

TARTU ÜLIKOOL
FÜÜSIKA-KEEMIA TEADUSKOND
ORGAANILISE JA BIOORGAANILISE KEEMIA INSTITUUT

Sven Parkel

**[³H]WAY 100635 SIDUMINE ROTI HIPOKAMPUSE
MEMBRAANIDELE**

Magistritöö

Juhendaja: prof. Ago Rinken

Tartu 2004

SISUKORD

Kasutatud lühendid.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 5-HT _{1A} retseptor	5
1.2 G-valgud.....	9
1.3 5-HT _{1A} ligandid.....	10
1.4 [³ H]WAY 100635 sidumise uurimine kirjanduses	12
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	15
2.1 Materjalid	15
2.2 Membraanpreparaadi valmistamine	15
2.3 Tasakaalulise sidumise uurimine	16
2.4 Kineetika uurimine.....	16
2.5 Retseptori stabiilsuse uurimine	17
2.6 Andmete analüüs	17
3 TULEMUSED JA ARUTELU	18
3.1 Kineetika	18
3.2 Tasakaaluline sidumine.....	22
3.3 Ioonide mõju uurimine.....	24
3.4 [³ H]WAY 100635 sidumiskohtade stabiilsus	31
Kokkuvõte	32
Summary	33
Kasutatud kirjandus:.....	34

Kasutatud lühendid

5-HT – serotoniin, 5-hüdroksütrüptamiin

8-OH-DPAT – 8-hüdroksü-2-(di-*n*-propüülamino)tetraliin

cAMP – 3'5'-tsükliiline adenosiin monofosfaat

DAG - diatsüülgütserool

EDTA – etüüldiaminotetraetaanhape

GPCR – G-valkudega seotud retseptor

GTP γ S – guanosiin-5-O-(γ -tio)trifosfaat

K_D – retseptor-ligand kompleksi tasakaalukonstant

K_i – inhibeerimiskonstant

k_{obs} – reaktsiooni näiv kiiruskonstant

NAN-190 – 1-(2-metoksüfenüül)-4-(4-ftalimidobutüül)piperasiin

Tris-HCl – Tris(hüdroksümetüül)-aminmetaan vesinikkloriid

WAY 100635 – [N-(2-(4-(2-metoksüfenüül)-1-piperasiinüül)etüül)-N-(2-püridinüül) tsükloheksaan karboksamiin

WAY 100135 – N-terts-butüül-3,4-(2-metoksüfenüül)piperasiin-1-yl-2-fenüülpropanamiid

SISSEJUHATUS

Serotoniini_{1A} (5-HT_{1A}) retseptor kuulub serotoniini (5-HT) retseptorite perekonda, mis on osa seitsme transmembraanse domääniga G-valguga seotud retseptorite superperekonnast. 5-HT_{1A} retseptorid on seotud mitmete erinevate psühholoogiliste ja füsioloogiliste funktsioonidega, näiteks tuju, mälu, seksuaalkäitumise ja isuga. Seetõttu eeldatakse, et 5-HT_{1A} retseptorid on märklauaks mitmetele ravimitele. Seni on 5-HT_{1A} retseptoreid põhiliselt iseloomustatud triitiumiga märgistatud agonisti, [³H]8-hüdroksü-2-(n-dipropüülamino)tetraliiniga ([³H]8-OH-DPAT), kuid viimastel aastatel on kasutusse võetud mõned kõrge afiinsusega antagonistid, nagu [³H][(R)-3-N, N-ditsüklobutüülamino-8-fluoro-3, 4-dihüdro-2H-1-bensopüraan-5-karboksamiid vesinik (2R, 3R) tartraat monohüdraat ([³H]NAD-299) ja [³H][N-[2-[4-(2-metoksüfenüül)-1-piperasiinüül]etüül]-N-(2-püridinüül)-tsükloheksaan-karboksamiid ([³H]WAY 100635). Praeguseks on [³H]WAY 100635 ainuke kommertsiaalselt saadaolev 5-HT_{1A} retseptorite antagonist ning teda kasutatakse juba oluliselt erinevates farmakoloogilistes katsetes. Samas on väga vähe teada selle ligandi sidumise kineetika ja mehhanismi kohta ning publitseeritud sidumisparameetrid on väga erinevad. Sellest lähtuvalt sai käesoleva töö eesmärgiks seatud [³H]WAY 100635 sidumise iseloomustamine, aga ka Mn²⁺- ja Mg²⁺-ioonide mõju uurimine ligandide sidumisele serotoniin_{1A} retseptorile roti hipokampuse membraanides.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 5-HT_{1A} retseptor

Kõik 5-HT retseptorid, peale 5-HT₃ alatüübi kuuluvad G-valkudega seotud retseptorite (GPCR) klassi, mis on imetajatel, sealhulgas ka inimesel, suurim retseptorite klass. Inimese genoomist on leitud üle 800 GPCR-i kodeeriva järjestuse, kuid endogeenne ligand on seni leitud neist vaid pisut rohkem kui 200-le. GPCR-id osalevad rakkudevahelises aeglasel signaaliülekanndes (sekunditest minutiteni) põhjustades rakusiseste protsesside modulatsiooni G-valkude kaudu.

Serotoniin, ehk 5-hüdroksütrüptamiin põhineb indoolituumal ja hüdroksüülrühm ning primaarne aminorühm muudavad ta füsioloogilisel pH-l laetuks ja hüdrofiilseks. Seega ei läbi ta hematoentsefaalset barjääri ning sünteesitakse ajus.

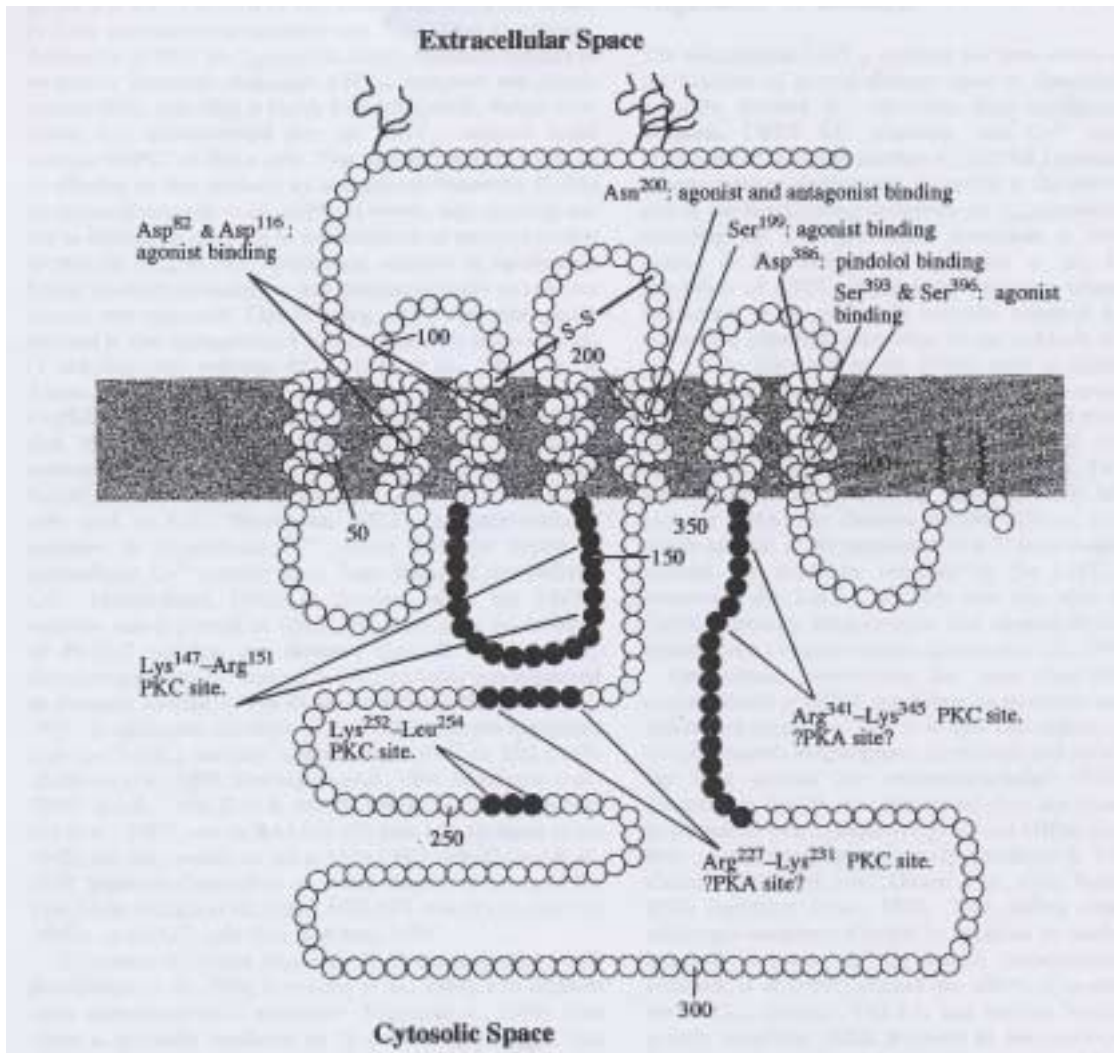
5-hüdroksütrüptamiini ehk serotoniini sünteesi alguseks on L-trüptofaani transport verest ajju. L-trüptofaani saab organism toidus sisalduvatest valkudest ning see viiakse ajju samadel kandjatel, millel teised aminohapped. Seega saab toiduga mõjutada serotoniini hulka ajus. Serotoniini neuronites on trüptofaani hüdroksülaas, mis muudab trüptofaani 5-hüdroksütrüptofaaniks. Serotoniin saab 5-hüdroksütrüptofaanist aromaatsel aminohappe dekarboksülaasi abil.

Serotoniini retseptorid on organismis seotud mitmete füsioloogiliste funktsioonidega. Näiteks on teada 5-HT_{1A} alatüübi seotus isu [1], termoregulatsiooni [2], seksuaalkäitumise [3], agressiivsuse [4], mälu [5] ja depressiooniga [6].

Tabel 1. Ülevaade serotoniini retseptoritest ja nende rollist rakus [7].

Retseptor	Signaali ülekandja	Füsioloogiline vastus rakus
5-HT _{1A}	G _i /G _o	Eelistatult inhibeerib cAMP moodustumist Suurendab K ⁺ -ioonide sissevoolu Aktiveerib fosfolipaas C-d
5-HT _{1B}	G _i /G _o	Eelistatult inhibeerib cAMP moodustumist Aktiveerib fosfolipaas C-d
5-HT _{1D}	G _i /G _o	Eelistatult inhibeerib cAMP moodustumist Aktiveerib fosfolipaas C-d
5-HT _{1e}	G _i /G _o	Eelistatult inhibeerib cAMPi moodustumist
5-HT _{1f}	G _i /G _o	Eelistatult inhibeerib cAMPi moodustumist
5-HT _{2A}	G _q /G ₁₁	Suurendab fosfoinositoolide hüdrolüüsi Suurendab Ca ²⁺ -ioonide kontsentratsiooni
5-HT _{2B}	G _q /G ₁₁	Suurendab fosfoinositoolide hüdrolüüsi Suurendab Ca ²⁺ -ioonide kontsentratsiooni
5-HT _{2C}	G _q /G ₁₁	Suurendab fosfoinositoolide hüdrolüüsi Suurendab Ca ²⁺ -ioonide kontsentratsiooni
5-HT ₃	Ioonkanal	Suurendab Ca ²⁺ -ioonide kontsentratsiooni
5-HT ₄	G _s	Suurendab cAMP-i sünteesi
5-HT _{5a}	Pole teada	Pole teada
5-HT _{5b}	Pole teada	Pole teada
5-HT ₆	G _s	Suurendab cAMP-i sünteesi
5-HT ₇	G _s	Suurendab cAMP-i sünteesi

5-HT_{1A}-retseptor (Joonis 1.) oli üks esimestest G-valguga seotud retseptoritest, mille aminohappeline järjestus klooniti. Roti ja inimese 5-HT_{1A}-retseptori homoloogsus on 88% [8]. Inimese 5-HT_{1A}-retseptorid koosnevad 422 aminohappejäägist, retseptori molekulmass on ligikaudu 46 kDa ning isoelektriline punkt on 8,8. On tehtud kindlaks seitsme hüdrofoobse lõigu olemasolu mis tõenäoliselt moodustavad membraani läbiva α -heeliksi. Hüdrofoobseid ahelaid ühendavad hüdrofiilsed ahelad, mis moodustavad kolm rakusisest ja kolm rakuvälist silmust. Analoogselt β_2 -adrenoretseptoriga võib teises rakusises domäänis paiknev Cys¹⁸⁶ moodustada disulfiidsideme Cys¹⁰⁹-ga [9], ning see side võib olla oluline retseptori stabiliseerimisel.



Joonis 1. Inimese serotoniin_{1A} (5-HT_{1A}) retseptor [10]

Tõestatud on 5-HT_{1A} retseptori seotus keemiliste signaaliülekaneradadega mitmetes psühholoogilistes käitumismudelites ning peaaegu kõik neist on läkakõha toksiini tundlikud, viidates signaaliülekandele G_{i/o} kaudu. Neuronites on põhilised 5-HT_{1A}-retseptoriga seotud signaalirajad adenülaaditsüklaasi inhibeerimine [11] ja kaaliumkanalite avanemine [12].

Adenülaaditsüklaasi inhibeerimine on väga efektiivne juba madalatel retseptori ekspressioonitasemetel. Samas ei ole teada, mis tüüpi adenülaaditsüklaasi retseptor inhibeerib, sest G-valkude erinevad alaühikud mõjuvad erinevatele adenülaaditsüklaasi isosüümidele, mida on kokku kümme. Lisaks otsesele inhibeerimisele G-valgu kaudu võib adenülaaditsüklaasi

inhibeerimine toimuda ka mõne teise molekuli mõjul, mis on aktiveeritavad G-valgu erinevate alaühikute poolt. Seega on cAMP-i kontsentratsiooni modulatsioon rakus mitmete keemiliste rakusiseste regulatsioonide tagajärg.

Mõnedes rakuliinides on leitud 5-HT_{1A}-retseptorite võime aktiveerida fosfolipaaas C-d (PLC) [13], mis põhjustab kahe teisese virgatsaine tekke: fosfatidüülinositooli lagunemisel tekkiv inositoltrifosfaat (IP₃) reguleerib rakusisest Ca²⁺-ioonide vabanemist endoplasmaatilisest retiikulumist [14], diatsüülglütserool (DAG) aga aktiveerib proteiinkinaas C (PKC). PKC aktivatsioon on näidatud HeLa rakuliinis, mis ilmselt toimub G-valgu βγ-alaühiku vahendusel [15].

Ioonkanalitest on 5-HT_{1A} retseptorite poolt mõjutatavad näiteks sissepoole avanevad kaaliumkanalid, suure juhtivusega anioonkanalid ja Ca²⁺-kanalid. G_{i/oα}-ga seotud retseptorid, sealhulgas ka 5-HT_{1A} retseptorid mõjutavad G-valgu βγ-alaühiku kaudu G-valgu poolt reguleeritavaid sissepoole avanevaid kaaliumkanaleid (GIRK) [16], mis mõjutavad hüperpolarisatsiooni postsünaptilisel rakumembraanil nii närvisüsteemis kui südames [11]. Lisaks ionikanalitele on 5-HT_{1A} retseptor seotud ka aktiivse iontranspordiga. HeLa rakuliinis stimuleerivad retseptorid Na⁺-sõltuvat fosfaadi tagasihaaret rakku läbi PKC aktivatsiooni [17] ning Na⁺/K⁺-ATPaasi Ca²⁺-ioonide vabanemise kaudu [15].

G-valkudest suudab serotoniini_{1A} retseptoriga kompleksi moodustada G_{αi1}, G_{αi2}, G_{αi3}, G_{αo} ja G_{αz} [18]. G_{tα}, G_{sα}, G_{qα}, G_{12α} ja G_{13α} seondumise kohta 5-HT_{1A} retseptoriga on seni vähe tõendeid [15].

Rakkudevahelise signaali ülekande pidurdamise peamine mehhanism on virgatsaine hüdrolüüs või tagasihaare. Lisaks sellele võib signaaliülekande pidurdus toimuda retseptori desensitisatsiooni kaudu. Desensitisatsiooniks nimetatakse protsessi, mille tulemusena väheneb signaaliraja võime signaali edasi anda ning peamiselt on GPRC-de desensitisatsioon seotud retseptori fosforüülimisega mõningate proteiinkinaaside poolt.

1.2 G-valgud

G-valgud on guanosiinfosfaate siduvad valgud ja nad kuuluvad GTP-d siduvate valkude perekonda ning on loomariigis laialdaselt levinud rakuprotsesside regulaatorid. Kuigi G-valkude avastamisest on möödas üle 30 aasta [20] ei ole G-valkude poolt suunatavad protsessid lõplikult selged.

G-valgud jagatakse kahte suurde gruppi – heterotrimeersed G-valgud ja väikesed G-valgud. Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest alaühikust - α -, β - ja γ -alaühikust, molekulmassidega vastavalt 36-52, 35-36 ja 8-10 kDa [21]. Praeguseks on teada 5 β -alaühikut, (tähistatuna β_{1-5}), 12 γ -alaühikut (γ_{1-12}) ja üle 20 α -alaühiku. Nad on jagatud perekondadesse G_{α} -alaühiku järgi, eristatakse nelja G-valgu perekonda: $G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$ ja $G_{12/13}$. G_s perekonna α -alaühikud stimuleerivad adenülaaditsüklaasi, G_i perekonna α -alaühikud (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{o1} , α_{o2} , α_{t1} , α_{t2} , α_{gust} ja α_z) seevastu inhibeerivad adenülaaditsüklaasi. G_q perekonna α -alaühikud (α_q , α_{11} , α_{14} ja α_{16}) on fosfolipaa C aktivaatorid.

G-valgu omadused on enamasti määratud α -alaühikuga. Organismis on piirkonniti α -alaühikute ekspressioon erinev, mõned alatüübid on levinud väga laialdaselt, mõnede alaühikute leidumine on küllaltki piiratud. Üks rakk võib ekspresseerida kuni kümme erinevat α -alaühikut [27].

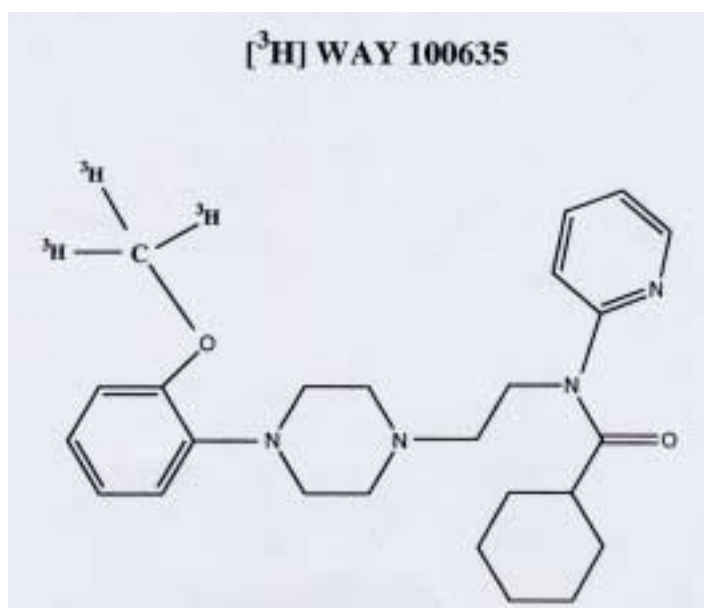
Kõik heterotrimeersed G-valgud osalevad signaaliülekanne protsessis samadel põhimõtetel ja heterotrimeersete G-valkude aktiveerimine võimaldab pöörduvat ja spetsiifilist signaali rakku viimist [22]. Puhkeolekus on G-valgud heterotrimeersed ja α -alaühikule on seotud GDP. G-valkude aktivatsiooni põhjustab interaktsioon membraani läbiva ligand-aktiveeritava retseptoriga mis põhjustab GDP affinsuse vähenemise ning GDP vabanemise G-valgult, mis avab GTP-le võimaluse G-valgule seostuda. Mg^{2+} -ioonid on vajalikud G-valgu funktsioneerimiseks ning eristatakse kahe afiinsusega Mg^{2+} -ioonide sidumist – kõrge afiinsusega sidumine ($K_D \sim 10^{-9}$ M) tagab valgu GTPaasse aktiivsuse, madala afiinsusega sidumine ($K_D \sim 10^{-3}$ M) on vajalik GDP/GTP vahetuseks [22]. GTP sidumisel toimub G-valgu dissotsiatsioon G_{α} -alaühikuks ja $G_{\beta\gamma}$ -alaühikuks. Aktiveeritud G_{α} -GTP ja $G_{\beta\gamma}$ -kompleksid on bioloogiliselt aktiivsed mõjustades teiseseid signaaliülekanne valke kuni G-valgu α -alaühiku GTPaasne aktiivsus hüdrolyüsib GTP GDPks. Hüdrolyüs taastab α -alaühiku affinsuse $G_{\beta\gamma}$

kompleksile ning G-valk reassoitseerub inaktiivseks heterotrimeeriks ja on valmis läbima järjekordset aktivatsioonitsükli. GDP vahetus GTP vastu toimub erinevatel G-valkudel erineva kiirusega – G_i / G_o -valgud on kiired nukleotiidide vahendajad, G_{t-} , G_{s-} , G_{z-} ja G_q -valgud on mõnevõrra aeglasemad, ning G_{12} - ja G_{13} -valgud vahetavad nukleotiide palju aeglasemalt [23; 24]. Kui rakkude vaheline signaaliülekanne toimub stöhhiomeetriaga üks ligandimolekul retseptorile, siis signaali ülekandel rakku sisse toimub signaali võimendumine kuna üks aktiveeritud retseptor on võimeline aktiveerima mitut G-valku [20, 25]. Näiteks on valgustundlik rodopsiini retseptor võimeline aktiveerima 3000 G-valku sekundis [26].

Kui algselt arvati, et ainult $G\alpha$ -alaühik on võimeline rakusiseseid protsesse aktiveerima ja $\beta\gamma$ -alaühik käitub ainult inhibiitorina, siis praeguseks on teada ka $\beta\gamma$ -alaühiku aktiveeriv toime mitmetele süsteemidele – kaaliumkanalitele, adenülaaditsüklaasile ja proteiinkinaasidele [27].

1.3 5-HT_{1A} ligandid

1995. aastani kasutati serotoniini_{1A} retseptori iseloomustamiseks agoniste või osalisi antagonistide, tuntuim neist agonist [³H]-8-OH-DPAT [28]. Agonistid seostuvad retseptorile kõrge afiinsusega, kui retseptor on seostunud G-valguga. Retseptorid, mis ei ole G-valguga kompleksis on agonisti suhtes madala afiinsusega, ning agonistist radioligand neid ei märgista. Antagonisti sidumine on aga G-valgust sõltumatu ja seega suudab ta võrdse afiinsusega märgistada G-valguga seostunud ja seostamata retseptorit. 1995. aasta alguses avaldati töö [29], kus pakuti välja uus selektiivne kõrge afiinsusega fenüülpiperasiini derivaat WAY 100635, mis käitus antagonistina nii *in vivo* kui *in vitro* katsetes. Katsetes erinevate radioligandidega leiti, et WAY 100635 seostub nanomolaarses kontsentratsioonipiirkonnas ($K_i = 0,8$ nM) ainult 5-HT_{1A} retseptorile. Nii uuriti ligandi selle afiinsust ka teistele 5-HT₁ alatüüpidele, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, α_1 - ja α_2 -adrenergilisele, β_1 - ja β_2 -adrenergilisele, D1 ja D2 dopamiini ja GABA_A retseptoritele ning suurim afiinsus leiti α_1 adrenergilisele retseptorile (360 nM) [29].



Joonis 2. [³H]WAY 100635 [29].

[³H]WAY 100635 süstimisel hiirtele leiti, et suurim radioaktiivsuse akumulatsioon esines hipokampuses. 5-HT_{2A}, β-adrenoretseptori ja α₁-adrenoretseptori ligandidega töötlemine ei mõjutanud [³H]WAY 100635 sidumist, küll aga vähendasid seda kontsentratsioonist sõltuvalt 5-HT_{1A} retseptori spetsiifilised ligandid [30].

Autoradiograafiaga on näidatud, et suurim [³H]WAY 100635 sidumine esineb hipokampuses, mis langeb kokku [³H]8-OH-DPAT-i sidumise lokaliseerimisega organismis. Striaatumis ja substantia nigra-s oli sidumine väga madal, jäädes mittespetsiifilise sidumise tasemele. 1 μM-l kontsentratsioonil ei mõjutanud dopamiin, noradrenaliin, histamiin, karbamöökoliin ega GABA [³H]WAY 100635 spetsiifilist sidumist hipokampuses. Parimad inhibeeringid olid 5-HT_{1A} ligandid (IC₅₀ väärtused alla 50 nM), 5-HT_{1B} ligand CP 93128 ja 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} agonist sumatriptan inhibeeringid [³H]WAY 100635 sidumist alles kontsentratsioonidel vastavalt 10 μM ja 16 μM. 5-HT₂ antagonistid omasid inhibeeringivat toimet alles mikromolaarses kontsentratsioonipiirkonnas, 5-HT₃ retseptori antagonistid 1 μM-l kontsentratsioonil [³H]WAY 100635 sidumist ei mõjutanud. Võrreldes erinevate ligandide võimet konkureerida [³H]WAY 100635 ja [³H]8-OH-

DPAT-i sidumiskohtadega andsid 16 serotonergilist ligandi suhteliselt hea korrelatsiooni [29, 31], näidates, et mõlemad ligandid on spetsiifilised 5-HT_{1A} retseptorile.

Mõned aastad tagasi on sünteesitud uus, struktuurselt erinev antagonist, NAD-299, mis on näidanud WAY 100635-st kõrgemat selektiivsust 5-HT_{1A} retseptorile, kuid pole siiani radioligandina laialdast kasutust leidnud [32].

1.4 [³H]WAY 100635 sidumise uurimine kirjanduses

[³H]WAY 100635 sidumise sõltuvust temperatuurist on uuritud nii roti hipokampuse membraanides kui ka hiina hamstri munasarja (CHO) rakuliinis kloonitud inimese 5-HT_{1A} retseptoril ning suurim sidumine saadi 20-35°C vahel [30, 31].

Reaktsiooni kineetikat uurides lähtuti tavaliselt ühest kineetilisest kõverast. Assotsiatsiooni kineetikat vaadeldes leiti, et tasakaal süsteemis saabub 60 minuti jooksul, kuna kõver jõudis platoole. Arvutati kiiruskonstandid ning saadud reaktsiooni kiirus võeti aluseks sidumiskatse planeerimisel. Assotsiatsiooni kiiruskonstandid on aga erinevatel autoritel väga erinevad, varieerudes vahemikus 0,069 – 263,4 nM⁻¹*min⁻¹, dissotsiatsiooni kiiruskonstandid jäävad vahemikku 0,007 – 0,12 min⁻¹ [29, 31, 33].

Roti hipokampuse membraanidele tehtud sidumiskatsetest saadud K_D-d on vahemikus 0,12 - 0,37 nM [29, 31]. Kasutades inimese retseptorit CHO rakuliinis on K_D väärtusteks saadud 0,32 nM [34] ja 0,056 nM [33]. Roti ajulõikudel mõõdeti K_D vahemikku 1,5-1,7 nM [30].

Võrreldes [³H]WAY 100635 maksimaalset sidumist laialdaselt levinud 5-HT_{1A} radioaktiivse agonisti, [³H]8-OH-DPAT-iga, nähti, et [³H]WAY 100635 B_{max} oli hipokampuse membraanides 36 – 50 % suurem [29, 31] ja CHO rakkudes ekspresseeritud inimese 5-HT_{1A} retseptori puhul kuni 61 % suurem kui 8-OH-DPAT-il [34]. [³H]5-HT ja [³H]8-OH-DPAT aga omasid võrdseid B_{max}-e [29], mis näitab, et [³H]WAY 100635 seostub kõigile 5-HT_{1A} retseptoritele, radioligandist agonistid aga ainult retseptor-G-valk kompleksidele.

Ka teiste ligandide võime konkureerida [³H]WAY 100635 sidumisega on andnud erinevates allikates erinevaid tulemusi (Tabel 2).

Tabel 2. Mõnede ligandide afiinsusi [³H]WAY 100635 sidumiskohale.

Ligand	pIC ₅₀ high/low	PK _i high/low	Viide
Roti aju hippokampuse membraanides			
8-OH-DPAT	8,25/6,67		
8-OH-DPAT + GTPγS	7,96/6,4		
5-HT	7,62/5,74		
5-HT + GTPγS	8,52/6,07		[29]
Inimese 5-HT_{1A} retseptor CHO rakuliinis			
8-OH-DPAT	7,87/6,4		
5-HT	7,46/5,67		[34]
8-OH-DPAT		9,91/7,98	
8-OH-DPAT + GTPγS		7,78	
5-HT		9,84/7,77	[35]
		9,84/7,85	[33]
5-HT + GTPγS		7,44	[35]
		7,54	
WAY100635		9,91	[33]

Uurides ioonide mõju sidumisele nähti CHO rakuliinis, et Mn²⁺ vähendas [³H]WAY 100635 afiinsust inimese 5-HT_{1A} retseptorile peaaegu 2 korda, kuid maksimaalne sidumine (B_{max}) jäi samaks [34]. Teises töös on nähtud, et 10 mM-l kontsentratsioonil vähendas Mn²⁺ ligandi maksimaalset sidumisvõimet 30%, aga [³H]8-OH-DPAT-i sidumist suurendas Mn²⁺ 1-10 mM vahemikus isegi 70% [29].

Retseptori inaktivatsiooni membraanides on mõõdetud ühes töös, agonisti, [³H]8-OH-DPAT-i, sidumisel. Töös leiti, et retseptori inaktivatsiooni poolestusaeg 37°C juures on 5,3 min, 25°C juures 29 minutit ja 4°C-l 3,6 tundi [36].

Kirjanduse ülevaatest ilmneb [³H]WAY 100635 sidumise kineetiliste konstantide suur varieeruvus, mis seab kahtluse alla tasakaalutingimused tehtud katsetes. Lisaks pakub huvi Mg²⁺ ja Mn²⁺ roll nii [³H]WAY 100635 kui ka

agonistide sidumisele, millele siia maani ühest seletust ei ole pakutud. Nende probleemide valguses sai töö eesmärgiks [³H]WAY 100635 sidumise iseloomustamine ja Mg²⁺ ja Mn²⁺ mõju uurimine agonisti ja antagonistide sidumisele roti hipokampuse membraanidele.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Materjalid

Wistar rottide hipokampused prepareeris ja andis katsetusteks prof Jaanus Harro,

[N-(2-(4-(2metoksüfenüül)-1-piperasiinüül)etüül)-N-(2-püridinüül) tsükloheksaan karboksamiin ([metoksü-³H]WAY 100635 (81 Ci/mmol)) - Amersham Pharmacia Biotech Ltd,

8-hüdrosü-2-(di-n-propüülamino)tetraliin (8-OH-DPAT) - Tocris Cookson Inc, 1-(2-metoksüfenüül)-4-(4-ftalimidobutüül)piperasiin (NAN-190) - Tocris Cookson Inc,

N-tert-butüül-3,4-(2-metoksüfenüül)piperasiin-1-üül-2-fenüülpropanamiid ((S)-WAY 100135) - Tocris Cookson Inc,

5-hüdrosütrüptamiin (5-HT) LabKemi,

Vesinikkloriidhape (HCl), MnCl₂ ja EDTA – Merck,

Tris(hüdrosümetüül)-aminmetaan – Sigma Chemical Co,

MgCl₂ – Acros,

veise seerumi albumiin (BSA) - Boehringer Mannheim,

guanosiin-5-O-(γ-tio)trifosfaat (GTPγS) – Roche,

stsintillatsioonikokteil Optiphase “HiSafe” 3 – PerkinElmer.

2.2 Membraanpreparaadi valmistamine

Rottide hipokampused homogeniseeriti ultraheliga Bandelin Sonoplus sonikaatoriga inkubatsioonipuhvril (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) ning inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit sisemiste ligandide dissotseerimiseks. Saadud suspensiooni tsentrifuugiti 20 minutit 43 000*g 4°C juures. Seejärel teostati veel kaks sademe homogeniseerimise ja tsentrifuugimise tsükli, misjärel sade homogeniseeriti 50 mM Tris-HCl puhvril ja külmutati -80°C juures lõppkontsentratsioonil, mis vastas suhtele 33 mg kudet/ml kasutamiseni või kasutati koheselt katseteks.

2.3 Tasakaalulise sidumise uurimine

Membranpreparaati inkubatsioonipuhvril (kontsentratsioonil 3 mg kudet/punkt) inkubeeriti erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel (0,008-0,9 nM). Inkubatsioonipuhvrina kasutati 50 mM Tris HCl (pH 7,4), radioligandi lahuse stabiilsuse suurendamiseks lisati 0,05 mg/ml BSA-d. Konkureeriva sidumise mõõtmisel kasutati radioligandi kontsentratsioone (vahemikus 0,7-0,9 nM), mis 25°C juures saavutaksid 90 minuti jooksul retseptoriga tasakaalu, ning konkureerivate ligandide erinevaid kontsentratsioone, EDTA-d, MgCl₂ ja MnCl₂ kasutati 1 mM kontsentratsioonil, GTPγS-i 30 μM-l kontsentratsioonil.

Vaba ligand eraldati filtreerimisel läbi GF/B WHATMAN klaasfiiberfiltril, mida oli eelnevalt niisutatud pesupuhvriga (20 mM K-fosfaatpuhver, 100 mM NaCl, pH 7,4). Filtrit pesti kolm korda jääkülma pesupuhvriga. Spetsiifiline sidumine määrati kogu sidumise ja mittespetsiifilise sidumise vahel. Mittespetsiifiline sidumine määrati 10 μM 5-HT, 10 μM 8-OH-DPAT-i või 10 μM (S)-WAY 100135 juuresolekul. Filtrid pandi viaalidesse, lisati 5 ml stsintillatsioonikokteili ja jäeti seisma vähemalt 12 tunniks. Loendamiseks kasutati loendurit Beckman 1801. Loendamise efektiivsus ³H-le oli 41%.

2.4 Kineetika uurimine

Membranpreparaadi suspensiooni inkubeeriti inkubatsioonipuhvril (50 mM Tris-HCl) 5-15 minutit temperatuuril 25°C, et stabiliseerida temperatuur ja mittespetsiifilise sidumise määramisel blokeerida retseptor radioligandile. Ajamomendil t₀ lisati radioligand lõppkontsentratsiooniga 0,08 – 2,9 nM. Ajamomendil t eraldati reaktsioonisegust alikvoodid, kus määrati seostunud ligand nagu on kirjeldatud eespool. Dissotsiatsioonikineetika mõõtmisel inkubeeriti membraane eelnevalt radioligandiga (0,4 nM) 60 minutit temperatuuril 25°C. Ajamomendil t₀ lisati konkureeriv ligand (5-HT lõppkontsentratsiooniga 28 μM). Ajamomendil t eraldati reaktsioonisegust alikvoodid, kus määrati seostunud ligand nagu on kirjeldatud eespool.

Uurides ioonide mõju dissotsiatsioonikineetikale mõõdeti dissotsiatsioonikiirust eelpool kirjeldatud viisil, lisades reaktsioonisegusse 1 mM EDTA-d, 1 mM MnCl₂ või 1 mM MgCl₂ ja ajamomendil t₀ lisati 50 µM WAY 100135.

2.5 Retseptori stabiilsuse uurimine

Membraansuspensiooni inkubeeriti temperatuuril 25°C, ajamomendil t eraldati reaktsioonisegust alikvoot, millele lisati [³H]WAY 100635 (0,9 nM), inkubeeriti täiendavalt 60 minutit 25°C juures ning seejärel määrati seostunud radioligand nagu on kirjeldatud ülalpool.

2.6 Andmete analüüs

Katsetest saadud andmeid analüüsiti mittelineaarsete vähimruutude meetodil kasutades kommertsiaalset programmi GraphPad PRISM™ (GraphPad, San Diego, CA, USA). Andmed on esitatud kujul keskmine ± SEM, mis on saadud duplikaatides mõõdetud katsepunktidest.

Näivad assotsiatsiooni kiiruskonstandid arvutati eeldusel, et [L]>>[R] ja lähtuti võrrandist:

$$B_t = B_{nonsp} + B_{sp} (1 - e^{-k_{obs} \times t}), \quad (I)$$

kus B_t on seondunud radioligandi hulk ajamomendil t, B_{nonsp} ja B_{sp} – vastavalt mittespetsiifiliselt ja spetsiifiliselt seondunud radioligandi hulk. B_{nonsp} saavutas tasakaalu nii kiiresti, et selle võis ajast sõltumatuks lugeda.

Dissotsiatsioonikineetika oli kirjeldatav ühefaasilise dissotsiatsiooniskeemi alusel vastavalt võrrandile:

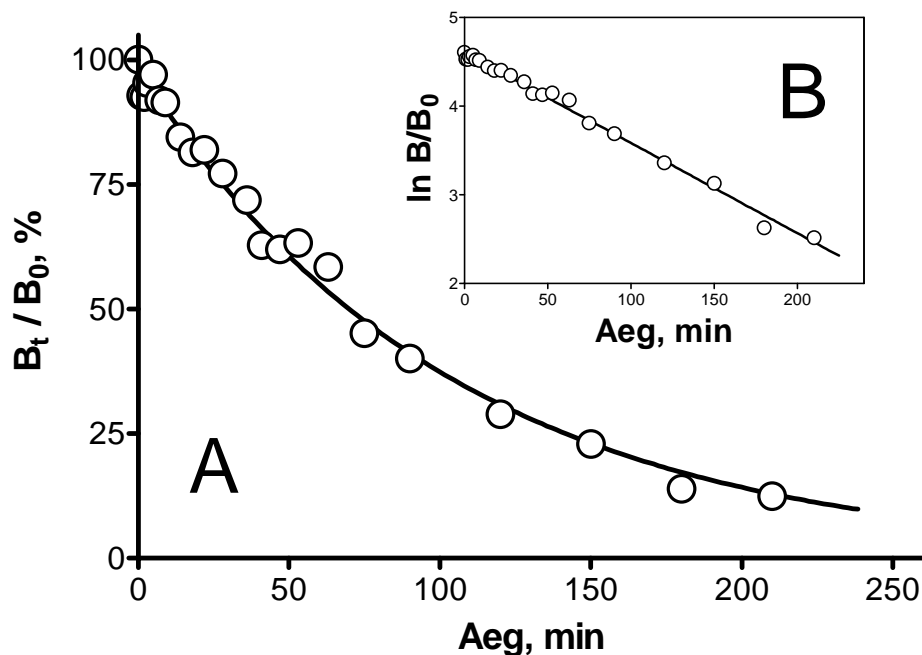
$$B_t = B_0 \times e^{k_{-1} \times t} + B_{nonsp}. \quad (II)$$

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Kineetika

[³H]WAY 100635 dissotsiatsioonikineetika mõõtmisel nähti ligandi dissotsiatsiooni ühelt sidumiskohalt ($p > 0,05$ võrdluses kahe sidumiskoha mudeliga) ja dissotsiatsiooni kiiruskonstandi väärtuseks mõõdeti $0,008 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$, mis andis dissotsiatsiooni poolestusajaks oli $89 \pm 11 \text{ min}$. Lähtudes sellest, et reaktsiooni võib lõppenuks lugeda pärast 5 poolestusaja möödumist (95 % reaktsiooni sügavust), siis kulgeb see reaktsioon vähemalt 7,5 tundi.

Seega peaks korrektse sidumiskõvera saamiseks retseptorit inkubeerima radioligandiga vähemalt 7,5 tundi, kuid sel juhul tuleb hakata arvesse võtma bioloogilise süsteemi stabiilsust.



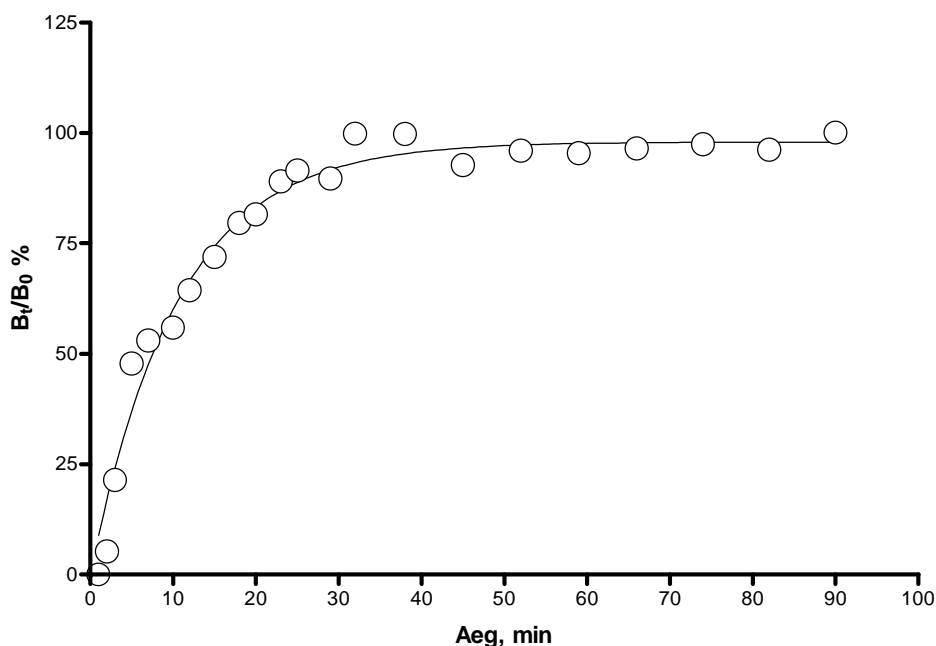
Joonis 3.

A: [³H]WAY 100635 dissotsiatsioon roti hipokampuse membraanidelt. Dissotsiatsioon algatati 28 μM 5-HT-ga pärast membraanide 60 minutulist inkubeerimist 0,4 nM [³H]WAY 100635-ga temperatuuril 25°C. k_{-1} väärtuseks mõõdeti $0,008 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$, reaktsiooni poolestusaeg seega $89 \pm 11 \text{ min}$.

B: Lineariseeritud dissotsiatsioonikineetika andmed semilogaritmilistes koordinaatides

[³H]WAY 100635 assotsiatsioonikineetikat mõõdeti erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel pseudo-monomolekulaarsetes tingimustes (ligandi võetakse ülehulgas ja tema kontsentratsioon loetakse ajas muutumatuks). Katseandmed lähendusid kõige paremini esimest järku eksponentsiaalse assotsiatsiooni võrrandile (võrrand I, lk 17).

0,48 nM ligandi kontsentratsioonil jõudis assotsiatsioonireaktsioon tasakaalu 40 minuti jooksul ($\tau_{1/2} = 7,1 \pm 0,3 \text{ min}$) ning järgneva 50 minuti jooksul ei toimunud tähelepanuväärset sidumise kasvu ega vähenemist (Joonis 4.).



Joonis 4. [³H]WAY 100635 assotsiatsioonikineetika roti hipokampuse membraanidele. Membraanpreparaati inkubeeriti 0.48 nM (○) [³H]WAY 100635-ga ning toodud ajahetkedel määrati spetsiifiliselt seostunud radioligandi hulk nagu on kirjeldatud *Meetodites*. B_t on ajahetkel t seostunud radioaktiivsus, B₀ on sidumine tasakaaluolekus.

Erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel mõõdetud näivatest assotsiatsioonikonstantide (k_{obs}) ning dissotsiatsiooni kiiruskonstandi sõltuvus ligandi kontsentratsioonist on toodud Joonisel 5. Madalatel ligandi kontsentratsioonidel iseloomustab seda sõltuvust kõige paremini sirge, millele vastab lihtne bimolekulaarne tasakaalureaktsioon, mille assotsiatsiooni iseloomustab:

$$k_{obs} = k_{+1} \times [L] + k_{-1} \quad (III)$$

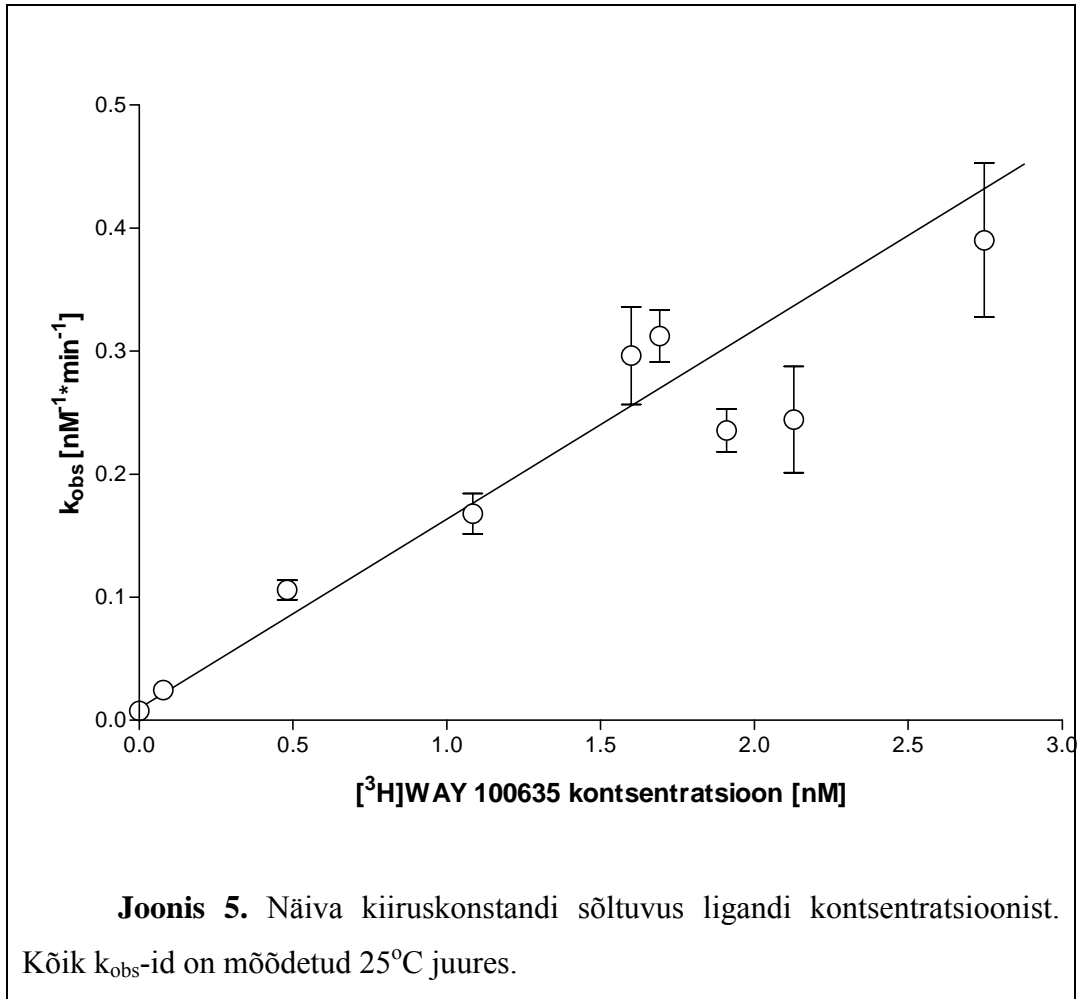
ja mis vastab järgnevale skeemile:



Selle reaktsiooni tasakaalukonstant on avaldatav:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R][L]}{[RL]}, \quad (V)$$

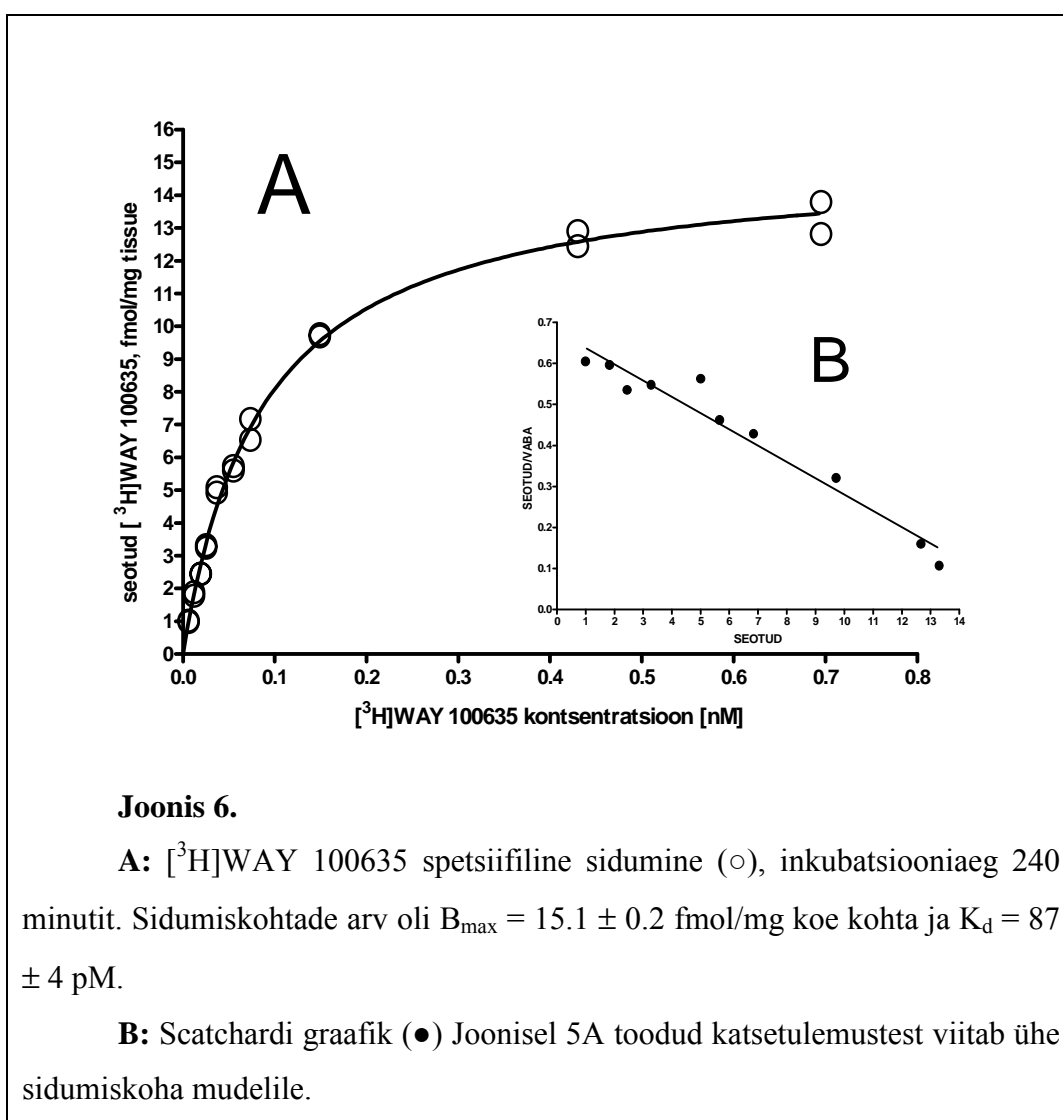
kus k_{-1} ja k_{+1} on selle reaktsiooni dissotsiatsiooni ja assotsiatsiooni kiiruskonstandid.



Lähtudes k_{obs} -ide andmetest leiti k_{+1} väärtuseks $0,16 \pm 0,02 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Sirge lõikumine y-teljega annab k_{-1} väärtuseks $(11 \pm 6) \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mis on heas kooskõlas dissotsiatsiooni kiiruskonstandiga, mis määrati otse katsest (Joonis 3.).

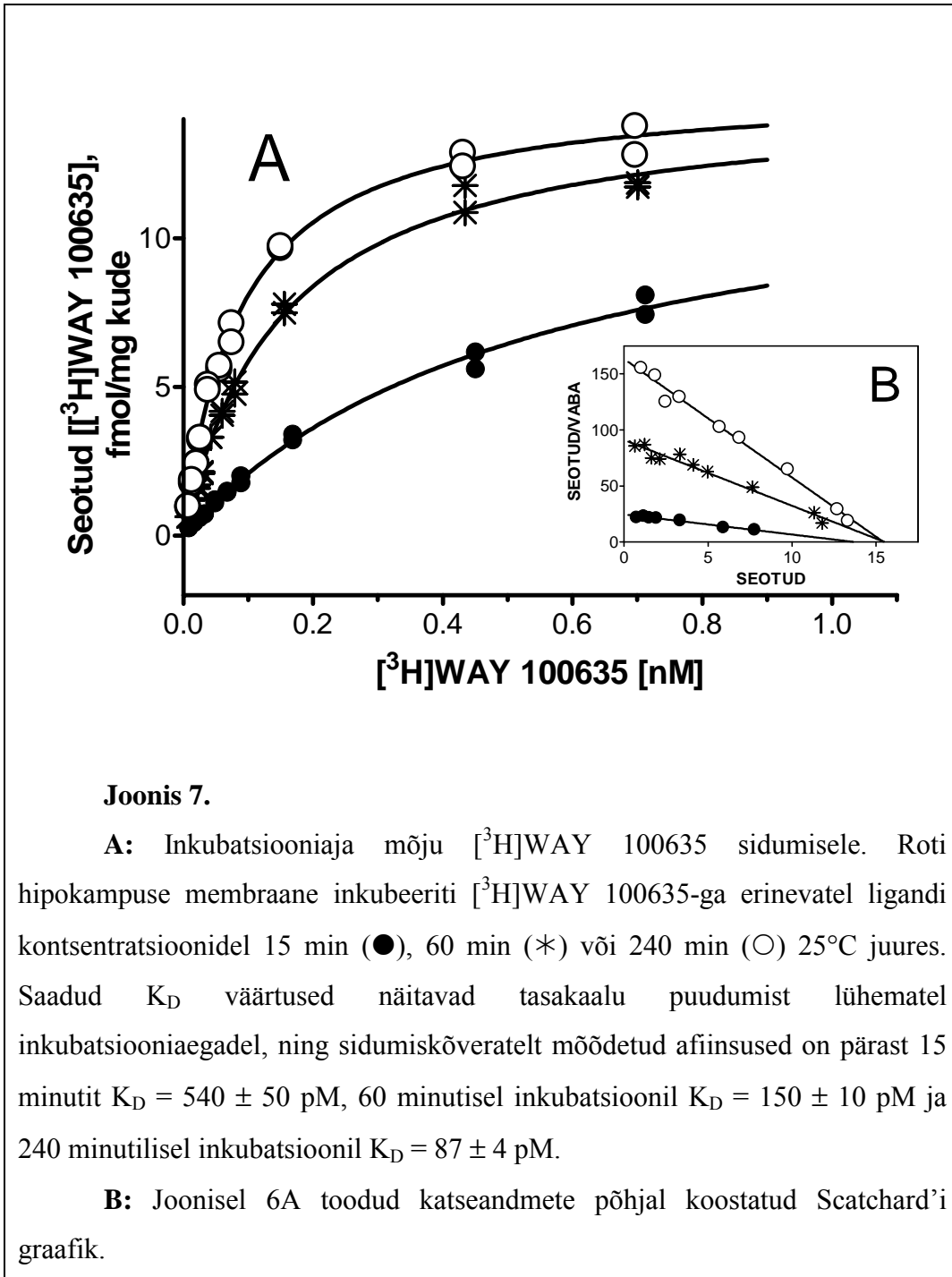
3.2 Tasakaaluline sidumine

[³H]WAY 100635 sidumine roti hipokampuse membraanidele oli spetsiifiline ja küllastuv. Scatchard'i graafik saadud katsetulemustest andis sirge, mis tähendab, et ligandi sidumine toimus ühele sidumiskohale. Samuti eelistas F-test ühe sidumiskoha mudelit võrdluses kahe sidumiskoha mudeliga. Sidumist iseloomustas afiinsus $K_D = 87 \pm 4$ pM ning sidumiskohtade arv $B_{\max} = 15,1 \pm 0,2$ fmol/mg koe kohta. Mõõdetud K_D on võrreldav reaktsiooni kiiruskonstantide kaudu arvatud K_D väärtusega, milleks oli 69 pM.



Ligandi aeglane dissotsiatsioonikineetika ($\tau_{1/2} = 89 \pm 11$ min) tingib pika inkubatsiooniaja nõude, mille kohaselt on reaktsiooni tasakaalu saabumine väga

pikaajaline protsess. Eespool toodud konstandid mõõdeti 240 minutisel inkubatsioonil 25°C juures. Pika inkubatsiooniaja nõuet toetavad ka katsetulemused, kus lühematel inkubatsiooniaegadel saadi näivad sidumiskonstandid, mis selgelt näitasid, et tasakaal süsteemis ei saabu 60 minutisel inkubeerimisel (Joonis 7.). Nii mõõdeti 15 minutisel inkubatsioonil ligandi afiinsuseks $K_D = 540 \pm 50$ pM ja 60 minutisel inkubatsioonil $K_D = 150 \pm 10$ pM.

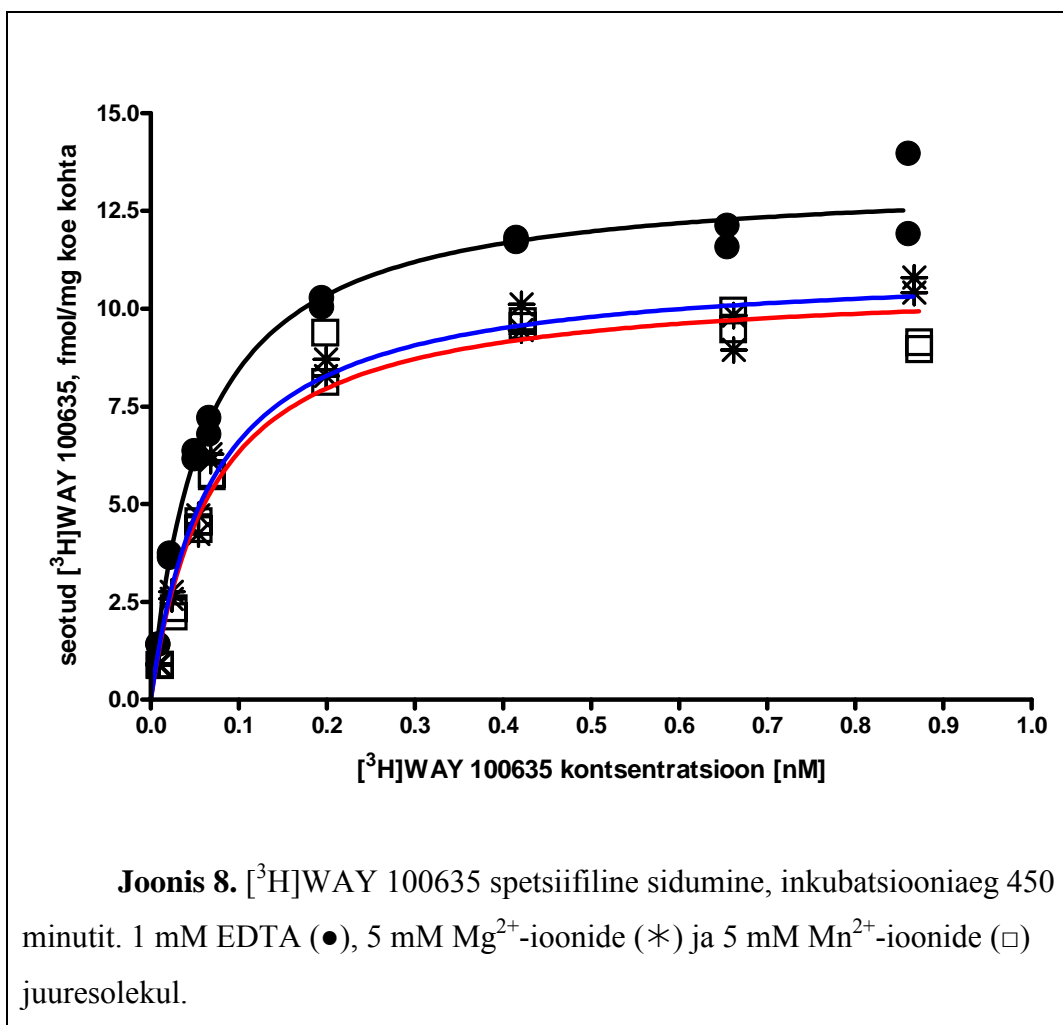


[³H]WAY 100635 aeglase kineetika võib olla üks põhjustest, miks selle ligandi puhul on sidumiskonstantide erinevus kirjanduse andmetel nii suur (vahemikus 56 pM [33] kuni 400 pM [31]). Radioligandi aeglase kineetika tõttu on ligandi affiinsuse määramine sidumiskatsetes problemaatiline. Esiteks on ligandi madalatel kontsentratsioonidel raske pseudo-monomolekulaarsete tingimuste hoidmine ($R \ll L$). Selle tulemusel hakkab reaktsioonimehhanism toimima teist järku reaktsiooni seaduspärasuste järgi ning arvestada tuleb ka ligandi vähenemist reaktsiooni käigus. Teiseks ei tohi inkubatsiooniaja jooksul toimuda retseptori inaktivatsiooni. Retseptori inaktivatsiooni mõõtmine näitas, et inaktivatsiooni poolestusaeg oli ligikaudu 27 tundi (inaktivatsiooni on eraldi käsitletud alapunktis 3.4). Pikkadel inkubatsiooniaegadel võib retseptori inaktivatsioon hakata segama tasakaalu püstitumist.

3.3 Ioonide mõju uurimine

Ioonidest uuriti Mn^{2+} ja Mg^{2+} mõju [³H]WAY 100635 sidumisele ja dissotsiatsioonikineetikale ning agonistide ja antagonistide võimet konkureerida [³H]WAY 100635 sidumisega vastavate ionide juuresolekul.

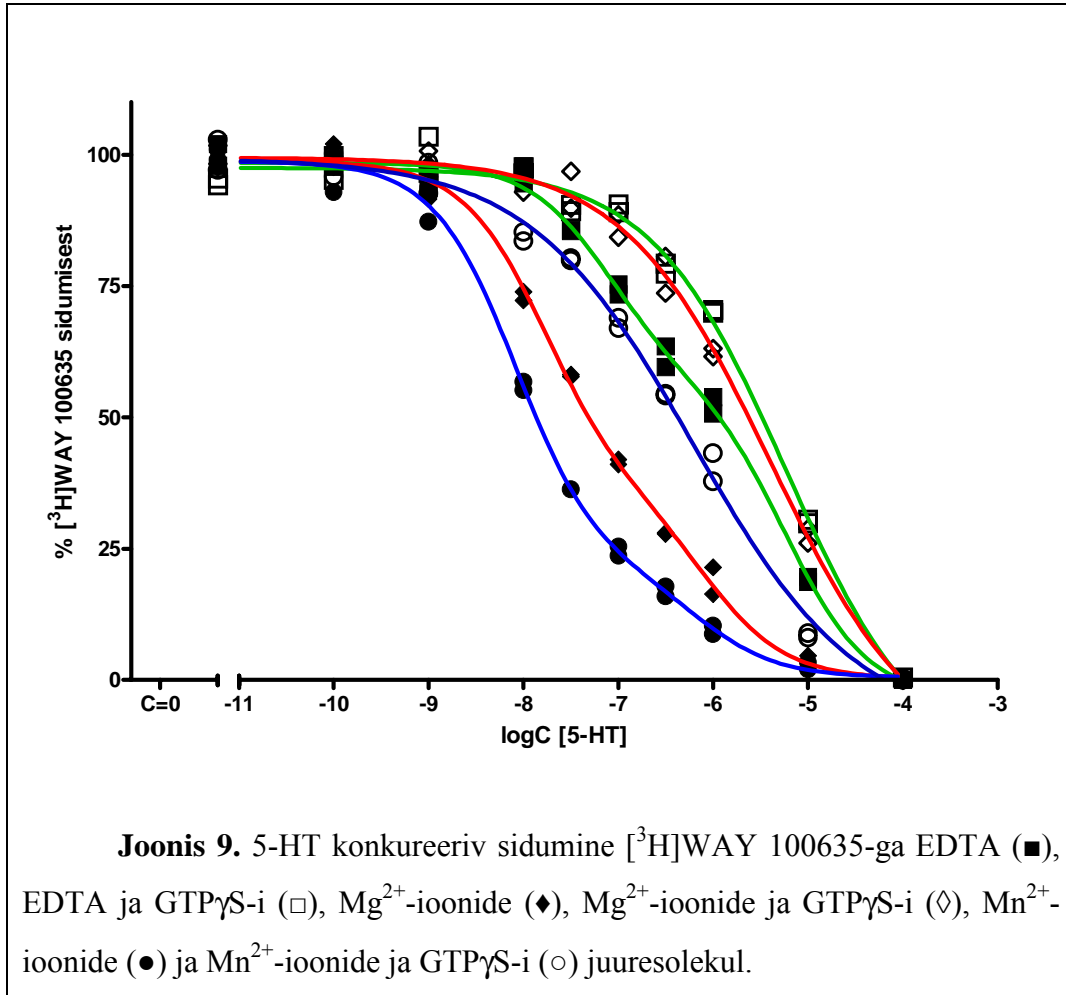
Ioonide mõju uurimisel tasakaalulisele sidumisele nähti ka varem kirjanduses täheldatud efekti, kus Mn^{2+} - ja Mg^{2+} -ioonid vähendasid kontsentratsioonist sõltuvalt radioligandi sidumiskohti. 450 minutisel inkubatsioonil saadi B_{max} 1 mM EDTA-ga inkubeerides $13,4 \pm 0,3$ fmol/mg koe kohta, 5 mM Mn^{2+} puhul $10,7 \pm 0,4$ fmol/mg koe kohta ja 5 mM Mg^{2+} -ioonidega inkubeerides $11,1 \pm 0,3$ fmol/mg koe kohta (Joonis 8.). Statistiline analüüs kolme katse alusel näitas, et ionid ei mõjutanud ligandi affiinsust ($p > 0,05$) ja keskmiseks väärtuseks saadi $K_D = 78 \pm 17$ pM, mis langeb hästi kokku ionideta mõõdetud K_D väärtusega ($K_D = 87 \pm 4$ pM).

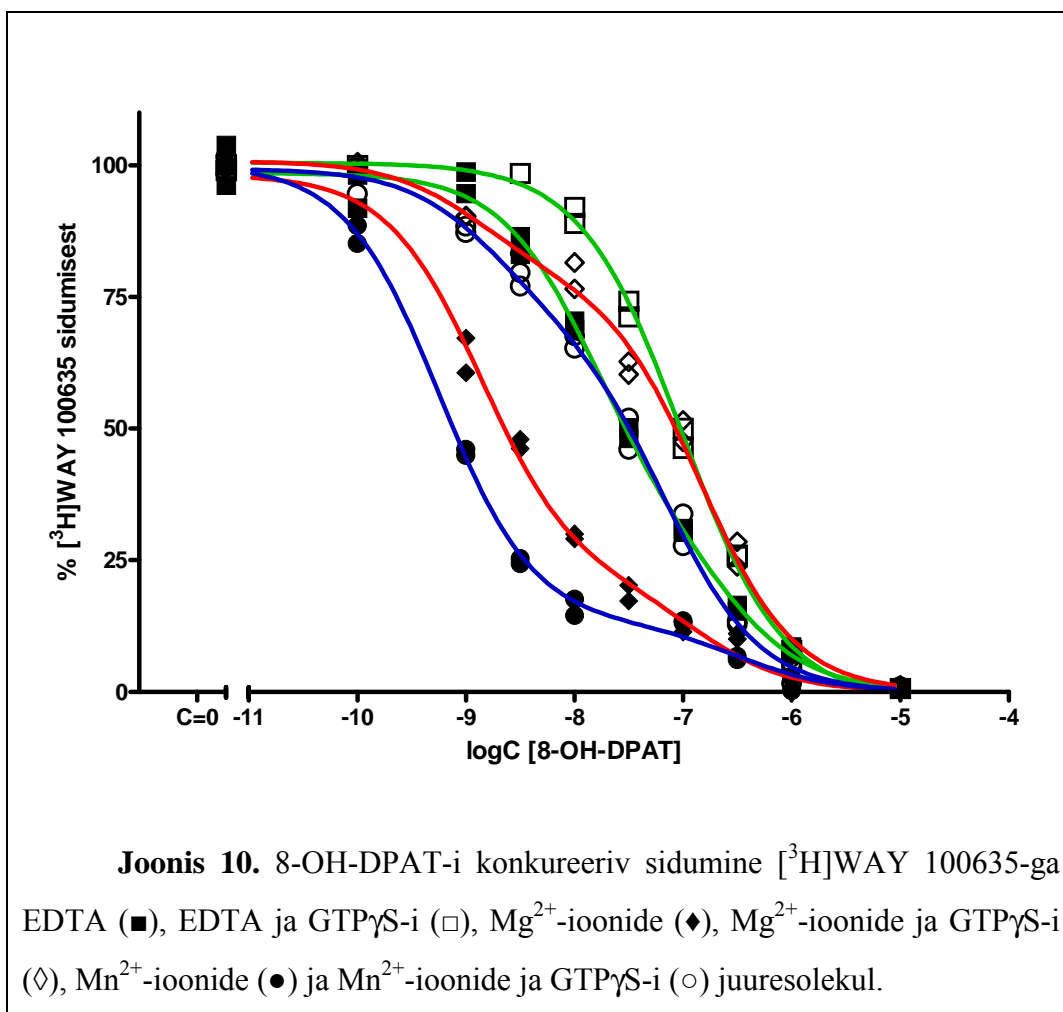


Uurides dissotsiatsioonikineetika sõltuvust EDTA-st, Mn²⁺ ja Mg²⁺-st saadi dissotsiatsiooni kiiruskonstantide väärtusteks 1 mM EDTA juuresolekul $0,008 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$, 5 mM MnCl₂-ga $0,006 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ja 5 mM MgCl₂-ga $0,011 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$, mis näitasid, et [³H]WAY 100635 dissotsiatsioon nendest ionidest oluliselt ei sõltu. Kõik mõõdetud dissotsiatsiooni kiiruskonstantide väärtused on omavahel heas korrelatsioonis, ning näitavad retseptor-ligand kompleksi dissotseerumise aeglust.

Konkureerival sidumisel nähti 5-HT_{1A}-spetsiifiliste ligandide võimet kontsentratsioonist sõltuvalt inhibeerida [³H]WAY 100635 sidumist. Uuriti Mn²⁺ ja Mg²⁺ mõju agonistide ja antagonistide konkureerivale sidumisele. Teadaolevalt on Mg²⁺-ioonid vajalikud retseptori kõrge afiinsusega oleku stabiliseerimiseks, Mn²⁺-ioonide võimet mõjutada agonisti sidumist on kirjeldatud ka varem [36]. Konkureeriv sidumine näitas, et mõlemad ionid on võimelised stabiliseerima agonisti kõrge afiinsusega sidumist. Mg²⁺-ga võrreldes

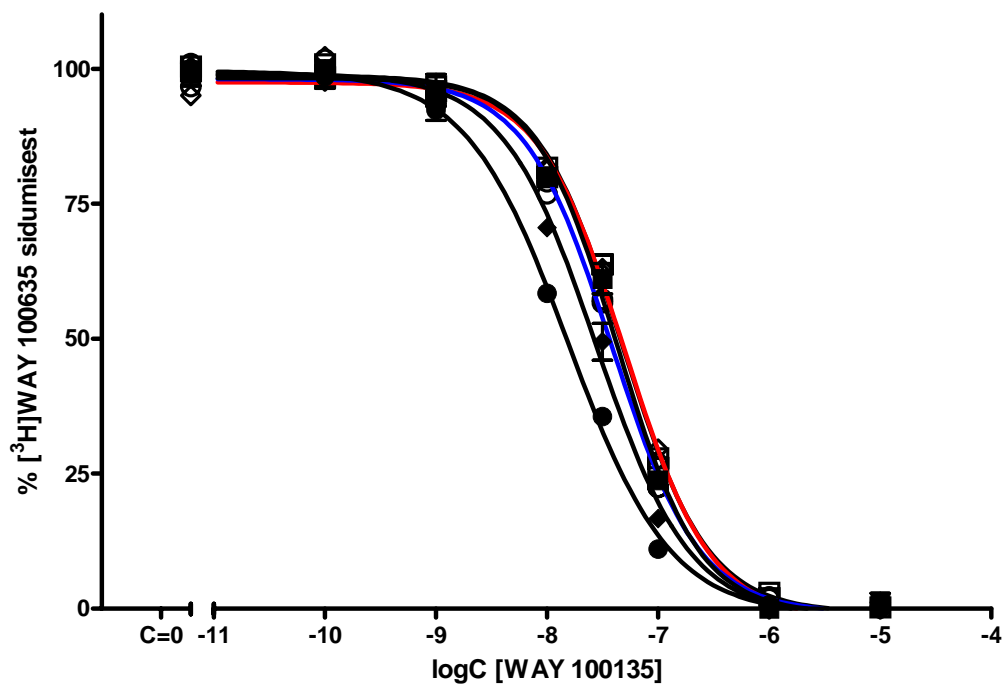
oli Mn^{2+} juuresolekul mõlema kasutatud agonisti (5-HT ja 8-OH-DPAT-i) afiinsus suurem ning rohkem oli ka kõrge afiinsusega sidumiskohti. 30 μM GTP γ S-i mõju agonisti sidumisele oli paremini nähtav Mg^{2+} -ga kui Mn^{2+} -ga.



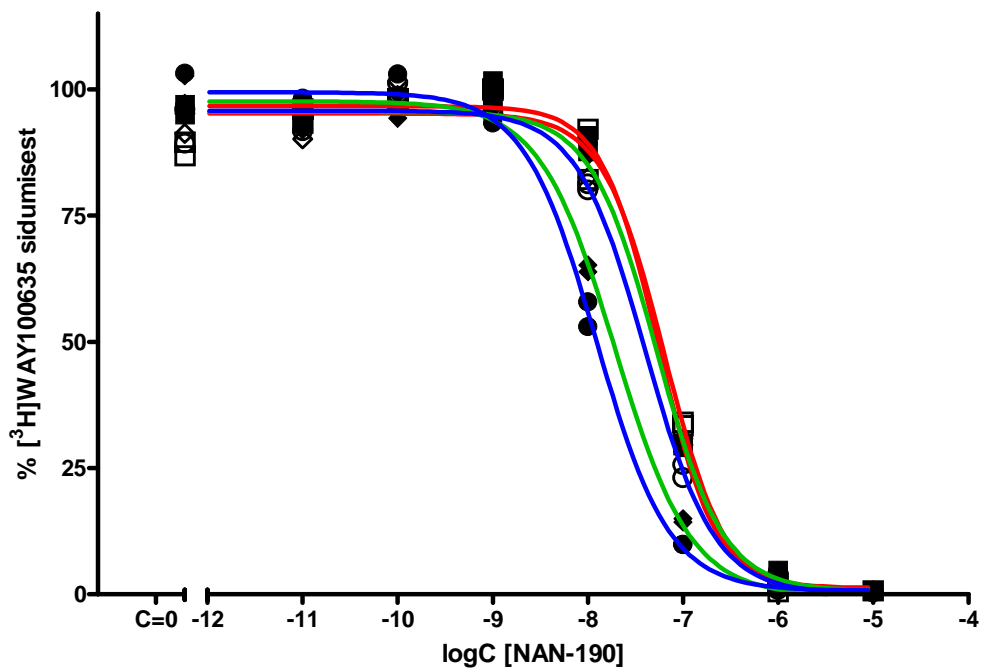


Mõlemad ioonid mõjutasid ka antagonistide WAY 100135 (Joonis 11) ja NAN-190 (Joonis 12) sidumist, põhjustades nende ligandide mõningase afiinsuse kasvu, mis kadus GTPγS-i juuresolekul. Lihtsaim seletus oleks nende ligandide käitumine osalise agonistina, mida on kirjeldatud ka varem [37, 38]. Kui WAY 100135 konkureeriva sidumise graafikutelt saadud Hilli koefitsendid on ühe sidumiskoha mudelile omaselt üsnagi 1 lähedal, siis NAN-190 konkureerival sidumisel saadi palju järsemad konkureeriva sidumise kõverad ning Hilli koefitsendi väärtused ulatusid 1,45-ni. Hilli koefitsendid, mis jäävad üle 1 võivad olla põhjustatud konkureeriva antagonisti positiivsest kooperatiivsusest või kineetika aeglusest.

Konkureeriva sidumise tulemused on kokku võetud Tabelis 3.



Joonis 11. WAY 100135 konkureeriv sidumine [³H]WAY 100635-ga EDTA (■), EDTA ja GTPγS-i (□), Mg²⁺-ioonide (◆), Mg²⁺-ioonide ja GTPγS-i (◇), Mn²⁺-ioonide (●) ja Mn²⁺-ioonide ja GTPγS-i (○) juuresolekul.



Joonis 12. NAN-190 konkureeriv sidumine [³H]WAY 100635-ga EDTA (■), EDTA ja GTPγS-i (□), Mg²⁺-ioonide (◆), Mg²⁺-ioonide ja GTPγS-i (◇), Mn²⁺-ioonide (●) ja Mn²⁺-ioonide ja GTPγS-i (○) juuresolekul.

Tabel 3. Konkureeriva sidumise tulemused 5-HT_{1A} retseptori spetsiifiliste ligandide ja [³H]WAY 100635 vahelisest konkureerivast sidumisest. 1 mM ioonide ja EDTA ning 30 µM GTPγS-i mõju.

Konkureerivast sidumisest mõõdetud 5-HT_{1A} ligandide afiinsused						
Ligand	K _i (high), nM	±SEM	K _i (low), nM	±SEM	%high ± SEM	Hilli koefitsent
5-HT						
EDTA	10,2	± 2,4	776	± 179	40 ± 3	0,49 ± 0,04
EDTA + GTPγS			759	± 219		0,60 ± 0,05
Mg ²⁺	2,1	± 0,4	110	± 42	63 ± 4	0,57 ± 0,04
Mg ²⁺ + GTPγS			525	± 136		0,56 ± 0,04
Mn ²⁺	1,1	± 0,2	93	± 35	79 ± 3	0,65 ± 0,5
Mn ²⁺ + GTPγS			79	± 13		0,50 ± 0,04
8-OH-DPAT						
EDTA	2,14	± 0,70	35	± 23	67 ± 11	0,75 ± 0,05
EDTA + GTPγS			15	± 1		0,93 ± 0,04
Mg ²⁺	0,21	± 0,03	21	± 12	78 ± 3	0,60 ± 0,04
Mg ²⁺ + GTPγS	0,20	± 0,16	22	± 3	22 ± 3	0,62 ± 0,06
Mn ²⁺	0,09	± 0,01	51	± 27	87 ± 2	0,81 ± 0,09
Mn ²⁺ + GTPγS	0,28	± 0,11	11	± 2	29 ± 4	0,64 ± 0,04
WAY100135						
EDTA	3,9	± 0,4				1,18 ± 0,10
EDTA + GTPγS	4,3	± 0,3				1,13 ± 0,07
Mg ²⁺	2,5	± 0,2				1,03 ± 0,08
Mg ²⁺ + GTPγS	4,6	± 0,3				1,13 ± 0,08
Mn ²⁺	1,4	± 0,1				0,95 ± 0,06
Mn ²⁺ + GTPγS	3,5	± 0,3				1,11 ± 0,07
NAN-190						
EDTA	6,8	± 1,0				1,45 ± 0,14
EDTA + GTPγS	7,9	± 1,4				1,34 ± 0,22
Mg ²⁺	2,5	± 0,2				1,09 ± 0,09
Mg ²⁺ + GTPγS	6,6	± 1,0				1,25 ± 0,13
Mn ²⁺	1,6	± 0,1				1,14 ± 0,12
Mn ²⁺ + GTPγS	5,1	± 0,6				1,20 ± 0,10

K_i väärtused arvatati konkureeriva sidumise graafikutelt vastavalt Cheng-Prusoffi valemile [39].

3.4 [³H]WAY 100635 sidumiskohtade stabiilsus

Retseptorite uurimisel on tähtis, et tema omadused ei muutuks reaktsiooni käigus. Arvestades, et [³H]WAY 100635 sidumine on aeglane (dissotsiatsiooni poolestusaeg 89 ± 11 min), tuleb vaadata, kas retseptor säilitab ligandide sidumise võime kogu inkubatsiooniperioodi jooksul.

Retseptori võime siduda [³H]WAY 100635 vähenes ajas seda oli võimalik kirjeldada I järku reaktsioonina, mille poolestusaeg oli 26 ± 5 tundi. Seega tuleb arvestada, et ligi 14% sidumiskohti võib inaktiveeruda 7,5-tunnise inkubatsiooniaja jooksul.

[³H]WAY 100635 sidumiskohtade kadu on oluliselt aeglasem kui [³H]-8-OH-DPAT-i sidumisvõime kadu (poolestusajaga 29 minutit) samades membraanides, kuid võrreldav muskariinse antagonistiga [³H]QNB sidumise kao (43 tundi) kiirusega [40]. Sellise erinevuse põhjuseks võib olla hoopis G-valgu inaktivatsioon. G-valgu inaktiveerudes läheb retseptor madala afiinsusega olekusse, ning ei ole agonistist radioligandi kasutataval kontsentratsioonil määratav.

Konkureeriva sidumise tulemused annavad alust arvata, et retseptori inaktivatsioon [³H]-8-OH-DPAT-i sidumisele võis olla põhjustatud G-valkude inaktivatsioonist ning retseptori pöördumisest madala afiinsusega olekusse. Konkureerival sidumisel inkubeeriti membraanpreparaati 120 minutit [³H]WAY 100635 ja eritevate 5-HT_{1A} spetsiifiliste ligandidega, sealhulgas ka 8-OH-DPAT-iga. Retseptori inaktivatsioon [³H]-8-OH-DPAT-i sidumisele toimus poolestusajaga 29 minutit, mis tähendab, et 120 minuti jooksul oleks pidanud üle 90% retseptoritest olema kaotanud võime siduda agonisti kõrge afiinsusega. Konkureerival sidumisel aga saadi kõrge affiinsusega retseptori osakaaluks 1 mM Mn²⁺ juuresolekul 87 ± 2 % ja 1 mM Mg²⁺ juuresolekul 78 ± 3 %. Siit ilmneb, et agonist käitub retseptor-G-valk kompleksi stabiliseerijana ja retseptori inaktivatsiooni mõõtmisel [³H]-8-OH-DPAT-iga nähti tõenäoliselt hoopis G-valkude inaktivatsiooni.

Kokkuvõte

[³H]WAY 100635 kineetika uurimine roti aju hipokampuse membraanidel näitas, et selle ligandi seostumine 5-HT_{1A} retseptoriga on spetsiifiline, aeglane ja pöörduv protsess. [³H]WAY 100635 dissotsiatsioonikiirust ligand-retseptor kompleksist iseloomustas poolestusaeg 89 ± 11 minutit. Dissotsiatsioonikineetika näitab, et tasakaal saabub 5-HT_{1A} retseptorite ja [³H]WAY 100635 vahel väga aeglaselt ning seda tuleb arvestada sidumiskatse planeerimisel.

Sidumiskatsetest ilmneb, et ligandi K_D jääb alla 100 pM, kuid [³H]WAY 100635 afiinsuse täpsem määramine problemaatiline, sest aeglase kineetika tõttu pole tõeline tasakaal radioligandi K_D -lähedastel kontsentratsioonidel praktiliselt saavutatav.

Samas on [³H]WAY 100635 väga kõrge afiinsuse ja aeglase dissotsiatsiooni tõttu suurepärase vahend 5-HT_{1A} retseptorite sidumiskohtade kontsentratsiooni määramiseks ning kasutatav konkureeriva sidumise katsetes teiste ligandide afiinsuste uurimisel.

Summary

We have characterized the binding of [³H][N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide ([³H]WAY 100635) to 5-HT_{1A} receptors in rat hippocampal membranes. Saturation experiments showed that [³H]WAY 100635 binds to a single class of binding sites with very high affinity ($K_D = 87 \pm 4$ pM, $B_{\max} = 15.1 \pm 0.2$ fmol/mg protein). The binding of [³H]WAY 100635 was reversible, but slow. The dissociation of [³H]WAY 100635 from its complex with 5-HT_{1A} receptors was characterized with the $k_{\text{off}} = (7.8 \pm 1.1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, which means that equilibrium at low concentrations of the radioligand cannot be achieved before 7,5 hours incubation at 25°C. Obtained data indicate that [³H]WAY 100635 is valuable tool for the determination of number of 5-HT_{1A} receptor binding sites, but the determination of its affinity is complicated as it hardly reaches equilibrium at concentrations close to its K_D .

Kasutatud kirjandus:

- 1 Gilbert F., Dourish C. T., Brazell C., McClue S., Stahl S. M., (1988) Relationship of increased food intake and plasma ACTH levels to 5-HT_{1A} receptor activation in rats, *Psychoneuroendocrinology* 13:471-478
- 2 Seletti B., Benkelfat C., Blier P., Annable L., Gilbert F., de Montigny C., (1995) Serotonin_{1A} receptor activation by flesinoxan in humans. Body temperature and neuroendocrine responses, *Neuropsychopharmacology*, 13:93-104
- 3 Maswood N., Caldarola-Pastuszka M., Uphouse L., (1998) Functional integration among 5-hydroxytryptamine receptor families in the control of female rat sexual behavior, *Brain Res.*, 802:98-103
- 4 Miczek K. A., Hussain S., Faccidomo S., (1998) Alcoholheightened aggression in mice: attenuation by 5-HT_{1A} receptor agonists, *Psychopharmacology*, 139:160-168
- 5 Edagawa Y., Saito H., Abe K., (1998) 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex, *Eur. J. Pharmacol.*, 349:221-224
- 6 Blier P., Bergeron R., de Montigny C., (1997) Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response, *Neuropsychopharmacology*, 16:333-338.
- 7 The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, 2nd Edition, 2000
- 8 Fujiwara Y., Nelson D. L., Kashihara K., Varga E., Roeske W. R., Yamamura H. I., (1990) The cloning and sequence analyses of the rat serotonin-1A receptor gene, *Life Sci*, 47:949-958

- 9 Dohlman H. G., Caron M. G., Deblasi A., Frielle T., Lefkowitz R. J., (1990) A role of extracellular disulfided bonded cysteines in the ligand binding function of the β_2 adrenergic receptor, *Biochemistry*, 29:2335-2342
- 10 Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gettys, T. W., Garnovskaya M. N., (1999) The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways, *British Journal of Pharmacology*, 127:1751-1764
- 11 de Vivo M., Maayani S., (1986) Characterization of 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238:248-253
- 12 Andrade R., Nicoll R. A., (1986) Pharmacological distribution of serotonin receptors on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro, *J. Physiol.*, 394:99-124
- 13 Fargin A., Raymond J. R., Regan J. W., Cotecchia S., Lefkowitz R. J., Caron M. G., (1989) Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor, *J. Biol. Chem.*, 264:14848-14852
- 14 Berridge M. J., Bootman M. D., Lipp P., (1998) Calcium – A life and death signal, *Nature*, 395:645-65813
- 15 Middleton J. P., Raymond J. R., Whorton A. R., Dennis V. W., (1990) Short-term regulation of Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase by recombinant human serotonin 5-HT_{1A} receptor expressed in HeLa cells, *J. Clin. Invest.*, 86:1799-1805
- 16 Doupnik C. A., Dessauer C. W., Slepak V. Z., Gilman A. G., Davidson N., Lester H. A., (1996) Time resolved kinetics of direct G β_1/γ_2 interactions with the carboxyl terminus of Kir3.4 inward rectifier K⁺ channel subunits, *Neuropharmacology*, 35: 923-931
- 17 Raymond J. R., Fargin A., Middleton J P., Graff J. M., Haupt D. M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Dennis V. W. (1989) The human 5-HT_{1A}

receptor expressed in HeLa cells stimulates sodium-dependent phosphate uptake via protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, 264:21943-21950

18 Butkerait P., Zheng Y., Hallak H., Graham T. E., Miller H. A., Burriss K. D., Molinoff P. D., Manning D. R., (1995) Expression of the human 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor in Sf9 cells. Reconstitution of a coupled phenotype by co-expression of mammalian G protein subunits, *J. Biol. Chem.*, 270:18691-18699

19 Abdel-Baset H., Bozovick V., Szyf M., Albert P. R., (1992) Conditional transformation mediated via a pertussis toxin-sensitive receptor signalling pathway, *Mol. Endo.*, 6:730-740

20 Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L., (1971) The glucagon-sensitive adenylyl-cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Binding of glucagons: effect of guanyl nucleotides. *J. Biol. Chem* 246:1872-1876

21 Hann V., Chazot P. L., (2004) G proteins, *Current anaesthesia & critical care* 15:79-81.

22 Gilman A. G., (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 615-649

23 Fields T. A., Linder M. E., Casey P. J., (1994) Subtype-specific binding of azidoanilido-GTP by purified G protein α -subunits. *Biochemistry* 33:6877-6883

24 Laugwitz K. L., Spicher K., Schultz G., Offermanns S., (1994) Identification of receptor-activated G proteinis: selective immunoprecipitation of photolabeled G protein α -subunits. *Methods Enzymol* 237: 283 294.

25 Hille B., (1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling, *Neuron*, 9:187-195.

- 26 Hargrave P. A., hamm H. E., Hofmann K. P., (1993) Interaction of rhodopsin with the G protein, transducin. *Bioessays* 15:43-50.
- 27 Offermanns S., (2003), G proteins as transducers in transmembrane signaling, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 83:101-130.
- 28 Gozlan H, el Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: ³H-PAT. *Nature* 1983; 305:140-142.
- 29 Gozlan, H., Thibault, S., Laporte, A-M., Lima, L., Hamon, M. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes, *European Journal of Pharmacology*, 1994
- 30 Laporte, A-M., Lima, L., Gozlan, H., Hamon, M. Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [³H]WAY 100635 in the mouse. *European Journal of Pharmacology*, 1994
- 31 Khawaja, X., Evans, N., Reilly, Y., Ennis, C., Minchin, M. C. W., Characterization of the Binding of [³H]WAY-100635 a Novel 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptor Antagonist, to Rat Brain, *Journal of Neurochemistry*, 1995
- 32 Jerning, E., Svantesson, G. T., Mohell, N., Receptor binding characteristics of [³H]NAD-299, a new selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, *European Journal of Pharmacology*, 1998
- 33 Newman-Tancredi, A., Verri le, L., Millan, M. J., Differential modulation by GTPγS of agonist and inverse agonist binding to h5-HT_{1A} receptors revealed by [³H]-WAY100,635, *British Journal of Pharmacology* 2001
- 34 Khawaja, X., Ennis, C., Minchin, M. C. W., Pharmacological characterization of recombinant human 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors using a novel antagonist radioligand, [³H]WAY 100635, *Life Sciences*, 1997

- 35 Newman-Tancredi, A., Verri le, L., Touzard, M., Millan, M. J., Efficacy of antipsychotic agents at human 5-HT_{1A} receptors determined by [³H]WAY 100635 binding affinity ratios: relationship to efficacy for G-protein activation, *European Journal of Pharmacology*, 2001
- 36 Arro, A., Uustare, A., Harro, J., Rinken, A., Modulation of [³H]-8-OH-DPAT binding to rat brain membranes by metal ions, *Estonian Acad. Sci. Chem.*, 2001
- 37 Stanton JA, Beer MS. Characterisation of a cloned human 5-HT_{1A} receptor cell line using [³⁵S]GTPγS binding. *Eur J Pharmacol* 1997; 320:267-275.
- 38 Pou C, Nenonene EK, Reader TA, Fargin A. (1997) The human 5-HT_{1A} receptor: comparison of its binding properties in transfected cells and cortical tissue. *Gen Pharmacol*; 29:737-747.
- 39 Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22:3099-3108.
- 40 Rinken AA, Langel  L, T hep ld LJ, J rv JL. Kinetics of the inactivation of the muscarine cholinoreceptor, solubilized by digitonin. *Biochemistry (Moscow)* 1984; 49:1533-1537

**Kinetics of [³H]WAY100635 binding to 5-HT_{1A} receptors in rat
hippocampal membranes.**

Sven Parkel, Ago Rinke^{*}

*Institute of Organic and Bioorganic Chemistry, University of Tartu, Jakobi
Str. 2, EE-51014 Tartu, Estonia*

*** Corresponding author:** Ago Rinke
Institute of Organic and Bioorganic Chemistry
University of Tartu
Jakobi Str. 2
EE-51014 Tartu
ESTONIA
Phone: +372 7 375 249
Fax: +372 7 375 260
E-mail: ago@ut.ee

Abstract

We have characterized the binding of [³H][N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide ([³H]WAY100635) to 5-HT_{1A} receptors in rat hippocampal membranes. Saturation experiments showed that [³H]WAY100635 binds to a single class of binding sites with very high affinity ($K_D = 87 \pm 4$ pM, $B_{max} = 15.1 \pm 0.2$ fmol/mg protein). The binding of [³H]WAY100635 was reversible, but slow. The dissociation of [³H]WAY100635 from its complex with 5-HT_{1A} receptors was characterized with the $k_{off} = (7.8 \pm 1.1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, which means that equilibrium at low concentrations of the radioligand cannot be achieved before 7 hours incubation at 25°C. Obtained data indicate that [³H]WAY100635 is valuable tool for the determination of number of 5-HT_{1A} receptor binding sites, but the determination of its affinity is complicated as it hardly reaches equilibrium at concentrations close to its K_D .

Keywords: [³H]WAY100635, 5-HT_{1A}-receptor, equilibrium, kinetics, affinity, rat hippocampus

Kokkuvõte

Serotoniini 1A retseptorite spetsiifilise radioligandi [³H]WAY100635 kineetika uurimine roti aju hippokampuse membraanidel näitas, et selle ligandi seostumine 5-HT_{1A} retseptoriga on spetsiifiline, aeglane ja pöörduv protsess. Väga kõrge afiinsuse ja aeglase dissotsiatsiooni tõttu on [³H]WAY100635 suurepärase vahend 5-HT_{1A} retseptorite sidumiskohtade kontsentratsiooni määramiseks ning kasutatav konkureeriva sidumise katsetes teiste ligandide afiinsuste uurimisel. Samas on [³H]WAY100635 afiinsuse määramine problemaatiline, sest aeglase sidumiskiiruse tõttu pole tõeline tasakaal radioligandi K_D-lähedastel kontsentratsioonidel praktiliselt saavutatav.

Introduction

The 5-HT_{1A} (serotonin_{1A}) receptor is member of the family of serotonin (5-HT) receptors, which belong to superfamily of seven-transmembrane spanning G protein-coupled receptors [1]. The 5-HT_{1A} receptor system has been implicated in a variety of physiological functions and behaviors, including mood (anxiety and depression) [2], learning, memory, sexual behavior and feeding [3]. Therefore the 5-HT_{1A} receptors have become important targets for various psychotherapeutic drugs and an attractive object in screenings for the highly selective ligands. For the long time the tritiated derivative of 8-hydroxy-2-(n-dipropylamino)tetraline ([³H]-8-OH-DPAT) [4] was the only commercially available specific radioligand for the characterization of 5-HT_{1A} receptors. Over the last years couple of new radioactive antagonists have been proposed: [³H][(R)-3-N, N-dicyclobutylamino-8-fluoro-3, 4-dihydro-2H-1-benzopyran-5-carboxamide hydrogen (2R, 3R) tartrate monohydrate ([³H]NAD-299 [5]) and [³H][N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl)-cyclohexane-carboxamide ([³H]WAY100635 [6]). For now, [³H]WAY100635 has become commercially available and has been found to be an useful tool for pharmacological experiments in membrane preparations [7] as well as in brain sections [8]. However, only limited information is available about the kinetic aspects of binding of [³H]WAY100635 to 5-HT_{1A} receptors [6,9]. In the present study we have used kinetic approach for characterization of the interactions of [³H]WAY100635 with the 5-HT_{1A} receptors in rat hippocampal membranes. The results indicate that [³H]WAY100635 is a valuable tool for the determination of the number of 5-HT_{1A} receptor binding sites, but the very slow binding seriously complicates the correct determination of the binding affinity of the radioligand.

Methods

Hippocampi from Wistar rats were homogenized in 30 vol (ww/v) of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) by Bandelin Sonoplus sonicator (2 passes, á 10 sec), incubated for 30 minutes at room temperature and centrifuged at 43,000 g for 20 minutes at 4°C. The membrane pellet was washed by re-suspending in 50 mM Tris-HCl buffer and centrifugation for two more times. The final pellet was re-suspended in 30 vol (ww/v) of the buffer and stored at -80°C until use.

In saturation binding experiments the suspension of hippocampal membranes (100 µg/ml) in the incubation buffer, containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumine) was incubated with different concentrations (0.009 – 0.75 nM) of [³H]WAY100635 (81 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech UK Limited) at 25°C for appropriate time. The reaction was terminated and bound radioactivity was separated from free by rapid filtration through Whatman GF/B glass microfibre filter by washing 3 times with 3 ml of 20 mM K-phosphate-buffer (pH=7.4) containing 100 mM NaCl. The radioactivity content of the filters was counted in 5 ml of scintillation cocktail OptiPhase HiSafe[®]3 (Wallac Perkin Elmer Life Sciences) by Beckman LS 1800 scintillation counter [10]. The specific binding was determined as the difference between total and non-specific binding, measured in the absence and presence of 10 µM WAY100135 or 8-OH-DPAT respectively. Displacement studies were performed the same way, including 0.5-0.9 nM [³H]WAY100635 and appropriate concentrations of non-labeled ligands.

Association kinetic experiments were started by addition of [³H]WAY100635 (final concentration from 0.08 – 4.5 nM) to a membrane suspension in the incubation buffer. At time intervals aliquots (200 – 1000 µl depending on radioligand concentration) were taken and filtered on GF/B as described above. Parallel incubations with corresponding concentration of [³H]WAY100635 and 10 µM 5-HT or WAY100135 were used to estimate non-specific binding.

Dissociation kinetics were measured after preincubation of membranes with 0.5 nM [³H]WAY100635 for 60 min at 25°C. Dissociation was then initiated by addition of non-labelled 5-HT (28 µM final concentration) and at timed intervals aliquots (200 µl) were filtered on GF/B and the bound radioactivity was determined as described above.

All data were analyzed by means of non-linear least squares regression method as described in [11] using a commercial program GraphPad PRISM™ (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data are presented as mean ± SEM of at least two independent determinations carried out in duplicates. Statistical significance of differences was determined by Student-Newman-Keuls test, where $P < 0.05$ was taken as a criterion of significance.

Results and Discussion

The kinetic curves of [³H]WAY100635 binding to rat hippocampal membranes were measured under the excess of radioligand over the receptor concentration. The association of [³H]WAY100635 was well described by the exponential function for the first-order reactions and observed rate constants (k_{obs}) were obtained at different radioligand concentrations as described earlier [11]. At 0.48 nM of the radioligand the steady-state was achieved within 40 minutes, ($\tau_{1/2} = 7.1 \pm 0.3$ min., Fig. 1) and no additional binding was found during the prolonged incubation time up to 120 min. Increasing the concentration of the radioligand caused proportional increase of the association rate, which reached the half life of $\tau_{1/2} = 2.2 \pm 0.2$ min at 3.0 nM of [³H]WAY100635 (Fig. 1 open symbols). The analysis of the dependence of the observed association rate constants on the radioligand concentration according the simple bimolecular reversible ligand binding model revealed the second order rate constant $k_1 = 0.16 \pm 0.02$ nM⁻¹min⁻¹.

The dissociation of [³H]WAY100635 from its complex with 5-HT_{1A} receptors in hippocampal membranes was complete and the equation of the one phase exponential decay revealed a rate constant $k_{\text{off}} = (7.8 \pm 1.1) \times 10^{-3}$ min⁻¹, which corresponds to the half time of the dissociation to be $\tau_{1/2} = 89 \pm 11$ min (Fig. 2). The monophasic exponential decay model was preferred by the F-test in comparison with the two phase exponential decay ($P > 0.05$) in analysis of the dissociation data. The obtained k_{off} value in these experiments was in the agreement with the $k_{-1} = (11 \pm 6) \times 10^{-3}$ min⁻¹ calculated from the intercept of the k_{obs} versus [A] plot. Obtained data indicate that the complete dissociation of the radioligand was achieved after at least 7.5 hours incubation.

In the saturation binding experiments the binding of [³H]WAY100635 to rat hippocampal membranes was specific and saturable and was characterized with affinity $K_D = 87 \pm 4$ pM and with the number of the specific binding sites $B_{max} = 15.1 \pm 0.2$ fmol/mg protein (Fig. 3 open symbols). The Scatchard plot of these data revealed a straight line and the single-site binding model was preferred also by the F-test in comparison with the two binding site receptor model ($P < 0.05$, Fig. 3 inset). Obtained affinity constant was in general agreement with the constant $K_D = k_{-1}/k_1 = 69$ pM, calculated from the rate constants of the simple reversible reaction. The binding studies with [³H]WAY100635 were carried out in the incubation buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.1 mg/ml BSA, which was found to be optimal for the high-affinity binding of the radioligand. The presence of at least 3 mM of Mg^{2+} is usually required for effective coupling of heptahelix receptors with G proteins [12,13], but for the [³H]WAY100635 binding had $MgCl_2$ a concentration dependent inhibitory effect. Thus, in the presence of 5 mM Mg^{2+} the binding was characterized with affinity $K_D = 85 \pm 8$ pM and number of the specific binding sites $B_{max} = 11.1 \pm 0.3$ fmol/mg protein (74 % of the control).

Kinetic data indicate that at least 7 hours incubation is required to achieve equilibrium at all [³H]WAY100635 concentrations. Shorter incubation times reveal steady state binding only at higher radioligand concentrations and allowed correct estimation of the number of specific binding sites, but leads to underestimation of the binding affinity. Thus, incubation of the reaction medium for 15 min gave $K_D = 540 \pm 50$ pM, while after 60 min incubation the affinity was $K_D = 150 \pm 10$ pM and after 240 minutes $K_D = 87 \pm 4$ pM (Fig 3). Slow kinetics of the [³H]WAY100635 binding might explain the large discrepancy between the previously determined dissociation constants (56 pM [9] and 400 pM [14]). However, it is quite complicated to overcome the problem of slow kinetics in experiments with [³H]WAY100635, as we here meet the limits of the method of radioligand binding. First, very high affinity of that radioligand complicates maintenance the pseudo-first-order reaction conditions ($[R] \ll [L]$) at low concentrations. The reaction will start following the regularities of the second order reaction kinetics, where in addition to decrease of receptor concentration also the decrease of the free radioligand concentration during the

reaction must be accounted for. Secondly, the receptors have to remain intact during the incubation time. The hippocampal membranes used in our experiments were quite stable losing the [³H]WAY100635 binding ability with a half life 27 hours (data not shown), which means that within 7.5 hours incubation no more than 14 % of the binding sites were lost. This kind of high stability for antagonist binding has been also found for other heptahelix G-protein-coupled receptors [11,15]. In contrast, the high-affinity agonist binding is much more labile [16,17] and it is shown that in rat hippocampal membranes the half-life of disappearance of binding sites of [³H]-8-OH-DPAT at 25°C is 29 minutes [16], indicating that an essential part of the high-affinity agonist binding sites may be lost in our experiments, as the displacement experiments were carried out with incubation period 120 min.

We have found that all studied serotonergic ligands were able to displace [³H]WAY100635 binding in concentration-dependent manner and with affinities which are generally in agreement with earlier reported data for 5-HT_{1A} receptors [14,18-20] (Table 1). Here we saw that Mg²⁺ is required for high-affinity agonist binding and activation of G proteins since 30 μM guanosine-5'-O-(γ-thio)triphosphate (GTPγS) turned the receptors into low-affinity state (Table 1). Slight influence of GTPγS in the presence of Mg²⁺ was also found in the displacement curves of antagonists WAY 100135 and NAN 190, which indicates that binding sites of these ligands are affected by the coupling of G protein and they possess some partial agonist properties as it is proposed also earlier [21,22]. Good agreement of obtained data with previously reported data indicates that usage of [³H]WAY100635 seems to be very reasonable for estimation of affinities of various compounds in the displacement experiments. But it must be kept in mind, that if the binding rate of competitive ligand is comparative with [³H]WAY100635 binding, overshoot of the radioligand takes part, which may lead to underestimation of the competitors affinity [23].

In summary, the kinetic analysis gives evidences that the [³H]WAY100635 interactions with 5-HT_{1A} receptors is a specific, slow and reversible process. Very high affinity and slow dissociation rate makes it a very valuable tool for the determination of number of 5-HT_{1A} receptor binding sites,

and allows its application as a reporter ligand in competition experiments. However, the correct determination of affinity of [³H]WAY100635 is complicated, as due to slow binding rate and high affinity it hardly reaches equilibrium at concentrations close to its K_D. Therefore, application of [³H]WAY100635 for assays of 5-HT_{1A} receptor binding properties has several limitations, which should be taken into consideration when planning experiments with this radioligand and when interpreting obtained data.

Acknowledgements

This work was supported by Estonian Science Foundation Grant 4603.

Table 1. Affinities of serotonergic ligands in displacement of [³H]WAY100635 in rat hippocampal membranes. The influence of Mg²⁺ and GTPγS.

Ligand	Control		+ 30 μM GTPγS	
	K _i ^{HIGH} , K _i ^{LOW} (nM)	α _{HIGH}	K _i ^{HIGH} , K _i ^{LOW} (nM)	α _{HIGH}
5-HT				
EDTA	10 ± 2 780 ± 180	0.40±0.03	758 ± 219	- ^b
5mM Mg ²⁺	2.1 ± 0.4 110 ± 42	0.63±0.04	525±136	- ^b
8-OH-DPAT				
EDTA	2.1 ± 0.7 35 ± 23	0.67±0.11	15 ± 1	- ^b
5 mM Mg ²⁺	0.21 ± 0.03 22 ± 12	0.78±0.03	0.2 ± 0.1 22 ± 3	0.22±0.03
WAY 100135				
EDTA	3.9 ± 0.4	- ^b	4.3 ± 0.3	- ^b
5 mM Mg ²⁺	2.5 ± 0.2	- ^b	4.6 ± 0.3	- ^b
NAN-190				
EDTA	6.8 ± 1.0	- ^b	7.9 ± 1.4	- ^b
5 mM Mg ²⁺	2.5 ± 0.2	- ^b	6.7 ± 1.0	- ^b

^a K_i values were calculated from displacement curves against 0.8 nM [³H]WAY100635 using the equations of Chen-Prusoff [24].

^b the single-site binding model was preferred (P<0.05)

References

1. Martin GR. 5-Hydroxytryptamine receptors. In The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. London: IUPHAR Media; 1998. pp. 167-185.
2. Harro J, Oreland L. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Rev* 2001; 38:79-128.
3. Zifa E, Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol Rev* 1992; 44:401-458.
4. Gozlan H, el Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: ³H-PAT. *Nature* 1983; 305:140-142.
5. Jerning E, Svantesson GT, Mohell N. Receptor binding characteristics of [³H]NAD-299, a new selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1998; 360:219-225.
6. Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 1995; 288:173-186.
7. Newman-Tancredi A, Verrielle L, Touzard M, Millan MJ. Efficacy of antipsychotic agents at human 5-HT_{1A} receptors determined by [³H]WAY100,635 binding affinity ratios: relationship to efficacy for G-protein activation. *Eur J Pharmacol* 2001; 428:177-184.

8. Castro ME, Harrison PJ, Pazos A, Sharp T. Affinity of (\pm)-pindolol, (-)-penbutolol, and (-)-tertatolol for pre- and postsynaptic serotonin 5-HT_{1A} receptors in human and rat brain. *J Neurochem* 2000; 75:755-762.
9. Newman-Tancredi A, Verri le L, Millan MJ. Differential modulation by GTP γ S of agonist and inverse agonist binding to h5-HT_{1A} receptors revealed by [³H]-WAY100,635. *Br J Pharmacol* 2001; 132:518-524.
10. Uustare A, Nasman J, Akerman KE, Rincken A. Characterization of M2 muscarinic receptor activation of different G protein subtypes. *Neurochem Int* 2004; 44:119-124.
11. Lepiku M, Rincken A, J rv J, Fuxe K. Kinetic evidence for isomerization of the dopamine receptor-raclopride complex. *Neurochem Int* 1996; 28:591-595.
12. Rincken A. Formation of the functional complexes of m2 muscarinic acetylcholine receptors with GTP-binding regulatory proteins in solution. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 120:193-200.
13. Slepak VZ, Quick MW, Aragay AM, Davidson N, Lester HA, Simon MI. Random mutagenesis of G-protein alpha subunit G_o α . Mutations altering nucleotide binding. *J Biol Chem* 1993; 268:21889-21894.
14. Khawaja X, Evans N, Reilly Y, Ennis C, Minchin MCW. Characterisation of the binding of [³H]WAY-100635, a novel 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, to rat brain. *J Neurochem* 1995; 64:2716-2726.
15. Rincken AA, Langel  L, T hep ld LJ, J rv JL. Kinetics of the inactivation of the muscarine cholinoreceptor, solubilized by digitonin. *Biochemistry (Moscow)* 1984; 49:1533-1537.

16. Arro A, Uustare A, Harro J, Rinken A. Modulation of [³H]-8-OH-DPAT binding to rat brain membranes by metal ions. *Proc Acad Sci Estonia (Chemistry)* 2001; 50:28-38.
17. Rinken A, Terasmaa A, Raidaru G, Fuxe K. D₂ dopamine receptor-G protein coupling. Cross-regulation of agonist and guanosine nucleotide binding sites. *Neurosci Lett* 2001; 302:5-8.
18. Fabre V, Boni C, Mocaer E, Lesourd M, Hamon M, Laporte AM. [³H]Alnespirone: a novel specific radioligand of 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1997; 337:297-308.
19. Dalpiaz A, Borea PA, Gessi S, Gilli G. Binding thermodynamics of 5-HT_{1A} receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 1996; 312:107-114.
20. Assie MB, Cosi C, Koek W. Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT_{1A} receptors and intrinsic activity. *Eur J Pharmacol* 1999; 386:97-103.
21. Stanton JA, Beer MS. Characterisation of a cloned human 5-HT_{1A} receptor cell line using [³⁵S]GTPγS binding. *Eur J Pharmacol* 1997; 320:267-275.
22. Pou C, Nenonene EK, Reader TA, Fargin A. The human 5-HT_{1A} receptor: comparison of its binding properties in transfected cells and cortical tissue. *Gen Pharmacol* 1997; 29:737-747.
23. Motulsky HJ, Mahan LC. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol* 1984; 25:1-9.

24. Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22:3099-3108.

Legends for figures

Figure 1. Time course of specific binding of [³H]WAY100635 to rat hippocampal membranes. The receptor preparations were incubated with 0.07 nM (●), 0.48 nM (*) or 3.0 nM (○)[³H]WAY100635, and at timed intervals the specifically bound radioactivity in aliquots were determined as described in *Methods*. The data are presented as the percentage of maximal specific binding at corresponding radioligand concentration.

Figure 2. Dissociation of [³H]WAY100635 from the complex with 5-HT_{1A} receptors in rat hippocampal membranes. The complex was formed by incubation of membranes with 0.5 nM [³H]WAY100635 for 60 min at 25°C. Dissociation was initiated by addition of large excess (28 μM) of 5-HT and data are presented as the percentage of the maximal specific binding. **Inset:** Data in semilogarithmic coordinates.

Figure 3. Specific binding [³H]WAY100635 to rat hippocampal membranes. The membranes in the incubation buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.1 mg/ml BSA) were incubated with different concentrations of [³H]WAY100635 in the absence (total binding) and presence (nonspecific binding) of 10 μM WAY 100135 for 15 min (●), 60 min (*) or 240 min (○) at 25°C. The specific binding was defined as difference between total and nonspecific binding. **Inset:** Scatchard plot of the corresponding data.

Figure 1

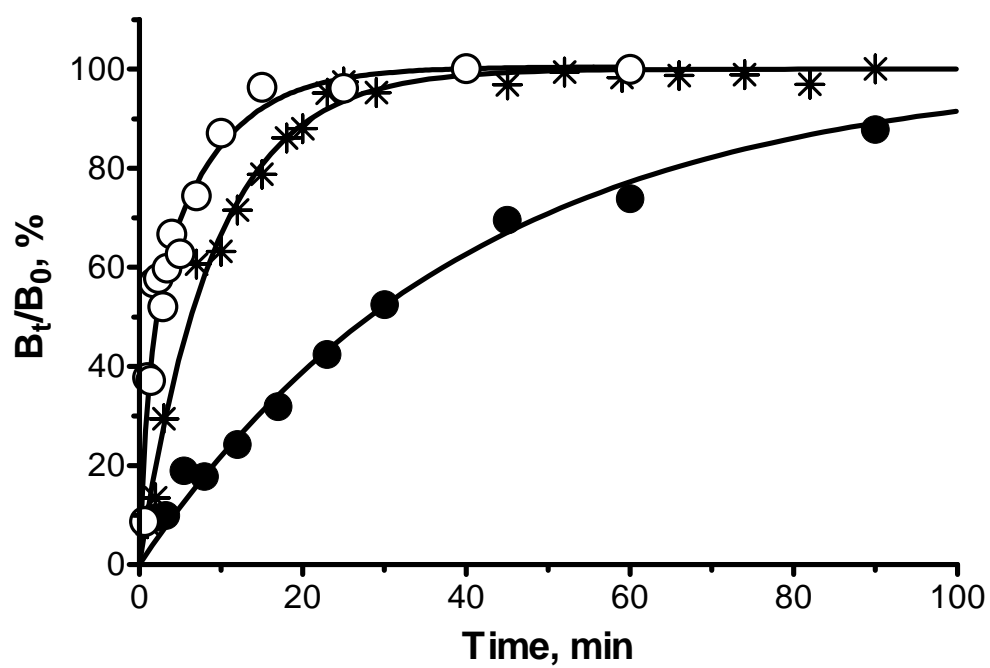


Fig. 2

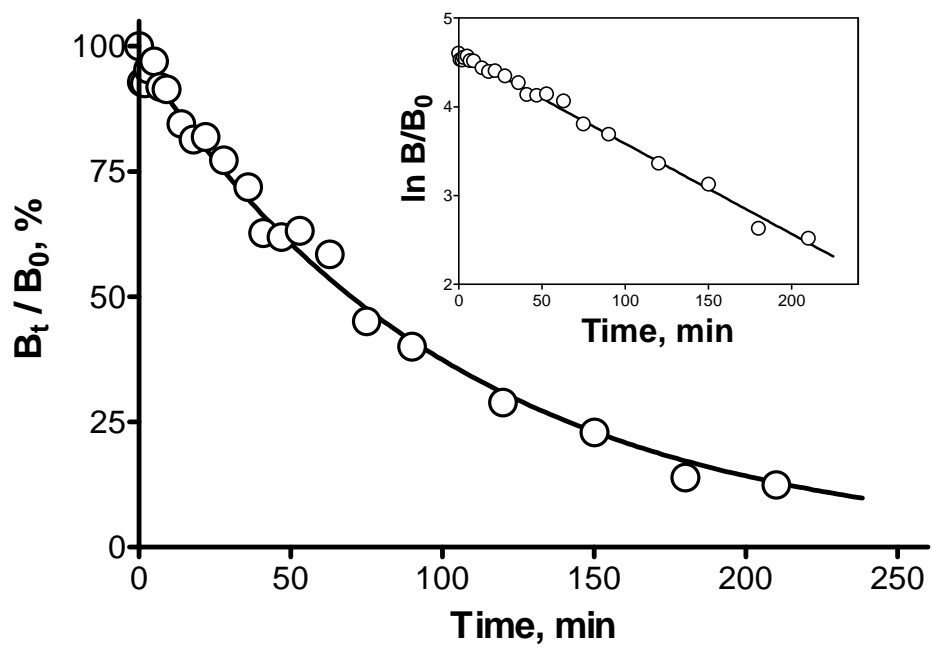


Figure 3

