

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Anni Allikalt

**UUTE DOPAMIINERGILISTE ÜHENDITE
ISELOOMUSTAMINE RADIOLIGANDI
VÄLJATÕRJUMISKATSETES**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: Professor Ago Rinke, MD, PhD

Tartu 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
1 VALDKONNA ÜLEVAADE	6
1.1 Signaali ülekanne	6
1.2 G-valguga seotud retseptorid	6
1.3 Dopamiinergilised retseptorid	8
1.3.1 Dopamiini retseptorite tähtsus	10
1.3.2 Dopamiini retseptorite struktuur	10
1.4 Apomorfiin	13
1.5 Lunasiin	14
1.6 Ligandi sidumiskatsed	15
1.6.1 Radioligandi väljatõrjumine ehk konkureeriv sidumine	16
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur	20
2.2 HEK-293 rakkude kasvatamine	21
2.3 Rakumembraanide valmistamine	21
2.4 Membraanpreparaatide testimine	22
2.5 Radioligandi väljatõrjumiskatsed	22
3 TULEMUSED JA ARUTELU	24
3.1 Membraanide testimine	24
3.2 3-asendatud apomorfiini derivaadid	25
3.3 9,10-asendis modifitseeritud apomorfiini derivaadid	27
3.4 2-asendatud apomorfiini derivaadid	29
3.5 Lunasiin	32
KOKKUVÕTE	34
TÄNUAVALDUSED	35
KASUTATUD KIRJANDUS	36
SUMMARY	41

KASUTATUD LÜHENDID

AC – ensüüm adenülaadi tsüklaas

AH – aminohape

APO – apomorfiin

cAMP – tsükliline adenosinmonofosfaat

Ci – kürii

cpm – lugemit minutis (*counts per minute*)

D_{2L} – dopamiini D₂ retseptori pikk isovorm

D_{2S} – dopamiini D₂ retseptori lühike isovorm

DA – dopamiin

DAR – dopamiinergiline retseptor

DMEM – Dulbecco modifitseeritud rakusööde

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DPBS – Dulbecco sooladega fosfaatpuhver

DTT – ditiotreitool

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FBS – veiseloote seerum

G418 – selektsiooniantibiootikum genetitsiin

GDP – guanosiindifosfaat

GPCR – G-valguga seotud retseptorid

GTP – guanosiintriifosfaat

KASUTATUD LÜHENDID

G- Valk – guaniinukleotiide siduv Valk

^3H – tritium

HEK-293 – inimese embrüonaalsed neerurakud 293

IC_{50} – määrgistamata ligandi kontsentratsioon, mis inhibeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses

K_i – inhibeerimiskonstant

K_D – radioligandi dissotsiatsiooni tasakaalukonstant

[L] – radioligandi molaarne kontsentratsioon

n_H – Hilli koefitsient

PD – Parkinsoni tõbi

Raklopriid – 3,5-dikloro-*N*-[[*(2S)*-1-etiül-2-pürrolidinüül]metüül]-2-hüdroksü-6-metoksübensamiid

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

TM – transmembraanne

Tris – 2-amino-2-hüdroksümetüül-propaan-1,3-diool

SISSEJUHATUS

Inimese ajus on sadu miljardeid närvirakke. Selleks, et inimesed suudaksid erinevatele muutustele reageerida, peavad rakud vastu võtma, töötleva ja edastama mitmesuguseid närvisignaale. Signaalide vahendamiseks on rakkude pinnal olemas valgud, mida nimetatakse retseptoriteks ning millega seostuvad signaali edastamisel erinevad signaalmolekulid. Kõige suurema ja mitmekesisema membraansete retseptorite perekonna moodustavad G-valguga seotud retseptorid. Häired G-valguga seotud retseptorite aktivatsioonis on seotud mitmesuguste erinevate haigustega. Just seetõttu on need retseptorid märklauaks väga suurele hulgal ravimitele.

Antud töös keskendutakse dopamiinergilistele retseptoritele, mis kuuluvad samuti G-valguga seotud retseptorite suurde perekonda. Dopamiini retseptorid mõjutavad mitmeid erinevaid protsesse, näiteks motivatsiooni, naudinguid, mälu, õppimisvõimet ja motoorikat. Probleemid dopamiinergilises süsteemis põhjustavad mitmesuguseid haigusi, millest tuntuimad on Parkinsoni tõbi ning skisofreenia. Nende haiguste ravimiseks üritatakse pidevalt leida tõhusamaid ja minimaalsete kõrvaltoimetega ühendeid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli rakendada radioligandi väljatõrjumismeetodit erinevate dopamiinergiliste ühendite iseloomustamiseks. Lõppeesmärgiks oli leida uusi, võimekamaid ja selektiivsemaid ravimikandidaate.

1 VALDKONNA ÜLEVAADE

1.1 Signaali ülekanne

Kõik elusorganismid koosnevad rakkudest. Rakud suudavad ellu jääda ainult siis, kui nad on pidevas infovahetuses ümbritseva keskkonnaga. Rakuni jõudnud signaal käivitab raku sees keemiliste reaktsioonide rea, mida nimetatakse signaali ülekandeks (Kilk 2007). Erinevaid bioloogilisi signaale ning neile vastavaid bioloogilisi muutusi on palju. Ometi kasutavad organismid signaali ülekandeks vaid mõnda evolutsiooni käigus säilinud mehhanismi. Olulisteks signaali ülekande vahendajateks on retseptorid. Antud töö raames keskendutakse G-valguga seotud retseptoritele (GPCR), mis moodustavad suurima raku pinnal olevate valkude perekonna (Lehninger *et al.* 2005).

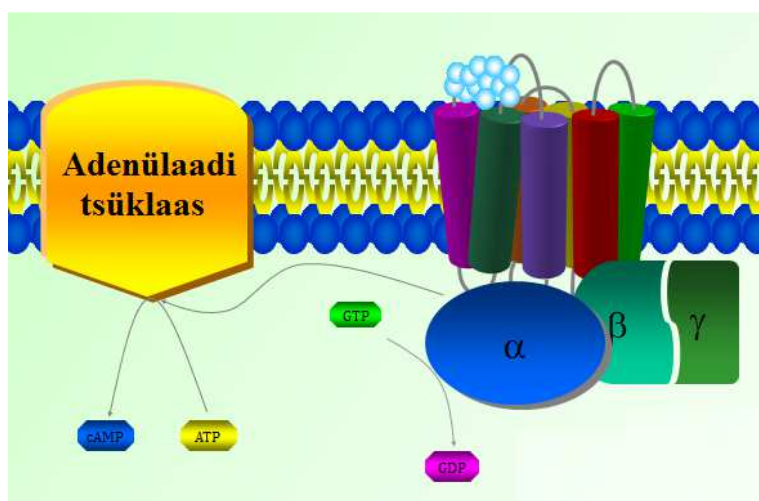
1.2 G-valguga seotud retseptorid

G-valkudeks nimetatakse guaniinukleotiide siduvaid regulaatorvalke, millel on oluline roll raku tulevate keemiliste signaalide ülekandes raku sisemusse. G-valgud kuuluvad GTP-aaside hulka ning need jagunevad kahte suurde perekonda: monomeersed väikesed GTP-aasid ja heterotrimeersed ehk suured G-valgud. Retseptoriga on vahetult seotud just heterotrimeersed G-valgud, mis koosnevad kolmest polüpeptiidsest alaühikust: alfa (α), beeta (β) ja gamma (γ) (Joonis 1), millel omakorda on mitmeid erinevaid alatüüpe. Beeta ja gamma alaühikud moodustavad omavahel dimeeri, mis dissotsieerub vaid denatureerimisel. Alfa alaühikul on võime siduda ja hüdrolüüsida guanosiintrifosfaati (GTP) guanosiindifosfaadiks (GDP) ja seda reguleerivad mitmed regulaatorvalgud (Kleuss *et al.* 1994).

G-valgud aktiveeruvad G-valguga seotud retseptorite kaudu, mis asuvad rakumembraanil ja millele on omane seitsmetransmembraanne struktuur. G-valguga seotud retseptoritel on oluline roll närvisignaali ülekandes. Häired signaaliülekanderadades on seotud mitmesuguste haigustega, mistõttu on GPCR-d tähtsad ravimite märklauad. Ligikaudu 50% tänapäeva farmaatsiatööstuse retseptiravimitest on suunatud just selle retseptorite perekonna selektiivsele mõjutamisele. G-valguga seotud retseptorite tähtsust illustreerib ka 2012. aasta Nobeli keemiaauhind, mis anti B. Kobilkale ning R. Lefkowitzile GPCR-de struktuuri ja omaduste avastamise eest (Linse 2012).

G-valgud reguleerivad mitmesuguseid ensüüme ja ionkanaleid. Sihtmärgiks olevaid ensüüme ja ionkanaleid kutsutakse efektoriteks, sest muutused nende aktiivsuses põhjustavad muutusi erinevate ionide või sekundaarsete virgatsainete tasemes rakus. Rakusisesteks virgatsaineteks on näiteks tsükliline guanosiinmonofosfaat, Ca^{2+} , fosfatidüülinositool, arahhidoonhape, NO jt. Dopamiinergiliste retseptorite puhul on oluliseks sekundaarseks virgatsaineiks tsükliline adenosiinmonofosfaat (cAMP) (Neer 1995, Filmore 2004).

Puhkeolekus on retseptoriga seotud heterotrimeerne G-valk, kusjuures α -alaühiku külge on seotud GDP (Joonis 1). Retseptori aktiveerimisel sobiva ligandiga muutub retseptori konformatsioon. Selle tulemusel muutub ka α -alaühiku konformatsioon ning GDP dissotsieerub. Kuna GTP kontsentratsioon rakus on kõrgem kui GDP-l, siis seostub eelistatult α -alaühikule GTP. Tagajärjeks on G-valgu dissotsieerumine retseptori küljest ning selle jagunemise kaheks: α -alaühik koos GTP-ga ning $\beta\gamma$ dimeer. Mõlemad kompleksid saavad edasi aktiveerida erinevaid sihtmärk-efektoreid. G-valgu aktivatsioon kestab seni kuni GTP hüdrolüüsitakse α -alaühiku poolt GDP-ks. Inaktiivne α -alaühik saab taas seostuda teiste alaühikute ja retseptoriga, moodustades uuesti puhkeolekus G-valgu trimeeri (Neer 1995, Siegel *et al.* 2012).



Joonis 1. G-valk ja rakumembraani läbiv G-valguga seotud retseptor. GPCR sisaldab seitset rakumembraani läbivat hüdrofoobset alfa-heeliksit. Välja on toodud ka G-valgu α -alaühiku GDP vahetamine GTP vastu. Joonisel olev ensüüm adenülaadi tsüklaas on efektor, mille kaudu GPCR-i signaal rakus edasi kandub.

G-valguga seotud retseptorite perekonna täpne suurus on teadmata. Praeguseks on avastatud enam kui 800 unikaalset liiget (Gloriam *et al.* 2007), mis jagatakse klassikaliselt kolme põhiklassi (Alexander *et al.* 2011):

- Klass A (rodopsiinilaadsed)
- Klass B (sekretiinilaadsed)
- Klass C (metabotroopsed glutamaadilaadsed)

G-valguga seotud retseptorite klassifitseerimiseks on olemas mitmeid erinevaid süsteeme. Näiteks jagatakse GPCR-d sageli järjestuste homoloogia ja funktsionaalsete sarnasuste alusel viieks. Lisaks eespool mainitud retseptoritele tuuakse siis eraldi välja ka adhesiooni ja *Frizzled*-retseptorid. Kõige suurem on klass A, kuhu kuulub ligikaudu 85% GPCR-dest. Käesolevas töös huvi all olevad dopamiini retseptorid kuuluvad samuti A klassi GPCR-de hulka. (Lagerström ja Schiöth 2008, Fredriksson *et al.* 2003). Lisaks võib eraldi klassina välja tuua retseptorid, mille puhul pole avastatud organismile omast ligandi ning samuti pole teada nende bioloogiline funktsioon. Selliseid retseptoreid nimetatakse orbretseptoriteks. Uute ravimimärklaudade leidmiseks üritatakse orgretseptorite arvu pidevalt vähendada. (Civelli *et al.* 2013).

G-valguga seotud retseptorite ligandid on väga erinevad. Mitmesugused ioonid, lõhnaained, amiinid, peptiidid, valgud, lipiidid, nukleotiidid ja isegi footonid kannavad signaali edasi GPCR-de kaudu. Lisaks ligandidele on suur varieeruvus ka G-valguga seotud retseptorite vahel. Erinevatel GPCR-del on siiski kaks põhilist sarnasust: seitse rakumembraani läbivat hüdrofoobset alfa-heeliksit ning retseptori võime aktiveerida trimeerseid G-valke (Fredriksson *et al.* 2003).

1.3 Dopamiinergilised retseptorid

Dopamiin (DA), IUPAC-i nomenklatuuri järgi 4-(2-aminoetüül)benseen-1,2-diool, on organismis oluline neurotransmitter ehk virgatsaine. DA on katehhoolamiin, mis tähendab, et see on kahe fenoolse hüdroksüülrühmaga füsioloogiliselt aktiivne monoamiin (Joonis 2). Lisaks dopamiinile kuuluvad katehhoolamiinide hulka ka serotoniin, noradrenaliin ja adrenaliin. Organismis sünteesitakse dopamiini enamasti aminohappest türosiin (Joonis 2) (Lehninger *et al.* 2005). DA funktsiooni virgatsainena avastas 1957. aastal Arvid Carlsson

1.3.1 Dopamiini retseptorite tähtsus

Dopamiini retseptorid mõjutavad organismis mitmeid erinevaid funktsioone, sealhulgas mootorikat (liigutuste ja kõne sujuvus), kognitiivseid omadusi (mälu, õppimine, motivatsioon), emotsioone, toitumist ja endokriinset süsteemi. Dopamiinil on oluline roll ka südameveresoonekonna ja neerude töös (Missale *et al.* 1998). Lisaks sellele on avastatud dopamiinergilise süsteemi seos seksuaalsete funktsioonidega (Benassi-Benelli *et al.* 1979, Sanna *et al.* 2011).

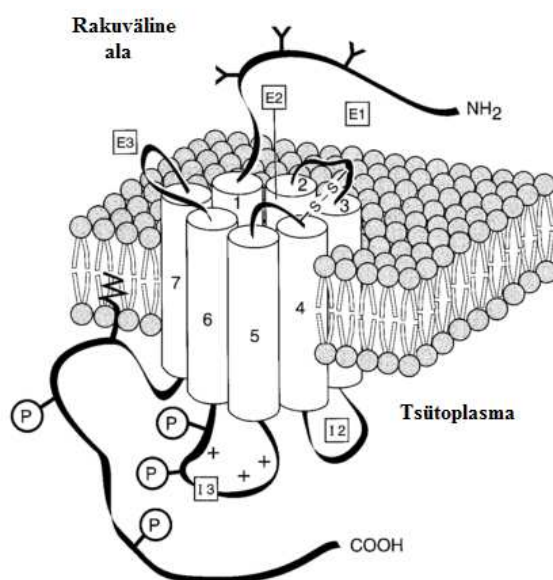
Probleemid dopamiinergilises süsteemis põhjustavad mitmeid neurodegeneratiivseid ning psühholoogilisi haigusi, millest tuntuimad on näiteks Parkinsoni tõbi (PD), bipolaarne häire ning skisofreenia. Parkinsoni tõve korral on tegemist dopamiinergilise süsteemi alatalitlusega, mis põhjustab mitmesuguseid motoorseid häireid – värinaid, bradükineesiat ning kõne- ja tasakaaluhäireid. Sümptomite leevendamiseks kasutatakse sageli dopamiini prekursorit L-DOPA-t, mis erinevalt dopamiinist suudab läbida vere-aju barjääri. Skisofreenia puhul on vastupidiselt tegemist dopamiinergilise süsteemi ülereguleeritusega. Paljud tänapäeva antipsühhootikumid baseeruvad dopamiini retseptori D₂ antagonistidel (Zhang *et al.* 2008).

Viimase paarikümne aasta väljakutseks on olnud leida selektiivseid dopamiinergilisi ravimeid, mis ei põhjustaks ebameeldivaid kõrvaltoimeid. Kõige keerulisem on leida selektiivsust ühte alamklassi kuuluvate retseptorite alatüüpide vahel (Missale, *et al.* 1998, Siegel *et al.* 2012).

1.3.2 Dopamiini retseptorite struktuur

GPCR-de puhul räägitakse rakuvälisest osast, transmembraansest (TM) alast ning rakusisestest domeenidest. Lisaks võib eraldi välja tuua C- ja N-terminaalsed otsad. Erinevate retseptorite alatüüpide võrdlemisel pöörataksegi tähelepanu eespool nimetatud struktuuriüksustele. Samasse alamklassi kuuluvad dopamiini retseptorid on omavahel struktuurilt küllaltki sarnased. D₁ ja D₅ retseptoritel on 80% transmembraansest alast identne. D₂ ja D₃ retseptorite TM ala sarnasus on 75% ning D₂ ja D₄ puhul on homoloogia 53%. Dopamiini retseptorite N-terminaalse saba aminohapete arv on sarnane kõigi DAR alatüüpide puhul, kuid erinevad võivad olla kohad, kus toimub valgu glükosüleerimine (Missale *et al.* 1998).

D₁-tüüpi retseptorite puhul on C-terminaalne osa ligikaudu seitse korda pikem kui D₂-tüüpi retseptoritel (Joonis 4). D₂-alamklassi kuuluvatel retseptoritel on jällegi pikem kolmas rakusisene aas. Selline omadus on iseloomulik paljudele G_i-valkudega seotud retseptoritele. Lühike kolmas rakusisene aas (nagu on D₁-tüüpi retseptoritel) viitab aga interaktsioonidele G_s-valguga. Sarnaselt paljudele teistele GPCR-dele on dopamiinergilistel retseptoritel teises ja kolmandas rakuvälises aasas kaks tsüsteiinijääki. Need aminohappejäägid moodustavad molekulisese disulfiidsilla, mis aitab stabiliseerida retseptori struktuuri (Missale *et al.* 1998).



Joonis 4. Dopamiini retseptorite üldstruktuur. Joonisel on näidatud D₁-tüüpi retseptorite struktuursed üksused. D₂-tüüpi retseptoritel on lühem C-terminaalne saba ning pikem kolmas rakuväline aas. E1-E3 – rakuvälised aasad, 1-7 – transmembraansed domeenid, I2-I3 – rakusisesed aasad. Potentsiaalsed fosforüleerimise kohad (tähistatud P-ga) asuvad 3. rakusisesel aasal (I3) ja C-terminaalses osas. Võimalikud glükosüleerimise kohad on illustreeritud N-terminuses. Modifitseeritud (Missale *et al.* 1998).

Erinevate agonistide (ka dopamiini) seostumine retseptoriga toimub hüdrofoobsete transmembraansete heeliksrite kaudu. Näiteks kolmas transmembraanne heeliks (Joonis 4) sisaldab aspartaadijääki, millega seostub dopamiini aminorühm. Viienda TM ala kaks seriinijääki saavad olla vesiniksideme doonoriks, andes interaktsioone DA hüdroksüülrühmadega. Lisaks aitavad sidumisele kaasa ka kuuendas TM heeliksis oleva fenüülalaniinijäägi ja dopamiini aromaatsse tuuma vahel esinevad dispersioonijõud (Missale *et al.* 1998).

1.3.2.1 D₁ retseptor

Täiskasvanud inimese ajus on dopamiini retseptoritest enim ekspresseeritud D₁ retseptoreid. Neil retseptoritel on kõrge afiinsus bensasepiinide suhtes. Selline ühend on näiteks SCH23390 (Joonis 8), mis on D₁ retseptori antagonist. Triitiumiga märgistatud SCH23390 kasutatakse laialdaselt selle retseptori alatüübi uurimiseks (Siegel *et al.* 2012).

D₁ ja D₅ retseptorid on farmakoloogiliselt sarnased, kuid D₅ on DA suhtes kõrgema afiinsusega (Siegel *et al.* 2012). Suurimad erinevused nende kahe alatüübi vahel on kolmandas rakusiseses aasas ning C-terminaalses sabas. Lisaks on erinevused teises rakuvälises aasas – see on D₁ retseptoril lühem (27 aminohappejääki) kui D₅ retseptoril (41 AH-jääki). Samuti on D₅ retseptori ekspressioon organismis madalam kui D₁ retseptoril. (Missale *et al.* 1998).

1.3.2.2 D₂ retseptor

D₂ retseptoril on kaks erinevat vormi: lühike (D_{2S}) ja pikk (D_{2L}). Pikemal variandil on kolmandas rakusiseses aasas 29 aminohappejääki rohkem. Praeguseks on kindlaks tehtud, et D_{2S} retseptor töötab peamiselt presünaptilise autoreseptorina ning D_{2L} on põhiliselt postsünaptilise funktsiooniga. D₂ retseptoreid leidub paljudes erinevates ajuosades ning just selle alatüübiga seostuvaid dopamiinergilisi ligande kasutatakse antipsühhootikumidena ning Parkinsoni tõve ravimitena (Missale *et al.* 1998, Siegel *et al.* 2012).

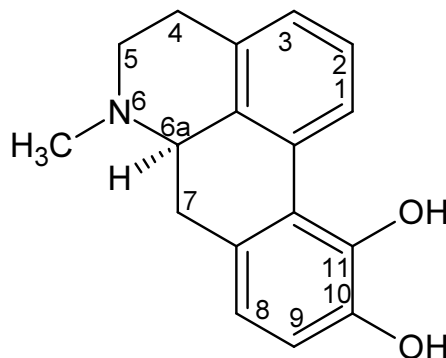
1.3.2.3 D₃ retseptor

D₃ retseptoreid ekspresseeritakse organismis vähem kui D₁ ja D₂ retseptoreid. Dopamiinil on aga D₃ suhtes 20 korda kõrgem afiinsus kui D₂ retseptoril. See tuleneb peamiselt alatüüpide kolmanda rakusisese aasa primaarjärjestuste erinevusest. D₂-tüüpi dopamiini retseptoritega seostuvad hästi bensamiidid. Näiteks raklopriid (Joonis 8) seostub ligikaudu sama kõrge afiinsusega nii D₂ kui ka D₃ retseptoriga. Selle ühendi triitiumiga märgistatud varianti kasutataksegi laialdaselt nende retseptorite uurimiseks (Zhang, *et al.* 2008, Missale *et al.* 1998).

1.4 Apomorfiin

Apomorfiin (APO) on ühend, mida saadakse morfiinist happelisel katalüüsil. Bioloogiliselt on aktiivne APO R-isomeer. Apomorfiini avastasid 1869. aastal A. Mathiesen ja C. R. Wright ning esialgu kasutati seda peamiselt oksendamist esilekutsuva ravimina mürgituse korral (Subramony 2006). Hiljem on apomorfiini kasutatud ka mitmesuguste teiste haiguste ravis, kuid just oksendamine on piiranud APO laialdasemat kasutamist (Ribarič 2012).

Kuna apomorfiin on oma struktuuri poolest sarnane dopamiinile, siis suudab see samuti aktiveerida nii D₁-tüüpi kui ka D₂ tüüpi dopamiinergilisi retseptoreid. Seega on APO mitteselektiivne dopamiini retseptorite agonist. Apomorfiini sidumisel DA retseptoriga on olulisteks struktuurielementideks tertsiarne amiin, kaks hüdroksüülrühma ning polütsükliid (Joonis 5). Oma struktuuri tõttu on APO lipofiilne ning vees keskmise lahustuvusega. Õhu ning valguse käes toimub aga APO kiire oksüdeerumine (Ribarič 2012, Subramony 2006).



Joonis 5. Apomorfiini struktuur

Lisaks dopamiinergilisele aktiivsusele on apomorfiin ka antioksidant ning vabade radikaalide püüdja. Hiljaaegu näidati ka mitte-retseptor-vahendatud neurokaitsvat efekti Alzheimeri tõve korral (Himeno *et al.* 2011). Lisaks on apomorfiini kasutatud unetuse, depressiooni, skisofreenia, sõltuvuse ning seksuaalsete probleemide ravimiseks. Kõige laialdasemalt kasutatakse apomorfiini siiski hilises staadiumis Parkinsoni tõve sümptomite ravimiseks. APO oli ka esimene dopamiini retseptorite agonist, mida PD ravis katsetati. Ravimina on selle toime kiire, kuid kestab lühikest aega (Ribarič 2012).

Apomorfiini puuduseks on vähene selektiivsus erinevate dopamiini retseptori alatüüpide vahel. Pidevalt otsitakse selektiivsemaid ühendeid, mis oleks sama hea või kõrgema

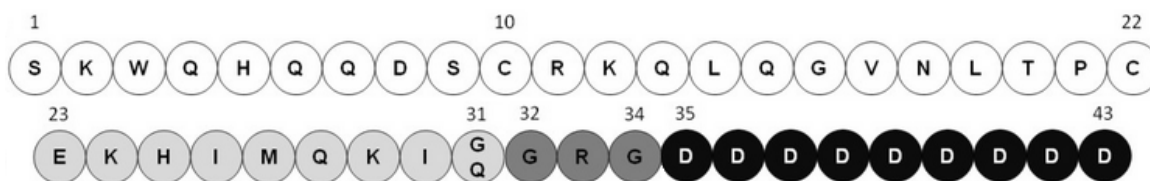
afiinsusega kui apomorfiin. Üheks võimaluseks on muuta apomorfiini struktuuri ning uurida selle mõju sidumisomadustele. Meie töörühmas tegeletaksegi erinevate apomorfiini derivaatide uurimisega. Apomorfiini struktuuri süstemaatilise modifitseerimise tulemusena on avastatud mitmeid retseptorile seostumise jaoks olulisi struktuurielemente, mille asendamine pole otstarbekas. Samas on kindlaks tehtud erinevaid funktsionaalrühmi, mis sidumisomadusi ning selektiivsust parandavad. Enne käesoleva töö tegemist oli testitud nelja erinevat apomorfiini derivaatide seeriat (Herm *et al.* 2009, Reinart *et al.* 2011, Reinart-Okugbeni *et al.* 2013).

Käesoleva töö raames testitakse kolme erinevat apomorfiini derivaatide seeriat, lootes leida veelgi võimekamaid ja selektiivsemaid potentsiaalseid ravimikandidaate.

1.5 Lunasiin

Lunasiin on 43-st aminohappejärgist koosnev polüpeptiid, mida leidub sojaubades. Esimesena kirjeldasid seda 1987. aastal Jaapani teadlased (Odani *et al.* 1987), kes eraldasid lunasiini sojavalgust ning avastasid peptiidil ebatavalise, mitmest L-asparagiinhappejärgist koosneva C-terminaalse osa (Joonis 6). Lunasiini avastajaks peetakse sageli ka A. Galvezi, kes võttis kasutusele termini lunasiin ning uuris selle peptiidi bioloogilist aktiivsust (Galvez ja de Lumen 1999).

Lunasiini puhul on avastatud mitmesuguseid tervist parandavaid omadusi. Näiteks seostatakse seda vähki haigestumise ennetamisega – lunasiin hoiab ära normaalsete rakkude muundumise vähirakkudeks (Hernandes-Ledesma *et al.* 2009b, de Lumen 2005). Erinevad uuringud on näidanud peptiidi põletikuvastast efekti (Hernandez-Ledesma *et al.* 2009a, de Meija ja Dia 2009). Lisaks seostatakse lunasiini kolesterooli alandava toimega (Galvez 2012). Vähe on aga uuritud lunasiini toimet kesknärvisüsteemile. Ometi on kindlaks tehtud, et lunasiin suudab läbida vere-aju barjääri ning jõuab seega ajuni (Hsieh *et al.* 2010). Seetõttu on oluline uurida peptiidi mõju kesknärvisüsteemile. Käesolevas töös uuriti lunasiini mõju dopamiinergilisele süsteemile (Dzirkale *et al.* 2013).



Joonis 6. Lunasiini primaarjärjestus. Polüpeptiid koosneb 43-st aminohappejäägist. C-terminaalses osas paiknevad asparagiinhappejäägid. Modifitseeritud (Kyle *et al.* 2012).

Joonisel 6 on näha lunasiini neli erinevat regiooni (tähistatud erinevate värvidega). Aminohappejääkide 1-22 funktsioon on teadmata. Järgmise osa (23-31) ülesandeks on lunasiini lokaliseerimine kromatiini juurde. Kromatiin on DNA ja sellega seostunud histoonide kompleks, millest moodustuvad kromosoomid. Aminohappejäägid 32-34 aitavad kaasa lunasiini liikumisele rakutuuma. Polüasparagiinhappejäägid (35-43) vastutavad aga lunasiini seostumise eest kromatiini histoonidega (Kyle *et al.* 2012).

1.6 Ligandi sidumiskatsed

G-valguga seotud retseptorid on väga olulised ravimite märklauad, mistõttu arendatakse pidevalt erinevaid meetodeid uute ligandide sidumisomaduste kindlaks määramiseks. Ligandi sidumiskatsed on peamine meetod retseptori ja ligandi vaheliste interaktsioonide iseloomustamiseks. See annab informatsiooni ligandide afiinsuse, seostumise ning dissotsiatsiooni kiiruse kohta. Lisaks on võimalik uurida kudedes või rakkudes ekspresseeritud retseptorite tihedust (Zhang ja Xie 2012).

G-valguga seotud retseptorite kaudu oma mõju avaldavate ravimite toime võib olla erinev. Ravimid võivad matkida organismile omase virgatsaine toimet ning aktiveerida retseptoreid. Sellisel juhul on tegemist agonistidega. Teine võimalus on kasutada ravimitena antagonistide, mis seostuvad retseptoriga ilma bioloogilist vastust põhjustamata. Seda tüüpi ühendid blokeerivad retseptori ja organismile omase virgatsaine ei saa enam signaali edasi kanda. Sidumiskatsetes on agonistide ja antagonistide eristamine keeruline, mistõttu kõikidele ühenditele viidatakse kui ligandidele (Davenport ja Russell 1996).

Esimesed radioligandi sidumiskatsed viidi läbi juba 1970ndatel aastatel (Paton ja Rang 1965, Lefkowitz *et al.* 1970). Sellest ajast alates on meetodit laialdaselt kasutatud uute ravimainete leidmiseks. Peamiselt kasutatakse ^3H või ^{125}I isotoopidega märgistatud ligande. Kuigi

radioligandi sidumiskatsed annavad usaldusväärseid tulemusi, on meetodil ka mõned puudused. Traditsioonilised radioligandi sidumiskatsed nõuavad pesemis- ja filtreerimisetappe, mistõttu väikseim võimalik formaat on 96 süvendiga plaat. Lisaks sellele on radioligandid küllaltki kallid ning mõnda radioligandi saab lühikese poolestusaja tõttu kasutada vaid vähest aega. Probleemiks on ka katsete käigus tekkinud jäätmete käitlemise keerukus. Kõikide nende puuduste tõttu arendatakse pidevalt uusi, mitteradioaktiivseid meetodeid ligandide iseloomustamiseks (Zhang ja Xie 2012).

Sidumiskatsete läbiviimiseks on olemas kolm erinevat lähenemist (Hulme ja Trevethick 2010):

- Kineetilised eksperimendid – seostumist jälgitakse erinevatel järjestikustel ajahetkedel, kasutades ühte või mitut erinevat radioligandi kontsentratsiooni. Tulemuseks saadakse seostumise või dissotsiatsiooni kiiruskonstandid.
- Tasakaalulise küllastussidumise katsed – vaadeldakse radioligandi seostumist erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel, kusjuures oodatakse tasakaalu saabumiseni. Sellise meetodiga on võimalik määrata radioligandi jaoks afiinsuskonstant, dissotsiatsioonikonstant ning spetsiifiliste sidumiskohtade kontsentratsioon.
- Konkureeriv sidumine – radioligandi kontsentratsioon hoitakse konstantsena ning varieeritakse märgistamata ligandi kontsentratsiooni. Ka siin uuritakse tasakaalulisi protsesse. Määratakse märgistamata ligandi inhibeerimiskonstandi (K_i) väärtus.

1.6.1 Radioligandi väljatõrjumine ehk konkureeriv sidumine

Seda tüüpi katsetega iseloomustatakse radioaktiivselt märgistamata ligandide interaktsiooni retseptoriga, uurides nende võimet inhibeerida radioligandi seostumist retseptoriga. See on nii-öelda kaudne meetod märgistamata ligandide sidumisomaduste uurimiseks. Retseptorite allikana kasutatakse peamiselt rakumembraane.

Käesolevas töös leiti märgistamata testainete afiinsuste võrdlemiseks kõigi ühendite inhibeerimiskonstantide väärtused. K_i iseloomustab märgistamata ligandi afiinsust radioligandi sidumiskohtadele. Selle arvutamiseks kasutatakse Cheng-Prusoffi võrrandit, mida

saab kasutada vaid siis kui tegemist on konkureeriva sidumisega ning on saavutatud tasakaal (Cheng ja Prusoff 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (1.1)$$

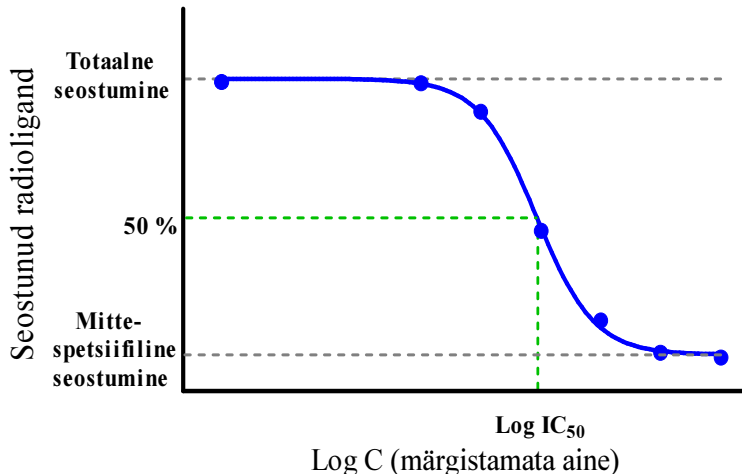
kus, K_i – inhibeerimiskonstant;

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

$[L]$ – radioligandi kontsentratsioon katses;

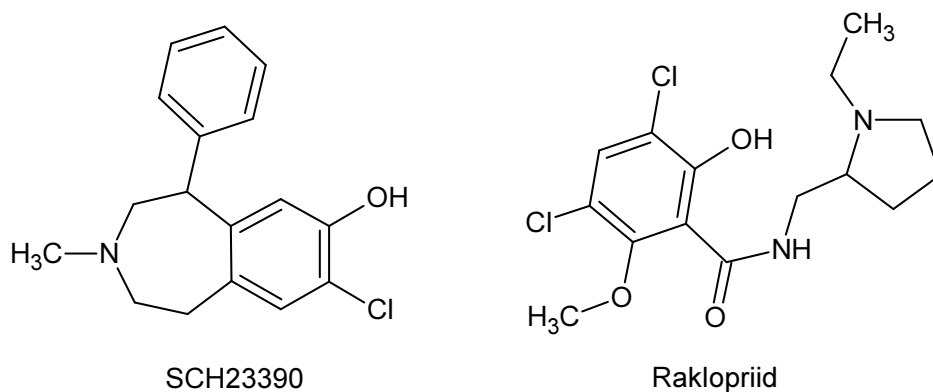
K_D – radioligandi dissotsiatsiooni tasakaalukonstant.

Inhibeerimiskonstandi arvutamiseks on vaja katse käigus kindlaks määrata radioligandi kontsentratsioon. Lisaks sellele on vaja teada ka radioligandi dissotsiatsiooni tasakaalukonstanti K_D ning IC_{50} väärtust. IC_{50} iseloomustab määrgistamata ligandi võimet inhibeerida radioligandi seostumist 50% ulatuses. IC_{50} väärtus leitakse väljatõrjumiskõveralt (Joonis 7).



Joonis 7. Väljatõrjumiskõveralt $\log IC_{50}$ väärtuse leidmine. $\log IC_{50}$ ehk logaritmi testaine kontsentratsioonist, mille juures on radioligandi sidumine inhibeeritud 50% võrra. Kõvera ülemine platoo iseloomustab radioligandi seostumist juhul kui määrgistamata testainet pole lisatud või on lisatud nii vähe, et see ei suuda veel radioligandiga konkureerida. Kõvera alumine osa on võrdne mittespetsiifilise seostumise osakaaluga. Modifitseeritud (Motulsky and Christopoulos 2003).

Dissotsiatsiooni tasakaalukonstant K_D iseloomustab ligandi ja retseptori vaheliste interaktsioonide tugevust. Definitsiooni järgi on K_D ligandi kontsentratsioon, mille juures on hõivatud 50% kõikidest retseptoritest. Kõrge afiinsusega ligandiks peetakse ühendit, mille tasakaalukonstandi väärtus on 1 nM või väiksem. Heal radioligandil peakski olema $K_D \leq 1\text{nM}$. See tagab piisavalt kõrge spetsiifilise seostumise osakaalu võrreldes mittespetsiifilise seostumisega. Mida madalam on radioligandi mittespetsiifiline seostumine, seda parem (Davenport and Russell 1996). Antud töö raames kasutati radioligandidena tritiumiga märgistatud ligande SCH23390 ja raklopriid (Joonis 8). Esimest neist kasutati D_1 retseptori ja teist D_2 ja D_3 retseptorite uurimiseks.



Joonis 8. Dopamiini retseptorite antagonistid. Väljatõrjumiskatsete läbiviimiseks kasutati ühendite radioaktiivseid (tritiumiga märgistatud) vorme.

Väljatõrjumiskõvera (Joonis 7) põhjal saab teha mitmeid järeldusi. Üheks oluliseks näitajaks on semilogaritmilistes koordinaatides esitatud kõvera tõus, mida iseloomustatakse Hilli koefitsiendiga (n_H). Koefitsienti kasutatakse enamasti selleks, et hinnata bioloogilise vastuse tekitamiseks vajaminevate ligandi molekulide hulka (Weiss 1997). Hilli koefitsiendi väärtuse järgi on võimalik otsustada ligandi seostumise homo- või heterogeensuse üle. Peamiselt vaadeldakse seda, kas kõvera tõusu absoluutväärtus on suurem, väiksem või võrdne ühega. Homogeense sidumise korral seostub radioligand sidumiskohtadele ühesuguse afiinsusega ning Hilli koefitsiendi absoluutväärtus on üks. Kui ligand seostub sidumiskohtadele erineva afiinsusega on tegemist heterogeense sidumisega ning väljatõrjumiskõver on laugem ($n_H < 1$) (Motulsky ja Christopoulos 2003).

Heterogeenset sidumist võivad põhjustada mitmed erinevad asjaolud. Esimeseks võimaluseks on sidumiskohtade tihe paiknemine ja osaline kattumine, mistõttu märgistamata ühendi

sidumine ühe sidumiskohaga võib põhjustada ligandi afiinsuse vähenemist lähedal asuvatele sidumiskohtadele (negatiivne kooperatiivsus). Lisaks võib heterogeense sidumise põhjuseks olla ka see, et märgistamata ühend ei seostu kõigile retseptoritele ühesuguse afiinsusega. Kolmanda võimalusena tuuakse sageli välja see, et G-valguga seotud ja seostumata retseptorid võivad siduda agoniste erineva afiinsusega (Motulsky ja Christopoulos 2003).

Lisaks eelpool mainitud variantidele võib Hilli koefitsiendi absoluutväärtus olla ka suurem kui üks. Sellisel juhul on väljatõrjumiskõvera tõus järsem kui tavaliselt. Seda võib põhjustada positiivne kooperatiivsus, mille puhul sidumiskohad paiknevad tihedalt (näiteks ühel retseptoril mitu sidumiskohta) ning märgistamata ligandi seostumine ühele sidumiskohale suurendab ligandi afiinsust teistele sidumiskohtadele (Motulsky ja Christopoulos 2003).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur

Katsed dopamiini retseptoritega viidi läbi inimese embrüo neerurakkudes HEK-293 (American Type Culture Collection). Rakkude kasvatamiseks kasutati polülüsiiniga kaetud Petri tase (Nunc). Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde (DMEM), penitsilliin, streptomütsiin, genetitsiin (G418), trüpsiin, Dulbecco sooladega fosfaatpuhver (DPBS) osteti firmalt PAA Laboratories GmbH. Veiseloote seerum (FBS) soetati firmast Gibco. Tris, HCl, dimetüülsulfoksiid (DMSO), KCl, EDTA, ditiotreitol (DTT), NaCl, MgCl₂ osteti firmast AppliChem.

Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks kasutati rakulugejat TC10TM Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). Rakkude elumuse määramiseks kasutati trüpaansinist (Sigma-Aldrich). Rakuplaatide rutiinseteks vaatamiseks kasutati mikroskoopi Olympus CKX31. Tsentrifugimine viidi läbi Sigma Laborzentrifugen mudeliga 3K30.

Katsete läbiviimiseks ja lahjenduste tegemiseks kasutati 96-kohalisi plaate (BRANDplates). Võrdlusaineteks kasutati agoniste dopamiin (Sigma-Aldrich) ja apomorfiin (Tocris). Radioaktiivsetes katsetes kasutati triitiumiga märgistatud antagonistide [³H]SCH23390 (84,3 Ci/mmol) ning [³H]Raklopriid (76,0 Ci/mmol), mis osteti firmalt Perkin Elmer. Apomorfiini derivaadid sünteesiti professor Attila Sipose töörühmas Debreceni Ülikoolis Ungaris. Sünteetiline lunasiin (CASLO Laboratory ApS) saadi professor Vija Klusa käest Läti Ülikoolist.

Reaktsiooni peatamiseks radioligandi sidumiskatsetes filtreeriti reaktsioonisegu läbi klaaskiudfiltermattide (GF/B, Perkin Elmer), kasutades selleks filtreerimissüsteemi FilterMate Harvester (Perkin Elmer). Radioaktiivsuse loendamiseks sulatati kuumpressi MeltilexTM Heatsealer (Wallac) abil filtrisse tahke stsintillant MeltilexTM B/HS (Perkin Elmer). Mõõtmiseks kasutati loendurit Wallac MicroBeta TriLux 1450 LSC Luminescence Counter (Perkin Elmer).

Kõikide tulemuste analüüsiks ja graafiliseks esitamiseks kasutati programmi GraphPad PrismTM 5.00.

2.2 HEK-293 rakkude kasvatamine

Rakuliini HEK-293 kasvatati 37 °C juures niiskus-reguleeritud inkubaatoris 5% CO₂ juuresolekul. Eelnevalt oli loodud kolm erinevat rakuliini, mis ekspresseerivad püsivalt rekombinantseid D₁, D_{2L} või D₃ retseptoreid (Reinart-Okugbeni *et al.* 2012). Antud töö raames kasutati järgmisi kloone: D₁R(E), D_{2L}R(B) ja D₃R(B). Kõiki rakke kasvatati polülüsiiniga kaetud Petri tassidel. Rakusöötmena kasutati DMEM High Glucose (4,5 g/l) söödet, millele oli eelnevalt lisatud 10% FBS, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. DAR geeni sisaldavate rakkude selekteerimiseks kasutati 400 µg/ml antibiootikumi G418. Rakke jagati iga 3-4 päeva tagant. Rakuarvu ja elumuse määramiseks kasutati 0,4% trüpaansinise lahust.

2.3 Rakumembraanide valmistamine

Membraanpreparaatide valmistamiseks kasvatati DA retseptoreid ekspresseerivaid HEK-293 rakke Petri tassidel konfluentsuseni 90-95%. Seejärel kontrolliti rakkude elumust ning määrati rakuarv ühel Petri tassil. Ülejäänud rakkudelt eemaldati sööde ja lisati 2 ml DPBS-i ühe plaadi kohta. Rakkude lahti pipeteerimiseks Petri tassidelt kasutati automaatpipette ning rakususpensioon koguti 50 ml plasttuubidesse. Iga retseptori alatüübi jaoks kasutati eraldi tuubi. Saadud suspensioonid tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 minuti jooksul 1000 g juures. Seejärel lahust dekanteeriti ning sadet hoiustati -80 °C juures kuni membraanpreparaadi valmistamiseni.

Membraanpreparaatide valmistamisel hoiti kõiki lahuseid jäävannis ning tsentrifuugimised viidi läbi 4 °C juures. Jäävannis sulatatud 20 Petri tassi rakud resuspendeeriti 20 ml-s jääkülmas pesupuhvril (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4) ning tsentrifuugiti 800 g juures 5 minuti jooksul. Saadud sade resuspendeeriti uuesti 20 ml-s pesupuhvril ning homogeniseeriti mehaaniliselt (homogenisaator Parmer LabGen 125) vähemalt 30 sekundi jooksul (kuni lahust oli homogeenne). Tuubid tasakaalustati puhvriga ning tsentrifuugimine viidi läbi 30 000 g juures 20 minuti jooksul. Seejärel supernatant dekanteeriti ja sade resuspendeeriti uuesti 20 ml-s jääkülmas pesupuhvril. Järgmise sammuna viidi taaskord läbi lahuse homogeniseerimine ning tsentrifuugimine 20 minuti jooksul 30 000 g juures. Viimane homogeniseerimine sooritati katsepuhvril (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, pH =

7,4) arvestusega, et lahuses oleks 10 miljonit rakku/ml-s. Saadud homogeenne lahus jagati 1 ml kaupa alikvootidesse ning hoiti -80 °C juures kuni katseni.

2.4 Membraanpreparaatide testimine

Membraanide testimise eesmärgiks oli välja selgitada ainete sõelumiseks (radioligandi väljatõrjumiskatseteks) sobiv membraanpreparaadi kogus. Samuti saab membraanide testimise abil hinnata mittespetsiifilise seostumise osakaalu.

Katse läbiviimiseks kasutati katsepuhvit (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4), millele lisati vahetult enne katset 1 mM DTT. Katses hoiti konstantsena radioligandide kontsentratsioon (ligikaudu 1 nM [³H]SCH23390 või [³H]Raklopriid). Radioligandi mittespetsiifilise seostumise määramiseks kasutati butaklamooli, mis on mitteselektiivne dopamiini retseptorite antagonist. Ka butaklamooli kontsentratsioon hoiti katses konstantsena (1 µM). Katse läbiviimisel varieeriti erinevate membraanpreparaatide kontsentratsiooni (arvestuslikult 5·10⁴, 1·10⁵, 2·10⁵, 4·10⁵ rakku/süvendis).

Katse sooritati 96-süvendiga katseplaadil ning lahuse ruumala süvendis oli 250 µl (50 µl radioligandi, 50 µl katsepuhvit või butaklamooli ja 150 µl membraanpreparaati). Katse viidi läbi duplikaatides. Pärast ainete lisamist inkubeeriti plaati loksutil 60 minutit 25 °C juures. Seejärel eraldati lahuses olev seostumata radioligand membraani ja radioligandi kompleksist. Selleks filtreeriti reaktsioonisegu läbi klaaskiudfiltrit. Filtrit pesti 5 korda jääkülma filtreerimispuhvriga (20 mM K-fosfaat, 100 mM NaCl, pH = 7,4). Seejärel kuivatati filtreid mikrolaineahjus 800 W juures 2 minuti jooksul. Kuivatatud filtritesse sulatati tahke stsintillant. Järgmise sammuna mõõdeti loenduri abil filtrile jäänud radioaktiivsus.

2.5 Radioligandi väljatõrjumiskatsed

Kõikidest testainetest ning apomorfiinist tehti 10 mM alglahused DMSO-s. Lunasiini 1 mM ning dopamiini 100 mM alglahused valmistati Milli-Q vees. Katsete teostamiseks kasutati katsepuhvit, millele lisati vahetult enne katset 1 mM DTT. Kõik määramised teostati triplikaatides. Katsed viidi läbi U-kujulise põhjaga 96-süvendilistel plaatidel. Kõigepealt pipeteeriti plaadile 50 µl radioligandi. Radioligandide kontsentratsioon katstes hoiti

konstantsena (ligikaudu 1 nM) ning katste käigus määrati ka kasutatud radioligandi täpne kontsentratsioon, mida hiljem kasutati testainete inhibeerimiskonstantide arvutamiseks. Selleks pipeteeriti 50 µl radioligandi lahust vedelasse stsintilleeruvasse ainesse ning radioaktiivsus mõõdeti hiljem loenduri abil.

Järgmisena lisati plaadile 50 µl testainet või standardainet. Väljatõrjumiskatsete jaoks tehti ühenditest seerialahjendused katsepuhvril nii, et iga ühendi korral kasutati kaheksat erinevat kontsentratsiooni. Viimasena pipeteeriti katseplaadile 150 µl eelnevalt kindlaks tehtud sobiva lahjendusega membraanpreparaati (katse lõppruumala 250 µl). Seejärel inkubeeriti reaktsioonisegu pidevalt segades 25 °C juures 90 minuti jooksul. Inkubatsiooniaeg peab olema tasakaalu saavutamiseks piisavalt pikk. Vaba radioligandi eraldamiseks kasutati taaskord filtreerimist (vt membraanpreparaatide testimine). Pärast filtri pesemist, kuivatamist ja tahke stsintillandi sulatamist filtrisse mõõdeti radioaktiivsus.

Väljatõrjumiskatsetes kasutati radioligandidena triitiumiga (³H) märgistatud ühendeid. Triitium on vesiniku isotoop, mille poolestusaeg on 12,32 aastat. Ebastabiilse triitiumi lagunemisel tekib β-kiirgus, mis on madala energiaga ning pole ohtlik. Radioaktiivsuse mõõtmine antud töös põhinebki β-kiirguse interakteerumisel stsintilleeruva molekuliga (tavaliselt mõni aromaadne ühend), mille tagajärjel viimane ergastub. Oma energia annab see molekul mõne aja möödudes ära valguskiirguse sähvatusena, mida detekteerivad valgustundlikud detektorid stsintillatsiooniloenduris. Iga süvendit mõõdeti 4 minutit, ning keskmistatud tulemused saadi ühikutes cpm (*counts per minute*).

Väljatõrjumiskatsete teostamiseks kasutati rakumembraane. Vastavad dopamiini retseptoreid püsivalt ekspresseerivad rakuliinid on varasemalt iseloomustatud (Reinart-Okugbeni *et al.* 2012). Käesolevas töös kasutati ühendite inhibeerimiskonstantide arvutamiseks eelnevalt Reet Reinart-Okugbeni poolt kindlaks määratud radioligandide tasakaalukonstante, mis on järgmised:

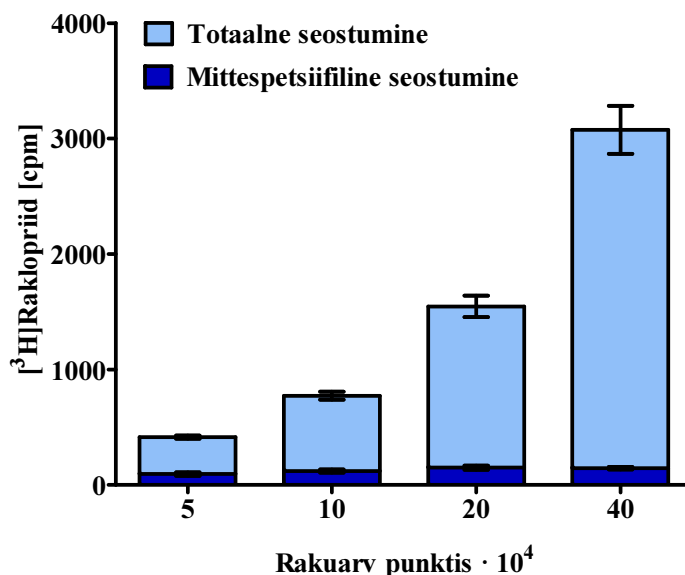
- $D_1R \rightarrow K_D([^3H]SCH23390) = 0,48 \pm 0,06 \text{ nM}$
- $D_2R \rightarrow K_D([^3H]Raklopriid) = 0,66 \pm 0,07 \text{ nM}$
- $D_3R \rightarrow K_D([^3H]Raklopriid) = 0,83 \pm 0,13 \text{ nM}$

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Membraanide testimine

Kõik radioligandi väljatõrjumiskatsed viidi läbi membraanpreparaatidel, mis sisaldasid D₁, D₂ või D₃ retseptoreid. Pärast uute rakumembraanide valmistamist teostati alati membraanide testimise katse. Testimist viidi läbi selleks, et selgitada välja radioligandi väljatõrjumiskatsete jaoks sobiv membraanpreparaatide kogus. Radioligandi soovituslik totaalne seostumine käesoleva töö katsetes peaks olema vahemikus 800-1200 cpm-i ehk seostub vähem kui 10% lahuses olevast vabast radioligandist.

Joonisel 9 on näidisenäna toodud membraanide testimise tulemus D₂ retseptori jaoks. Antud katse põhjal on sobiv membraanpreparaadi kogus punktis, mis vastab 150 000 rakule. Kuna membraanid säilitatakse alikvootides 10⁷ rakku/ml, siis tuleks katse jaoks kasutada 10-kordset lahjendust alglahusest. Lisaks on katse põhjal võimalik näha radioligandi mittespetsiifilise seostumise madalat osakaalu (väärtused alla 150 cpm).

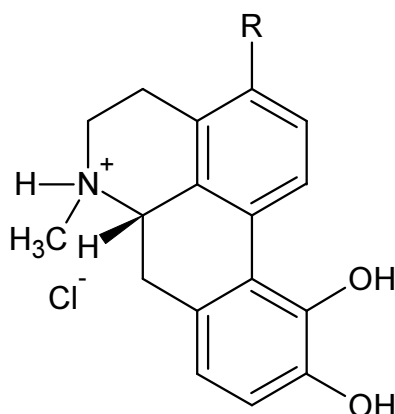


Joonis 9. Membraanide testimine radioligandi väljatõrjumiskatsete jaoks. Graafikul on toodud triplikaatides teostatud katse keskmised tulemused ± SEM. Katse põhjal on sobiv membraanpreparaadi kogus 150 000 rakku/punktis (10-kordne lahjendus alglahusest).

Samasugused katsed viidi läbi ka D_1 ja D_3 retseptorite jaoks. Joonisel 9 välja toodud D_2 retseptoriga samal ajal valmistatud D_1 retseptori jaoks oli sobiv membraanpreparaadi hulk 75 000 rakku/punktis (20-kordne lahjendus alglahusest) ning D_3 retseptori jaoks 150 000 rakku/punktis (10-kordne lahjendus). Mõlema retseptori puhul oli taaskord võimalik näha madalat mittespetsiifilise seostumise osakaalu, mis viitab kvaliteetsetele membraanpreparaatidele.

3.2 3-asendatud apomorfiini derivaadid

Käesolevas töös testiti esimesena ühendeid, mille puhul varieeriti funktsionaalrühmi apomorfiini kolmandas positsioonis (Joonis 10). Eelnevalt on meie töörühmas testitud nelja erinevat apomorfiini derivaatide seeriat. Seetõttu on laborisisese tähistusviisi järgi tegemist viienda seeriaga. Seeria moodustavad kaheksa erinevat 3-asendatud apomorfiini derivaati.



Joonis 10. 3-asendatud apomorfiinide struktuuri üldvalem. Seeria koosneb kaheksast derivaadist, mille puhul apomorfiini kolmas positsioon asendati erinevate funktsionaalrühmadega.

Kõik 3-asendatud apomorfiini derivaadid konkureerisid radioligandiga ning näilised afiinsused jäid vahemikku 0,12-1300 nM (Tabel 1). Mõõtmiste käigus selgus, et viiendas seerias on kuus ühendit, millel on parem afiinsus D_1 retseptorile kui apomorfiinil. Viiel testainel on kõrgem afiinsus D_2 ja neljal ühendil D_3 suhtes võrreldes apomorfiiniga. Madalamaid K_1 väärtusi, kui organismile omasel virgatsainel dopamiin, on võimalik näha vastavate retseptorite alatüüpide jaoks peaaegu kõigi viienda seeria ühendite puhul. Enamus testitud ühendeid (välja arvatud U5-2 ja U5-3) on mitteselektiivsed dopamiini retseptorite ligandid.

Tabel 1. 3-asendatud apomorfiini derivaatide keskmised $K_i \pm SEM$ väärtused, mis on arvatud triplikaatides teostatud vähemalt kolme korduskatse tulemustest ($n \geq 3$). Inhibeerimiskonstant K_i iseloomustab ühendi võimet inhibeerida radioligandi sidumist. Selektiivsus väljendab ühendi erinevate retseptori alatüüpide inhibeerimiskonstantide suhet.

Ühend	Asendaja	K_i (nM) \pm SEM			Selektiivsus		
		D_1R	$D_{2L}R$	D_3R	D_1/D_{2L}	D_1/D_3	D_{2L}/D_3
U5-1	Kloro-	110 \pm 16	90 \pm 20	53 \pm 7	1,2	2,1	1,7
U5-2	Bromo-	440 \pm 49	38 \pm 15	0,12 \pm 0,06	12	3700	320
U5-3	Hüdroksüül-	1300 \pm 100	4,8 \pm 1,1	0,30 \pm 0,11	270	4300	16
U5-4	Metüül-	130 \pm 17	30 \pm 5	18,1 \pm 0,3	4,3	7,2	1,7
U5-5	Fenüül-	55 \pm 5	15 \pm 3	11 \pm 5	3,7	5,0	1,4
U5-6	<i>N,N</i> -dimetüül-4-aminofenüül-	59 \pm 6	50 \pm 12	30 \pm 1	1,2	2,0	1,7
U5-7	4-hüdroksüfenüül-	4,6 \pm 1,8	9,0 \pm 2,0	4,9 \pm 0,5	0,5	0,9	1,8
U5-8	4-dibensofuranüül-	46 \pm 10	26 \pm 7	27 \pm 4	1,8	1,7	1,0
Apo	Hüdrüül-	370 \pm 45	39 \pm 7	15 \pm 2	9,5	25	2,6
DA	-	10000 \pm 1200	2000 \pm 690	35 \pm 5	5,0	290	57

Radioligandi väljatõrjumiskatsete tulemusena avastati viiendas seerias mitu silmapaistvat ühendit. Kõige parema afiinsusega ühend D_1 retseptorile on 4-hüdroksüfenüül-asendajaga apomorfiini derivaat (U5-7, $K_i = 4,6 \pm 1,8$ nM). Ühendi inhibeerimiskonstandi väärtused on samas suurusjärgus ka D_2 ($K_i = 9,0 \pm 2,0$ nM) ja D_3 ($K_i = 4,9 \pm 0,5$ nM) retseptorite jaoks. Seega on ühend U5-7 mitteselektiivne dopamiini retseptorite ligand.

Kui võrrelda 4-hüdroksüfenüül-asendajat (U5-7) hüdroksüül-asendajaga (U5-3), on näha, et D_1R inhibeerimiskonstandid erinevad ligikaudu 300 korda. Selle põhjal võib järeldada, et 4-hüdroksüfenüül-asendaja on sobival kaugusel selleks, et OH-rühm saaks interakteeruda D_1 retseptoriga. Lisaks võib ühendi U5-7 parem afiinsus D_1 retseptorile olla seotud aromaatses tuuma π - π interaktsioonidega või sellega, et aromaatses tuuma küljes olev hüdroksüülrühm on happelisem kui alifaatne OH-rühm. D_2 retseptorite puhul on ühendite U5-7 ja U5-3

inhibeerimiskonstandid väikse erinevusega. Ühend U5-3 on aga D₃ retseptori jaoks ootamatult kõrge, subnanomolaarse afiinsusega ($K_i = 0,30 \pm 0,11$ nM).

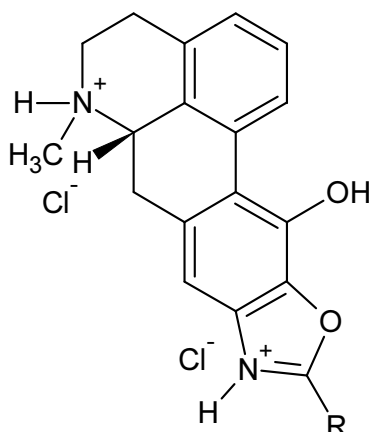
Tabelis 1 on võimalik näha hüdroksüülaseendajaga aine (U5-3) unikaalset selektiivsust. Ühend seostub D₂ retseptorile 270 korda paremini kui D₁ retseptorile. Veelgi suurem selektiivsus on saavutatud D₁ ja D₃ retseptorite vahel – ühendi afiinsus D₃ retseptorile on ligikaudu 4300 korda parem. Kõige raskem on saavutada selektiivsust ühte alamklassi kuuluvate retseptorite vahel, kuid ühendi U5-3 puhul on võimalik näha 16-kordset selektiivsust D₂ ja D₃ retseptori vahel.

Viienda seeria kõige madalama K_i väärtusega ühend on bromoasendajaga U5-2. See ühend on kõrge afiinsusega D₃ retseptori suhtes ($K_i = 0,12 \pm 0,06$ nM). Sellest tulenevalt on ka selle ühendi puhul näha huvitavat selektiivsusprofiili: K_i väärtused retseptoritele D₁ ja D₂ on 12-kordse erinevusega. Testaine U5-2 seostub D₃ retseptorile 3700 korda paremini kui D₁ retseptorile. Viienda seeria silmapaistvaimaks tulemuseks on 320-kordne selektiivsus D₃ retseptorile võrreldes D₂ retseptoriga. Kõrge selektiivsusega ühendid on aga perspektiivsed ravimikandidaadid, sest kõrvalmõjude vältimiseks eelistatakse ühendeid, mis seostuvad eelistatult soovitud sihtmärgile.

3.3 9,10-asendis modifitseeritud apomorfiini derivaadid

Järgmise seeria puhul muudeti asendajaid apomorfiini üheksandas ja kümnendas positsioonis (Joonis 11). Kuues seeria koosneb seitsmest erinevast ühendist, mille puhul apomorfiinile lisati 9- ja 10-asendisse 1,3-oksasolo rühm ning asendajaid varieeriti lisatud funktsionaalrühma 2-asendis.

Kõik 9,10-asendis modifitseeritud apomorfiini derivaadid konkureerisid radioligandiga, kuid inhibeerimiskonstantide väärtused jäid vahemikku 0,15-10 µM. Katsete tulemusel nähti, et kõigi ühendite afiinsused erinevatele DA retseptoritele on madalamad kui apomorfiinil (Tabel 2). Seega ei õnnestunud leida selektiivsemaid ja parema afiinsusega ühendeid.



Joonis 11. 9,10-asendis modifitseeritud apomorfiini derivaadid. Seeria moodustavad seitse ühendit, mille puhul lisati apomorfiinile 1,3-oksasolo rühm ning asendajaid varieeriti lisatud funktsionaalrühma 2-asendis.

Kõige paremini seostus dopamiini retseptoritele hüdrüülasendajaga ühend U6-9, mis oli kõige suurema afiinsusega D_3 retseptorile ($K_i = 150 \pm 12$ nM). Samas suurusjärgus inhibeerimiskonstandi väärtus oli ühendil ka D_2 retseptori jaoks ($K_i = 170 \pm 28$ nM). D_1 retseptorile seostus ühend kuni 10 korda madalama afiinsusega kui D_2 ja D_3 retseptoritele.

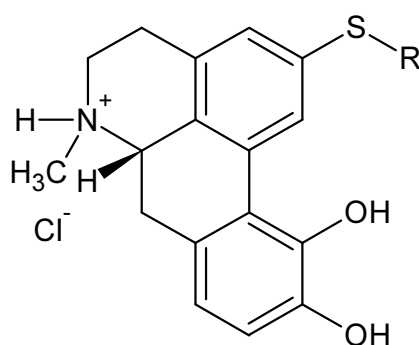
Tabel 2. 9,10-asendatud apomorfiini derivaatide keskmised $K_i \pm$ SEM väärtused, mis on arvatud triplikaatides teostatud vähemalt kolme korduskatse tulemustest ($n \geq 3$). Selektiivsus väljendab testaine erinevate retseptorite jaoks leitud inhibeerimiskonstantide suhet.

Ühend	Asendaja	K_i (nM) \pm SEM			Selektiivsus		
		D_1R	$D_{2L}R$	D_3R	D_1/D_{2L}	D_1/D_3	D_{2L}/D_3
U6-9	Hüdrüül-	1400 \pm 190	170 \pm 28	150 \pm 12	8,2	9,3	1,1
U6-10	Ammoonium-	10000 \pm 1000	6400 \pm 2100	6900 \pm 830	1,6	1,4	0,9
U6-11	Fenüül-	4400 \pm 340	1100 \pm 140	4400 \pm 930	4,0	1,0	0,3
U6-12	2-hüdroksüfenüül-	4700 \pm 570	2700 \pm 370	3100 \pm 230	1,7	1,5	0,9
U6-13	3-hüdroksüfenüül-	6800 \pm 470	1000 \pm 80	1800 \pm 90	6,8	3,8	0,6
U6-14	4-hüdroksüfenüül-	6800 \pm 1200	1700 \pm 190	1500 \pm 240	4,0	4,5	1,1
U6-15	3-metoksüfenüül-	2600 \pm 400	1000 \pm 120	1700 \pm 200	2,6	1,5	0,6
Apo	–	540 \pm 73	48 \pm 4	27 \pm 9	11	20	1,8

Kuuenda seeria ühendite madalad afiinsused viitavad sellele, et apomorfiini üheksandas ja kümnendas positsiooni ei ole mõistlik suuri funktsionaalrühmi kasutada. Ilmselt on madalam afiinsus tingitud sellest, et apomorfiini struktuuris on asendatud üks hüdroksüülrühm. Arvatakse, et nii dopamiini kui apomorfiini kaks hüdroksüülrühma on DA retseptoritele sidumisel olulisteks võtmeelementideks (Subramony 2006). Seda hüpoteesi toetavad ka kuuenda seeriaga läbiviidud sidumiskatsed.

3.4 2-asendatud apomorfiini derivaadid

Viimase seeria moodustavad kümme ühendit, millel puhul varieeriti asendajad apomorfiini teises positsioonis (Joonis 12). Kõigile ühenditele oli lisatud APO teise asendisse väävli aatom, mille küljes olevaid funktsionaalrühmi seitsmendas seerias varieeriti.



Joonis 12. 2-asendatud apomorfiini derivaatide struktuur. Seeria koosneb kümnest ühendist, mis kõik sisaldavad 2-asendis väävli aatomit.

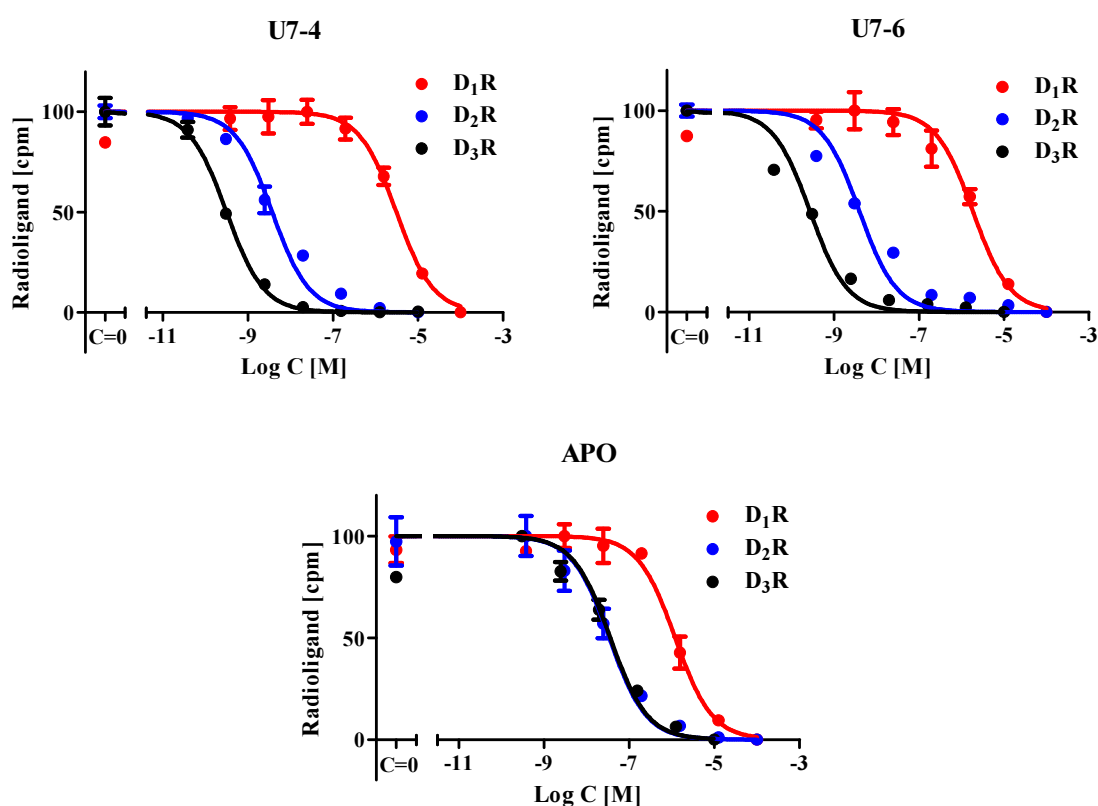
Tabelis 3 on välja toodud 2-asendatud apomorfiini derivaatide inhibeerimiskonstantide väärtused. Kõigi ühendite inhibeerimiskonstantide väärtused erinevatele DA retseptoritele jäid vahemikku 0,12 nM kuni 5800 nM. Võrreldes apomorfiiniga leiti seitsmendas seerias kolm ühendit, millel oli kõrgem afiinsus D₁ retseptorile kui APO-l endal. Lisaks sellele tehti kindlaks, et võrdluses apomorfiiniga on viiel derivaadil kõrgem afiinsus D₂ ja D₃ suhtes. Katsete tulemusena leiti mitu ühendit, millel oli suurem selektiivsus erinevate DAR alatüüpide suhtes kui apomorfiinil.

Tabel 3. 2-asendatud apomorfiini derivaatide keskmised $K_i \pm SEM$ väärtused, mis on arvutatud triplikaatides teostatud vähemalt nelja korduskatse tulemustest ($n \geq 4$). Selektiivsus väljendab testaine erinevate retseptorite jaoks leitud inhibeerimiskonstantide suhet.

Ühend	Asendaja	K_i (nM) \pm SEM			Selektiivsus		
		D_1R	$D_{2L}R$	D_3R	D_1/D_{2L}	D_1/D_3	D_{2L}/D_3
U7-1	(E)-2-fenüül-etenüül-	590 \pm 98	57 \pm 15	68 \pm 11	10	8,7	0,8
U7-2	(Z)-2-fenüül-etenüül-	110 \pm 8	8,3 \pm 1,4	11 \pm 1	13	10	0,8
U7-3	(E)-2-karboksüül-etenüül-	1200 \pm 320	47 \pm 12	100 \pm 21	26	12	0,5
U7-4	(E)-2-(N-metüülamiid)-etenüül-	1400 \pm 30	3,9 \pm 0,9	0,33 \pm 0,07	360	4200	12
U7-5	(E)-2-(N,N-dimetüülamiid)-etenüül-	62 \pm 15	9,3 \pm 1,7	12 \pm 2	6,7	5,2	0,8
U7-6	(E)-2-(N-ettüülamiid)-etenüül-	1000 \pm 110	2,4 \pm 0,7	0,12 \pm 0,04	420	8300	20
U7-7	(E)-2-(N-propüülamiid)-etenüül-	1000 \pm 80	25 \pm 3	12 \pm 5	40	83	2,1
U7-8	(E)-2-(N-butüülamiid)-etenüül-	2300 \pm 190	660 \pm 64	730 \pm 160	3,5	3,2	0,9
U7-9	(E)-2-(hüdrosümetüleen)-etenüül-	21 \pm 8	290 \pm 73	350 \pm 22	0,1	0,1	0,8
U7-10	(E)-2-(bromometüleen)-etenüül-	5800 \pm 530	3600 \pm 1250	1300 \pm 130	1,6	4,5	2,8
Apo	-	530 \pm 79	30 \pm 5	20 \pm 4	18	27	1,5

Seitsmenda seeria esimese kahe ühendi puhul on apomorfiinile lisatud 2-fenüületenüül asendaja, kuid tegemist on geomeetriliste isomeeridega. Tabelist 3 on näha, et cis-konformatsioonis olev ühend U7-2 on kõikide testitud dopamiini retseptorite suhtes kõrgema afiinsusega kui trans-vormis olev testaine U7-1. Kõige paremini seostuvad mõlemad ühendid D_2 retseptorile – trans-vormi $K_i = 57 \pm 15$ nM ning cis-vormi $K_i = 8,3 \pm 1,4$ nM. Suurimad inhibeerimiskonstantide väärtused on aga nendel testainetel D_1 retseptorite suhtes. Tabelis 3 on välja toodud ka ühendite U7-1 ja U7-2 selektiivsus. Huvitav on näha, et kahe geomeetrilise isomeeri selektiivsused on väga sarnased.

Kogu seeria üheks silmapaistvamaks ühendiks on testaine U7-4 (Joonis 13), mille funktsionaalrühmaks on *N*-metüülamiid. Testaine on kõrge afiinsuse ja selektiivsusega D₂-tüüpi retseptoritele, kusjuures eriti hästi seostub ühend D₃ retseptorile ($K_i = 0,33 \pm 0,07$ nM). D₂ retseptorile on sidumine aga ligikaudu 12 korda madalama afiinsusega ($K_i = 3,9 \pm 0,99$ nM) kui D₃R-le. D₁ retseptorile seostub ühend aga ligikaudu 4200 korda madalama afiinsusega kui D₃ retseptorile. Seeria järgmise ühendi (U7-5) puhul lisati amiidsele lämmastikule teine metüülrühm ning selle tulemusena kaotati ühendi selektiivsus. Tulemuseks on mitteselektiivne DA retseptorite ligand.



Joonis 13. Seitsmenda seeria apomorfiini derivaatide U7-4 ja U7-6 võrdlus apomorfiiniga.

Ühendid U7-4 ja U7-6 on antud seeria kõrgeima afiinsuse ja selektiivsusega ühendid. Joonisel on toodud iga ühendi jaoks väljatõrjumiskõverad DAR erinevatele alatüüpidele. On näha, et testained U7-4 ja U7-6 on selektiivsed D₂-tüüpi retseptorite suhtes ning kõige kõrgema afiinsusega D₃ retseptorile. Võrdlusainena kasutatud apomorfiin on DA retseptorite mitteselektiivne ligand. Katsed on teostatud neljas korduses, triplikaatides. Joonisel on toodud ühe eksperimendi tulemused. Graafik on normaliseeritud arvestades 100%-ks radioligandi sidumist retseptoritele juhul, kui märgistamata testainet pole lisatud.

Järgmise kolme ühendi puhul varieeriti amiidse lämmastiku küljes oleva alküülahela pikkust. Selgelt paistab välja tendents, mis on sõltuvuses alküülahela pikkusest. Tabelis 3 toodud tulemustest on näha, et mida lühem on alküülahel (U7-6), seda kõrgem on afiinsus kõigile dopamiinergilistele retseptoritele. Butüülrühmaga testainel U7-8 on kõige kõrgemad K_i väärtused ning ka kõige väiksem selektiivsus erinevate retseptorite suhtes. Propüül-asendajaga ühend U7-7 on selektiivne D_2 -tüüpi retseptoritele, kusjuures sidumine D_2 ja D_3 retseptoritele on ligikaudu samasuguse afiinsusega. Seitsmenda seeria kõige huvitavamaks ühendiks on etüülrühmaga testaine U7-6 (Joonis 13). See apomorfiini derivaat on kogu seeria kõige kõrgema afiinsusega ühend nii D_2 ($K_i = 2,4 \pm 0,7$ nM) kui ka D_3 ($K_i = 0,12 \pm 0,04$ nM) retseptorile. Lisaks paistab silma ühendi selektiivsusprofiil – testaine seostub ligikaudu 8300 korda kõrgema afiinsusega D_3 retseptorile kui D_1R -le. Samuti on ühend ligikaudu 420 korda selektiivsem D_2 retseptorile võrreldes D_1R -ga. Märkimisväärne 20-kordne selektiivsus on saavutatud ka D_2 -tüüpi retseptorite vahel. Võrreldes omavahel ühendeid U7-6 ja U7-7 on näha, et D_2 retseptori puhul on inhibeerimiskonstantide erinevus ligikaudu 10-kordne ning D_3 retseptori puhul 100-kordne.

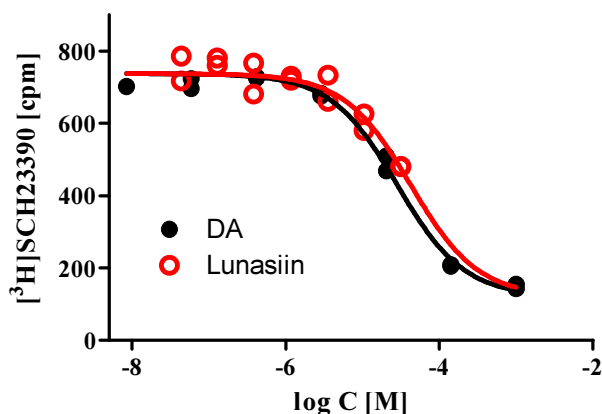
Hüdroksüülrühmaga testaine U7-9 on seitsmenda seeria kõige kõrgema afiinsusega ühend D_1 retseptorile ($K_i = 21 \pm 8$ nM). Testaine afiinsus D_2 retseptori suhtes on kuni 14 korda madalam. D_3 retseptorile seostub ühend veelgi halvemini, kusjuures võrreldes D_1 retseptoriga on afiinsuste erinevus 17-kordne. Seeria järgmise testaine puhul (U7-10) asendati hüdroksüülrühm broomiga ning tulemuseks saadi madala afiinsusega mitteselektiivne ühend.

3.5 Lunasiin

Peptiidi dopamiinergilist aktiivsust testiti samuti radioligandi väljatõrjumiskatsetes. Katsed teostati seetõttu, et käitumiskatsetes on nähtud lunasiini mõju kesknärvisüsteemile, kuid otsest sihtmärki, millele peptiid mõjub, pole teada. Katsete läbiviimiseks valiti üks DA retseptor, mis on seotud G_s -valguga (D_1R) ja teine, mis kannab signaali üle $G_{i/o}$ -valgu kaudu (D_2R). Katsete tulemused publitseeriti koostöös Läti Ülikooli teadlastega teadusartiklis (Dzirkale *et al.* 2013).

Katsete tulemusena nähti, et lunasiin seostub D_1 retseptorile arvestatava afiinsusega. Kahe duplikaatides teostatud korduskatse tulemusel saadi lunasiini inhibeerimiskonstandiks $K_i = 60 \pm 15$ μ M (Joonis 14). Samas suurusjärgus on ka organismile omase virgatsaine dopamiini

inhibeerimiskonstandi väärtus $K_i = 36 \pm 7 \mu\text{M}$. DA retseptorite ligandid on valdavalt madalmolekulaarsed ühendid, kui katsete põhjal nähti, et dopamiinergilistele retseptoritele võivad seostuda ka peptiidid. Lunasiini sidumiskatsetes D_2R retseptoritele ei nähtud olulist efekti kuni peptiidi kontsentratsioonini $32 \mu\text{M}$.



Joonis 14. Radioligandi [³H]SCH23390 väljatõrjumine dopamiini (DA) või lunasiiniga D_1 retseptoriga rakumembraanides. Graafik kujutab ühe eksperimendi tulemusi. Inhibeerimiskonstandi väärtused arvutati kahe korduskatse tulemustest. Dopamiini jaoks $K_i = 60 \pm 15 \mu\text{M}$ ja lunasiinil $K_i = 36 \pm 7 \mu\text{M}$.

Radioligandi väljatõrjumiskatsete põhjal nähti, et peptiid lunasiin võib mõjutada dopamiinergilist süsteemi ning selle kaudu avaldada mõju kesknärvisüsteemile. Lisaks dopamiini retseptoritele võib lunasiin aktiveerida ka teisi GPCR-e. Seetõttu on huvitav edasi uurida peptiidi mõju nii dopamiinergilisele süsteemile kui ka teistele G-valguga seotud retseptoritele. Praeguseks on kindlaks tehtud, et lunasiin ei mõjuta serotoniini 1A retseptoreid (avaldamata andmed).

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös uuriti erinevate ühendite sidumisomadusi dopamiinergilistele retseptoritele, eesmärgiga leida uusi, alatüüp-selektiivseid ja kõrge afiinsusega ligande. Testimiseks kasutati dopamiini retseptoreid D₁, D₂ ja D₃, mida ekspresseeriti HEK-293 rakuliinis. Ligandide esmaste farmakoloogiliste omaduste iseloomustamiseks kasutati radioligandi väljatõrjumiskatseid.

Teoreetilises osas kirjeldati G-valguga seotud retseptoreid, sealhulgas dopamiinergilisi retseptoreid, ning nende tähtsust organismis. Lisaks anti lühike ülevaade ligandi sidumisest, peatudes pikemalt radioligandi väljatõrjumiskatsetel. Põgusalt räägiti ka apomorfiinist ning sojavalgus leiduvast peptiidist lunasiin.

Suure osa käesolevas töös testitud ühenditest võtsid enda alla erinevad apomorfiini derivaadid. Katsete käigus leiti mitmeid nanomolaarse afiinsusega D₂ retseptori ligande. Samuti tehti kindlaks mitu subnanomolaarse afiinsuse ja märkimisväärse D₃ retseptori selektiivsusega ühendit. Kokkuvõttes tuvastati mitmeid sidumisomadusi parandavaid struktuurielemente, mis on abiks uute, efektiivsete dopamiinergiliste ravimikandidaatide arendamisel. Lisaks sellele uuriti esimest korda lunasiini toimet kesknärvisüsteemile ning avastati, et peptiid seostub dopamiini retseptoritele ligikaudu kaks korda madalama afiinsusega kui organismile omane virgatsaine DA.

Töö dopamiinergiliste retseptoritega jätkub. Ligandide sidumisomadusi on plaanis uurida ka D₄ ja D₅ retseptoritele. Lisaks on kavas rakendada DA retseptorite uurimiseks fluorestsentsmeetodeid, mille abil retseptor-ligand interaktsioone veelgi täpsemalt jälgida. Käesoleva töö raames avastati mitmeid ühendeid, mida oleks võimalik kasutada dopamiinergiliste fluorestsetsliigandide arendamiseks.

Antud töö tulemused on publitseeritud ühes teadusartiklis (Dzirkale *et al.* 2013). Lisaks on koostamisel teise artikli käsikiri ning üks patenditaotlus.

TÄNUAVALDUSED

Kõige suurem tänu ja lugupidamine läheb minu juhendajale, Ago Rinkenile, kelle professionaalsel suunamisel see magistritöö valmis. Ago on mind õpetanud iseseisvalt katsetama ja teaduslikult mõtlema ning kaasanud mind aktiivselt töörühma igapäevastesse toimetustesse. Suur tänu heade ettepanekute ja igati toetava suhtumise eest.

Siirad tänusõnad kuuluvad meie töörühma hingedele Reet Reinart-Okugbenile ja Olga Mazinale. Ilma Reedata poleks ma dopamiinini tõenäoliselt jõudnudki. Reet ja Olga on suurepäraseks eeskujuks tudengite juhendamisel ja teadustöö tegemisel. Tänan teid huvitavate vestluste ja innustavate mõtete ning selle töö valmimisele kaasa aitamise eest.

Positiivse töökeskkonna loomise eest soovin tänada kõiki oma praeguseid ja endiseid laborikaaslasid, kes on alati valmis nõu ja jõuga aitama. Suur tänu Sergei Kopantšukile, Santa Veikšinale ning Lauri Tõntsonile oma teadmiste ja kogemuste lahke jagamise eest. Samuti soovin tänada oma saatusekaaslasid Kairi Tõnsaud, Annika Heinlood ja Reet Linki – ühiselt oli meil kindlasti toredam kogu õppeprotsessi läbida. Aitäh ka sulle, Kairi Kübarsepp, keeleliste nõuannete lahke jagamise eest.

Erilised tänusõnad lähevad minu elukaaslasele Mihklile, kellega on hea kodus „keemiajuttu“ rääkida. Suured tänusõnad kuuluvad ka mu perekonnale, kes alati uurib „Kuidas su rakud elavad?“. Ma tänan teid pideva julgustamise ja minusse uskumise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A. (2011) Guide to Receptors and Channels (GRAC). *British Journal of Pharmacology*. 164 (S1): S1-S324.

Benassi-Benelli, A., Ferrari, F., Quarantotti, BP. (1979) Penile erection induced by apomorphine and N-n-propyl-norapomorphine in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 242(2), 241-247.

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*. 180, 1200.

Cheng, Y.-C., Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*. 22, 3099-3108.

Civelli, O., Reinscheid, R. K., Zhang, Y., Wang, Z., Fredriksson, R., Schiöth, H. B. (2013) G Protein-Coupled Receptor Deorphanizations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 53, 127-146.

Davenport, A. P., Russell, F. D. (1996) Radioligand Binding Assay: Theory and Practice. *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*. 169-179.

Dzirkale, Z., Rumaks, J., Svirskis, S., Mazina, O., Allikalt, A., Rincken, A., Jekabsons, K., Muceniece, R., Klusa, V. (2013) Lunasin-induced behavioural effects in mice: Focus on the dopaminergic system. *Behavioural Brain Research*. 256, 5-9.

de Lumen, B. O. (2005) Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide. *Nutrition Reviews*. 63(1), 16-21.

de Mejia, E. G., Dia, V. P. (2009) Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage. *Peptides*. 30, 2388-2398.

Filmore, D. (2004) It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery*. 24-28.

- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., Schiöth H. B. (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*. 63(6), 1256-1272.
- Galvez, A. F. (2012) Identification of Lunasin as the Active Component in Soy Protein Responsible for Reducing LDL Cholesterol and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 126:A10693.
- Galvez, A. F., de Lumen B. O. (1999) A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 17, 495-500.
- Gloriam, D. E., Fredriksson, R., Schiöth, H. B. (2007) The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* 8, 338-405.
- Herm, L., Berenyi, S., Vonk, A., Rinken, A., Sipos, A. (2009) N-Substituted-2-alkyl- and 2-arylnorapomorphines: Novel, highly active D₂ agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17, 4756-4762.
- Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C.-C., de Lumen, B. O. (2009a) Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 390, 803-808.
- Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C.-C., de Lumen, B. O. (2009b) Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*. 30, 426-430.
- Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N., Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., Tabira, T., LaFerla, F.M., Kira, J. (2011) Apomorphine Treatment in Alzheimer Mice Promoting Amyloid- β Degradation. *American Neurological Association*. 69, 248-256.
- Hsieh, C.-C., Hernandez-Ledesma, B., Jeong, H. J., Park, J. H., de Lumen, B. O. (2010) Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable. *PLoS ONE*. 5(1): e8890.
- Hulme, E. C., Trevethick, M. A. (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British Journal of Pharmacology*. 161(6), 1219-1237.

Kilk, A. Signaali ülekanne eukariootses rakus;

http://www.ebc.ee/loengud/Ann_Kilk/signaali_ylekanne_rakus/signaali_ylekanne_eukaryootses_rakus.2007.pdf viimati alla laetud 20.05.2014

Kleuss, C., Raw, A. S., Lee, E., Sprang, S.R., Gilman, A. G. (1994) Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9828-9831.

Kyle, S., James, K. AR., McPherson, M. J. (2012) Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microbial Cell Factories.* 11:28.

Lagerström, M. C., Schiöth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery.* 7, 339-357.

Lefkowitz, R. J., Roth, J., Pastan, I. (1970) Radioligand Assay of Adrenocorticotrophic Hormone: New Approach to Assay of Polypeptide Hormones in Plasma. *Science.* 170, 633-635.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005) Biosignaling, In: *Principles of Biochemistry.* W.H.Freeman and Company., New York.

Linse, S. S. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2012. Studies of G-protein-coupled receptors;

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/advanced-chemistryprize2012.pdf viimati uuendatud 10.10.2012

Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews.* 1, 189-225.

Motulsky, H., Christopoulos, A. (2003) Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A practical guide to curve fitting. *GraphPad Prism,* 4.

Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell.* 80, 249-257.

- Odani, S., Koide, T., Ono, T. (1987) Amino Acid Sequence of Soybean (*Glycine max*) Seed Polypeptide Having a Poly(L-aspartic Acid) Structure. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(22), 10502-10505.
- Paton, W. D. M., Rang, H. P. (1965) The Uptake of Atropine and Related Drugs by Intestinal Smooth Muscle of Guinea-Pig in Relation to Acetylcholine Receptors. *Proc. R. Soc.* 163, 1-44.
- Reinart, R., Gyulai, Z., Berenyi, S., Antus, S., Vonk, A., Rinken, A., Sipos, A. (2011) New 2-thioether-substituted apomorphines as potent and selective dopamine D₂ receptor agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46, 2992-2999.
- Reinart-Okugbeni, R., Ausmees, K., Kriis, K., Werner, F., Rinken, A., Kanger, T. (2012) Chemoenzymatic synthesis and evaluation of 3-azabicyclo[3.2.0]heptane derivatives as dopaminergic ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 55, 255-261.
- Reinart-Okugbeni, R., Vonk, A., Uustare, A., Gyulai, Z., Sipos, A., Rinken, A. (2013) 1-substituted apomorphines as potent dopamine agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21, 4143-4150.
- Ribarič, S. (2012) The Pharmacological Properties and Therapeutic Use of Apomorphine. *Molecules*. 17, 5289-5309.
- Sanna, F., Succu, S., Hübner, H., Gmeiner, P., Argiolas, A., Melis, M. R. (2011) Dopamine D₂-like receptor agonist induce penile erection in male rats: differential role of D₂, D₃, and D₄ receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Behavioural Brain Research*. 225, 169-176.
- Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., Price D. L. (2012) Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology. 8th edition. Elsevier Academic Press.
- Subramony, J. A. (2006) Apomorphine in Dopaminergic Therapy. *Molecular Pharmaceutics*. 3(4), 380-385.

Zhang, J., Xiong, B., Zhen, X., Zhang, A. (2008) Dopamine D₁ Receptor Ligands: Where Are We Now and Where Are We Going. *Medicinal Research Reviews*. 29(2), 272-294.

Zhang, R., Xie, X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Phramacologica Sinica*. 33, 372-384.

Weiss, J. N. (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB Journal*. 11, 835-841.

CHARACTERIZATION OF NOVEL DOPAMINERGIC LIGANDS BY COMPETITIVE RADIOLIGAND BINDING ASSAY

Anni Allikalt

SUMMARY

This Master's thesis characterizes binding properties of different dopaminergic ligands. Aim of the study was to apply the D₁, D₂ and D₃ dopamine receptor stable cell lines for ligand binding studies. The main purpose of this work was to discover novel, subtype-selective, high-affinity dopaminergic ligands.

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are involved in many diseases and are therefore targets of approximately 50% of prescription drugs. The theoretical part of the thesis describes GPCRs, including dopamine receptors, and their importance in cellular signal transduction. In addition, a short overview of ligand binding, focusing on radioligand competition assay, was given. Moreover, apomorphine and a soy peptide lunasin were briefly described.

Most of the experiments in the thesis were done with apomorphine derivates. Several compounds with nanomolar affinities for D₂ receptor were described. Also, some compounds with subnanomolar affinity and notable selectivity for D₃ receptor were identified. In summary, some promising functional groups, which improved binding properties of apomorphine derivates, were discovered. This is an additional step towards novel, subtype-selective dopaminergic drugs. In addition, the effect of lunasin on the central nervous system was investigated for the first time. It was discovered that lunasin has two times lower affinity towards D₁ receptor than dopamine itself.

Work with dopaminergic receptors continues. The goal is to characterize binding properties of novel ligands towards D₄ and D₅ receptors. In addition, the aim is to implement different fluorescence methods for dopamine receptors. This would help to understand and characterize receptor-ligand interactions in further details. Several new compounds identified in the thesis could be applied for development of novel fluorescent ligands.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Lunasin-induced behavioural effects in mice: Focus on the dopaminergic system



Zane Dzirkale^a, Juris Rumaks^a, Simons Svirskis^a, Olga Mazina^b, Anni Allikalt^b, Ago Rinke^b, Kaspars Jakobsons^c, Ruta Muceniece^c, Vija Klusa^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Latvia, 1A Sarlotes St, Riga, LV-1001, Latvia

^b Department of Bioorganic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Tartu, Ravila 14a, Tartu, EE-50411, Estonia

^c Division of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Latvia, 1A Sarlotes St, Riga, LV-1001, Latvia

HIGHLIGHTS

- For the first time central effects of peptide lunasin are studied.
- Lunasin possesses markedly expressed neuroleptic/cataleptic effect in mice.
- Lunasin does not influence ketamine and bicuculline effects in mice.
- Binding assay demonstrates modest affinity of lunasin for the dopamine D1 receptor.
- Lunasin antagonises apomorphine effect on cAMP accumulation.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2013

Received in revised form 1 August 2013

Accepted 5 August 2013

Available online 8 August 2013

Keywords:

Lunasin

Behaviour

Dopamine receptors

cAMP

ABSTRACT

The present study for the first time is devoted to identify central effects of synthetic lunasin, a 43 amino acid peptide. A markedly expressed neuroleptic/cataleptic effect was observed at low (0.1–10 nmol/mouse) centrally administered doses in male C57Bl/6 mice. Lunasin considerably reduced the amphetamine hyperlocomotion but weakly apomorphine climbing behaviour. No influence on ketamine and bicuculline effects was observed. Binding assay studies demonstrated modest affinity of lunasin for the dopamine D₁ receptor ($K_i = 60 \pm 15 \mu\text{M}$). In a functional assay of cAMP accumulation on live cells lunasin antagonised apomorphine effect on D₁ receptor activation ($\text{pEC}_{50} = 6.1 \pm 0.3$), but had no effect in cells expressing D₂ receptors. The obtained data suggest that lunasin's action at least in part is provided via dopaminergic D1 receptor pathways. However, other non-identified mechanisms (probably intracellular) may play an important role in lunasin's central action. Nevertheless further studies of lunasin are promising, particularly taking into account a necessity for novel type of antipsychotic drugs.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lunasin is a biologically active 43 amino acid peptide (SKWQHQQDSCRKQKQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDD), which was first discovered by Dr. Alfredo Galvez [1,2] by isolating it from soybeans. Afterwards lunasin was found in cereal grains [3–7] and other plants [8,9]. Since its discovery, many health-promoting effects of lunasin and its mechanisms of action have been described. The cancer-preventing activity is explained by lunasin's ability to inhibit histone acetyltransferase [10–13], anti-inflammatory effects by suppression of NF- κ B, cyclooxygenase-2, iNOS, PGE2 and interleukine-1 β production in macrophages [14,15], cholesterol-lowering properties by inhibition of the

expression of HMG-CoA reductase gene and upregulation of the LDL-receptor gene [16] and the immune-modulating action by the activation of NK cells [17]. Lunasin protects DNA from oxidation [18] and increases the glutathione peroxidase activity, and shows 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity [4]. However, despite lunasin's medical importance, its exact three-dimensional structure is not very clearly characterized, though using the method of classical molecular dynamics the conformational profile of three α -helical bundles has been demonstrated [19]. Previously a cell adhesion motif RGD and a carboxylic acid tail of nine aspartic acid residues were identified [11].

Studies in animals [20] and human beings [21] have shown that lunasin administered orally can enter target tissues, even brain tissue [20]. However up to now, we have not found any data about lunasin's influence on the central nervous system functions. Therefore, the present study for the first time is devoted to the examination of the synthetic full sequence (43 amino acids) of

* Corresponding author. Tel.: +371 29276263; fax: +371 67366306.

E-mail address: vjaklus@latnet.lv (V. Klusa).

lunasin on behaviour after its central (intracisternally) administration in mice. Pharmacological properties *in vitro* (ligand binding and signal transduction modulation) of lunasin on dopamine receptors D₁ and D₂ were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male C57Bl/6 mice were obtained from the Laboratory of Experimental Animals, Riga Stradins University, Riga, Latvia. Animals weighing 22 ± 2 g were housed under standard conditions (21–23 °C, 12-h light–dark cycle) with unlimited access to food and water. Experimental groups consisted of 6–8 mice. All experimental procedures were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU and local laws and policies on the protection of animals were used for scientific purposes, and were approved by the Animal Ethics Committee of the Food and Veterinary Service (Riga, Latvia). All efforts were made to minimize animal sufferings and to reduce the number of animals used.

2.2. Materials

Synthetic lunasin was purchased from CASLO Laboratory ApS (Technical University of Denmark, Denmark), reference drugs amphetamine, apomorphine, ketamine and bicuculline from Sigma/Aldrich (St. Louis, USA), [³H]SCH23390 and [³H]raclopride were from PerkinElmer (Massachusetts, USA), as well as all the equipment and materials used for counting radioactivity. The biological activity of lunasin on live cells was assessed using ¹Epac^{CV} cAMP biosensor [22]. Cell culture media and supplements were from PAA (Westborough, USA); foetal bovine serum was from Sigma/Aldrich (St. Louis, USA).

2.3. Intracisternal injection

Lunasin was dissolved in sterile water for stock solution, and then diluted for necessary concentrations with the artificial cerebrospinal fluid (aCSF). The peptide was injected into cisterna magna (intracisternally, i.c.) in conscious mice via a J-shape needle connected to a Hamilton syringe as described previously [23,24]. Lunasin was tested at doses 0.1, 1.0 and 10.0 nmol/mouse/5 μl. The mostly used dose was 0.1 nmol/mouse. For the control group, mice received aCSF i.c. (5 μl).

2.4. Open field test

2.4.1. Influence on locomotion

Locomotor behaviour was evaluated in open field (wooden square box 50 cm × 50 cm × 20 cm) using video-tracking programme with software *Panlab Smart Version 2.5*. Lunasin was injected at doses 0.1, 1.0 and 10.0 nmol/mouse/5 μl, i.c. 10 min before testing. Horizontal locomotor activity was quantified as the total distance travelled in centimetres during 5 min testing.

2.4.2. Influence on amphetamine-induced hyperactivity

The influence of lunasin at a dose 0.1 nmol/mouse on hyperlocomotion induced by amphetamine (injected 2.5 mg/kg i.p. 20 min before peptide) was assessed in open field as in Section 2.4.1.

2.4.3. Influence on ketamine-induced locomotion

Ketamine was administered at a dose 15 mg/kg i.p. 10 min before i.c. injection of lunasin at dose 0.1 nmol/mouse. Locomotion was registered as in Section 2.4.1.

2.5. Influence on apomorphine-induced climbing behaviour

The experimental procedure was carried out according to that described elsewhere [25,26]. Animals received injection of apomorphine (5 mg/kg s.c.) dissolved in 0.1% sterile ascorbic acid solution, or 0.1% ascorbic acid solution for control, 10 min before i.c. administration of lunasin. After 5 min, the mouse was placed in wire-mesh cage and observed for climbing behaviour at a 5 min interval for 30 min. The climbing behaviour was scored as follows: 0, all four paws on the floor; 1, one paw on the wall of the cage; 2, two paws on the wall of the cage; 3, three paws on the wall of the cage, and 4, four paws on the wall of the cage. Thus, the climbing scores can vary from 0 to 24 for each animal.

2.6. Catalepsy test

The catalepsy test was performed 5, 30 and 60 min after lunasin administration by placing both forepaws of the mouse over a horizontal bar (diameter 0.2 cm), elevated 6 cm from the surface of the desk. The time required for the animal to move all four paws (latency) was scored in seconds [27]. The influence of apomorphine (5 mg/kg s.c. 10 min before lunasin injection) and amphetamine (2.5 mg/kg i.p. 20 min before lunasin injection) on peptide-induced catalepsy was also tested.

2.7. Influence on bicuculline-induced seizures

Seizure threshold was determined according to the method described previously [28,29]. The seizure threshold was determined by intravenous infusion (Syringe Infusion Pump, Model SP100iZ; World Precision Instruments, USA) of bicuculline (dissolved in saline to a final concentration of 2 mg/ml) at a constant rate of 0.5 ml/min and by recording the bicuculline dose that caused the first myoclonic jerk of the head and neck. Bicuculline dose per mg/kg bodyweight in the presence and absence of lunasin was calculated. Lunasin at dose 0.1 nmol/mouse was administered 10 min before bicuculline infusion.

2.8. Radioligand displacement assay

The affinities of lunasin for dopamine receptors were estimated by their ability to displace the specific binding of and [³H]SCH23390 for D₁ and [³H]raclopride for D₂ receptors. The used competitive radioligands [³H]SCH23390 and [³H]raclopride have high affinity for D₁-like (K_d: 0.5 nM) and D₂-like (K_d: 0.7 nM) dopamine receptors, respectively. The experiments were performed on cell membrane suspensions of HEK293 cells stably expressing recombinant dopamine D₁ or D₂ receptors [30].

The cell membrane suspensions were prepared and the competition assays were performed as described previously [31]. For eight-point competition assay, the concentration of radioligand was fixed to near K_d value (1 nM) and concentration of lunasin was varied from 50 μM to 1 nM.

2.9. cAMP biosensor assay

The biological activity of lunasin was tested by its ability to either activate or inhibit cAMP synthesis in HEK293 cells stably expressing recombinant dopamine D₁ or D₂ receptors [30]. For monitoring the changes in cAMP in live cells ¹Epac^{CV} biosensor [22] was used. For the expression of ¹Epac^{CV} cAMP biosensor in HEK293 cells BacMam system was generated and used and described previously [32].

Cyclic AMP levels in live cells were measured as described by Mazina et al. [32] with minor modifications. Fluorescence from ¹Epac^{CV} biosensor was measured using PHERAstar plate reader (BMG Labtech GmbH) at 37 °C. Background fluorescence intensities were detected in non-stimulated cells by excitation at 427(20) nm (mTurquoise excitation) and measuring dual emission of the excited fluorophores at 480(20) nm (mTurquoise emission) and 530(20) nm (Venus emission).

2.10. Statistics

The behavioural data were analysed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., CA): one-way ANOVA with Bonferroni's comparison test for selected pairs of columns as post hoc analysis. The results were expressed as mean ± SEM. A significance level was set at *p* < 0.05.

All *in vitro* pharmacological data were normalized to 100% response values and analyzed by means of non-linear least squares regression analysis using the GraphPad Prism 5. Changes in FRET and the corresponding biological activities of the ligand were calculated as described previously [32] using MATLAB 7.8.0 (R2009a) (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). The results are represented as mean ± SEM of at least two independent experiments carried out in triplicates.

3. Results

In open field test, the influence of lunasin on locomotor activity was observed by video tracking at the doses 0.1, 1.0 and 10 nmol/mouse injected i.c. The peptide caused a considerable decrease in locomotor activity (*F*(3,24) = 10.18, *p* < 0.0002) by reducing the total length of track. The more pronounced effect was observed at the lowest tested dose of 0.1 nmol/mouse (reduction of track length by 75% vs. control, *p* < 0.001); at the higher tested doses of 1.0 and 10.0 nmol/mouse the effect was even less than that of the lowest one (reduction of track length by about 63% vs. control, *p* < 0.01) (Fig. 1).

For further experiments we used the lowest active dose of 0.1 nmol/mouse. This dose significantly (by about 40%) inhibited hyperlocomotion induced by amphetamine (*F*(3,23) = 28.7, *p* < 0.0001) (Fig. 2A), and reduced (by 15%) the apomorphine-induced climbing effect (*F*(3,20) = 43.8, *p* < 0.0001) (Fig. 2B). No significant influences on ketamine-induced locomotor activity were observed (Fig. 3A), however ketamine per se reduced horizontal activity in open field test (*F*(3,26) = 12.15, *p* < 0.0001). Lunasin also did not change bicuculline-induced convulsions (Fig. 3B).

At a dose 0.1 nmol/mouse lunasin caused a pronounced catalepsy (*F*(3,20) = 55.59, *p* < 0.0001) (Fig. 4), which started in 5 min after lunasin injection and lasted for 30 min (*F*(3,20) = 67.37,

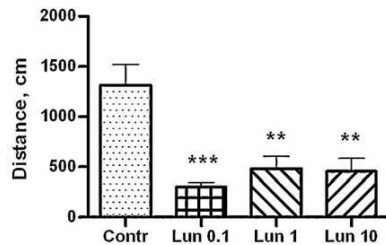


Fig. 1. Influence of lunasin on locomotor activity in open field test in C57Bl/6 mice. Lunasin (Lun) at doses 0.1, 1.0 and 10 nmol/mouse/5 μ l or aCSF for control (Contr) was injected i.c. 10 min before testing. Horizontal locomotor activity was quantified as the total distance travelled in centimetres during 5 min testing. Data are expressed as mean \pm SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. Contr.

p < 0.0001) (and even 60 min, not shown). Pre-treatment with apomorphine or amphetamine completely prevented lunasin-induced catalepsy (Fig. 4).

Radioligand displacement assay studies demonstrated modest affinity of lunasin for the D₁ receptor with $K_i = 60 \pm 15 \mu$ M (Fig. 5 circles), however no effect on 1 nM [³H]raclopride binding to D₂ receptors could be detected at peptide concentrations up to 100 μ M (data not shown).

In cAMP assay lunasin inhibited the cAMP formation initiated by 10 nM apomorphine in cells expressing dopamine D₁ receptor activation with apparent pEC₅₀ value 6.1 ± 0.3 ($n = 5$), whereas D₁-specific antagonist's SCH 39166 had pEC₅₀ = 7.61 ± 0.03 ($n = 5$) in

this system. No effect on cAMP accumulation (neither agonistic nor antagonistic) was evident in cells expressing D₂ receptors at lunasin concentrations up to 100 μ M.

4. Discussion

The ability of lunasin, a 43-amino acid natural peptide, to penetrate the blood–brain barrier [20] evokes our interest to assess its influence on the functions of the central nervous system. For the first time, we have found that the synthetic lunasin induced very clearly expressed motionless and catalepsy, even at small doses, such as 0.1 nmol/mouse. Taking into account the well-established phenomenon of catalepsy, which is provided mostly via dopamine receptor antagonism, first of all we studied the interactions of lunasin with drugs related to dopaminergic system. When we pre-treated mice with apomorphine, a dopamine receptor agonist, which activates both D₁ and D₂ subtypes of dopamine receptors, and which causes a considerable climbing behaviour, surprisingly we found only 15% reduction of climbing activity when lunasin was injected.

The binding of lunasin to dopamine D₁ and D₂ receptors assessed in a radioligand displacement assay on HEK293 cell membranes showed a significant binding to D₁ receptors ($K_i = 60 \pm 15 \mu$ M), but no binding to D₂ receptors.

The cAMP assay in live HEK293 cells expressing D₂ receptors showed neither agonistic nor antagonistic properties of lunasin, while in cells expressing D₁ receptors it inhibited the activation of 10 nM apomorphine with average efficacy EC₅₀ = 0.8 μ M.

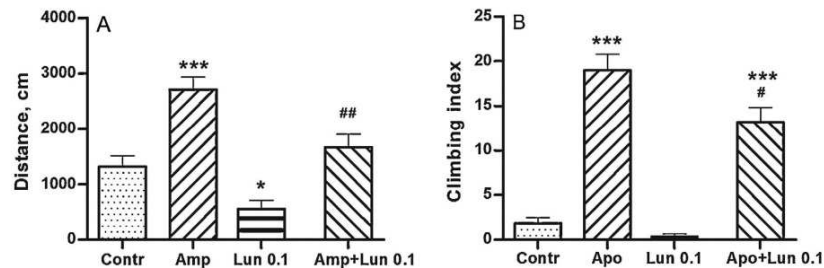


Fig. 2. Influence of lunasin on amphetamine-induced hyperactivity (A) and apomorphine-induced climbing behaviour (B) in C57Bl/6 mice. Amphetamine (Amp) 2.5 mg/kg i.p. administered 20 min before lunasin at dose 0.1 nmol/mouse/5 μ l (Lun 0.1) or aCSF (Contr) for control i.c. injection. Locomotor activity in open field test was assessed 10 min after i.c. injection and scored as the total distance travelled in centimetres during 5 min testing. Apomorphine (Apo) 5 mg/kg s.c. administered 10 min before Lun 0.1 or aCSF for control i.c. injection. The climbing behaviour was observed starting 5 min after the i.c. injection, and scored at 5 min interval for 30 min. Data are expressed as mean \pm SEM. * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs. Contr; # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. Amp (A) or Apo (B).

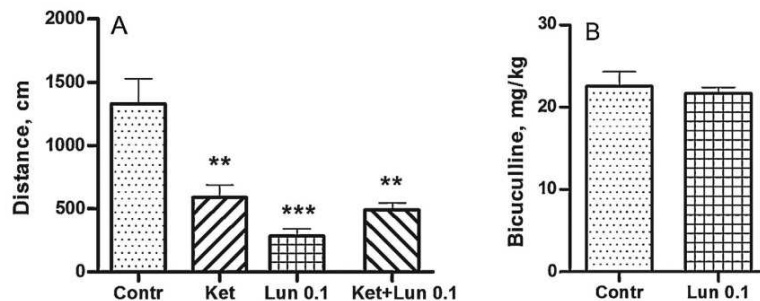


Fig. 3. Influence of lunasin on ketamine-induced locomotion in open field test (A) and bicuculline-induced seizures (B) in C57Bl/6 mice. Ketamine (Ket) was administered 15 mg/kg i.p. 10 min before lunasin 0.1 nmol/mouse/5 μ l (Lun 0.1) or aCSF (Contr) for control i.c. injection. Locomotor activity in open field test was assessed 10 min after i.c. injection and scored as the total distance travelled in centimetres during 5 min testing. Lun 0.1 or aCSF was administered i.c. 10 min before bicuculline 2 mg/ml i.v. infusion. Seizure threshold was calculated as bicuculline dose per mg/kg bodyweight. Data are expressed as mean \pm SEM. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. Contr.

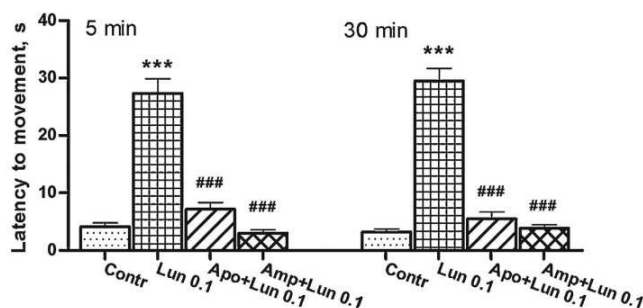


Fig. 4. Influence of amphetamine and apomorphine on lunasin-induced catalepsy, which was assessed 5 and 30 min after peptide i.c. injection in C57Bl/6 mice. Apomorphine (Apo) 5 mg/kg s.c. was injected 10 min before lunasin (Lun 0.1 nmol/mouse/5 μ l) and amphetamine (Amp) 2.5 mg/kg i.p. 20 min before Lun 0.1 or aCSF for control i.c. injection. The time required for the animal to move all four paws was scored in seconds (latency). Data are expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001 vs. Contr; ### p < 0.001 vs. Lun 0.1.

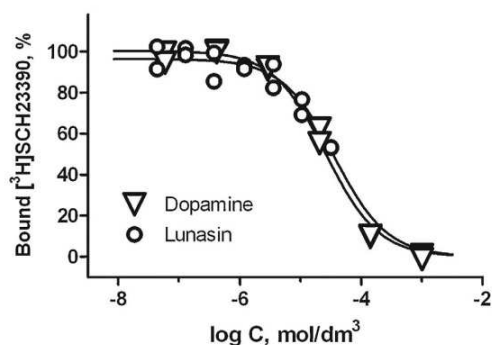


Fig. 5. Displacement of [3H]SCH23390 by dopamine and lunasin at dopamine D1 receptors in HEK293 cell membranes. Data on graph are from a single representative experiment. The affinity constant values from two independent experiments for dopamine: $K_i = 36 \pm 7 \mu\text{M}$ and lunasin $K_i = 60 \pm 15 \mu\text{M}$.

The obtained data allow us to suggest that D₁ receptors rather than D₂ receptors play an essential role in lunasin's central effects. However, the dopaminergic mechanism of lunasin cannot be attributed only to the D₁ receptor-mediated action, because in catalepsy test, both apomorphine (receptor agonist) and amphetamine (dopamine releaser) completely prevented lunasin-induced catalepsy. Moreover, lunasin caused a pronounced (by 40%) inhibition of amphetamine locomotion, indicating that intracellular dopaminergic processes affected by lunasin may be involved in its central effects. In this context, the possibility of lunasin to be internalised in the cell via the RGD cell adhesion motif and C-terminal nine aspartic acid tail [33] is not to be ruled out.

The present data demonstrated that lunasin did not significantly influence the locomotor activity induced by ketamine, which is classified as an NMDA receptor antagonist, and did not change the dose of bicuculline (a GABA-A receptor GABA site ligand) to induce seizures. Therefore these findings indicate that glutamate and GABAergic systems do not play an essential role in lunasin's central effects.

5. Conclusions

The obtained results are intriguing because for the first time they demonstrated clearly expressed motionless and cataleptic action of the peptide lunasin that at least in part is provided via dopaminergic pathways, however other non-identified mechanisms may play an important role in lunasin's central action. Nevertheless further

investigation of this peptide is promising particularly taking into account a necessity for novel type of antipsychotic drugs.

Acknowledgements

This work has been supported by the European Social Fund within the project Support for Doctoral Studies at the University of Latvia-2; Projects of the University of Latvia No. D-715005d-ST-N-840 and No. B-4370z-ZF-N-840; Estonian Research Council projects No. SF0180032s12 and 8314; and by the European Regional Development Fund (TK114 and 30020).

References

- [1] Galvez AF, de Lumen BO. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology* 1999;17(5):495–500.
- [2] Galvez AF, Revilla MJR, de Lumen BO. A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of a cDNA (Accession No AF005030) Plant Gene Register #PGR97-103. *Plant Physiology* 1997;114:1567.
- [3] Nakurte I, Klavins K, Kirchner I, Namniece J, Adlerer L, Matvejevs J, et al. Discovery of lunasin peptide in triticale (X Triticosecale Wittmack). *Journal of Cereal Science* 2012;56(2):510–4.
- [4] Nakurte I, Kirchner I, Namniece J, Saleniece K, Kriger L, Mekss P, et al. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Cereal Science* 2013;57(3):319–24.
- [5] Jeong HJ, Jeong JB, Hsieh CC, Hernandez-Ledesma B, de Lumen BO. Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in vivo and in vitro studies. *Nutrition and Cancer* 2010;62(8):1113–9.
- [6] Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, Park JH, Lee JB, Kweon DH, et al. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters* 2007;255(1):42–8.
- [7] Jeong HJ, Lee JR, Jeong JB, Park JH, Cheong YK, de Lumen BO. The cancer preventive seed peptide lunasin from rye is bioavailable and bioactive. *Nutrition and Cancer* 2009;61(5):680–6.
- [8] Silva-Sanchez C, de la Rosa APB, Leon-Galvan MF, de Lumen BO, de Leon-Rodriguez A, de Mejia EG. Bioactive peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(4):1233–40.
- [9] Jeong JB, Jeong HJ, Park JH, Lee SH, Lee JR, Lee HK, et al. Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55(26):10707–13.
- [10] de Lumen BO. Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutrition Reviews* 2005;63(1):16–21.
- [11] Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Lunasin a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides* 2009;30(2):426–30.
- [12] Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition & Food Research* 2011;55(7):989–98.
- [13] Armstrong WB, Wan XS, Kennedy AR, Taylor TH, Meyskens FL. Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of neu immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment. *The Laryngoscope* 2003;113(10):1687–702.
- [14] Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;390(3):803–8.

- [15] de Mejia EG, Dia VP. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF- κ B pathway in the macrophage. *Peptides* 2009;30(12):2388–98.
- [16] Galvez AF. Identification of lunasin as the active component in soy protein responsible for reducing LDL cholesterol and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2012;126:A10693.
- [17] Chang HC, inventor. Modulating innate immune cell activity by lunasin and selected cytokines. WO2012166875. 2012 Dec 6.
- [18] Jeong JB, de Lumen BO, Jeong HJ. Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Letters* 2010;293(1):58–64.
- [19] Singh P, Bisetty K. A molecular dynamics study of lunasin. *South African Journal of Chemistry* 2012;65:115–24.
- [20] Hsieh CC, Hern-Indez-Ledesma B, Jeong HJ, Park JH, de Lumen BO. Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *PLoS ONE* 2010;5(1):e8890.
- [21] Dia VP, Torres S, de Lumen BO, Erdman JW, Gonzalez De Mejia E. Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57(4):1260–6.
- [22] Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TW, Jalink K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS ONE* 2011;6(4):e19170.
- [23] Takagi H, Shiomi H, Ueda H, Amano H. Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (kytorphin) and its analogue. *European Journal of Pharmacology* 1979;55(1):109–11.
- [24] Jansone B, Rumaks J, Dzirkale Z, Pupure J, Svirskis A, Muceniece R, et al. Gamma1- and gamma2-melanocyte stimulating hormones induce central anxiogenic effects and potentiate ethanol withdrawal responses in the elevated plus-maze test in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2009;92(2):267–71.
- [25] Costall B, Naylor RJ, Nohria V. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. *European Journal of Pharmacology* 1978;50(1):39–50.
- [26] Dixit TS, Sharma AN, Lucot JB, Elased KM. Antipsychotic-like effect of GLP-1 agonist liraglutide but not DPP-IV inhibitor sitagliptin in mouse model for psychosis. *Physiology & Behavior* 2013;114/115:38–41.
- [27] Allen JA, Yost JM, Setola V, Chen X, Sassano MF, Chen M, et al. Discovery of beta-arrestin-biased dopamine D2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(45):18488–93.
- [28] Dzirkale Z, Pupure J, Rumaks J, Svirskis S, Vanina M, Mezhapuke R, et al. Comparative study of taurine and tauroprone: GABA receptor binding, mitochondrial processes and behaviour. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011;63(2):230–7.
- [29] Muceniece R, Saleniece K, Rumaks J, Krigere L, Dzirkale Z, Mezhapuke R, et al. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2008;90(4):712–6.
- [30] Reinart-Okugbeni R, Ausmees K, Kriis K, Werner F, Rincken A, Kanger T. Chemoenzymatic synthesis and evaluation of 3-azabicyclo[3.2.0]heptane derivatives as dopaminergic ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012;55:255–61.
- [31] Reinart-Okugbeni R, Vonk A, Uustare A, Gyulai Z, Sipos A, Rincken A. 1-substituted apomorphines as potent dopamine agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013;21(14):4143–50.
- [32] Mazina O, Reinart R, Kopanchuk S, Rincken A. BacMam system for FRET based cAMP sensor expression in studies of melanocortin MC1 receptor activation. *Journal of Biomolecular Screening* 2012;17(8):1096–101.
- [33] Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research* 2001;61(20):7473–8.

Mina,

Anni Allikalt

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

UUTE DOPAMIINERGILISTE ÜHENDITE ISELOOMUSTAMINE
RADIOLIGANDI VÄLJATÕRJUMISKATSETES,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on

Ago Rinke,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **02.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2014**