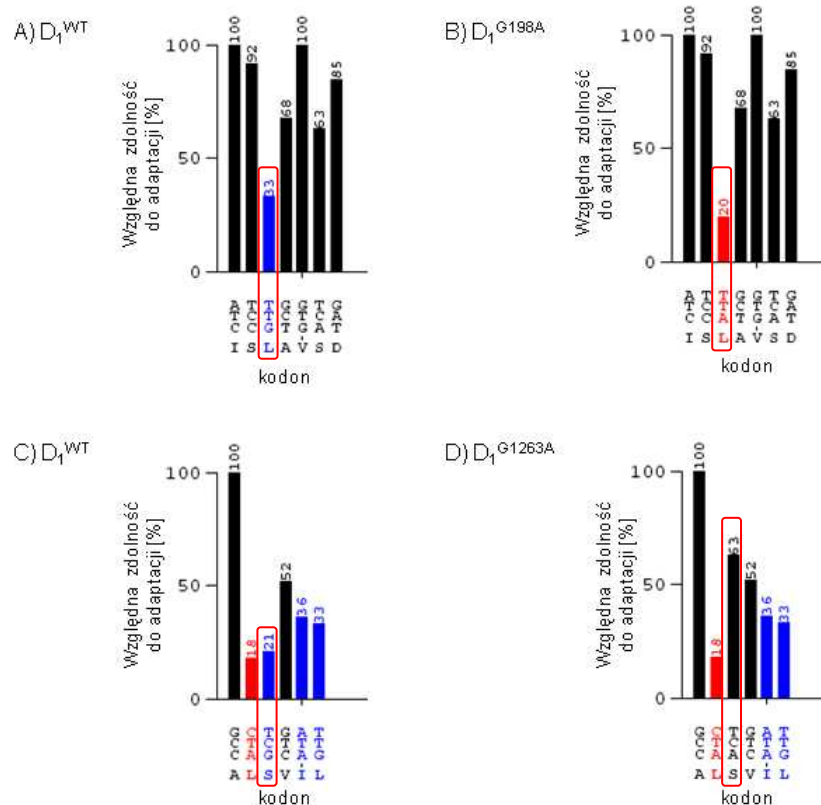


Rycina 6.1-1. Przykłady drugorzędowej struktury mRNA uzyskane przy użyciu programu MFOLD dla fragmentu sekwencji kodującej. A) struktury zaproponowane dla D_1R^{G198A} (nukleotydy 70-300), B) struktury zaproponowane dla D_1R^{G1263A} (nukleotydy 1140-1341). Strzałki wskazują zmienione zasady.

Wyniki te mogą być pomocne w interpretacji mechanizmu prowadzącego do zmian w gęstości receptorów. Wydaje się bowiem, że to zmiany na etapie translacji w procesie biosyntezy białka mogą leżeć u podstaw obserwowanych efektów. Podobny wniosek wynika z ostatnio opublikowanych danych wskazujących, że mutacje synonimiczne mogą silnie wpływać na kinetykę translacji (Fung i Gottesman 2009), gdyż rzadkie kodony wymagają mniej powszechnie występujących typów tRNA (Kimchi-Sarfaty i wsp. 2007). Translacja jest procesem wieloetapowym, w którym sekwencja nukleotydowa mRNA jest „przepisywana” na sekwencję aminokwasów w białku, a składa się z inicjacji translacji, elongacji i terminacji. Istnieje wiele czynników, które wpływają na szybkość syntezy polipeptydu, m. in. oddziaływanie kodon-antykodeon, sąsiedztwo innych kodonów, drugorzędowa struktura mRNA czy wreszcie dostępność odpowiednich typów tRNA (Fung i Gottesman 2009, Varenne i wsp. 1989, Wen i wsp. 2008). Mniej wydajne etapy mogą powodować dysocjację tRNA od rybosomu prowadząc do spowolnienia procesu lub jego nagłego zatrzymania i wznowienia. Czasami jednak rybosomy spowalniają i rozpoznają nowy kodon po przesunięciu się o pojedynczy nukleotyd i wówczas może następować tzw. przesunięcie ramki odczytu (ang. *frame-shift*). W najgorszym przypadku spowolnienie może być odebrane przez komórkę jako sygnał „stop”, wówczas rybosom nie przesunie się wzdłuż transkryptu i ulegnie oddzieleniu od kompleksu (Fung i Gottesman 2009).

Dodatkowo, część z wymienionych sytuacji uruchomi endogenne system naprawy prowadzący do degradacji RNA.

W oparciu o analizę częstości występowania kodonów ustalono, że częściej występują tranzykcje w kierunku $G \rightarrow A$ niż $A \rightarrow G$ (Cooper i Krawczak 1989) a ponadto okazuje się, że nukleotyd guaninowy ulega dokładniejszej translacji niż pozostałe nukleotydy (Negre i wsp. 1988). Wykazano również, że adenina (A) i tymina (T) destabilizują wiązanie kwasów nukleinowych w obszarze TATA i w regionie poly-A, co sugeruje że potrójne wiązanie wodorowe między guaniną (G) i cytozyną (C) stabilizuje oddziaływanie mRNA-antykonon. Z wyników przedstawionych przez Epstein i wsp. (2000) wynika, że największe znaczenie ma zamiana w ostatniej pozycji kodonu. A zatem, jeżeli na ostatniej pozycji kodonu występowałaby A lub T – bardziej podatne na błędy translacji – to wybór pary GC będzie preferowany, co w następstwie naturalnej selekcji w procesie ewolucji doprowadzi do jego większej wydajności (Epstein i wsp. 2000). Mając to na uwadze sprawdzono częstotliwość występowania kodonów w przypadku obu wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 : D_1^{G198A} i D_1^{G1263A} . Jakość kodonów może być określona dwoma sposobami. Pierwszy polega na określeniu częstotliwości występowania danego kodonu na podstawie dostępnych danych literaturowych, drugi określa względną zdolność do adaptacji kodonu (ang. *relative adaptiveness*) i bierze pod uwagę częstotliwość użycia danego kodonu w odniesieniu do wszystkich kodonów kodujących dany aminokwas. Przykładową analizę w prezentowanej pracy przeprowadzono przy pomocy dostępnego komercyjnego analizatora graficznego GCUA (ang. *Graphical Codon Usage Analyser*) (Fuhrmann i wsp. 2004) w oparciu o bazę KAZUSA (Nakamura i wsp. 2000) (rycina 6.1-3).



Rycina 6.1-2. Częstotliwość użycia kodonów wyrażona jako względna zdolność do adaptacji. A) natywna sekwencja receptora dopaminowego D₁ w pozycji 198 (Leu), B) wariant z wprowadzoną mutacją D₁^{G198A}, C) natywna sekwencja receptora dopaminowego D₁ w pozycji 1263 (Ser), D) wariant z wprowadzoną mutacją D₁^{G1263A}. Wyniki uzyskano przy pomocy analizatora GCUA (v.2.0).

W przypadku obu wariantów genetycznych badanych w niniejszej pracy zmiana obejmuje trzecią zasadę w kodonie (rycina 6.1-6), jednak okazuje się, że o ile w przypadku wariantu G198A następuje zamiana kodonu częstszego (TTG) na rzadszy (TTA), o tyle dla wariantu G1263A następuje zamiana kodonu rzadszego (TCG) na częstszy (TCA). Wynik taki pośrednio tłumaczy niższą ekspresję receptora D₁^{G198A} oraz większą w stosunku do niego ekspresję receptora D₁^{G1263A} (niższą jednak, niż w przypadku receptora natywnego). Nie jest jasne czy kontrola kinetyczna przy użyciu rzadkich kodonów pełni w naturze funkcje regulacyjne. Wydaje się, że ewolucyjne przystosowanie takiego mechanizmu regulacyjnego w celu uzyskania odmiennych konformacji powstającego białka jest jednak stosunkowo mało prawdopodobne, gdyż byłoby rozwiązaniem zbyt ryzykownym.

Również Tsai i wsp. (2008) zasugerowali, że mutacje ciche oraz obecność rzadkich kodonów prowadzą do tzw. opóźnień rybosomów, a skala czasowa tego zjawiska będzie determinować fałdowanie obszarów przed pauzą i za nią. W przejrzysty sposób autorzy dyskutują hipotezę tworzenia zmian w obrębie białek na skutek wydajnego spowolnienia

translacji przez wprowadzoną mutację. W myśl tej koncepcji wprowadzenie mutacji „podzieliłoby” sekwencje na dwie części: pierwszą, znajdującą się przed miejscem spowolnienia translacji i drugą – za mutacją. W efekcie, spowolnienie procesu translacji prowadziłoby do odmiennych mechanizmów fałdowania białka w zależności od tego, który fragment ulegałby procesowi fałdowania szybciej (Tsai i wsp. 2008). Wydaje się zatem, że zlokalizowana na początku genu białka receptorowego mutacja cicha G198A prowadziłaby do większych zmian niż polimorfizm G1263A zlokalizowany pod koniec łańcucha – w tym przypadku większość sekwencji uległaby translacji, zanim nastąpiłoby spowolnienie tego procesu. Ponieważ białka są krytycznymi elementami procesów biologicznych, zatem zapewnienie ich odpowiedniej funkcji jest niezwykle istotne i wymaga odpowiedniej struktury we właściwej populacji i przy energetycznie preferowanej konformacji. Mechanizmy „inżynierii białka” wytworzone przez naturę są bardzo skomplikowane, a dla nas nie tylko sam mechanizm fałdowania, ale też mechanizm kontroli tego procesu nie są jeszcze całkiem jasne.

6.2 Metody fluorescencyjne w biologii

Pełne zrozumienie oddziaływań między białkami na poziomie molekularnym, które jest celem nie tylko poznania funkcji receptorów, ale przede wszystkim opracowania nowych strategii leczenia szerokiego zakresu chorób neuropsychiatrycznych, wymaga poznania rozkładu białek i ich zachowania w warunkach *in-vitro*. Kluczowe znaczenie ma znajomość molekularnych mechanizmów oddziaływania białek receptorowych z innymi elementami komórki, w tym również z innymi białkami. Stosowane w badaniach biologii komórki metody pomiarowe powinny zatem umożliwiać śledzenie zmian strukturalnych towarzyszących oddziaływaniom białek z jednej strony i powinny być jak najmniej inwazyjne dla samej komórki z drugiej strony.

Mikroskopia fluorescencyjna okazała się jedną z ważniejszych metod obrazowania w biologii, głównie z uwagi na wysoką czułość i szeroki wybór selektywnych znaczników. Podczas gdy konwencjonalna mikroskopia fluorescencyjna ma ograniczoną rozdzielczość przestrzenną (limit dyfrakcyjny ok. 200 nm), to przy użyciu skaningowej mikroskopii konfokalnej można osiągnąć dużo wyższe rozdzielczości. Ponadto do badań biologicznych wprowadzane są coraz bardziej zaawansowane techniki jak: mikroskopia wielofotonowa, stymulowany zanik emisji, mikroskopia 4-Pi czy skaningowa mikroskopia bliskiego pola (Elangovan i wsp. 2003, Garini i wsp. 2005, Pawley 2006). Polepszają one nie tylko

rozdzielczość, ale na przykład wykorzystanie do wzbudzeń promieniowania bliskiej podczerwieni NIR w przypadku mikroskopii wielofotonowej pozwala na zmniejszenie efektów fototoksycznych w komórkach w porównaniu z klasyczną metodą jednofotonową wykorzystującą promieniowanie UV (Duncan i wsp. 2004).

Alternatywne podejście wykorzystuje zalety zjawiska fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET), czyli obserwację przekazania energii pomiędzy wzbudzonymi molekułami: donorem i akceptorem (rozdział 1.2). Wydajność tego zjawiska jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między tymi fluoroforami, a zatem jest wyjątkowo czuła na zjawiska zachodzące w odległościach rzędu 1-10 nm (Lakowicz 2006, Pawley 2006, Selvin 2000). Należy również podkreślić, że szeroki wybór dostępnych fluoroforów umożliwia dostosowanie znacznika do prowadzonych badań. Istnieje możliwość znakowania badanych białek fluoroforami bezpośrednio w komórce (Griffin i wsp. 1998) lub poprzez połączenie genów badanych białek z genami wybranych białek fluorescencyjnych (Tsien 1998). W ostatnim czasie najważniejsze miejsce zajmują białka fluorescencyjne, od pierwotnie odkrytego GFP aż po całe spektrum jego odmian o ulepszonych własnościach spektralnych i fizykochemicznych (rozdział 1.5). Szczególne miejsce zajmują kolorowe warianty stosowane jako komplementarne pary donor-akceptor właśnie w badaniach FRET. I chociaż znaczniki te zapoczątkowały olbrzymi postęp w badaniach biologicznych, to należy mieć na uwadze fakt, iż uzyskanie ilościowej informacji jest zadaniem nietrywialnym. W niniejszej pracy wykorzystano metody fluorescencyjne do zbadania oddziaływania receptorów dopaminowych D_1 i D_2 oraz wpływu na to oddziaływanie dwóch mutacji synonimicznych wprowadzonych w genie receptora dopaminowego D_1 (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}).

6.2.1 Wybór pary fluoroforów do pomiarów FRET

Białka fluorescencyjne ulegają ekspresji w większości linii komórkowych, a ich fluorofor tworzy się spontanicznie wewnątrz komórki, co stanowi dużą zaletę w badaniach procesów komórkowych. Wydajność ekspresji białka fluorescencyjnego powinna być wysoka, ale równocześnie nie może wywoływać efektów toksycznych. W badaniach fluorescencyjnych w liniach komórkowych istotne jest, aby sygnał emisji fluorescencji przewyższał autofluorescencję samych komórek (Shaner i wsp. 2005). Dodatkowo w pomiarach FRET istotnymi parametrami są: wysoka wydajność kwantowa donora i duży współczynnik absorpcji akceptora (Berney i Danuser 2003).

W niniejszej pracy wykorzystano powszechnie używaną parę fluoroforów: jasnoniebieskie białko fluorescencyjne CFP (donor) oraz żółte białko YFP (akceptor), która – chociaż wykazuje tendencję do spontanicznej oligomeryzacji (Zacharias i wsp. 2002) – to jest ona nieznaczna i nie wpływa na pomiary FRET (Biener-Ramanujan i wsp. 2006). Przy zastosowaniu metod biologii molekularnej białka fluorescencyjne (YFP i CFP) zostały przyłączone do C-końców receptorów dopaminowych, odpowiednio D₁ i D₂, aby nie zaburzać ciągłości genu, funkcji białka lub jego lokalizacji. Przeprowadzona analiza restrykcyjna wykazała, że otrzymano pożądane sekwencje (rozdział 5.1). Sprawdzenie funkcjonalności otrzymanych konstruktów i wykluczenie ewentualnych błędów powstałych w czasie klonowania wymagało ekspresji stworzonych białek fuzyjnych w eukariotycznym układzie komórkowym (linia HEK293). Weryfikację funkcjonalną receptorów przeprowadzono stosując analizę saturacyjną i wykazano, że przyłączenie białek fluorescencyjnych nie powodowało zmian parametrów wiązania receptor-ligand (rozdział 5.2), a obrazy uzyskane w mikroskopie konfokalnym potwierdziły błonową lokalizację receptorów (rozdział 5.4).

Dla użytej pary fluoroforów CFP-YFP odległość Förstera (R_0) wynosi ok. 4,9 nm (Lakowicz 2006, Patterson i wsp. 2000), lecz z uwagi na cylindryczny kształt białek (średnica ok. 2,5 nm oraz długość 4 nm) (Tsien 1998) efektywna odległość R_0 może być mniejsza. Na wydajność zjawiska FRET ma wpływ nie tylko rozmiar i umiejscowienie białek, ale również ich wzajemna orientacja (κ^2). Zbliżone wartości czasów życia pomiędzy różnymi komórkami wskazują, że wzajemna orientacja dipoli przejścia donora i akceptora ulega uśrednianiu dynamicznemu, a zatem nawet jeśli przyjęta wartość $\kappa^2 = 2/3$ (Kenworthy 2001, Lakowicz 2006, Tsien 1998) jest nie do końca prawidłowa, to zależności między pozostałymi wielkościami nie ulegną zmianie.

6.3 Pomiar zaniku fluorescencji w czasie – wyznaczenie wydajności FRET

W przypadku pomiarów stacjonarnych fluorescencji różnice w intensywności fluorescencji mogą być wynikiem zmian mikrootoczenia, różnic w stężeniu fluoroforów czy też artefaktów wynikających z optyki układu. Ponieważ czas życia fluorescencji nie zależy od stężenia fluoroforów, to jego pomiar pozwala ominąć problemy metod opartych na pomiarach intensywności fluorescencji. Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji jest coraz powszechniej wykorzystywana do badania przekazywania energii

w komórkach (Clegg i wsp. 2003, Duncan 2006, Gadella i wsp. 1995, Ng i wsp. 1999). Niemniej jednak zaniki fluorescencji często są skomplikowane, a przy analizie ilościowej wydajności FRET dynamika układu powinna być brana pod uwagę (Grailhe 2006, Millington i wsp. 2007, Rizzo i wsp. 2006, Tramier i wsp. 2006, Verveer i wsp. 2000, Zeng i wsp. 2006). Zmiana wydajności FRET może też bezpośrednio zależeć od wielkości zmian konformacyjnych wywołanych ligandem, które to zmiany dla szeregu receptorów wynoszą typowo ok. 0,1 nm i nie stwierdzono, aby były większe niż 0,2 nm (Garnier i wsp. 2007, Hoffmann i wsp. 2005). W literaturze wykazano, że maksymalna zmiana transferu w takim układzie wynosilaby 0,51% (Faron-Górecka i wsp. 2008), czyli byłaby znacznie niższa od wartości wydajności przeniesienia energii uzyskiwanych w badaniach FRET. Można zatem sądzić, iż nawet w przypadku aktywacji receptora ligandem (co nie miało miejsca w prezentowanej pracy) to nie zmiany konformacyjne w obrębie receptorów są źródłem obserwowanych zmian wydajności transferu energii, które interpretuje się jako wynik oddziaływania badanych receptorów.

W niniejszej pracy zastosowano metodę skorelowanego w czasie zliczania fotonów (TCSPC) do pomiaru skomplikowanych zaników fluorescencji w czasie uzyskiwanych w żywych komórkach eukariotycznych (linia HEK293), które mogą dostarczyć informacji o zjawisku FRET, a w szczególności o oddziaływaniu receptorów błonowych. Przeprowadzono analizę czasów życia fluorescencji do zbadania heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D_1 i D_2 oraz wpływu na to oddziaływanie dwóch polimorfizmów cichych wprowadzonych w genie receptora D_1 (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}). Schemat modelowy badanego układu przedstawiono na rycinie 1.5-2.

Niewątpliwą zaletą pomiarów zaniku fluorescencji w czasie w porównaniu z metodami opartymi na pomiarach intensywności (Lakowicz 2006) jest to, że czas życia fluorescencji nie zależy ani od stężenia fluorofora ani od długości drogi optycznej. Jednak, gdy w otoczeniu fluorofora obecny jest akceptor, czas życia fluorescencji ulega skróceniu i umożliwia śledzenie procesu przeniesienia energii. Należy jednak pamiętać, że ten sam fluorofor w zależności od otoczenia może wykazywać różne czasy życia fluorescencji, co można wykorzystać do monitorowania zmian pH i temperatury, stężenia jonów Ca^{2+} , Cl^- czy tlenu (Bastiaens i Jovin 1996, Bastiaens i Squire 1999, Jayaraman i wsp. 2000, Lakowicz 2006, Ng i wsp. 1999). Przy pomiarach na żywych komórkach należy bardzo starannie optymalizować warunki doświadczenia, przez m.in. utrzymanie stabilnej temperatury, użycie stabilnego źródła światła i zestawu filtrów neutralnych do kontroli intensywności wiązki wzbudzającej, a także układu filtrów polepszających stosunek sygnału do szumu.

6.3.1 Standaryzacja pomiarów i analiza średnich czasów życia fluorescencji

Problemy powstające w czasie pomiarów mają wpływ na uzyskiwany wynik, a zatem istotne jest poznanie potencjalnych przyczyn tych niepewności. Ich źródłem mogą być niedoskonałości aparatury, dualizm korpuskularno-falowy światła, właściwości komórek i własności fizyczne użytych fluoroforów.

W prezentowanej pracy wykorzystano dwa standardy fluorescencyjne do oceny możliwości pomiarowych i czułości aparatury. Związki te charakteryzują się znanymi czasami życia fluorescencji, a ich emisja ma charakter monoeksponencjalny (Boens i wsp. 2007). Wybrano dwa standardy różniące się czasami życia, a mianowicie p-terfenyl rozpuszczony w cykloheksanie, o czasie życia fluorescencji 938 ps i erytrozynę B, która po rozpuszczeniu w metanolu ma czas życia fluorescencji 444 ps, natomiast w wodzie – 79 ps. Wyniki pomiarów (tabela 5.3-1) pozostają w zgodzie z danymi publikowanymi w literaturze (Boens i wsp. 2007), a przykładowe zaniki fluorescencji przedstawiono na rycinach 5.3-1 i 5.3-2. Rezultaty te pozwalają stwierdzić, że stosowany układ pomiarowy jest odpowiednio czuły do mierzonych zaników fluorescencji białek CFP i YFP, a wyniki są powtarzalne.

Należy jednak pamiętać, że komórka jest układem dynamicznym i ulega efektom fototoksycznym, a dodatkowo efekty niekorzystne jakim może ulegać sam fluorofor (np. fotobłaknięcie), mogą prowadzić do lokalnych różnic w jego stężeniu. Z kolei przy zagęszczeniu fluorofora można nie mieć pewności, czy skrócenie czasu życia fluorescencji jest wynikiem FRET, czy też wygaszania fluorescencji na skutek przypadkowych zderzeń. Ważna jest zatem optymalizacja etapu transfekcji i zachowanie odpowiedniego stosunku ilości donora do akceptora. Z badań własnych (dane niepublikowane) oraz z danych literaturowych wynika, że najbardziej optymalny stosunek donora do akceptora – przy zachowaniu równowagi pomiędzy poziomami ekspresji białek fuzyjnych, a najbardziej optymalną wydajnością FRET – wynosi 2:1 (Berney i Danuser 2003). Przy pomiarach w komórkach kotransfekowanych zawsze sprawdzano fluorescencję obu fluoroforów, CFP i YFP, z uwagi na możliwość braku jednego z nich w komórce, gdyby transfekcja była mniej wydajna. Trudno bowiem zagwarantować, że w pomiarach tego typu wydajność transfekcji jest zawsze jednakowa, gdyż wiele czynników może mieć na nią wpływ (np.: wydajność oczyszczania plazmidowego DNA).

Kolejny istotny aspekt pomiarów czasów życia fluorescencji to analiza uzyskiwanych wyników. Zaniki fluorescencji większości białek fluorescencyjnych mają złożony przebieg,

a uśrednianie może prowadzić do niedoszacowania wydajności FRET. W przypadku białka CFP przyjmuje się dwueksponencjalny model zaniku fluorescencji, w którym dwie składowe odpowiadają obecności dwóch konformerów odmiennie oddziałujących z otaczającymi resztami aminokwasowymi (Bae i wsp. 2003), a których obecność potwierdziły badania NMR (Seifert i wsp. 2002). Uzyskane wartości czasów życia fluorescencji dla konstruktu fuzyjnego D₂-CFP wynoszą 3,15 ns i 0,84 ns, a odpowiadające im amplitudy 72,4% i 27,6%. Wyniki te korelują z czasami uzyskanymi dla białka CFP przez Becker i wsp. (2004): 2,8-2,9 ns (60%) i 1,2-1,3 ns (40%), Tramier i wsp. (2002): 3,84 ns (47%) i 1,3 ns (53%), Duncan i wsp. (2004): 2,19 ns (62%) i 0,42 ns (38%), Millington i wsp. (2007): 3,04 ns (62%) i 1,36 ns (38%). Ponadto uzyskano również dwa czasy życia fluorescencji dla fluorofora CFP w roztworze (Rizzo i wsp. 2004): 3,6 ns (86%) i 1,2 ns (14%), Borst i wsp. (2005): 3,72 ns (66,5%) i 1,14 ns (33,5%). Natomiast Habuchi i wsp. (2002), zaobserwowali oprócz dwóch składowych: 3,3 ns (89%) i 1,1 ns (10%), dodatkową krótką składową 0,24 ns o niewielkim 1% udziale w całkowitym zaniku. Z uwagi na pojawiające się rozbieżności, w niniejszej pracy do analizy wyników wykorzystano także model trójeksponencjalny, lecz uzyskane średnie czasy życia fluorescencji dla D₂-CFP nie różniły się znacząco. Zaobserwowano jednak, że jakość dopasowania modelu trójeksponencjalnego była gorsza niż w modelu dwueksponencjalnym, a ponadto algorytm analizy nie we wszystkich przypadkach prawidłowo rozdzielał składowe.

W komórkach kotransfekowanych, w których obecne były obydwie receptory, D₂-CFP i D₁-YFP, uzyskano średni czas życia fluorescencji donora $2,38 \pm 0,05$ ns, który nie różnił się znacząco od wartości uzyskanej przy dopasowaniu trójeksponencjalnym ($2,40 \pm 0,05$ ns). W porównaniu z komórkami, w których obecny był tylko D₂-CFP zaobserwowano skrócenie czasu życia fluorescencji donora w wyniku zjawiska FRET. Uzyskana w modelu trójeksponencjalnym wydajność FRET ($4,71 \pm 0,02\%$), była niższa od wartości obliczonej z dopasowania dwueksponencjalnego ($5,22 \pm 0,02\%$), co pozwala sądzić, że dopasowanie dwueksponencjalne przeszacowuje wydajności przekazania energii prawdopodobnie z powodu niedokładnego określenia składowych czasowych życia fluorescencji. Niemniej jednak wydajności transferu były nieznacznie wyższe od uzyskanej wcześniej w podobnym układzie doświadczalnym wydajności FRET dla pary receptorów dopaminowych D₁-D₂, która wynosiła 3,73% (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006). W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano znaczne zmniejszenie

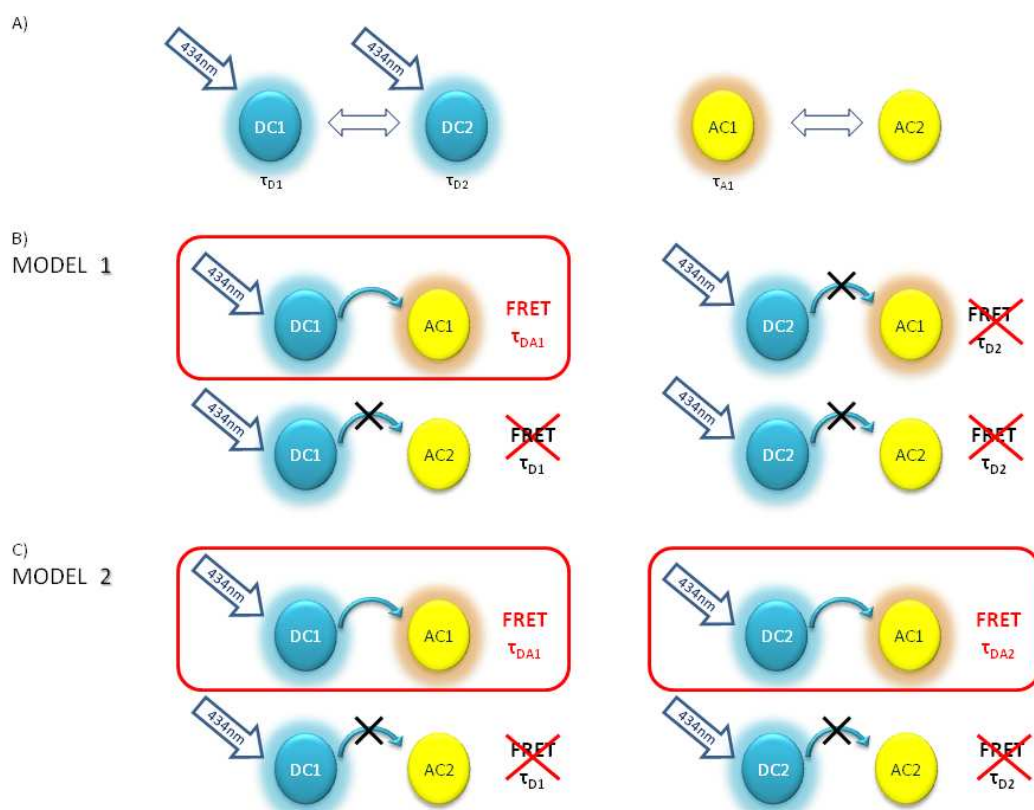
wydajności transferu w przypadku obu wariantów polimorficznych receptora D₁ (rozdział 5.3.2).

6.3.2 Analiza składowych zaniku fluorescencji – określenie wydajności FRET

W niniejszej pracy zastosowano także bardziej zaawansowaną niż poprzednio (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006) metodę analizy multieksponeńcjalnych zaników fluorescencji zaproponowaną przez Millingtona i wsp. (2007) i opierającą się na analizie poszczególnych składowych, w której amplitudy każdej składowej określają pulę oddziałujących receptorów sprzężonych z fluoroforami CFP i YFP. Nasuwa się zatem pytanie czy na podstawie tak przeprowadzonej analizy uzyskujemy znamienne różnice w interpretacji wyników oraz uzyskanych wydajności FRET w porównaniu z raczej standardowo stosowaną metodą analizy średnich czasów życia fluorescencji?

Pomiar zaniku fluorescencji w czasie w układzie donor-akceptor wykazał obecność trzech składowych czasowych, z których dwie były zbliżone do wartości składowych zaniku dwueksponeńcjального zmierzonego dla donora D₂-CFP. Te dwie składowe przypisano obecności dwóch konformacji fluorofora białka CFP (τ_{D1} i τ_{D2}): krótkożyciowej DC1 (ok. 1 ns) i długożyciowej DC2 (ok. 3 ns). Jak się okazało, wartość amplitudy B_2 (określającej pulę donora w konformacji długożyciowej biorącej udział w emisji) nie ulegała zasadniczo zmianie w układzie donor-akceptor, podczas gdy amplituda B_1 malała. Zmiana ta okazała się być równoważona przez pojawienie się trzeciej, najkrótszej składowej czasowej o amplitudzie B_3 . Zmierzone czasy życia fluorescencji w naszym układzie doświadczalnym dobrze korelowały z wynikami uzyskanymi przez zespół Millingtona, co pozwoliło na posłużenie się zaproponowanym modelem w dalszej analizie.

Autorzy modelu oparli się na doświadczeniach, w których wykazano, że uprotonowany chromofor YFP (AC2) nie może być akceptorem fluorescencji (Elslinger i wsp. 1999). Na rycinie poniżej przedstawiono schematycznie obecność dwóch konformacji fluorofora YFP, z których tylko jedna bierze udział w zjawisku przekazania energii (AC1). Zatem jedynie oddziaływanie donora z akceptorem w konformacji AC1 będzie skutkowało zmianą czasu życia fluorescencji, odpowiednio (τ_{DA1}) – dla oddziaływania z donorem w konformacji DC1 lub (τ_{DA2}) – dla oddziaływania z donorem w konformacji DC2.



Rycina 6.3-1. Schemat zaproponowanych modeli. A) równowaga dynamiczna między dwoma konformacjami donora CFP (DC1 i DC2). Wzbudzenie światłem 434 nm skutkuje emisją fluorescencji o charakterystycznym dla każdej konformacji czasie zaniku (τ_{D1} i τ_{D2}). YFP występuje w równowadze między aktywną (AC1) i nieaktywną (AC2) konformacją. Tylko AC1 bierze udział w zjawisku FRET i emituje fluorescencję o czasie zaniku τ_{DA1} . B) model 1 – FRET zachodzi między jedną konformacją donora i aktywną konformacją akceptora (AC1), przy założeniu że druga konformacja donora (DC2) nie bierze udziału w zjawisku (jej amplituda B_2 i czas życia ok. 1 ns nie ulegają zmianie). C) model 2 – FRET zachodzi między każdą z konformacji donora a aktywną konformacją akceptora (AC1). Pojawiające się trzy składowe zaniku sugerują, że dwa spośród czasów zaniku (τ_{D2} i τ_{DA1}) są podobne i nie mogą być rozróżnione.

Pojawia się zatem pytanie, jak interpretować zmierzone zmiany amplitud i czasów zaniku fluorescencji w układzie donor-akceptor. Rozważania można oprzeć o tzw. „model 3τ ” (model 1 – rycina 6.3-1 B) lub „model 4τ ” (model 2 – rycina 6.3-1 C). W najprostszym przypadku założono oddziaływanie tylko jednej z dwóch konformacji donora (DC1), co koreluje z brakiem zmiany składowej τ_{D2} i jej amplitudy B_2 , jako że konformacja DC2 nie bierze udziału w zjawisku FRET. Wartość amplitudy B_1 można interpretować wówczas jako liczbę molekuł donora biorących udział w przeniesieniu energii. O ile model taki wydaje się prawdopodobny, to uwzględniając dynamiczne zmiany konformacji chromofora CFP, wydaje się, że nie można wyodrębnić osobnej puli nieoddziałujących molekuł donora. Drugi model (rycina 6.3-1 C) uwzględnia oddziaływanie obu konformacji donora CFP i pojawiają się cztery składowe zaniku fluorescencji (stąd alternatywna nazwa „model 4τ ”),

przy czym dwóch nie można rozdzielić, gdyż ich wartości są zbyt zbliżone do siebie, a w rezultacie składowa T_2 i jej amplituda B_2 nie ulegają zmianie (wzrost amplitudy składowej τ_{DA1} będący wynikiem oddziaływania DC1 z AC1 jest równoważony spadkiem amplitudy składowej τ_{D2} na skutek przekazania energii od DC2 do AC1). W obu przypadkach pula niewygaszanych molekuł donora jest jednakowa i wynosi ok. 30%. Mając na uwadze, że badane komórki utrzymywano w roztworze o pH 7,4 można przyjąć, że ok. 24% chromoforów YFP powinno być w formie nieaktywnej (Millington i wsp. 2007, Nagai i wsp. 2002). Uwzględniając niepewność określenia wewnątrzkomórkowego pH, można założyć, że w układzie istnieje równowaga między uprotonowaną (AC1) i nieuprotonowaną (AC2) konformacją chromofora YFP.

Uzyskane wyniki pokazują, że metoda analizy średnich czasów życia fluorescencji zaniża wydajności przeniesienia energii, a zmiana wydajności FRET obliczona na podstawie nowych modeli jest bardziej znamienna. Wydaje się zatem, że przedstawione rezultaty przemawiają na korzyść zastosowanej techniki TCSPC i wydaje się, że pozwalają odrzucić pojawiające się czasem zarzuty o niskiej wydajności FRET uzyskiwanej metodą TCSPC. Rzeczywiście wyniki uzyskane metodą średnich czasów życia oscylują wokół 4-14% w układzie wyznakowanych fluorescencyjnie receptorów, ale należy uwzględnić, że wydajność FRET dla białka CFP połączonego odcinkiem 15 aminokwasów z akceptorem YFP wynosi ok. 37%, co uznano za wartość maksymalną w tej metodzie, obliczoną w oparciu o średnie czasy życia fluorescencji (Dziedzicka-Wasylewska i wsp. 2006, Faron-Górecka 2009, Łukasiewicz 2008). Uzyskane zmiany korelują z danymi obliczonymi na podstawie wartości średnich, aczkolwiek dużo wyższe wydajności FRET (40-85%) wydają się przemawiać na korzyść analizy zastosowanej w prezentowanej pracy, pozwalającej na oszacowanie udziału populacji receptorów w badanych oddziaływaniach. Co ciekawe, dla obu dopasowań uzyskano znamienne obniżenie wydajności transferu energii pomiędzy receptorem dopaminowym D_2 , a każdym z dwóch wariantów genetycznych receptora dopaminowego D_1 .

Pomiar czasów życia fluorescencji do oznaczenia wydajności FRET jest wysoce miarodajny i pozwala wyznaczyć frakcję donora, która bierze udział w przeniesieniu energii, co umożliwia dokładniejszy pomiar odległości między donorem a akceptorem. Dodatkowo, analizy przeprowadzone w niniejszej pracy wykazują, że technika ta jest odpowiednio czuła i dostarcza powtarzalnych wyników, co również wynika z pomiarów czasów zaniku fluorescencji standardów.

6.4 Mikroskopia konfokalna

W dalszym etapie pracy wykorzystano mikroskopię konfokalną do określenia lokalizacji utworzonych białek fuzyjnych (receptorów dopaminowych D_1 i D_2 połączonych z białkami fluorescencyjnymi YFP i CFP oraz wariantów receptora D_1) w komórce, co miało na celu wyjaśnienie przyczyn obniżonej heterodimeryzacji wariantów polimorficznych receptora dopaminowego D_1 . Okazuje się bowiem, że obniżenie wydajności FRET może nie wynikać bezpośrednio ze zmian heterodimeryzacji lecz – jak wykazano dla wariantów receptora dopaminowego D_2 z usuniętymi resztami Arg z pętli ic3 – z odmiennej lokalizacji białka receptorowego w komórce (Łukasiewicz i wsp. 2009).

Wyższa rozdzielczość zdjęć – w porównaniu z uzyskiwanymi w tradycyjnym mikroskopie fluorescencyjnym – pozwoliła określić rozmieszczenie białek w komórce. Ponieważ obrazy uzyskano na preparatach utrwalonych, to nie trzeba było utrzymywać stałej temperatury, stężenia CO_2 i pH, co pozwoliło na większą swobodę pomiaru. Chociaż proces samego utrwalania zmienia właściwości fluorescencyjne białka CFP i zmniejsza wydajność FRET (Dobrucki 2004), to z uwagi na fakt, że w tym etapie badań nie przeprowadzono pomiarów ilościowych FRET, efekt ten nie miał większego znaczenia. Zaobserwowano natomiast efekt fotobłaknięcia, szczególnie silnie obserwowany dla białka YFP, który co prawda utrudnia długą wizualizację komórek (Bernas i wsp. 2004, Song i wsp. 1995), ale przy ograniczeniu liczby zdjęć pojedynczej komórki można uzyskać obrazy dobrej jakości.

Obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu konfokalnego pozwoliły stwierdzić, że zarówno receptor dopaminowy D_1 , jak i D_2 są zlokalizowane w błonie oraz, że podobną lokalizację mają oba warianty genetyczne receptora dopaminowego D_1 (D_1^{G198A} i D_1^{G1263A}). Zauważono również nieznaczną lokalizację cytoplazmatyczną receptora D_2 , która może wynikać z niewydajnej obróbki receptora D_2 lub z internalizacji receptora niezależnej od agonisty (Prou i wsp. 2001, So i wsp. 2005, Vickery i Von Zastrow 1999). Jednak obserwacja lokalizacji receptora na obrazach komórek z kilku niezależnych transfekcji nie wykazała, aby zjawisko to miało znaczący udział, co następnie potwierdzono w analizie kolokalizacji.

6.4.1 Analiza kolokalizacji

Zagadnienie kolokalizacji w mikroskopii jest dosyć niejednoznaczne. Istnieje szereg metod analizy, od prostych obliczeń nakładających się punktów obrazu aż po grupę

rozwiązań bardziej skomplikowanych, większość z nich bazuje na globalnej analizie statystycznej rozkładu intensywności pojedynczych punktów obrazu (Costes i wsp. 2004, Li i wsp. 2004, Manders i wsp. 2003). Złożoność niektórych z tych narzędzi utrudnia implementację metody najbardziej odpowiedniej i odzwierciedla fakt, iż badanie kolokalizacji w każdym przypadku wymaga niestandardowego podejścia.

Kolokalizację dwóch lub więcej znaczników w obrębie struktur komórkowych można zdefiniować jako całkowite lub częściowe fizyczne zachodzenie na siebie grup znaczników w obrębie pewnego obszaru. Ograniczona zdolność rozdzielcza mikroskopu wprowadza niepewność dokładnego określenia fizycznej lokalizacji małego obiektu w obszarze dwuwymiarowym, a tym bardziej trójwymiarowym. Współczynnik Pearsona pozwala na określenie stopnia kolokalizacji obrazu poprzez wyznaczenie fluorogramu, na którym intensywności każdego z kanałów odkładane są na odpowiednich osiach (intensywność kanału zielonego – oś x, a kanału czerwonego – oś y). Jeżeli znakowanie dwoma znacznikami jest proporcjonalne, a detekcja w każdym kanale jest liniowa, to w rezultacie otrzymywany jest fluorogram o rozkładzie liniowym, którego nachylenie odzwierciedla stechiometrię użytych fluoroforów, modulowaną wydajnością detekcji każdego z nich. Współczynnik Pearsona określa zgodność dopasowania liniowego fluorogramu z rozkładem intensywności, aczkolwiek dosyć silnie zależy od intensywności fluorescencji i szumów. Metoda ta została zastosowana w pomiarach czasowych i przestrzennych replikacji DNA w interfazie (Manders i wsp. 1992). Do oznaczenia kolokalizacji stosuje się też współczynnik Mandersa, który bazuje na współczynniku Pearsona, ale nie posługuje się uśrednionymi wartościami intensywności lecz wartościami względnymi danego kanału (w obszarach, w których intensywność fluorescencji w kanale drugim jest większa od zera), w stosunku do całkowitej intensywności tego kanału. Współczynniki M1 i M2 są dobrymi wyznacznikami koincydencji kanału zielonego z czerwonym powyżej ich intensywności całkowitej, nawet wówczas gdy intensywności w obu kanałach się różnią. Współczynnik ten jest bardzo czuły na szumy układu lub tzw. efekt *cross-talk*.

Kolejną metodą określenia współwystępowania znaczników w zadanym obszarze jest przeprowadzana w dwóch etapach metoda Costes’a (Costes i wsp. 2004), która chociaż wydaje się wskazywać rzeczywistą kolokalizację nawet przy wysokich szumach, to jednak jest dosyć silnie ograniczona, gdy wzrasta odchylenie standardowe szumu i zależy od sposobu przeprowadzenia testu. Autorzy proponowali powtarzanie procedury 200-krotnie, aby uzyskać rozkład znamieny statystycznie i prowadzący do eliminacji wyniku fałszywie

pozytywnego. Spore zainteresowanie wzbudziła również praca Li i wsp. (2004), w której rozwinięto graficzną metodę interpretacji grup obrazów w oparciu o ich odpowiednie intensywności. Stanowi ona duży krok naprzód w stosunku do opisanych histogramów i pozwala na bezpośrednie określenie kolokalizacji lub jej wykluczenie.

Jakościowe, jak i ilościowe badania kolokalizacji na poziomie subkomórkowym są kluczowe z uwagi na dynamiczne przemieszczanie białek zachodzące w procesach komórkowych. Rozwój technik fluorescencyjnych umożliwia badanie zachodzących procesów, a analiza obrazów stanowi pewne wyzwanie. Chociaż obrazy są jedynie pewnym odzwierciedleniem rzeczywistości, to jednak sporo uwagi wymaga sposób ich uzyskiwania. Szczególnie istotny jest odpowiedni wybór systemu zbierania danych przystosowanego do rozmiaru i struktury obiektów kolokalizujących oraz minimalizacja wszelkich szumów.

W niniejszej pracy w oparciu o obliczone współczynniki Pearsona określono kolokalizację receptorów dopaminowych D₁ i D₂ oraz ewentualny wpływ na nią cichych polimorfizmów receptora dopaminowego D₁. Przy użyciu współczynnika Pearsona oceniano stopień współwystępowania obu receptorów połączonych z białkami fluorescencyjnymi. Na podstawie wartości współczynnika Pearsona, która w badanych układach wynosiła 0,77-0,85 wywnioskowano, że receptory dopaminowe dobrze kolokalizują, a wprowadzone mutacje w genie receptora dopaminowego D₁ nie zmieniają lokalizacji powstałych mutein w stosunku do receptorów natywnych. Wykazano ponadto, że obniżona ekspresja obu wariantów nie jest wynikiem cytoplazmatycznej lokalizacji wariantów genetycznych receptora D₁. Podobnie obniżona heterodimeryzacja wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₁ z receptorem D₂ nie jest wynikiem odmiennej lokalizacji tych białek w komórce.

6.5 Oddziaływania molekularne odpowiedzialne za tworzenie heterodimerów

Mechanizmy molekularne wyjaśniające interakcje białko-białko w procesie dimeryzacji receptorów nie są do końca poznane. Postuluje się udział zarówno kowalencyjnych (wiązania disiarczkowe), jak i niekowalencyjnych (oddziaływania hydrofobowe, tzw. *coiled-coil*) oddziaływań w tym procesie (AbdAlla i wsp. 1999, Carillo i wsp. 2003, Fotiadis i wsp. 2006, Guo i wsp. 2003, Hebert i wsp. 1996, Hernanz-Falcón i wsp. 2004, Kaupmann i wsp. 1998, Kunishima i wsp. 2000, Liang i wsp. 2003, Pagano i wsp. 2001, Zeng i Wess 1999). W tworzenie stabilnych niekowalencyjnych kompleksów

białkowych mogą również być zaangażowane oddziaływania elektrostatyczne. Oddziaływania te mogą występować pomiędzy charakterystycznymi powierzchniami oddziaływania, z których jedna zawiera grupę kationową (grupa guanidynowa łańcucha bocznego Arg), a druga składa się z anionowej grupy karboksylowej Asn lub Glu i/lub anionowej grupy fosforanowej obszaru ufosforylowanego (Agnati i wsp. 2006, Schug i Lindner 2005, Wang i wsp. 2005, Woods i Ferre 2005, Woods i wsp. 2005). Wykazano, że motywy sekwencji składające się z dwóch przylegających reszt Arg („RR” lub „RKR”) na jednym peptydzie i dwóch przyległych reszt Asn („DD”) lub Glu („EE”) i/lub jednej ufosforylowanej Ser w bliskim sąsiedztwie drugiej (APPENDIX V), było wystarczające do powstania stabilnego kompleksu pomiędzy dwoma peptydami (Jackson i wsp. 2005, 2006; Woods i wsp. 2003). Ponadto Jackson i wsp. (2006) wykazali, że oddziaływanie obejmujące tylko jedną grupę fosforanową jest prawie tak stabilne jak oddziaływanie zawierające wielokrotne reszty Glu. Dodatkowo pokazano, że obecność ufosforylowanego obszaru powodowała znaczący wzrost stabilności oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy powierzchniami dimeryzacji białek (Jackson i wsp. 2006). Jednocześnie, podkreśla się znaczenie procesów fosforylacji-defosforylacji w modulacji oddziaływań elektrostatycznych (Woods i Ferre 2005).

Różne prace sugerują, że mechanizm zaangażowany w heterodimeryzację niektórych GPCRs może być związany z obecnością opisanych motywów, neutralizowaniem wzajemnym swojego ładunku elektrycznego i tworzeniem mostków solnych (Canals i wsp. 2003, Fiorentini i wsp. 2003, Lee i wsp. 2002, Woods i Ferre 2005). Ostatnio Łukasiewicz i wsp. (2009) wykazali, że oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy bogatymi w Arg epitopami/obszarami w pętli ic3 receptora D₂, a dwoma przyległymi resztami Glu C-końca receptora dopaminowego D₁ biorą udział w heterodimeryzacji pomiędzy tymi receptorami. Podobne oddziaływania zostały opisane dla receptora dopaminowego D₂ i kanabinoidowego CB₁ (Lee i wsp. 2002) oraz dla jonotropowego receptora glutaminianu typu NMDA (podjednostka NR1) i receptora dopaminowego D₁ (Jackson i wsp. 2005). Ponadto Ciruela i wsp. (2004) przy użyciu spektrometrii masowej sugerowali, że heterodimeryzacja receptorów adenozynowego A_{2A} i dopaminowego D₂ silnie zależy od elektrostatycznych oddziaływań pomiędzy bogatym w Arg obszarem pętli ic3 receptora D₂, a Asn w obszarze C-końca receptora A_{2A}. Podkreślili oni również istotną rolę fosforylacji Ser374 (zlokalizowanej na C-końcu receptora A_{2A} w obszarze sekwencji *konsensusowej* kinazy kazeinowej CK1) w tym procesie. Ponadto wykazano, że w przeciwieństwie do sekwencji CK1, dwie przyległe reszty Asn nie były zachowywane między gatunkami, co sugeruje, że

heterodimeryzacja jest najprawdopodobniej skojarzona z obszarami ufosforylowanymi (Ciruela i wsp. 2004).

Powszechnie wiadomo, że fosforylacja Ser odgrywa kluczową rolę w regulacji różnych procesów komórkowych, a mutacje w obrębie miejsca fosforylacji substratu mogą prowadzić do rozwoju pewnych zaburzeń (Cohen 2001). Polimorfizm G1263A, będący przedmiotem niniejszej pracy, jest zlokalizowany w obrębie kodonu kodującego Ser w pozycji 421 czyli na C-końcu receptora dopaminowego D₁, dlatego sprawdzono czy Ser w tej pozycji ulega fosforylacji. Przy pomocy bazy PHOSIDA (ang. *phosphorylation site database*), zaprojektowanej do identyfikacji miejsc fosforylacji (Gnad i wsp. 2007) określono, że Ser421 jest miejscem potencjalnie rozpoznawanym przez CK1, gdyż jest zlokalizowana w obrębie obszaru zawierającego sekwencję *konsensusową* kinazy CK1 (S-X₃-pSS) (Pearson i Kemp 1991). Kinaza kazeinowa CK1 należy do rodziny kinaz białkowych specyficznych wobec układu Ser/Thr, których powszechność występowania sugeruje istotną rolę regulacyjną tego białka (Chergui i wsp. 2005). Wykazano, że CK1 nasila zależną od agonisty fosforylację receptora muskarynowego M₃ i pośredniczy w fosforylacji rodopsyny w odpowiedzi na stymulację światłem (Chergui i wsp. 2005, Tobin 2002). Ponieważ badany polimorfizm G1263A – jak sugerowano powyżej – może prowadzić do spowolnienia procesu translacji i następnie zmiany struktury białka, zatem wydaje się możliwe, że reszta Ser421 może być inaczej przestrzennie zlokalizowana w takiej cząsteczce białka – mniej dostępna dla kinazy, co może osłabiać lub spowalniać proces fosforylacji. Chociaż jest to sugestia oparta wyłącznie na rozważaniach teoretycznych, wydaje się uprawniona i może być jedną z przyczyn obserwowanego osłabienia heterodimeryzacji wariantu genetycznego D₁^{G1263A} z receptorem D₂.

Coraz częściej wskazuje się na rolę heterodimeryzacji receptorów dopaminowych D₁-D₂ w mechanizmie działania leków przeciwpsychotycznych (Faron-Górecka i wsp. 2008). Dlatego uzyskane w niniejszej pracy wyniki wydają się wskazywać na możliwe molekularne mechanizmy odpowiedzialne za związek obu polimorfizmów receptora dopaminowego D₁ (D₁^{G198A} i D₁^{G1263A}) ze zmienioną odpowiedzią na terapię.

7. WNIOSKI KOŃCOWE

Zaproponowany układ doświadczalny, w którym zastosowano nowoczesne narzędzia z zakresu biologii molekularnej (mutageneza punktowa, białka fuzyjne, ekspresja pożądanых białek w układzie modelowym *in-vitro*) oraz zaawansowane techniki biofizyczne (pomiar wydajności zjawiska FRET z użyciem czasów życia fluorescencji), a także wykorzystanie technik bioinformatycznych (modelowanie struktury II-rzędowej RNA przy użyciu programu MFOLD, zastosowanie symulatora PHOSIDA i analizatora GCUA), wydaje się bardzo dobrym zestawem narzędzi, które mogą być zastosowane w przyszłości do badania mechanizmów heterodimeryzacji wielu różnych par receptorów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

W niniejszej pracy nie zaobserwowano zmiany wartości stałej powinowactwa K_d , wyznaczonej dla zmutowanych receptorów dopaminowych D₁ w porównaniu z receptorem natywnym, co uznawane jest za wyznacznik braku zmian konformacyjnych w obrębie struktury białka, a przynajmniej w rejonie domen odpowiedzialnych za wiązanie liganda. Jednak oddziaływanie tych mutein z receptorem dopaminowym D₂ ulegało zmianie, jak wynika z badań FRET. Obserwowana zmiana w heterodimeryzacji wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₁ z receptorem dopaminowym D₂ nie wynikała z ich zmienionej lokalizacji, bo oba warianty genetyczne kolokalizowały z receptorami D₂ w błonie komórkowej w podobnym stopniu co natywny receptor D₁. Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać hipotezę Tsai i wsp. (2008) sugerującą ścisły związek kinetyki procesu translacji z fałdowaniem powstającego białka. Oczywiście, obserwowana zmiana oddziaływania może wynikać z prostego faktu zaniżonej ekspresji wariantów genetycznych w stosunku do porównywalnej z innymi danymi ekspresji receptora dopaminowego D₁. Niemniej jednak, niezwykle istotne jest, że w taki czy inny sposób obserwowany efekt jest wynikiem wpływu mutacji cichych, które – zgodnie z tym co się powszechnie uważa – nie powinny powodować żadnych zmian.

Zastosowana metoda analizy czasów życia fluorescencji z rozkładem na składowe okazała się lepsza niż analiza średnich czasów życia fluorescencji. Prezentowane w pracy techniki doświadczalne oraz uzyskane rezultaty dowodzą, że stosowane metody są odpowiednio czule do wykrycia zmian wywołanych zaniżoną ekspresją, a zatem

potwierdzono przydatność i wiarygodność zastosowanego układu doświadczalnego i aparatury.

KODA

Organizmy żywe są niezwykle skomplikowanymi układami biologicznymi, których kompleksowa natura nie jest jeszcze do końca poznana (czy kiedykolwiek będzie?). Jeżeli przyjmiemy, że istota n -wymiarowa jest w stanie pojąć ideę jedynie $n-1$ wymiarów, możemy obawiać się tego, że nigdy w pełni nie poznamy własnej natury. Warto jednak zbliżyć się do kresu poznania choćby małutkimi krokami.

Od początku swego istnienia człowiek interesował się naturą zarówno otoczenia, jak i siebie samego. Do dnia dzisiejszego zgromadzono wyniki licznych prac poznawczych, jednakże pomimo całego ogromu wiedzy w nich zawartej w dalszym ciągu pewne kwestie pozostają nieodgadnione. Może jeszcze nie posiadamy odpowiednich narzędzi, aby zgromadzić wystarczająco dużo danych, a może zgromadziliśmy ich za dużo aby je w pełni zrozumieć. Niniejsza praca stanowi – w nadziei Autorki – niewielki, aczkolwiek ważny wkład do poznania niezwykle skomplikowanych zagadnień natury biologicznej, biofizycznej czy neurofarmakologicznej, dostarcza narzędzi do lepszego ich zrozumienia oraz przynosi pewne odpowiedzi. Czy zatem przybliży nas do celu czy oddala od niego? Na to pytanie odpowiedzieć może sobie czytelnik.

*Niniejsze opracowanie nie miało na celu opisanie wszystkich możliwych aplikacji zastosowanych metod fluorescencyjnych, została podjęta próba zastosowania odmiennej, bardziej zaawansowanej analizy zmierzonych zaników fluorescencji w czasie w kontekście oddziaływania receptorów dopaminowych. W kolejnych etapach prezentowanej pracy badano efekty wprowadzenia mutacji w genie *DRD1* i jak się okazało – interpretacja uzyskanych wyników jest nie tylko trudna, ale również często niejednoznaczna. Prawdopodobnie najbardziej fascynującym elementem nauki samej w sobie jest ten dreszczyk emocji towarzyszący każdemu doświadczeniu, a element zaskoczenia sprawia, że nauka jest nie tylko*

interesująca, ale wręcz pociągająca. Badanie mechanizmów stworzonych, lecz skrzętnie ukrywanych, przez naturę, stanowi wyzwanie. Szukanie odpowiedzi na jedno pytanie, otwiera drzwi do kolejnych zagadek, łamigłówek. I chociaż pojawiają się liczne pytania to nie na wszystkie poznamy odpowiedzi.

Zaczynając niniejsze opracowanie zaprezentowano dwie niezwykle istotne pozycje literaturowe, czyli podręcznik podstaw fluorescencji oraz mikroskopii konfokalnej, których uważne przestudiowanie nie uczyni nikogo specjalistą, ale bez nich ani rusz. Albowiem znany jest pogląd, że mistrzostwo osiąga się po, bagatelka, dziesięciu tysiącach godzin (Ericsson i Smith 1991, Chi i wsp. 1988). Pół litra oczyszczonego plazmidu..., później jesteśmy już pewni, że owe dziesięć tysięcy godzin jest niezbędne do osiągnięcia perfekcji. Po upływie niezliczonych godzin pipetowania i transfekcji dochodzimy do wniosku, że to dopiero początek. Początek nauki, przygody, fascynacji...

Katarzyna Grymek

Kraków, 7. Października 2009 roku

APPENDIX I

Szlaki dopaminergiczne i rozmieszczenie receptorów dopaminowych w mózgu

W mózgu występują cztery, wyraźnie zróżnicowane szlaki dopaminergiczne:

1. **Nigrostriatalny** – łączy substancję czarną z prążkowiem i wchodzi w skład tzw. układu pozapiramidowego. Zmniejszenie aktywności tego szlaku powoduje zaburzenia ruchów dowolnych i napięcia mięśniowego obserwowanych w chorobie Parkinsona, natomiast nadczynność wywołuje objawy płasawicy Huntingtona.
2. **Mezolimbiczny** (śródmózgowiowo-rąbkowy) – odgrywa ważną rolę w regulacji zachowań emocjonalnych i poznawczych.
3. **Mezokortykalny** (śródmózgowiowo-korowy) – reguluje procesy uczenia się, zachowań motywacyjnych i funkcje poznawcze.
4. **Guzkowo-lejkowy** – związany jest z regulacją czynności hormonalnych.

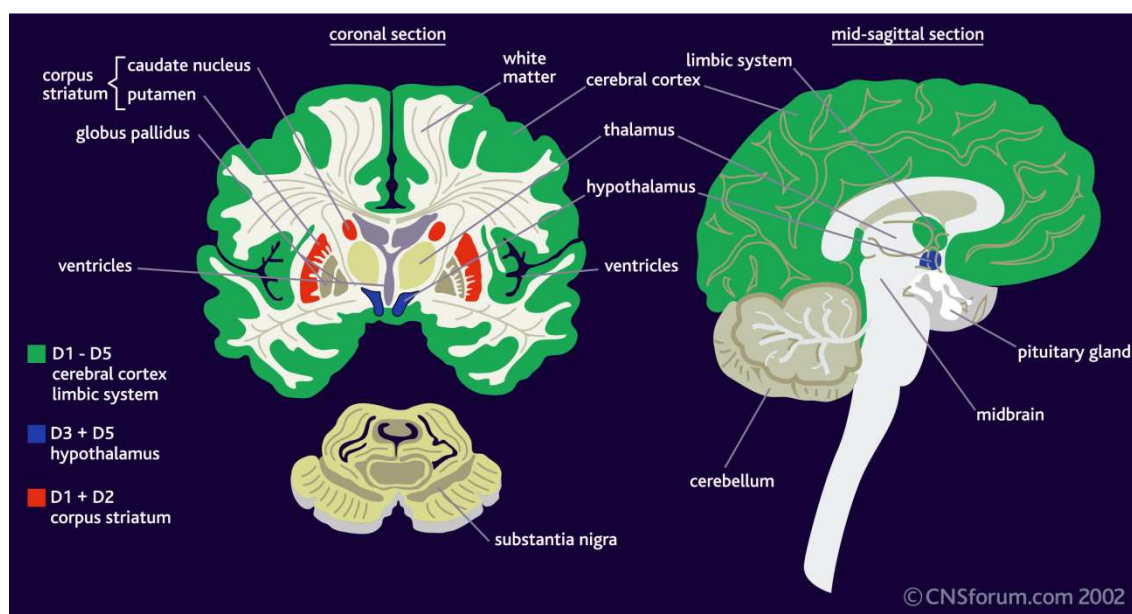
Dopamina występuje również w narządach obwodowych, takich jak serce, nerki, nadnercza, trzustka i in. Pełnienie funkcji regulacyjnej i homeostatycznej jest sugerowane przez wielu autorów, potwierdzałyby to rozległe zaburzenia większości funkcji mózgu wywołane leżą neuronów dopaminergicznych (Missale i wsp. 1998, Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Jaber i wsp. 1996).

Rozmieszczenie receptorów w mózgu jest zróżnicowane (tabela 1), przy czym najbardziej rozpowszechnionymi typami, występującymi w większości obszarów mózgu są receptory D_1 i D_2 (rycina 1). Natomiast receptory D_3 , D_4 oraz D_5 są rozmieszczone przede wszystkim w małych ściśle określonych strukturach mózgowych (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004).

Kolokalizacja różnych typów receptorów dopaminowych na tych samych komórkach dotyczy ok. 30% neuronów (rycina 1) (Aizman i wsp. 2000). Współwystępowanie wydaje się zjawiskiem niezwykle istotnym w kontekście synergistycznego działania receptorów dopaminowych, (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004). Receptory dopaminowe zlokalizowano również obwodowo: w naczyniach krwionośnych i nadnerczach (D_1 i D_2), a także w nerkach (głównie D_1) i sercu (D_4).

Tabela 2. Rozmieszczenie receptorów dopaminowych w mózgu.

Typ receptora	Lokalizacja anatomiczna
Podrodzina D1	D1 prążkowie (ang. <i>Striatum</i>), jądro pólleżące (ang. <i>Nucleus Accumbens</i>): rdzeń i powłoka (ang. <i>core</i> i <i>shell</i>), wysepki Calleja
	D5 hipokamp (ang. <i>Hippocampus</i>) (obszary CA1, CA2, CA3 i CA4), zawój zębaty hipokampa (ang. <i>Dentate Gyrus</i>)
Podrodzina D2	D2 prążkowie, jądro pólleżące (rdzeń i powłoka), istota czarna (ang. <i>Substantia Nigra</i>), pole brzuszne nakrywki (ang. <i>Ventral Tegmental Area</i>)
	D3 jądro pólleżące (powłoka), wysepki Calleja, mózdzek (ang. <i>Cerebellum</i>) (warstwy 9 i 10), istota czarna, pole brzuszne nakrywki, hipokamp (obszary CA1, CA2, CA3 i CA4), zawój zębaty hipokampa
	D4 kora czołowa (ang. <i>Frontal Cortex</i>), hipokamp (obszary CA1, CA2, CA3 i CA4), zawój zębaty hipokampa, mózdzek



Rycina 2. Rozmieszczenie i współwystępowanie różnych typów receptorów dopaminowych w mózgu (www.CNSforum.com).

APPENDIX II

Profil farmakologiczny receptorów dopaminowych

W oparciu o wyniki badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej ustalono, że występuje dużo więcej podtypów receptorów dopaminowych niż wskazywały na to badania czysto farmakologiczne i funkcjonalne. Jednym z powodów jest wysokie podobieństwo budowy domeny wiążącej ligandy w obrębie podrodziny, stopień homologii obszaru transbłonowego wynosi 86% dla receptorów dopaminowych D₁ i D₅. Konsekwencją tego faktu jest brak selektywnych ligandów, które wiązałyby się tylko z jednym podtypem receptora. Związki, którymi dysponujemy pozwalają na badania porównawcze jedynie podrodziny D₁ i D₂. Agonista podrodziny D₁ (SKF39393) i antagonistą (SCH23390) mają 100-10000 razy większe powinowactwo do receptorów D₁ i D₅ niż do receptorów D₂, D₃ i D₄, a z kolei antagonistą podrodziny D₂, sulpiryd, wiąże się 1000 razy silniej z receptorami podrodziny D₂ niż D₁ (Missale i wsp. 1998, Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004, Seeman 2009).

Charakterystyka farmakologiczna receptorów podrodziny D1

Ocenę profilu farmakologicznego receptorów D₁ i D₅ prowadzono na heterologowych liniach komórkowych, w których doszło do ekspresji cDNA każdego z receptorów, a ocenie podlegało hamowanie wiązania selektywnych agonistów (³H]SCH23390 lub [¹²⁵I]SCH23982) lub modulacja aktywności AC (Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004).

Zbadano powinowactwo zarówno antagonistów (SCH23390>(+)butaklamol>haloperidol i in.), jak i agonistów receptorów dopaminowych (fenoldopam>SKF39393>dopamina i in.), lecz nie wykazano zasadniczej różnicy w profilu powinowactwa tych leków do receptora D₁ i D₅, sklonowanego, jak i naturalnie występującego w prążkowie szczura. Zasadnicza różnica to powinowactwo dopaminy, która wiąże się 5-20 razy silniej do receptora D₅ niż do D₁, co sugeruje potencjalny udział receptorów D₅ w regulacji podstawowej transmisji dopaminergicznej, a z kolei butaklamol 10-krotnie silniej blokował receptor D₁ (Missale i wsp. 1998).

Charakterystyka farmakologiczna receptorów podrodziny D2

Dominującym spośród podrodziny D₂ jest receptor D₂, który może stanowić do 90% całej populacji podrodziny D₂ w zależności od badanej struktury mózgu. Analiza profilu

farmakologicznego podrodziny D2 oparta na doświadczeniach prowadzonych na receptorach ulegających ekspresji w modelowych układach komórkowych, nie wykazała znaczących różnic w powinowactwie badanych związków do izoform receptora D₂. Ocenie podlegało hamowanie wiązania selektywnych antagonistów D₂ (m.in. [³H]spiroperidolu), modulacja aktywności AC, uwalnianie kwasu arachidonowego i wytwarzanie fosforanów inozytolu.

Profil receptora D₃ wykazał, że pewne związki pozwalają odróżnić go od receptora D₂. Na przykład dopamina wykazuje ok. 20-krotnie wyższe powinowactwo do receptora D₃ niż D₂, podobnie wyższe powinowactwo do D₃ uzyskano dla 7-OH-DPAT i kwiniopirolu. Większość neuroleptyków (leków przeciwpsychotycznych) wykazała nanomolarne powinowactwo do obu receptorów, aczkolwiek haloperidol (klasyczny neuroleptyk) i spiperon mają 10-20-krotnie wyższe powinowactwo do D₂ niż D₃, podczas gdy kłozapina (atypowy lek przeciwpsychotyczny, lek nowej generacji) nie umożliwia rozróżnienia tych typów receptorów (Missale i wsp. 1998, Dziedzicka-Wasylewska i Zawilska 2004).

Analiza profilu farmakologicznego receptora dopaminowego D₄ przypomina profil pozostałych członków podrodziny D2. Najważniejsza różnica to wyższe powinowactwo kłozapiny do receptorów D₂ i D₃, a z kolei chlorpromazyna ma 10-20-krotnie niższe powinowactwo do receptorów D₄ niż do D₂ i D₃.

APPENDIX III

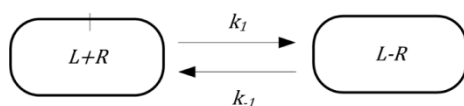
Analiza saturacyjna

Przez długi czas receptory pozostawały pod postacią pojęć koncepcyjnych, które pozwalały wyjaśniać farmakologiczne efekty zachodzące w tkankach. Jednak od połowy lat 70-tych XX. wieku możliwe stało się ich badanie przy użyciu techniki wiązania znakowanych ligandów. Analiza saturacyjna pozwala na określenie parametrów wiązania praktycznie dowolnego związku do danego receptora błonowego (Vauquelin i von Mentzer 2007), a tworzenie odwracalnego kompleksu receptor-ligand jest jej podstawowym założeniem. Najczęściej stosowane są ligandy znakowane trytem ($[^3\text{H}]$) lub jodem ($[^{125}\text{I}]$).

Wiązanie radioligandu rozpoczyna się poprzez proces inkubacji znakowanego radioaktywnie związku z komórkami, homogenatem komórkowym lub wyizolowaną frakcją błonową receptorów; ta ostatnia została wykorzystana w niniejszej pracy. W kolejnym etapie przeprowadzany jest proces filtracji kompleksu receptor-ligand, który osadza się na membranie filtracyjnej, od wolnego radioligandu, który nie ulega wiązaniu z filtrem. Metoda ta zakłada, że mierzone scyntylacje pochodzą od kompleksu radioligand-receptor i pozwalają na obliczenie parametrów wiązania: stałej dysocjacji K_d oraz gęstości receptorów B_{max} .

Wiązanie radioligandu do interesującego receptora powinno być nasycone z uwagi na obecność skończonej liczby receptorów w materiale biologicznym. Należy jednak uwzględnić obecność innych niespecyficznych miejsc wiązania (inne receptory, miejsca niereceptorowe takie jak nośniki białkowe, enzymy, elementy komórkowe z odpowiednimi układami chemicznymi czy nawet elementy niekomórkowe, jak filtry czy probówki) (Vauquelin i von Mentzer 2007).

Analiza saturacyjna pozwala na oznaczenie gęstości receptorów (B_{max}) lub porównanie ilości różnych receptorów w tkance, co pozwala na monitorowanie zmian fizjologicznych, efektów wywołanych terapią lub stanów patofizjologicznych. W doświadczeniach tego typu stała objętość zawiesiny błonowej jest inkubowana ze zwiększającą się ilością radioligandu, w rezultacie otrzymywana jest krzywa saturacyjna, czyli zależność wiązania całkowitego w funkcji stężenia użytego radioligandu. Uzyskane wyniki podlegają analizie w oparciu o różne modele. W najprostszym przypadku oddziaływanie radioligandu (L) z receptorem (R) można przedstawić jako prostą reakcję odwracalną:



W stanie równowagi stała dysocjacji K_d [nM] opisana jest zależnością (Vauquelin i von Mentzer 2007):

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = [L] \times \frac{[R]}{[L - R]}$$

Równanie 17

gdzie: k_1 – stała szybkości wiązania, k_{-1} – stała szybkości dysocjacji, $[L]$ – ilość wolnego liganda, $[R - L]$ – ilość frakcji związanej receptor-ligand.

Związek pomiędzy ilością związanych receptorów (B), a stężeniem radioligandu (c_{RL}) jest opisany następującą hiperbolą:

$$B = \frac{B_{max}}{1 + \frac{K_d}{c_{RL}}}$$

Równanie 18

gdzie: B_{max} – całkowita liczba receptorów [pM/mg białka], K_d – stała dysocjacji [nM], c_{RL} – stężenie radioligandu.

Z zależności powyższej widać, iż początkowo następuje prawie liniowy wzrost B ze zwiększającym się stężeniem radioligandu, aby następnie ulec wysyceniu. Wartość graniczną wyznacza parametr B_{max} . Warto zauważyć iż wartość B_{max} zostanie osiągnięta dla nieskończonego stężenia liganda, a zatem w praktyce możemy jedynie zbliżyć się do niej, ale nigdy nie osiągniemy. Stała K_d odpowiada takiemu stężeniu radioligandu, przy którym połowa receptorów ulega związaniu, jest zatem miarą powinowactwa badanego związku do receptora, przy czym dla wysokich wartości K_d powinowactwo jest niskie i na odwrót.

Metoda wiązania radioligandu dostarcza bezpośrednich informacji o powinowactwie związków chemicznych (agonistów i antagonistów) do receptorów. Pozwala również na detekcję współwystępowania różnych typów receptorów w danej tkance, a w pewnych przypadkach także na rozróżnienie między agonistą i antagonistą. Z uwagi na prostotę i dokładność, jest ona bardzo użytecznym narzędziem w identyfikacji, klasyfikacji i odkrywaniu nowych receptorów, jak również w badaniach powinowactwa i specyficzności nowych substancji o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

(+) T7

(-) T7

pcDNA3.1 (+/-)
5428/527 bp

P CMV

BGH pA

t1 ori

SV40 ori

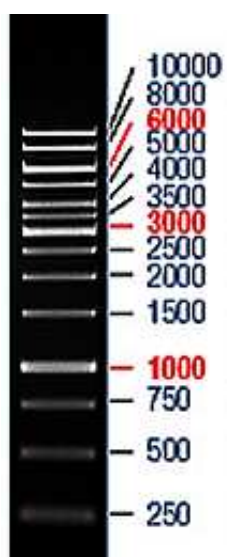
NeoR/TK/can

SV40 pA

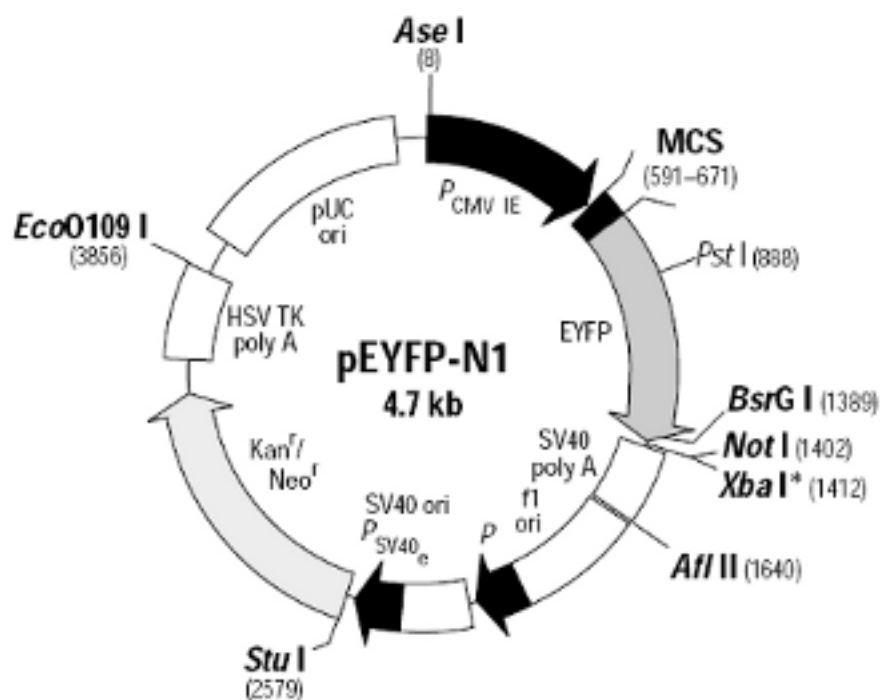
pUC ori

Ampicillin

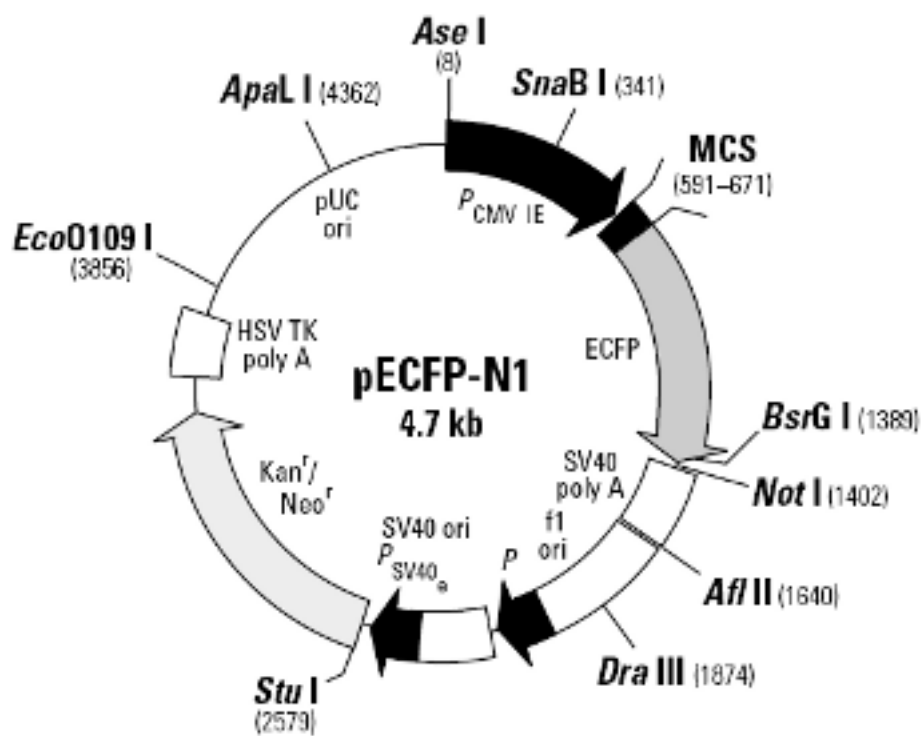
GeneRuler 1kb DNA Ladder firmy Fermentas



Mapa plazmidu pEYFP-N1



Mapa plazmidu pECFP-N1



APPENDIX V

Tabela 3. Kod genetyczny (w oparciu o Berg i wsp. 2007).

	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC	UCC	UAC	UGC	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG	UCG	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU	CCU	CAU His	CGU	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC	ACC	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA Val	GCA	GAA Glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

Jednoliterowe skróty aminokwasów

Ala (A) – alanina
 Cys (C) – cysteine
 Asp (D) – kwas asparaginowy
 Glu (E) – kwas glutaminowy
 Phe (F) – fenyloalanina
 Gly (G) – glicyna
 His (H) – histydyna

Ile (I) – izoleucyna
 Lys (K) – lizyna
 Leu (L) – leucyna
 Met (M) – metionina
 Asn (N) – asparagina
 Pro (P) – prolina
 Gln (Q) – glutamina

Arg (R) – arginina
 Ser (S) – seryna
 Val (V) – walina
 Trp (W) - tryptofan
 Thr (T) – treonina
 Tyr (Y) – tyrozyna

BIBLIOGRAFIA

AbdAlla S, Zaki E, Lothar H i Quitterer U (1999) Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J Biol Chem* **274**, 26079-26084.

Agnati LF, Ferré S, Genedani S, Leo G, Guidolin D, Filaferro M, Carriba P, Casadó V, Lluís C, Franco R, Woods AS i Fuxe K (2006) Allosteric modulation of dopamine D2 receptors by homocysteine. *J Proteome Res* **5**, 3077-3083.

Agnati LF, Tarakanov AO, Ferre S, Fuxe K i Guidolin D (2005) Receptor-receptor interactions, receptor mosaics, and basic principles of molecular network organization: possible implications for drug development. *J Mol Neurosci* **26**, 193-208.

Aizman O, Brismar H, Uhlén P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P i Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* **3**, 226-230.

Ameloot M i Hendrickx H (1983) Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves. *Biophys J* **44**, 27-38.

Armstrong D i Strange PG (2001) Dopamine D2 receptor dimer formation: evidence from ligand binding. *J Biol Chem* **276**, 22621-22629.

Arun KH, Kaul CL i Ramarao P (2005) Green fluorescent proteins in receptor research: an emerging tool for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* **51**, 1-23.

Bae JH, Rubini M, Jung G, Wiegand G, Seifert MH, Azim MK, Kim JS, Zumbusch A, Holak TA, Moroder L, Huber R i Budisa N (2003) Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent proteins. *J Mol Biol* **328**, 1071-1081.

Ballesteros J i Palczewski K (2001) G protein-coupled receptor drug discovery: implications from the crystal structure of rhodopsin. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**, 561-574.

Bastiaens P i Squire A (1999) Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol* **9**, 48-52.

Bastiaens PI i Jovin TM (1996) Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8407-8412.

Becker W, Bergmann A, Hink MA, Koenig K, Benndorf K i Biskup C (2004) Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* **63**, 58-66.

Berg JM, Tymoczko JL i Stryer L (2007) Biochemistry – 6th Edition. WH Freeman and Company, New York, USA

Bernas T, Zarebski M, Cook PR i Dobrucki JW (2004) Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: Role of anomia and Proton flux. *J Microsc* **215**, 281-296

Berney C i Danuser G (2003) FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophys J* **84**, 3992-4010.

Biener-Ramanujan E, Ramanujan VK, Herman B i Gertler A (2006) Spatiotemporal kinetics of growth hormone receptor signaling in single cells using FRET microscopy. *Growth Hormone & IGF Res* **16**, 247-257.

Boens N, Qin W, Basarić N, Hofkens J i wsp. (2007) Fluorescence lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Anal Chem* **79**, 2137-2149.

- Borst JW, Hink MA, van Hock A i Visser AJ (2005) Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins. *J Fluoresc* **15**, 153-160.
- Bouvier M (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274-286.
- Brochon JC (1994) Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. *Methods Enzymol* **240**, 262-311.
- Bulenger S, Marullo S i Bouvier M (2005) Emerging role of homo-and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 131-137.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR i Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-781.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferré S, Lluís C, Bouvier M i Franco R (2003) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* **278**, 46741-46749.
- Carillo JJ, Pediani J i Milligan G (2003) Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. *J Biol Chem* **278**, 42578-42587.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW i Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chamary JV i Hurst LD (2005) Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome Biol* **6**, R75.
- Chamary JV, Parmley JL i Hurst LD (2006) Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* **7**, 98-108.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK i Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265.
- Chergui K, Svenningsson P i Greengard P (2005) Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* **25**, 6601-6609.
- Chi, Michelene TH, Glaser R, Farr MJ, eds. (1988) *The Nature of Expertise*. Lawrence Erlbaum Associates. Hillsdale, N.J.
- Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, Goldberg SR, Bader M, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C i wsp. (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem* **76**, 5354-5363.
- Clegg RM (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* **211**, 353-388.
- Clegg RM, Holub O i Gohlke C (2003) Fluorescence lifetime-resolved imaging: measuring lifetimes in an image. *Methods Enzymol* **360**, 509-542.
- Cohen P (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* **268**, 5001-5010.
- Cooper DN i Krawczak M (1989) Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet* **83**, 181-188.
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G i Lockett S (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* **86**, 3993-4003.
- Cox BA, Henningsen RA, Spanoyannis A, Neve RL i Neve KA (1992) Contributions of conserved serine residues to the interactions of ligands with dopamine D2 receptors. *J Neurochem* **59**, 627-635.

- Cravchik A, Sibley DR i Gejman PV (1996) Functional analysis of the human D2 dopamine receptor missense variants. *J Biol Chem* **271**, 26013-26017.
- Cravchik A, Sibley DR i Gejman PV (1999) Analysis of neuroleptic binding affinities and potencies for the different human D2 dopamine receptor missense variants. *Pharmacogenetics* **9**, 17-23.
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Sáez K, Henríquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J i Moon RT (2007) Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 9434-9439.
- Devi LA (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 532-537.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ i Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.
- Dobrucki JW (2004) Confocal microscopy: quantitative analytical capabilities. *Methods Cell Biol* **75**, 41-72.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J i Gejman PV (2003) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* **12**, 205-216.
- Duncan R (2006) Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interactions inside cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 679-682.
- Duncan R, Bergmann A, Cousin MA, Apps DK i Shipston MJ (2004) Multidimensional time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells. *J Microsc* **215**, 1-12.
- Dziedzicka-Wasylewska M i Zawilska JB (2004) Receptory Dopaminowe. Rozdział 16 w „Receptory i Mechanizmy Przekazywania Sygnału” pod red. Jerzego Z. Nowaka i Jolanty B. Zawilskiej. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.
- Dziedzicka-Wasylewska M, Faron-Górecka A, Andrecka J, Polit A, Kuśmider M i Wasylewski Z (2006) Fluorescence studies reveal heterodimerization of dopamine D1 and D2 receptors in the plasma membrane. *Biochemistry* **45**, 8751-8759.
- Elangovan M., Wallrabe H, Chen Y, Day RN, Barroso M i Periasamy A (2003) Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **29**, 58-73.
- Elslinger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K i Remington SJ (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**, 5296-5301.
- Epstein RJ, Lin K i Tan TW (2000) A functional significance for codon third bases. *Gene* **245**, 291-298.
- Ericsson KA i Smith J, eds., (1991) Toward a General Theory of Expertise: Prospects and Limits. Cambridge University Press. New York:
- Evans WE i Johnson JA (2001) Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**, 9-39.
- Faron-Górecka A (2009) Badania in-vitro roli hetero-dimeryzacji receptorów dopaminowych D1 i D2 w mechanizmie działania leków przeciwpsychotycznych. Praca doktorska. Instytut Farmakologii Polska Akademia Nauk, Kraków.
- Faron-Górecka A, Górecki A, Kuśmider M, Wasylewski Z i Dziedzicka-Wasylewska M (2008) The role of D1-D2 receptor hetero-dimerization in the mechanism of action of clozapine. *Eur Neuropsychopharmacol* **18**, 682-691.
- Ferre S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C i Franco R (2007) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* **30**, 440-446.

- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR i wsp. (2008) Wellcome Trust Case Control Consortium. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* **40**, 1056-1058.
- Fiorentini C, Gardoni F, Spano P, Di Luca M i Missale C (2003) Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **278**, 20196-20202.
- Fotiadis D, Jastrzebska B, Philippsen A, Müller DJ, Palczewski K i Engel A (2006) Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 252-259.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A i Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**, 127-128.
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M i Hegemann P (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**, 869-881.
- Fung KL i Gottesman MM (2009) A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 860-871.
- Fuxe K, Canals M, Torvinen M, Marcellino D, Terasmaa A, Genedani S, Leo G, Guidolin D, Diaz-Cabiale Z, Rivera A, Lundström L, Langel U, Narvaez J, Tanganelli S, Lluís C, Ferre S, Woods A, Franco R i Agnati LF (2007) Intramembrane receptor-receptor interactions: a novel principle in molecular medicine. *J Neural Transm* **114**, 49-75.
- Fuxe K, Marcellino D, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Filip M, Gago B, Roberts DC, Langel U, Genedani S, Ferraro L, de la Calle A, Narvaez J, Tanganelli S, Woods A i Agnati LF (2008) Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on Neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev* **58**, 415-452.
- Gadella TW i Jovin TM (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy - a stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol* **129**, 1543-1558.
- Garini Y, Vermolen BJ i Young IT (2005) From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 3-12.
- Garnier S, Kim S, Shafer AM, Ratnala VR, Fung JJ, Zare RN i Kobilka B (2007) Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem* **282**, 12895-13905.
- Gazi L, López-Giménez JF, Rüdiger MP i Strange PG (2003) Constitutive oligomerization of human D2 dopamine receptors expressed in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) and in HEK293 cells. Analysis using co-immunoprecipitation and time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Eur J Biochem* **270**, 3928-3938.
- Genedani S, Guidolin D, Leo G, Filaferrero M, Torvinen M, Woods AS, Fuxe K, Ferre S i Agnati LF (2005) Computer-assisted image analysis of caveolin-1 involvement in the internalization process of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterodimers. *J Mol Neurosci* **26**, 177-184.
- George SR i O'Dowd BF (2007) A novel dopamine receptor signaling unit in brain: heterooligomers of D1 and D2 dopamine receptors. *Scientific World Journal* **7**, 58-63.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G i O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors: Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* **275**, 26128-26135.
- George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY i O'Dowd BF (1998) A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* **273**, 30244-30248.
- Glatt SJ i Jönsson EG (2006) The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141B**, 149-154.

- Gnad F, Ren S, Cox J, Olsen JV, Macek B, Oroshi M i Mann M (2007) PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol* **8**, R250.
- González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ i Sealfon SC (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93-97.
- Gouldson PR, Higgs C, Smith RE, Dean MK, Gkoutos GV i Reynolds CA (2000) Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* **23**, 60-77.
- Grailhe R, Merola F, Ridard J, Couvignou S, Le Poupon C, Changeux JP i Laguitton-Pasquier H (2006) Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the cyan fluorescent protein. *Chemphyschem* **7**, 1442-1454.
- Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stoffko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC i Civelli O (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9762-9766.
- Grandy DK, Zhou QY, Allen L, Litt R, Magenis RE, Civelli O i Litt M (1990) A human D1 dopamine receptor gene is located on chromosome 5 at q35.1 and identifies an EcoRI RFLP. *Am J Hum Genet* **47**, 828-834.
- Gratton E, Breusegem S, Sutin J, Ruan Q i Barry N (2003) Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods. *J Biomed Opt* **8**, 381-390.
- Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA i Tsien RY (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* **276**, 29188-29194.
- Griffin AB, Adams SR i Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272.
- Grinvald A i Steinberg IZ (1974) On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal Biochem* **59**, 583-598.
- Grymek K, Gaška M, Łukasiewicz S, Górecki A, Dziedzicka-Wasylewska M (2008) Fluorescence studies of G-protein coupled receptors oligomerization. *Postępy Biochem* **54**, 431-437.
- Guo W, Shi L i Javitch JA (2003) The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J Biol Chem* **278**, 4385-4388.
- Gurevich VV i Gurevich EV (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 105-111.
- Gurevich VV i Gurevich EV (2008) GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci* **31**, 74-81.
- Habuchi S, Cotlet M, Hofkens J, Dirix G, Michiels J, Vanderleyden J, Subramaniam V i De Schryver FC (2002) Resonance energy transfer in a calcium concentration-dependentameleon protein. *Biophys J* **83**, 3499-3506.
- Haselden JN i Nicholls AW (2006) Personalized medicine progresses. *Nat Med* **12**, 510-511.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C i Bouvier M (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**, 16384-16392.
- Heim R i Tsien RY (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**, 178-182.
- Hernanz-Falcón P, Rodríguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gomez L, Valencia A, Martínez-A C i wsp. (2004) Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol* **5**, 216-223.

- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S i Fuxe K (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* **277**, 18091-18097.
- Hoffman C, Gaietta G, Bünemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH i Lohse MJ (2005) A FAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* **2**, 171-176.
- Hoppe A, Christensen K i Swanson JA (2002) Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells. *Biophys J* **83**, 3652-3664.
- Iida K i Akashi H (2000) A test of translational selection at 'silent' sites in the human genome: base composition comparisons in alternatively spliced genes. *Gene* **261**, 93-105.
- Itokawa M, Arinami T, Futamura N, Hamaguchi H i Toru M (1993) A structural polymorphism of human dopamine D2 receptor, D2(Ser311-->Cys). *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 1369-1375.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP i Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-1217.
- Jaakola VP, Prilusky J, Sussman JL i Goldman A (2005) G protein-coupled receptors show unusual patterns of intrinsic unfolding. *Protein Eng Des Sel* **18**, 103-110.
- Jaber M, Robinson SW, Missale C i Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1504-1519.
- Jackson A, Iwaszow RM i Tiberi M (2000) Distinct function of the cytoplasmic tail in human D1-like receptor ligand binding and coupling. *FEBS Letters* **470**, 183-188.
- Jackson SN, Wang HY i Woods AS (2005) Study of the fragmentation patterns of the phosphate-arginine noncovalent bond. *J Proteome Res* **4**, 2360-2363.
- Jackson SN, Wang HYJ, Yergey A i Woods AS (2006) Phosphate stabilization of intermolecular interactions. *J Proteome Res* **5**, 122-126.
- Janetopoulos C, Jin T i Devreotes P (2001) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* **291**, 2408-2411.
- Jayaraman S, Haggis P, Wachter RM, Remington SJ i Verkman AS (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* **275**, 6047-6050.
- Johnston CA i Siderovski DP (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol* **72**, 219-230.
- Jones KW i Peroutka SJ (1998) Step-wise analysis of polymorphisms in the human dopamine D2 receptor gene. *Neuropharmacology* **37**, 803-814.
- Jönsson EG, Sillén A, Vares M, Ekholm B, Terenius L i Sedvall GC (2003) Dopamine D2 receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **119B**, 28-34.
- Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H i Miyawaki A (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J* **381**, 307-312.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R i wsp. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683-687.
- Kawanishi Y, Tachikawa H i Suzuki T (2000) Pharmacogenomics and schizophrenia. *Eur J Pharmacol* **410**, 227-241.
- Kawski A (1992) Fotoluminescencja roztworów. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

- Kebabian JW i Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**, 93-96.
- Kenworthy AK (2001) Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289-296.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV i Gottesman MM (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* **315**, 525-528.
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 794-807.
- Komar AA (2007) Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* **315**, 466-467.
- Krauss G (2008) Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 4th edition. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.
- Kroeger KM, Hanyaloglu AC, Seeber RM, Miles LE i Eidne KA (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **276**, 12736-12743.
- Kroeger KM, Pflieger KD i Eidne KA (2004) G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* **24**, 254-278.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto, M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H i Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971-977.
- Kusumi A, Ike H, Nakada C, Murase K i Fujiwara T (2005) Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Semin Immunol* **17**, 3-21.
- Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd edition, Springer Science+Business Media LLC, New York, USA.
- Lakowicz JR, Szmacinski H, Nowaczyk K, Lederer WJ, Kirby MS i Johnson ML (1994) Fluorescence lifetime imaging of intracellular calcium in COS cells using Quin-2. *Cell Calcium* **15**, 7-27.
- Laws SM, Hone E, Gandy S i Martins RN (2003) Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem* **84**, 1215-1236.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM i Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**, 219-230.
- Lee SP, O'Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T i George SR (2003) D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* **42**, 11023-11031.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lança AJ, O'Dowd BF i George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**, 35671-35678.
- Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB i Stanley EF (2004) A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* **24**, 4070-4081.
- Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K i Engel A (2003) Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem* **278**, 21655-21662.
- Lilly L, Fraser CM, Jung CY, Seeman P i Venter JC (1983) Molecular size of the canine and human brain D2 dopamine receptor as determined by radiation inactivation. *Mol Pharmacol* **24**, 10-4.

- Limbird LE i Lefkowitz RJ (1976) Adenylate cyclase-coupled beta adrenergic receptors effect of membrane lipid-perturbing agents on receptor binding and enzyme stimulation by catecholamines. *Mol Pharmacol* **12**, 559-567.
- Lippincott-Schwartz J i Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**, 87-91.
- Litt M, al-Dhalimy M, Zhou Q, Grandy D i Civelli O (1991) A TaqI RFLP at the DRD1 locus. *Nucleic Acids Res* **19**, 3161.
- Liu IS, George SR i Seeman P (2000) The human dopamine D2(Longer) receptor has a high-affinity state and inhibits adenyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* **77**, 281-284.
- Liu Q, Sobell JL, Heston LL i Sommer SS (1995) Screening the dopamine D1 receptor gene in 131 schizophrenics and eight alcoholics: identification of polymorphisms but lack of functionally significant sequence changes. *Am J Med Genet* **60**, 165-171.
- Lodowski DT, Angel TE i Palczewski K (2009) Comparative analysis of GPCR crystal structures. *Photochem Photobiol* **85**, 425-430.
- Lopez RJ, Gonzalez F i Moreno F (1992) Application of sine trans form metod to experiments of single-photon decay spectroscopy: singleexponential decay signals. *Rev Sci Instrum* **63**, 3268-3273.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL i Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Łukasiewicz S (2008) Fluorescencyjne badania dimeryzacji w obrębie receptorów dopaminowych i serotoninowych w układzie modelowym *in-vitro*. Praca doktorska. Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Kraków.
- Łukasiewicz S, Błasiak E, Faron-Górecka A, Polit A, Tworzydło M, Górecki A, Wasylewski Z i Dziedzicka-Wasylewska M (2007) Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A2A and serotonin 5HT1A receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol Rep* **59**, 379-392.
- Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Dobrucki J, Polit A & Dziedzicka-Wasylewska M (2009) Studies on the role of the receptor protein motifs possibly involved in electrostatic interactions on the dopamine D1 and D2 receptor oligomerization. *FEBS J* **276**, 760-775.
- Maggio R, Vogel Z i Wess J (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3103-3107.
- Majoul I, Yiwei J i Duden R (2006) Practical Fluorescence Resonance Energy Transfer Or Molecular Nanobioscopy of Living Cells. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy. Pawley JB, 3rd edition. Springer Science+Business Media, LLC, New York
- Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R i Aten JA (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* **103**, 857-862.
- Manders EM, Visser AE, Koppen A, de Leeuw WC, van Liere R, Brakenhoff GJ i van Driel R (2003) Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus. *Chromosome Res* **11**, 537-547.
- Mansour A, Meng F, Meador-Woodruff JH, Tay-Lor LP, Civelli O i Akil H (1992) Site-directed mutagenesis of the human dopamine D2 receptor. *Eur J Pharmacol* **227**, 205-214.
- Marinissen MJ i Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 368-376.
- Marullo S i Bouvier M (2007) Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 362-365.

- Mattera R, Pitts BJ, Entman ML i Birnbaumer L (1985) Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J Biol Chem* **260**, 7410-7421.
- Milligan G (2004) Applications of bioluminescence – and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* **21**, 397-405.
- Milligan G (2007) G protein-coupled receptor dimerisation:molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 825-835.
- Milligan G (2009) A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br J Pharmacol* **153**, 216-229.
- Millington M, Grindlay GJ, Altenbach K, Neely RK, Kolch W, Bencina M, Read ND, Jones AC, Dryden DT i Magennis SW (2007) High-precision FLIM-FRET in fixed and living cells reveals heterogeneity in a simple CFP-YFP fusion protein. *Biophys Chem* **127**, 155-164.
- Minneman KP (2007) Heterodimerization and Surface Localization of G Protein Coupled Receptors. *Biochem Pharmacol* **73**, 1043-1050.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M i Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**, 189-225.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R i Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2135-2140.
- Mobarec JC i Filizola M (2008) Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. *Expert Opin Drug Discov* **3**, 343-355.
- Moore CA, Milano SK i Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 451-482.
- Mustafi D i Palczewski K (2009) Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol Pharmacol* **75**, 1-12.
- Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W i Diatchenko L (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* **314**, 1930-1933.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K i Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.
- Nakamura Y, Gojobori T i Ikemura T (2000) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 292.
- Negre D, Cenatiempo Y i Cozzzone AJ (1988) High fidelity of guanine translation in a plasmid-directed in vitro system. *Biochimie* **70**, 1715-1718.
- Nemoto W i Toh H (2004) Prediction of interfaces for oligomerizations of G-protein coupled receptors. *Proteins* **58**, 644-660.
- Neve KA, Cox BA, Henningsen AR, Spanoyannis A i Neve RL (1991) Pivotal role for aspartate-80 in the regulation of dopamine D2 receptor affinity for drugs and inhibition of adenylylcyclase. *Mol Pharmacol* **39**, 733-739.
- Ng T, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, Harris W, Barnes D, Schmidt S, Mellor H, Bastiaens PI i Parker PJ (1999) Imaging protein kinase C alpha activation in cells. *Science* **283**, 2085-2089.
- Novikov EG (1998) Reference reconvolution analysis by chase plane metod. *Rev Sci Instrum* **69**, 2603-2610.
- O'Dowd BF (1993) Structure of dopamine receptors. *J Neurochem* **60**, 804-816.
- O'Dowd BF, Ji X, Aljaniaram M, Rajaram RD, Kong MM, Rashid A, Nguyen T i George SR (2005) Dopamine receptor oligomerization visualized in living cells. *J Biol Chem* **280**, 37225-37235.

- O'Donovan MC, Craddock NJ i Owen MJ (2009) Genetics of psychosis; insights from views across the genome. *Hum Genet* **126**, 3-12.
- Ohara K, Ulpian C, Seeman P, Sunahara RK, Van Tol HH i Niznik HB (1993) Schizophrenia: dopamine D1 receptor sequence is normal, but has DNA polymorphisms. *Neuropsychopharmacology* **8**, 131-5.
- Oldham WM i Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 60-71.
- Ott S, Costa T, Wüster M, Hietel B i Herz A (1986) Target size analysis of opioid receptors. No difference between receptor types, but discrimination between two receptor states. *Eur J Biochem* **155**, 621-630.
- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C i wsp. (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* **21**, 1189-1202.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M i Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Parmley JL i Hurst LD (2007) How do synonymous mutations affect fitness? *Bioessays* **29**, 515-519.
- Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW i Makoff AJ (2004) The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry* **56**, 406-410.
- Patterson GH, Day RN i Piston DW (2001) Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**, 837-838.
- Patterson GH, Piston DW i Barisas BG (2000) Förster distances between green fluorescent protein pairs. *Anal Biochem* **284**, 438-440.
- Pawley JB (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3rd Edition. Springer Science+Business Media LLC, New York, USA.
- Pearson RB i Kemp BE (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* **200**, 62-81.
- Pflegler KD i Eidne KA (2005) Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* **385**, 625-637.
- Pflegler KD, Dalrymple MB, Dromey JR i Eidne KA (2007) Monitoring interactions between G-protein-coupled receptors and beta-arrestins. *Biochem Soc Trans* **35**, 764-766.
- Pin JP, Neubig R, Bouvier M, Devi L, Filizola M, Javitch JA, Lohse MJ, Milligan G, Palczewski K, Parmentier M i Spedding M (2007) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* **59**, 5-13.
- Piston DW i Kremers GJ (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* **32**, 407-414.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG i Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Prou D, Gu WJ, Le Crom S, Vincent JD, Salamero J i Vernier P (2001) Intracellular retention of the two isoforms of the D(2) dopamine receptor promotes endoplasmic reticulum disruption. *J Cell Sci* **114**, 3517-3527.
- Rashid AJ, O'Dowd BF, Verma V i George SR (2007) Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 551-555.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weiss WI i Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387.
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* **405**, 847-856.

- Rizzo MA, Springer G, Segawa K, Zipfel WR i Piston DW (2006) Optimization of pairings and detection conditions for measurement of FRET between cyan and yellow fluorescent proteins. *Microsc Microanal* **12**, 238-254.
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B i Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**, 445-449.
- Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP i O'Malley KL (2001) Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* **59**, 46-53.
- Romano C, Yang WL i O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* **271**, 28612-28616.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC i Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-1273.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF i Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL i wsp. (International SNP Map Working Group) (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**, 928-933.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T i Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**, 4625-4636.
- Sambrook J, Fritsch EF i Maniatis T (1985) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- Sanders R, Draaijer A, Gerritsen HC, Houpt PM, Levine YK (1995) Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy. *Anal Biochem* **227**, 302-308.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV i Gottesman MM (2007a) Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res* **67**, 9609-9612.
- Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV i Gottesman MM (2007b) The sounds of silence: synonymous mutations affect function. *Pharmacogenomics* **8**, 527-532.
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Liu R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R (2001) D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* **276**, 30308-30314.
- Schöneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Römpler H i Sangkuhl K (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* **104**, 173-206.
- Schug KA i Lindner W (2005) Stereoselective discrimination and quantification of arginine and N-blocked arginine enantiomers by formation and dissociation of calcium-mediated diastereomeric trimer complexes with a chiral reference compound using electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **16**, 825-834.
- Seeman P (2009) Glutamate and dopamine components in schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* **34**, 143-149.
- Seeman P, Bzowej NH, Guan HC, Bergeron C, Reynolds GP, Bird ED, Riederer P, Jellinger K i Tourtellotte WW (1987) Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. *Neuropsychopharmacology* **1**, 5-15.
- Seeman P, Guan HC, Civelli O, Van Tol HH, Sunahara RK i Niznik HB (1992) The cloned dopamine D2 receptor reveals different densities for dopamine receptor antagonist ligands. Implications for human brain positron emission tomography. *Eur J Pharmacol* **227**, 139-146.

- Seifert MH, Ksiazek D, Azim MK, Smialowski P, Budisa N i Holak TA (2002) Slow exchange in the chromophore of a green fluorescent protein variant. *J Am Chem Soc* **124**, 7932-7942.
- Selvin PR (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* **7**, 730-734.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE i Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572.
- Shaner NC, Steinbach PA i Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-909.
- Shen LX, Basilion JP i Stanton VP Jr (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7871-7876.
- Shimomura O (1995) A short story of Aequorin. *Biol Bull* **189**, 1-5.
- Shimomura O, Johnson F i Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Small EW (1992) Method of moments and treatment of nonrandom error. *Methods Enzymol* **210**, 237-279.
- So CH, Varghese G, Curley KJ, Kong MMC, Alijanian M, Ji X, Nguyen T, O'Dowd BF i George SR (2005) D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol* **68**, 568-578.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Barthenet ML i Schwartz JC (1994) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146-151.
- Song L, Hennink E J, Young I T i Tanke HJ (1995) Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **68**, 2588-2600.
- Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**, 819-846.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van To HHM i Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* **350**, 614-619.
- Terrillon S i Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**, 30-34.
- Tobin AB (2002) Are we beta-ARKing up the wrong tree? Casein kinase 1 alpha provides an additional pathway for GPCR phosphorylation. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 337-343.
- Tomic M, Seeman P, George SR i O'Dowd BF (1993) Dopamine D1 receptor mutagenesis: role of amino acids in agonist and antagonist binding. *Biochem Biophys Res Commun* **191**, 1020-1027.
- Topiol S i Sabio M (2009) X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem Pharmacol* **78**, 11-20.
- Torvinen M, Torri C, Tombesi A, Marcellino D, Watson S, Lluís C, Franco R, Fuxe K i Agnati LF (2005) Trafficking of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *J Mol Neurosci* **25**, 191-200.
- Tramier M, Gautier I, Piolot T, Ravalet S, Kemnitz K, Coppey J, Durieux C, Mignotte V i Coppey-Moisán M (2002) Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* **83**, 3570-3577.
- Tramier M, Sanvitto, Emiliani V, Durieux C i Coppey-Moisán M (2005) FRET and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. W: Goldman RD i Spector DL Live Cell Imaging. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tramier M, Zahid M, Mevel JC, Masse MJ i Coppey-Moisán M (2006) Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc Res Tech* **69**, 933-939.

- Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM i Nussinov R (2008) Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol* **383**, 281-291.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **76**, 509-538.
- Undie AS, Weinstock J, Sarau HM i Friedman E (1994) Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem* **62**, 2045-2048.
- Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB i Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**, 610-614.
- Varenne S, Baty D, Verheij H, Shire D i Lazdunski C (1989) The maximum rate of Gene expression is dependent on the downstream context of unfavourable codons. *Biochimie* **71**, 1221-1229.
- Vauquelin G i von Mentzer B (2007) G Protein-Coupled Receptors: Molecular Pharmacology. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Chichester, England.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM i wsp. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Verveer PJ, Squire A i Bastiaens PI (2000) Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data. *Biophys J* **78**, 2127-2137.
- Vickery RG i von Zastrow M (1999) Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* **144**, 31-43.
- Wang HY, Taggi AE, Meinwald J, Wise RA i Woods AS (2005) Study of the interaction of chlorisondamine and chlorisondamine analogues with an epitope of the alpha-2 neuronal acetylcholine nicotinic receptor subunit. *J Proteome* **4**, 532-539.
- Wen JD, Lancaster L, Hodges C, Zeri AC, Yoshimura SH, Noller HF, Bustamante C i Tinoco I (2008) Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature* **452**, 598-603.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM i Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679-682.
- Wong AHC, Buckle CE i Van Tol HHM (2000) Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol* **410**, 183-203.
- Woods AS i Ferre S (2005) Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction. *J Proteome Res* **4**, 1397-1402.
- Woods AS, Ciruela F, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C, Franco R i Ferre S (2005) Role of electrostatic interaction in receptor-receptor heteromerization. *J Mol Neurosci* **26**, 125-132.
- Woods AS, Fuhrer K, Gonin M, Egan T, Ugarov M, Gillig KJ i Schultz JA (2003) Angiotensin II-acetylcholine noncovalent complexes analyzed with MALDI-ion mobility-TOF MS. *J Biomol Tech* **14**, 1-8.
- Wouters FS, Bastiaens PI, Wirtz KW i Jovin TM (1998) FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J* **17**, 7179-7189.
- Wurch T, Matsumoto A i Pauwels PJ (2001) Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins. *FEBS Lett* **507**, 109-113.
- Xie T i Ding D (1998) The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Lett* **434**, 93-96.
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC i Tsien RY (2002) Partitioning of lipidmodified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916.

Zawilska JB 2004 Receptory – Uwagi Wstępne, Klasyfikacja. Rozdział 13 w „Receptory i Mechanizmy Przekazywania Sygnału” pod red. Jerzego Z. Nowaka i Jolanty B. Zawilskiej. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.

Zeng FY i Wess JJ (1999) Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J Biol Chem* **274**, 19487-19497.

Zeng W, Seward HE, Málnási-Csizmadia A, Wakelin S, Woolley RJ, Cheema GS, Basran J, Patel TR, Rowe AJ i Bagshaw CR (2006) Resonance energy transfer between green fluorescent protein variants: complexities revealed with myosin fusion proteins. *Biochemistry* **45**, 10482-10491.

Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M (2001) The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* **276**, 5316-5322.

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

Inne:

<http://www.chemistry.ucsc.edu>

<http://www.chemicalbook.com/StructureFile>

<http://www.cnsforum.org>

<http://www.gcu.schoedl.de>

<http://www.kazusa.or.jp/codon>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.nobelprize.org>

<http://www.rcsb.org/pdb>

<http://www.tocris.com>

DAS 6 Fluorescence Decay Analysis Software: User Manual IBH 1998-2001

Data Station Hub User Guide IBH Jobin Yvon 2000 – 2004