

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Pawła Mystka wykonanej w Zakładzie Biochemii  
Fizycznej WBBiB pod opieką prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej  
oraz dr Agnieszki Polit

### **Przekazywanie sygnałów w układzie dopaminergicznym – lokalizacja i oddziaływanie receptora dopaminowego D<sub>1</sub> z białkami G.**

Receptory związane z białkami G, GPCRs (ang. *G-protein coupled receptors*), reprezentują najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną rodzinę receptorów transbłonowych oraz stanowią cel działania blisko 50% dostępnych na rynku środków farmaceutycznych. Zidentyfikowano ponad 800 ludzkich genów kodujących receptory dla różnego rodzaju zewnątrzkomórkowych ligandów: jonów, odorantów organicznych, amin, peptydów, białek, lipidów, nukleotydów, a także fotonów. Związanie agonisty do receptora prowadzi do utworzenia aktywnego kompleksu receptor-białko G. Heterotrimeryczne białka G zbudowane są z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , wiążąc nukleotyd guaninowy pełnią rolę molekularnych przełączników, które w odpowiedzi na aktywację receptora na powierzchni komórki uruchamiają wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną. Funkcja ta realizowana jest przez dimer  $G\beta\gamma$  oraz podjednostkę  $G\alpha$ , która oscyluje pomiędzy konformacją spoczynkową, odpowiedzialną za oddziaływanie z aktywnym receptorem, a konformacją sygnalizacyjną, zdolną do modulowania aktywności białek efektorowych. Jako pierwszorzędkowy pośrednik między receptorem i efektor, heterotrimeryczne białka G odgrywają istotną rolę w determinowaniu specyficzności i przejściowej charakterystyki odpowiedzi komórkowej na różnego rodzaju zewnątrzkomórkowe czynniki stymulujące.

Pomimo bardzo intensywnych badań prowadzonych przez ostatnie trzy dekady w dalszym ciągu nie udało się odpowiedzieć na kilka bardzo ważnych pytań dotyczących działania układu przekazywania sygnałów. Wciąż jednoznacznie nie wyjaśniono, czy kompleks receptor-białko G jest trwały w stanie spoczynkowym i przechodzi w stan aktywny natychmiast po związaniu przez receptor liganda (*precoupling model*), czy też tworzy się po ekspozycji agonisty, w którym to przypadku oddziaływanie pomiędzy receptorem a białkiem G jest ograniczane przez dyfuzję (*collision coupling model*). Obecnie badacze mają coraz więcej przesłanek za tym, że środowisko lipidowe i jego skład mogą pełnić istotną rolę w przekazywaniu sygnałów. Znane są doniesienia, w których udowodniono lokalizację receptorów z rodziny GPCR w domenach lipidowych o zróżnicowanym składzie. W takich strukturach jak tratwy lipidowe czy kaweole odnajdywano również podjednostki  $G\alpha$  białek G i ich białka efektorowe.

Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy o lokalizacji i oddziaływaniu w obrębie domen lipidowych receptora dopaminowego D1 z różnymi podjednostkami  $G\alpha$  białek G w modelowych komórkach eukariotycznych. Do dokładnego określenia współczynników dyfuzji lateralnej badanych białek wykorzystano mikroskopię odrostu intensywności fluorescencji po fotobłaknięciu (ang. fluorescence recovery after photobleaching). Badania te prowadzono w komórkach eukariotycznych linii HEK 293 transfekowanych przejściowo wektorami, które zawierały sekwencje kodujące białka fuzyjne podjednostek  $G\alpha$  z pochodną białka zielonej fluorescencji oraz sekwencję receptora dopaminowego D1 sprzęgniętą z pochodnymi białka zielonej lub czerwonej fluorescencji. Uzyskane wyniki wskazują na znacząco różną lokalizację w błonie komórkowej białek  $G\alpha s$  oraz białek rodziny  $G\alpha i$ , jednocześnie białka G pozostają w biskim sąsiedztwie receptora dopaminowego D1 w stanie spoczynkowym. Co więcej, otrzymane wyniki nie potwierdzają obecności trwałego kompleksu nieaktywowanego receptora D1 z białkiem G.

W kolejnych przeprowadzonych eksperymentach sprawdzano wpływ różnych modyfikacji lipidowych podjednostek  $G\gamma$  na dyfuzję lateralną heterotrimerycznego białka G. Obecność odmiennych podjednostek  $G\gamma$  istotnie zmienia pozorne współczynniki dyfuzji pełnych heterotrimerów, co wskazuje na relokację białek G do domen o innym składzie lipidowym. Tym samym  $G\gamma$  determinuje rozmieszczenie heterotrimerycznych białek G w błonie komórkowej.

W następnych etapach komórki linii HEK 293 traktowano  $\beta$ -cyklodekstryną lub fumonizyną B1 powodując zubożenie ilości cholesterolu oraz sfingolipidów w błonie komórkowej. Zaburzenie składu lipidowego błony zdeorganizowało tratwy lipidowe czy kaweole, wpływając tym samym na dyfuzję białek związanych z domenami. Uzyskane w tych eksperymentach wyniki świadczą o lokalizacji podjednostek  $G\alpha s$  oraz  $G\alpha i$  w domenach lipidowych o odmiennym składzie, co oznacza izolację badanych ścieżek przekazywania sygnału. Cholesterol obecny w błonie komórkowej reguluje lokalizację receptora dopaminowego D1 oraz podjednostki  $G\alpha i$ , ale nie podjednostki  $G\alpha s$ .

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano technikę mikroskopii odrostu intensywności fluorescencji po fotobłaknięciu do badań nad lokalizacją i oddziaływaniem białek dopaminergicznego szlaku przekazywania sygnałów. Przeanalizowane rezultaty nie potwierdzają obecności kompleksu heterotrimerycznego białka G z receptorem w stanie nieaktywowanym. Dodatkowo, otrzymane wyniki wskazują na odrębną lokalizację różnych podjednostek  $G\alpha$  białek G.

08-02-2018

Pawel Myjles