

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Ewy Błasiak wykonanej w Zakładzie Biochemii Fizycznej WBBiB pod opieką prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej

Fluorescencyjne badania oddziaływań receptorów dopaminowych w układzie modelowym *in vitro* – rola polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w obrębie receptorów D₂.

Receptory dopaminowe D₁ oraz D₂, należące do receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR), odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu ludzkiego mózgu. Kontrolują one m.in. funkcje motoryczne, poznawcze oraz układ nagrody i kary. Zaburzenia w ich funkcjonowaniu prowadzą do ciężkich schorzeń neuropsychiatrycznych, takich jak: choroba Parkinsona, schizofrenia, uzależnienia lekowe, ADHD. Receptory te, podobnie jak inne GPCR, występują w błonie komórkowej w formie homo- bądź hetero-oligomerów. Mechanizm interakcji receptorów D₁ i D₂ nie został jeszcze dokładnie poznany, istnieją jednak dowody, że do realizacji pewnych funkcji konieczna jest równoczesna aktywacja obu receptorów. Gdy w komórce występują wyłącznie receptory D₁ lub D₂, aktywacja wywołuje odpowiednio wzrost lub obniżenie aktywności cyklazy adenylationowej. Podobnie dzieje się, gdy w komórce ulegają ekspresji oba receptory i tylko jeden z nich jest aktywowany. Jeżeli jednak w takim układzie następuje równoczesna stymulacja dwóch receptorów, powstaje nowy kompleks sygnalizacyjny, zdolny do przekazywania sygnału na drodze regulowanego przez fosfolipazę C wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Szczegółowe badania mechanizmu oddziaływania receptorów wskazują, iż w procesie tym uczestniczy białko G_{αq}.

To odkrycie ma szczególne znaczenie w kontekście etiologii schizofrenii, której terapia opiera się na podawaniu leków będących antagonistami receptorów dopaminowych D₂, a jedną ze zmian występujących w mózgach schizofrenicznych pacjentów jest deregulacja homeostazy wapniowej. W obrębie receptora dopaminowego D₂ opisano trzy polimorfizmy prowadzące do zmian w sekwencji aminokwasów: Val96Ala, Pro310Ser i Ser311Cys. Ogromna liczba badań farmakogenetycznych obejmuje próby znalezienia związku pomiędzy polimorfizmami w obrębie receptorów dopaminowych, a występowaniem określonych schorzeń, szczególnie schizofrenii. Jednakże dotąd nie podejmowano zbyt wielu badań nad wpływem mutacji na funkcjonowanie wariantów genetycznych GPCR ani też nad molekularnym mechanizmem takich zmian.

Podstawowym celem pierwszego etapu pracy było wykorzystanie mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) do badania oligomeryzacji receptorów dopaminowych oraz wpływu ligandów na stopień asocjacji. Badania wykonano wykorzystując komórki linii HEK 293 transfekowane przejściowo plazmidami zawierającymi sekwencje cDNA receptorów dopaminowych sprzęgniętych z pochodnymi białka zielonej oraz czerwonej fluorescencji. Uzyskane wyniki potwierdziły obserwacje poczynione z użyciem innych technik fluorescencyjnych (FLM, spektroskopia fluorescencji), świadczące o tworzeniu heterodimerów przez receptory dopaminowe D₁ i D₂. Pokazano, że równoczesna aktywacja dwóch receptorów wywołuje efekt silniejszy niż wywołana stymulacją każdego z osobna. Przeprowadzone doświadczenia wskazały zasadność stosowanej metodologii oraz modelu in vitro do badania oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G.

W następnym kroku technikę FLIM wykorzystano do zbadania czy warianty polimorficzne występujące w obrębie genu receptora dopaminowego D₂ wpływają na tworzenie oligomerów z receptorem dopaminowym D₁. Uzyskano interesujące wyniki świadczące o wpływie jednonukleotydowych zmian sekwencji na konstytutywną oligomeryzację z receptorem dopaminowym D₁, a także na zmiany w stopniu asocjacji receptorów wynikające z obecności ligandów.

W kolejnym etapie wykonano badania funkcjonalne z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego Fluo-4 do oceny wpływu zmian polimorficznych występujących w obrębie receptora dopaminowego D₂ na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Wykorzystując wektor przeznaczony do równoległej produkcji dwóch białek przygotowano szereg linii komórkowych wykazujących stabilną ekspresję receptora dopaminowego D₁ samego bądź w towarzystwie wariantów genetycznych receptora dopaminowego D₂. Pomiarzy wykonane przy użyciu czytnika mikroplątek potwierdziły wyniki prezentowane w literaturze naukowej świadczące o tym, że równoczesna stymulacja dwóch receptorów powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Wyniki uzyskane w liniach komórkowych wykazujących ekspresję receptora dopaminowego D₁ oraz wariantów polimorficznych receptora dopaminowego D₂ wykazały zależności korelujące z tymi, które uzyskano wykonując eksperymenty FLIM.

Jak się okazało, mutacja receptora dopaminowego D₂ w pozycji S311C, a zatem w obrębie trzeciej pętli cytoplazmatycznej – odpowiedzialnej za oddziaływanie z białkami G - wykazała największe różnice w stopniu oligomeryzacji,

a także we wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia wywołanym podaniem ligandów, w stosunku do wariantu naturalnego. Odkrycie to jest szczególnie interesujące w kontekście etiologii schizofrenii, ponieważ najwięcej doniesień literaturowych dotyczących korelacji polimorfizmów receptora D₂ z występowaniem schizofrenii dotyczy właśnie wymiany aminokwasu w pozycji 311.

Podjęto również próbę zbadania bezpośredniej interakcji receptora dopaminowego D₁ występującego w towarzystwie receptora D₂ z białkiem G_{αq} wykorzystując mikroskopię konfokalną. W tym celu przygotowano konstrukty genetyczne zawierające cDNA białka G_{αq} sprzęgnięte z pochodną białka czerwonej fluorescencji na C końcu oraz w obrębie domeny helikalnej. W żadnym przypadku nie udało się zaobserwować lokalizacji podbłonowej białka, co znalazło odzwierciedlenie w rezultatach pomiarów czasów życia fluorescencji, nie wykazano bowiem występowania prekompleksów receptora dopaminowego D₁ z białkiem G_{αq} ani oddziaływania wywołanego obecnością ligandów. Z tego powodu zdecydowano się rozszerzyć projekt o uzyskanie ekspresji receptorów dopaminowych oraz białek G w komórkach wyprowadzonych z linii owadzych, wykorzystując system bakulowirusowy. W toku badań przygotowano szereg bakulowirusów, które posłużyły do produkcji białek G, w tym podjednostek G_{αs}, G_{αq}, G_{β1} oraz G_{γ2}, oraz receptorów dopaminowych. Każde z białek opatrzone zostało odpowiednią metką składającą się z histydyn bądź metką StrepTag. Ekspresję białek w owadzych liniach komórkowych potwierdzono metodą Western Blot oraz w przypadku receptora dopaminowego D₁ – poprzez wiązanie radioligandów. Opracowano metody oczyszczania białek G oraz receptorów dopaminowych z błon komórkowych z hodowli prowadzonych na małą skalę. Do planowanych w przyszłości badań biofizycznych konieczne będą dodatkowe eksperymenty, które pozwolą na ustalenie optymalnego otoczenia dla receptorów dopaminowych –detergentów, nanodysków lub liposomów. Wydaje się jednak, że wszystkie procesy optymalizacyjne związane z uzyskaniem ekspresji w systemie bakulowirusowym zostały pomyślnie zakończone.

Podsumowując, w toku niniejszej pracy udało się zastosować bardzo zaawansowane narzędzie biofizyczne, pozwalające na pomiar zjawiska FRET w żywych komórkach – mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji - do badania oligomeryzacji receptorów sprzężonych z białkami G. Pokazano, że może ono służyć do badania subtelnych zmian zachodzących w obrębie kompleksów białek receptorowych następujących po podaniu ligandów. Wyniki uzyskane w tych

eksperymentach dowodzą, że zmiany pojedynczego nukleotydu występujące w obrębie receptora dopaminowego D₂ wpływają na stopień asocjacji z receptorem dopaminowym D₁, a badania funkcjonalne pokazały, że zmiany te są skorelowane ze zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Badania te świadczą o zaangażowaniu podjednostki G_{αq} w przekaz sygnału pochodzący od kompleksów receptorów dopaminowych D₁ oraz D₂. W pracy opisano także zastosowanie bakulowirusowego systemu ekspresyjnego do produkcji receptorów GPCR oraz białek G, co w niedalekiej przyszłości pozwoli na zweryfikowanie hipotezy dotyczącej uruchamiania alternatywnej ścieżki przekazu sygnału następującej po równoczesnej aktywacji dwóch receptorów dopaminowych.