

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych



*Wykorzystanie modeli komórkowych w analizie
potencjalnych ligandów receptorów metabotropowych,
na przykładzie receptorów adenozynowych,
histaminowych i kannabinoidowych*

Rozprawa doktorska

mgr farm. Tadeusz Karcz

promotor
Prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

Kraków 2014

Recenzenci:

Prof. dr hab. Małgorzata Filip

Prof. dr hab. Krzysztof Józwiak

© *Copyright by Tadeusz Karcz*

ISBN 978-83-7271-909-6

Projekt okładki: Tadeusz Karcz
Rysunek na okładce przedstawia strukturę
histaminy, adenozyiny i anandamidu

Druk i oprawa: Zespół Poligraficzny
Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie

Moim bliskim, za nieustające wsparcie....

1. WSTĘP	7
1.1. Receptory metabotropowe	9
1.1.1. Receptory adenozynowe	13
1.1.2. Receptory kannabinoidowe	21
1.1.3. Receptory histaminowe H_4	28
1.2. Farmakologia molekularna receptorów siedmiotransbłonowych	31
1.2.1. Modele wykorzystujące receptory natywne	31
1.2.2. Modele opierające się na receptorach rekombinowanych	32
1.2.3. Metody uzyskiwania ekspresji receptorów rekombinowanych	35
1.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	35
1.2.3.2. Drożdże	36
1.2.3.3. Komórki owadzie	36
1.2.3.4. Komórki ssacze	42
1.2.4. Analizowane poziomy sygnalizacji receptorów siedmiotransbłonowych	51
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	59
3. WYNIKI I Dyskusja	65
3.1. Ekspresja w komórkach eukariotycznych ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} , znakowanego fluorescencyjnym białkiem ECFP	67
3.1.1. Klonowanie genu ludzkiego receptora A_{2A} adenozynowego	67
3.1.2. Transfekcja przejściowa komórek CHO plazmidem phA_{2A} AR-ECFP	71
3.1.2.1. Transfekcja komórek z wykorzystaniem odczynnika FuGENE HD	71
3.1.2.2. Transfekcja przejściowa komórek linii CHO z wykorzystaniem rozgałęzionej polietylenoiminy	74
3.1.2.3. Charakterystyka farmakologiczna komórek przejściowo transfekowanych konstruktem fuzyjnym receptora adenozynowego A_{2A} z białkiem cyjanowej fluorescencji	75
3.1.3. Stabilna ekspresja białka hA_{2A} AR-ECFP	78
3.1.3.1. Otrzymanie linii komórkowej charakteryzującej się stabilną ekspresją białka hA_{2A} AR-ECFP	78
3.1.3.2. Charakterystyka farmakologiczna linii stabilnej	80
3.2. Badanie wpływu modyfikacji chemicznych w grupie podstawionych dialkilo-pirymido-purynodionów na aktywność względem ludzkich i szczurzych podtypów receptorów adenozynowych	83
3.2.1. Ocena powinowactwa względem podtypów receptorów adenozynowych	84
3.2.2. Ocena aktywności wewnętrznej wybranych połączeń	100
3.3. Opracowanie modeli badawczych i ocena aktywności potencjalnych ligandów receptorów kannabinoidowych CB_1 i CB_2 oraz receptora sierocego GPR18	103
3.3.1. Otrzymanie linii CHO- hCB_1R i CHO- hCB_2R	103
3.3.2. Ocena parametrów wiązania [3H]CP99,540 do preparatu błon komórek CHO- hCB_1R i CHO- hCB_2R	104
3.3.3. Ocena funkcjonalna otrzymanych linii CHO- hCB_1R i CHO- hCB_2R w teście akumulacji cAMP	105
3.3.4. Charakterystyka referencyjnych ligandów receptora GPR18 w teście aktywacji szlaku β -arrestynowego	107

3.3.5. <i>Pochodne imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu jako ligandy receptorów CB₁R, CB₂R oraz GPR18</i>	108
3.4. Opracowanie modelu komórkowego do badań aktywności potencjalnych ligandów receptora histaminowego H ₄	117
3.4.1. <i>Klonowanie receptora histaminowego H₄ i otrzymanie stabilnej linii komórkowej</i>	117
3.4.2. <i>Charakterystyka farmakologiczna uzyskanej linii komórkowej CHO-hH₄R</i>	118
3.4.3. <i>Wykorzystanie uzyskanej linii CHO-hH₄R do oznaczania powinowactwa potencjalnych ligandów receptora histaminowego H₄</i>	120
4. PODSUMOWANIE	123
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	127
5.1. Miejsce prowadzenia badań	129
5.2. Aparatura.....	131
5.3. Materiały	133
5.3.1. <i>Uniwersalne odczynniki chemiczne i sole nieorganiczne</i>	133
5.3.2. <i>Odczynniki i materiały wykorzystane do hodowli bakteryjnych</i>	133
5.3.3. <i>Odczynniki i materiały do biologii molekularnej</i>	134
5.3.4. <i>Plazmidy</i>	134
5.3.5. <i>Linie komórkowe</i>	135
5.3.6. <i>Odczynniki i materiały stosowane w eksperymentach z hodowlami komórkowymi</i>	136
5.3.7. <i>Preparaty błon komórek</i>	137
5.3.8. <i>Tkanki zwierzęce</i>	137
5.3.9. <i>Materiały wykorzystane w badaniach radioreceptorowych i testach funkcjonalnych</i>	137
5.3.10. <i>Radioligandy</i>	138
5.3.11. <i>Związki referencyjne</i>	139
5.3.12. <i>Związki do badań</i>	141
5.4. Metody	142
5.4.1. <i>Hodowla komórek bakteryjnych</i>	142
5.4.1.1. <i>Wprowadzenie bakterii w stan kompetencji</i>	142
5.4.1.2. <i>Transformacja bakterii</i>	142
5.4.1.3. <i>Bankowanie bakterii</i>	143
5.4.1.4. <i>Izolacja plazmidowego DNA w małej skali</i>	143
5.4.1.5. <i>Izolacja plazmidowego DNA w dużej skali</i>	143
5.4.2. <i>Biologia molekularna</i>	144
5.4.2.1. <i>Analiza spektrofotometryczna DNA</i>	144
5.4.2.2. <i>Elektroforeza DNA</i>	144
5.4.2.3. <i>Reakcja PCR</i>	145
5.4.2.4. <i>Trawienie enzymami restrykcyjnymi</i>	148
5.4.2.5. <i>Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych</i>	150
5.4.2.6. <i>Izolacja DNA z żelu agarozowego</i>	150
5.4.2.7. <i>Ligacja fragmentów DNA</i>	150
5.4.2.8. <i>Sekwencjonowanie</i>	151

5.4.3. Hodowla komórek eukariotycznych.....	153
5.4.3.1. Warunki hodowli	153
5.4.3.2. Rozbankowanie komórek.....	154
5.4.3.3. Pasażowanie komórek.....	154
5.4.3.4. Bankowanie komórek	154
5.4.3.5. Zliczanie komórek.....	155
5.4.4. Ekspresja rekombinowanych białek w komórkach eukariotycznych.....	156
5.4.4.1. Transfekcja przejściowa z użyciem FugeneHD	156
5.4.4.2. Transfekcja przejściowa z użyciem PEI	156
5.4.4.3. Transfekcja stabilna	157
5.4.4.4. Transdukcja retrowirusowa.....	158
5.4.4.5. Transdukcja komórek owadzych	159
5.4.4.6. Analiza cytometryczna.....	159
5.4.5. Testy wiązania radioligandów.....	160
5.4.5.1. Preparaty błon komórkowych z adherentnych komórek eukariotycznych.....	160
5.4.5.2. Preparat błon komórkowych z komórek owadzych	161
5.4.5.3. Preparaty błon z tkanek zwierzęcych	161
5.4.5.4. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego.....	162
5.4.5.5. Założenia analizy saturacyjnej.....	164
5.4.5.6. Założenia analizy kompetycyjnej.....	167
5.4.5.7. Testy saturacyjnego wiązania ligandów receptorów adenozytowych A_{2A}	170
5.4.5.8. Testy kompetycyjnego wiązania ligandów receptorów adenozytowych	172
5.4.5.9. Testy radioreceptorowe względem receptorów kannabinoidowych	176
5.4.5.10. Testy radioreceptorowe w kierunku receptorów histaminowych H_4	177
5.4.6. Testy funkcjonalne.....	178
5.4.6.1. Test akumulacji cAMP.....	178
5.4.6.2. Test aktywacji szlaku β -arrestynowego.....	184
5.4.7. Bufory i roztwory.....	186
6. LITERATURA.....	189
7. ANEKS.....	211
7.1. Wykaz skrótów	213
7.2. Załączniki.....	215
Załącznik 1. Mapy plazmidów wykorzystanych jako wektory genetyczne w przeprowadzonych eksperymentach biologii molekularnej	215
Załącznik 2. Wynik sekwencjonowania nr 1	216
Załącznik 3. Wynik sekwencjonowania nr 2	220
Załącznik 4. Wynik sekwencjonowania nr 3	224
Załącznik 5. Wynik sekwencjonowania nr 4	228
Załącznik 6. Wyniki oznaczeń potencjalnych ligandów GPR18 w trybie agonisty za pomocą testu rekrutacji β -arrestyny	231
Załącznik 8. Krzywe kompetycyjnego wiązania radioligandów receptorów adenozytowych i kannabinoidowych.	232
8. ŻYCIORYS NAUKOWY AUTORA PRACY	245
9. PODZIĘKOWANIA.....	251

1. WSTEP

1.1. Receptory metabotropowe

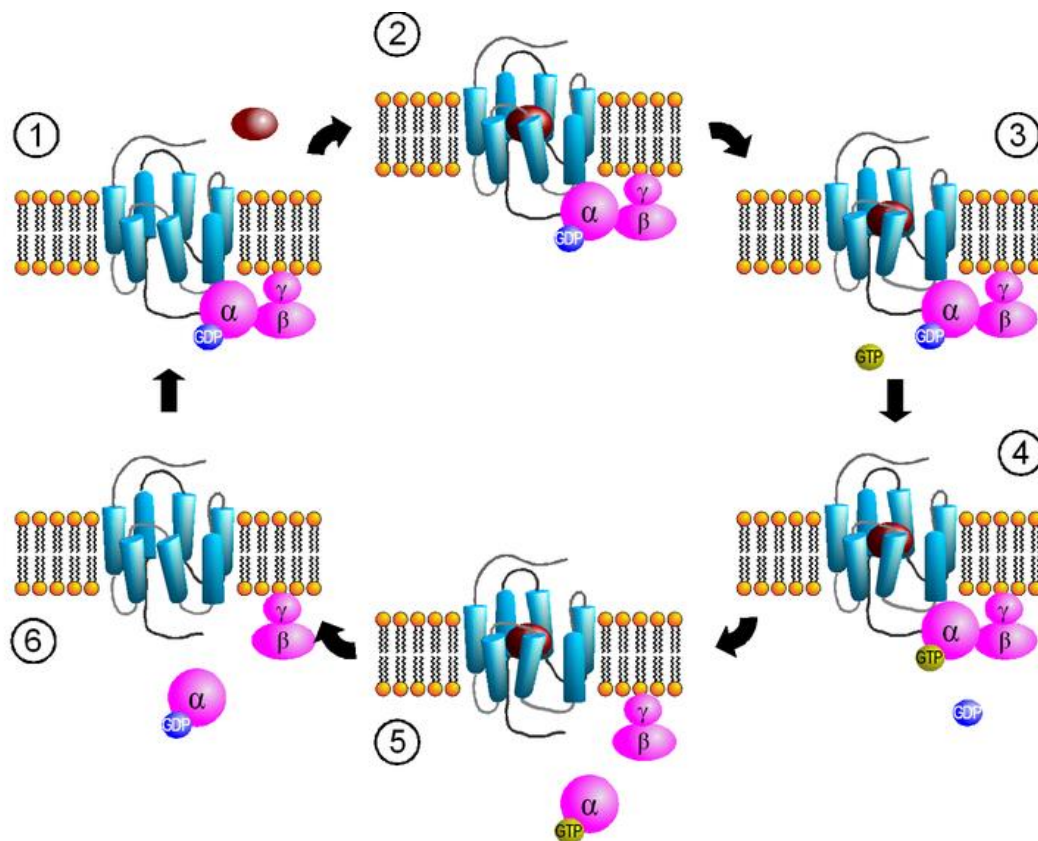
Mianem receptorów metabotropowych określamy receptory błonowe, które w odróżnieniu od receptorów jonotropowych (tworzących kanały jonowe), przekazują sygnał do komórki z wykorzystaniem wtórnych przekaźników [1]. Najliczniejszą grupę receptorów metabotropowych stanowią receptory oddziałujące z białkami G (GPCR, ang.: *G protein-coupled receptors*) [2]. Ze względu na istnienie coraz większej ilości naukowych dowodów na obecność niezależnych od białek G szlaków sygnałowych związanych z tymi receptorami [3, 4], stosuje się również nazwę wynikającą z organizacji strukturalnej GPCR, tj. receptory o siedmiu helisach transbłonowych vel receptory siedmiotransbłonowe (7TM, ang.: *seven-transmembrane receptors*). W niniejszej pracy wymienione wyżej nazwy są stosowane zamiennie.

Omawiana grupa receptorów obejmuje ponad 800 różnych typów białek o bardzo zróżnicowanych funkcjach, w tym na przykład: uczestnictwo w sygnalizacji neuronalnej, regulacji skurczu mięśnia sercowego, procesach sekrecyjnych komórek oraz odbiór bodźców węchowych i świetlnych [5]. Receptory o siedmiu helisach transbłonowych stanowią intensywnie badaną grupę białek, bardzo interesującą z punktu widzenia współczesnej farmakologii. Wśród obecnie dostępnych na rynku leków, ponad 30% działa bezpośrednio poprzez te receptory [6, 7].

Receptory 7TM zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, przy czym N-koniec białka występuje zewnątrzkomórkowo, a segment C-końca wewnątrzkomórkowo. Cechą charakterystyczną budowy GPCR jest obecność siedmiu transbłonowych domen hydrofobowych, składających się z 22-28 reszt aminokwasowych, przedzielonych fragmentami hydrofilowymi, tworzącymi po trzy pętle zewnątrzkomórkowe oraz wewnątrzkomórkowe [8].

W wiązaniu ligandów GPCR najczęściej uczestniczą: zewnątrzkomórkowy N-koniec łańcucha polipeptydowego oraz obszary transbłonowe [4, 9, 10]. Przyjmuje się, że związanie agonisty z białkiem receptora wywołuje zmiany konformacyjne w części transbłonowej receptora, a w konsekwencji także w pętlach wewnątrzkomórkowych. Prowadzi to do odsłonięcia miejsc wiążących białka G, występujących w obrębie pętli wewnątrzkomórkowych. Białko G, będące trimerym zbudowanym z podjednostek α , β i γ , przyłącza się do receptora, czemu towarzyszy zastąpienie GDP (występującego wyjściowo w podjednostce α), przez GTP. To z kolei prowadzi do oddysocjowania podjednostki α związanej z GTP od podjednostek β i γ , a następnie jej migrację w kierunku struktur efektorowych (cyklaza adenylanowa, fosfolipaza C, kanały jonowe). Połączenie

podjednostki α z efektorom prowadzi z jednej strony do wywołania konkretnego efektu biologicznego, ale jednocześnie powoduje wzrost aktywności GTP-azowej podjednostki α . Na tym etapie dochodzi więc do enzymatycznego rozpadu GTP do GDP i P_i przy udziale podjednostki α . Powstający w ten sposób kompleks podjednostka α -GDP wykazuje niskie powinowactwo względem struktur efektorowych, natomiast charakteryzuje się wysokim powinowactwem względem kompleksu podjednostek β i γ . Dochodzi więc do odtworzenia trimerycznego białka G połączonego z cząsteczką GDP (**Rysunek 1.1**) [11].



Rysunek 1.1 Cykl aktywacji białka G w wyniku przyłączenia agonisty GPCR. 1 - stan wyjściowy; 2 - związanie liganda; 3 i 4 - wymiana GDP na GTP; 5 - oddysocjowanie podjednostki α i kompleksów $\beta\gamma$ oraz ich oddziaływanie z efektorami; 6 - hydroliza GTP i odtworzenie stanu wyjściowego. [<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:GPCR-Zyklus.png>]

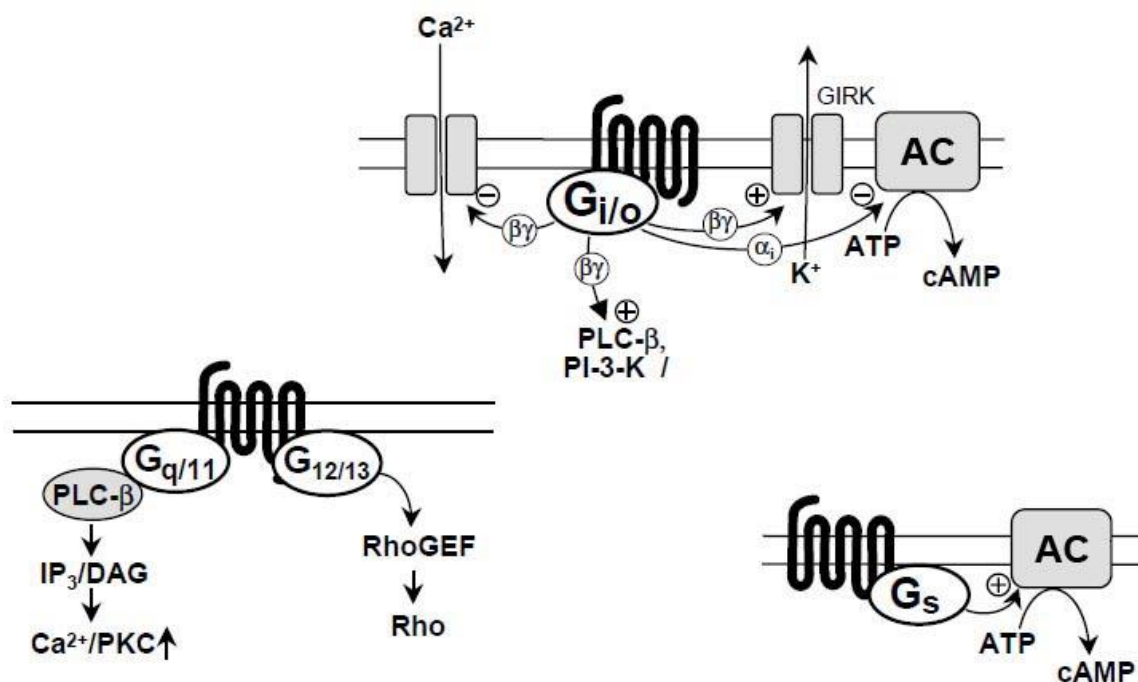
Właściwości funkcjonalne poszczególnych heterotrimerycznych białek G są zależne przede wszystkim od charakteru podjednostki α . Determinuje ona główny (odmienny pomiędzy poszczególnymi klasami - $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ oraz $G\alpha_{12/13}$) profil aktywności, odpowiadając za selektywne oddziaływanie z szeregiem białek efektorowych [11, 12]. Okazuje się jednak, że również dimery podjednostek β i γ białek G odgrywają rolę w oddziaływaniu z białkami efektorowymi. Inaczej niż w przypadku podjednostek α , poza nielicznymi wyjątkami, nie obserwuje się istotnych różnic w zdolności poszczególnych wariantów kompleksów $\beta\gamma$ (kombinacja 5 klas podjednostek β i 12 klas podjednostek γ) do wpływu na białka

efektorowe. Ponieważ grupą białek G ulegającą ekspresji w największej ilości w większości tkanek jest rodzina $G_{i/o}$, aktywacja tych białek jest głównym źródłem kompleksów $\beta\gamma$ w komórce. Z tego powodu efekty aktywności podjednostek β/γ obserwujemy najczęściej w związku z pobudzeniem białek $G_{i/o}$. Białka efektorowe pozostające pod wpływem podjednostek białek G są zebrane w **Tabeli 1.1** oraz na **Rysunku 1.2** [11].

Tabela 1.1 Białka efektorowe regulowane przez heterotrimeryczne białka G. Wg [11].

Białko efektorowe	Podtyp	Regulacja zależna od białek G
AC	I	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/o/z} \downarrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	II	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	III	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
	IV	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	V	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/z} \downarrow$
	VI	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/z} \downarrow$
	VII	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	VIII	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
	IX	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
PLC	$\beta 1$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$
	$\beta 2$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$; $G\beta\gamma \uparrow$
	$\beta 3$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$; $G\beta\gamma \uparrow$
	$\beta 4$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$
IRK	K _{ir} 3.1	$G\beta\gamma \uparrow$
	K _{ir} 3.2	$G\beta\gamma \uparrow$
	K _{ir} 3.3	$G\beta\gamma \uparrow$
	K _{ir} 3.4	$G\beta\gamma \uparrow$
VDCC	Ca _v 2.1 (typu P/Q)	$G\beta\gamma \downarrow$
	Ca _v 2.2 (typu N)	$G\beta\gamma \downarrow$
	Ca _v 2.3 (typu R)	$G\beta\gamma \downarrow$
PI-3-K	PI-3-K β	$G\beta\gamma \uparrow$
	PI-3-K γ	$G\beta\gamma \uparrow$
RhoGEF	Lsc/p115RhoGEF	$G\alpha_{13} \uparrow$
	PDZ-RhoGEF	$G\alpha_{12/13} \uparrow$
	LARG	$G\alpha_{12/13} \uparrow$

AC - cyklaza adenylanowa (ang.: *adenyl cyclase*); PLC - fosfolipaza C (ang.: *phospholipase C*); IRK - wewnątrzprostowniczy kanał potasowy (ang.: *inward rectifier potassium channel*); VDCC - napięćo-zależny kanał wapniowy (ang.: *voltage-dependent calcium channel*); PI-3-K - 3-kinaza fosfatydoinozytoli (ang.: *phosphoinositide-3-kinase*); RhoGEF - czynnik wymiany nukleotydów guaninowych dla GTP-az Rho (ang.: *Rho guanine nucleotide exchange factor*).



Rysunek 1.2 Funkcje regulatorowe białek G - $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ i G_s . PLC- β - fosfolipaza C- β ; PI-3-K - 3-kinaza fosfatydyloinozytoli; GIRK - aktywowany białkami G wewnątrzprostowniczy kanał potasowy; AC - cyklaza adenylnowa; ATP - adenozyno-5'-trifosforan; cAMP - cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; IP₃ - 1,4,5-trisfosforan inozytoli; DAG - 1,2-diacyloglicerol; PKC - kinaza białkowa C (ang.: *protein kinase C*); RhoGEF - czynnik wymiany nukleotydów dla GTP-az Rho; Rho - GTPaza Rho.

Badania wykazały, że oprócz trimerycznych białek G jeszcze dwie inne grupy białek ulegają rekrutacji do powierzchni błony komórkowej w wyniku pobudzenia receptorów 7TM. Są to kinazy receptorów oddziałujących z białkami G (GRK, ang.: *G protein-coupled receptor kinase*) oraz β -arestyny (ang.: *β -arrestin*). W wyniku rekrutacji kinaz GRK w bezpośrednie sąsiedztwo receptora dochodzi do jego fosforylacji, głównie w obrębie fragmentu C-końcowego, ale także w obrębie pętli wewnątrzkomórkowych. Ufosforylowane białko receptora charakteryzuje się zwiększonym powinowactem do β -arestyn, które jako kolejne przyłączają się do receptora i tworząc zawadę przestrzenną w interakcji z białkami G, prowadzą do jego desensytyzacji. Ponadto β -arestyny, po przyłączeniu do receptora, tworzą rusztowanie, do którego rekrutowane są kolejne białka. Zalicza się tu między innymi: fosfodiesterazę typu 4D (odpowiadająca za rozkład cAMP), klatryny (uczestniczące w internalizacji receptora), ale także białka umożliwiające przekazanie sygnału do wnętrza komórki w sposób niezależny od białek G, jak na przykład: kinaza tyrozynowa c-Src oraz kinazy aktywowane mitogenami (MAPK, ang.: *mitogen-activated kinases*). W ten sposób β -arestyny uczestniczą w utworzeniu, alternatywnego względem związanego z białkami G, szlaku sygnałowego receptorów 7TM [3, 4, 13, 14].

1.1.1. Receptory adenozynowe

Zewnątrzkomórkowa adenozyzna działa głównie jako lokalny czynnik regulacyjny. Dominuje jej aktywność cytoprotekcyjna, związana z: indukcją lokalnej dystrybucji tlenu, zapobieganiem uszkodzeniom tkanki w następstwie hipoksji, stymulacją angiogenezy i pośrednictwem w reakcjach układu immunologicznego. Źródłami zewnątrzkomórkowej adenozyzny są: transport z komórki w poprzek błony cytoplazmatycznej poprzez specyficzne białka transportujące, enzymatyczny rozkład występujących w płynie zewnątrzkomórkowym nukleotydów adenozynowych oraz adenozyzna uwolniona w wyniku uszkodzenia komórek [15, 16].

Adenozyzna działa poprzez receptory adenozynowe (AR, ang.: *adenosine receptors*). Znane są cztery typy tych receptorów: A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃. Różnią się one profilem farmakologicznym (w tym powinowactwem do adenozyzny), lokalizacją tkankową i układem przekaźników II rzędu. Wszystkie należą do grupy receptorów siedmiotransbłonowych [17, 18].

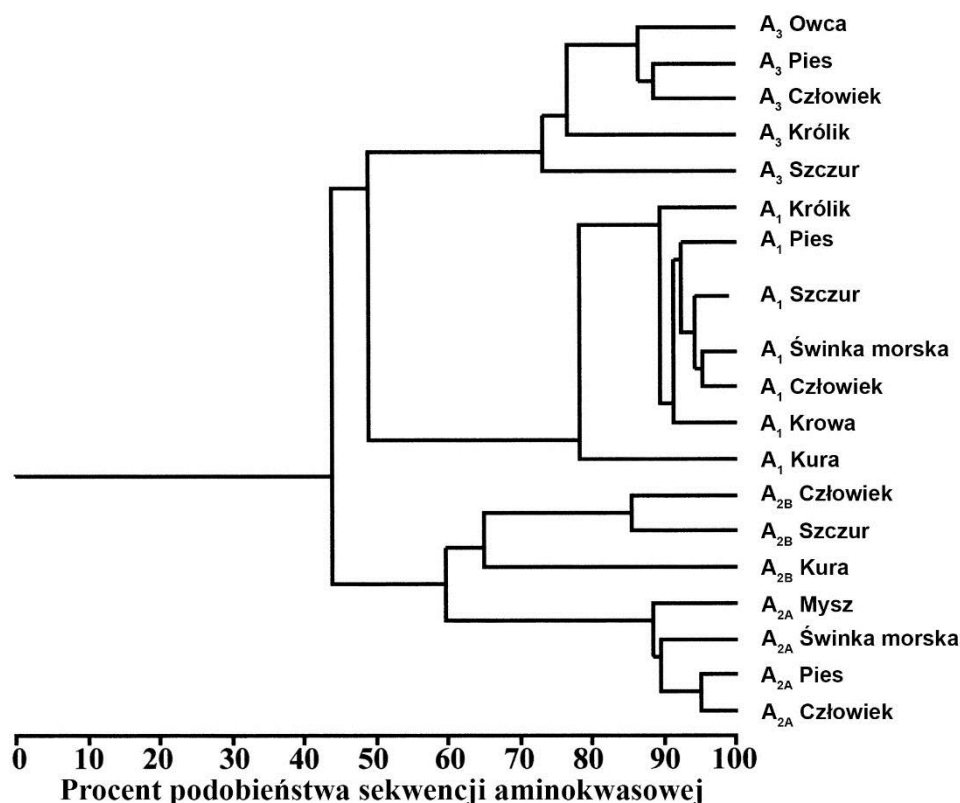
Klonowanie genów receptorów adenozynowych zostało przeprowadzone na przełomie lat 80-tych i 90-tych ubiegłego stulecia [19]. Dwa pierwsze podtypy receptorów adenozynowych, których sekwencje udało się z powodzeniem powielić technikami biologii molekularnej, to pozyskane z psiej biblioteki cDNA geny receptorów A₁ i A_{2A} [20]. Szczegółowa identyfikacja produktów tych genów została dokonana w kolejnych latach, odpowiednio za sprawą prac Liberta [21] i Maenhauta [22]. Wkrótce potem pozyskano również sekwencje kodujące wszystkie podtypy receptorów adenozynowych z ludzkich bibliotek genowych [15]. Geny kodujące każdy z podtypów AR mają zbliżoną strukturę. Są zbudowane z dwóch egzonów przedzielonych pojedynczą sekwencją intronową, występującą w obrębie fragmentu kodującego drugą pętlę wewnątrzkomórkową [19]. **Tabela 1.2** przedstawia zestawienie lokalizacji genów receptorów adenozynowych w obrębie ludzkiego genomu oraz wielkość powiązanych produktów białkowych.

Tabela 1.2 Chromosomalna lokalizacja genów receptorów adenozynowych oraz wielkość białek receptorowych.

Receptor	Chromosomalna lokalizacja genu	Wielkość produktu białkowego	Numer wpisu w bazie UniProt [23]
A ₁ AR	1q32.1 [24]	326 aminokwasów	P30542
A _{2A} AR	22q11.2 [15]	412 aminokwasów	P29274
A _{2B} AR	17p11.2-p12 [25]	332 aminokwasów	P29275
A ₃ AR	1p13.3 [26]	318 aminokwasów	P33765

U ludzi najbardziej podobne sekwencje posiadają podtypy A_{2A} i A_{2B} (59% podobieństwa sekwencji). Receptory A₁ i A₃ z kolei cechują się 49-procentowym podobieństwem [16].

Jak zostało uwidocznione na **Rysunku 1.3**, podobieństwo receptorów pochodzących z różnych gatunków jest wysokie w obrębie znanych podtypów, przynajmniej dla receptorów ssaczyczych (zwykle >70%). Największą zmiennością międzygatunkową cechuje się podtyp A₃, dla którego różnica w składzie aminokwasowym pomiędzy receptorem ludzkim a szczurzym wynosi prawie 30% i jest większa nawet niż pomiędzy ludzkim, a kurzym receptorem A₁.



Rysunek 1.3 Dendrogram obrazujący różnice w sekwencji sklonowanych receptorów adenozynowych, wg [18].

Sygnalizacja związana z receptorami adenozynowymi

Na poziomie molekularnym poszczególne podtypy receptorów adenozynowych w sposób przeciwstawny wpływają na wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP. Podtypy A₁ i A₃ oddziałują przede wszystkim z białkami G_i, hamując produkcję cyklicznego AMP poprzez zahamowanie cykazy adenylanowej, podczas gdy receptory adenozynowe A_{2A} i A_{2B} reprezentują grupę receptorów sprzężonych głównie z białkami G_s, stymulującymi aktywność cykazy adenylanowej i zwiększającymi wewnątrzkomórkowy poziom cAMP [15, 18]. Stwierdzono ponadto, że wszystkie podtypy receptorów adenozynowych mają zdolność oddziaływania również z dodatkowymi klasami białek G. Wspomniana różnorodność

możliwych oddziaływań z białkami G determinuje złożoność efektów wewnątrzkomórkowych, związanych z aktywacją poszczególnych receptorów adenozynowych (**Tabela 1.3**).

Pobudzenie receptorów A_1 prowadzi, oprócz zahamowania cykazy adenylanowej, do aktywacji fosfolipazy C, co skutkuje uwolnieniem IP_3 i DAG oraz mobilizacją wewnątrzkomórkowych zasobów wapnia i w następstwie stymulacją kinaz białkowych C. W wyniku pobudzenia receptorów adenozynowych A_1 obserwuje się ponadto aktywację kilku typów kanałów potasowych, przede wszystkim w tkance mięśnia sercowego i komórkach neuronalnych. Otwarcie kanałów potasowych w komórkach przedsionka serca, węzła zatokowo-predsionkowego oraz węzła przedsionkowo-komorowego prowadzi do spowolnienia akcji serca. Stymulacja receptorów A_1 AR wpływa także na ATP-zależne kanały potasowe (kanały K_{ATP}), odgrywające rolę w kondycjonowaniu niedokrwiennym (ang.: *ischemic conditioning*) serca i mózgu. Otwarcie tych samych kanałów w komórkach nerwowych prowadzi do hiperpolaryzacji błony i zmniejszonej pobudliwości neuronów [15, 16, 27].

Podniesienie poziomu cAMP poprzez oddziaływanie receptora A_{2A} z białkami G_s jest głównym szlakiem sygnałowym dla tego receptora w tkankach obwodowych, natomiast w prądkowiu, które charakteryzuje się najwyższym poziomem ekspresji podtypu A_{2A} , receptory te wiążą się przede wszystkim z białkami G_{olf} , również prowadząc do aktywacji CA [16, 28]. Potwierdzone zostało również powiązanie receptora A_{2B} z różnymi szlakami sygnałowymi. Oprócz podstawowego efektu pobudzenia receptora w postaci aktywacji cykazy adenylanowej, wykazano również aktywację kinaz białkowych C poprzez interakcję receptora z białkami $G_{q/11}$ [15, 19].

Z białkami $G_{q/11}$ może również oddziaływać receptor A_3 . Wzrost komórkowego poziomu IP_3 i DAG, mobilizacja jonów wapniowych oraz aktywacja kinaz białkowych C są efektami pobudzenia tego receptora towarzyszącymi jego dominującej ścieżce sygnałowej, związanej z hamowaniem produkcji cAMP poprzez szlak związany z białkami $G_{i2/13}$ [16, 18].

Wspólną cechą wszystkich receptorów adenozynowych jest zdolność do oddziaływania ze szlakiem kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), w tym stymulacja fosforylacji kinaz ERK 1 i 2 (ang.: *extracellular regulated kinase*). Aktywacja szlaku kinaz MAPK, o dużym znaczeniu dla procesów różnicowania, przeżywalności, proliferacji i śmierci komórek, występuje niezależnie od tego czy klasyczny szlak sygnałowy receptorów adenozynowych, związany ze zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, ulega aktywacji (A_2 AR) czy zahamowaniu (A_1 i A_3) [16, 19].

Tabela 1.3 Charakterystyka receptorów adenozynowych.

	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
Oddziaływanie z białkami G	G _{i1/2/3} ; G _o	G _s ; G _{olf}	G _s ; G _{q/11}	G _{i1/3} ; G _{q/11}
Efekty komórkowe	↓cAMP, ↑IP ₃ /DAG (PLC) ↑K ⁺	↑cAMP	↑cAMP, ↑IP ₃ /DAG (PLC)	↓cAMP, ↑IP ₃ /DAG (PLC)
Lokalizacja	centralny system nerwowy (kora mózgowa, wzgórze, pień mózgu, hipokamp, rdzeń kręgowy), serce, nerka, tkanka tłuszczowa	centralny system nerwowy (prążkowie), komórki układu immunologicznego, płytki krwi, śledziona, grasica, śródbłonek, mięśniówka naczyń krwionośnych	ekspresja w większości tkanek, jednak w niewielkiej ilości	niewielki poziom ekspresji w warunkach fizjologicznych, nadekspresja w komórkach nowotworowych i komórkach układu immunologicznego w trakcie stanu zapalnego
Funkcje fizjologiczne	hamujący wpływ na przewodnictwo nerwowe, hamowanie ośrodka oddechowego, sedacja, skurcz naczyń nerkowych, działanie inotropowo- i chronotropowo-ujemne, skurcz oskrzeli, zahamowanie lipolizy	modulacja sygnalizacji w jądrach podstawnych, hamowanie agregacji płytek, wazodilatacja, hamowanie produkcji cytokin prozapalnych	rozkurcz naczyń i mięśniówki gładkiej jelit, aktywacja degranulacji mastocytów	modulacja aktywności komórek układu immunologicznego, działanie kardioprotekcyjne w stanach niedokrwienych mięśnia sercowego, stymulacja komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych

Funkcje receptorów adenozynowych

Receptor adenozynowy A₁ ulega największej ekspresji w centralnym systemie nerwowym, gdzie jego aktywacja blokuje uwalnianie niektórych neuroprzekaźników oraz redukuje częstość potencjałów czynnościowych w komórkach nerwowych. Zmniejszona aktywność neuronów i związana z tym obniżona konsumpcja tlenu ułatwia adaptację do warunków hipoksji [15, 27]. W nerwach obwodowych podobne mechanizmy (hiperpolaryzacja błony komórkowej, redukcja częstotliwości potencjałów czynnościowych) prowadzą do zahamowania przewodnictwa bólowego [16]. Do najważniejszych ośrodkowych efektów związanych z aktywacją A₁ zalicza się działanie sedacyjne, przeciwdrgawkowe i anksjolityczne [15]. Receptory adenozynowe A₁ pośredniczą także w inotropowo- i chronotropowo-ujemnym działaniu adenozyny, na drodze, ściśle związanej z tym podtypem receptorów, aktywacji kanałów potasowych w komórkach ośrodków układu bódźco-przewodzącego serca [16, 29]. Oprócz działania cytoprotekcyjnego w mózgu i sercu receptory A₁ odrywają również rolę w zjawisku ochrony nerek przed przewlekłym niedokrwieniem i

następującą potem reperfuzyją. Aktywacja receptorów A_1 w nerce prowadzi do skurczu naczyń i zmniejszonej filtracji kłębuszkowej oraz zmniejszonego wydzielania reniny w sytuacji zwiększonego przepływu krwi przez narząd [29, 30]. Pobudzenie receptorów adenozynowych A_1 w tkance tłuszczowej prowadzi do zahamowania lipolizy i uwrażliwienia komórek na działanie insuliny [15].

Receptor adenozynowy A_{2A} ulega ekspresji w komórkach układu immunologicznego, płytkach krwi, centralnym systemie nerwowym oraz mięśniówce gładkiej i śródbłonku naczyń krwionośnych [15]. W ośrodkowym układzie nerwowym najwięcej receptorów A_{2A} występuje w prądkowiu, gdzie tworzą one oligomery z innymi GPCR. Opisano występowanie dimerów A_{2A} z receptorami: dopaminowymi D_2 i D_3 (DR), kannabinoidowymi CB_1 oraz glutaminergicznymi $mGlu_5$, a także potwierdzono istnienie form heterotrimerycznych - $CB_1R/D_2R/A_{2A}$ AR [28]. Występujące w oligomerach receptory adenozynowe A_{2A} modulują aktywność ligandów receptorów-partnerów oligomeryzacyjnych. W interakcji z receptorem CB_1R , receptory A_{2A} stanowią komponentę niezbędną dla wywołania efektu hamującego aktywność motoryczną przez agonistów receptorów kannabinoidowych [31, 32]. Z kolei dimeryzacja receptorów A_{2A} i D_2 wydaje się być istotna w kontekście choroby Parkinsona [33]. Ma to związek z opisanymi oddziaływaniami antagonistycznymi obu receptorów, obejmującymi m.in. obniżenie powinowactwa agonistów do receptora D_2 w wyniku pobudzenia receptora A_{2A} [15, 16, 34]. Aktywacja receptorów A_{2A} w prądkowiu prowadzi także do desensytyzacji receptorów A_1 , z którymi tworzą one heterodimery [17]. Zarówno receptory adenozynowe A_1 , jak i wspomniane wcześniej receptory D_2 , oddziałują głównie z białkami G_i i dlatego pobudzenie receptorów A_{2A} prowadzi w prądkowiu do przesunięcia równowagi w kierunku szlaków aktywujących cyklazę adenylanową [15]. Z efektów behawioralnych związanych z receptorami A_{2A} najsilniej zaznaczone jest działanie sedacyjne i hamujące aktywność motoryczną. Postuluje się, że główne efekty psychostymulujące nieselektywnego antagonisty receptorów adenozynowych - kofeiny realizowane są właśnie poprzez blokowanie receptorów A_{2A} [15, 29]. W łożysku naczyniowym pobudzenie receptorów A_{2A} promuje proces angiogenezy, poprzez aktywację sygnałów mitogennych w komórkach śródbłonka [15]. Rola receptorów A_{2A} w naczyniach krwionośnych jest dodatkowo związana z procesem wazodilatacji, przy czym różna wrażliwość naczyń na działanie agonistów receptorów adenozynowych (najsilniejszy efekt obserwuje się w aorcie i naczyniach wieńcowych) wynika prawdopodobnie ze zróżnicowanego poziomu ekspresji receptorów A_{2A} w mięśniówce i śródbłonku poszczególnych naczyń [15, 16]. Obecność receptorów A_{2A} w komórkach układu

immunologicznego odpowiada za hamowanie procesów zapalnych. Jest to kolejny mechanizm działania ochronnego układu adenozyнового w sytuacji reperfuzji po epizodzie ischemicznym, ponieważ odczyn zapalny jest główną przyczyną uszkodzenia tkanek w tym stanie patologicznym. Szczegółowe efekty wpływu aktywacji receptorów A_{2A} na układ immunologiczny obejmują, m.in. zahamowanie aktywacji i proliferacji limfocytów T oraz produkcji cytokin prozapalnych, przy jednoczesnej stymulacji uwalniania cytokin przeciwzapalnych [16, 34]. Kolejną istotną rolą obwodowych receptorów adenozyновых A_{2A} jest ich zaangażowanie w proces krzepnięcia krwi poprzez udział w hamowaniu agregacji płytek krwi [27, 35].

Receptory adenozyновые A_{2B} są obecne w szerokim spektrum tkanek, jednak poziom ekspresji jest zwykle niski. Receptory te są również najmniej podatne na pobudzenie przez endogenne liganda (najmniejsze powinowactwo do adenozyны ze wszystkich podtypów receptorów adenozyновых) i dlatego uważa się, że odgrywają szczególną rolę w procesach patologicznych związanych z podwyższonym stężeniem adenozyны, jak hipoksja, ischemia i stan zapalny [27]. Pobudzenie receptorów A_{2B} obecnych w łożysku naczyniowym prowadzi do wazodilatacji, jednak efekt ten obserwuje się jedynie w tych naczyniach, które nie pozostają pod kontrolą receptorów adenozyновых A_{2A} [15, 29]. Udział receptorów A_{2B} w degranulacji mastocytów, jak również potwierdzenie istotnej funkcjonalnie ekspresji tego białka w drogach oddechowych, wskazuje na możliwą rolę tych receptorów w procesach alergicznych jak np. astma [15, 36].

Ważną cechą receptorów adenozyновых A_3 są, wspomniane wcześniej, duże różnice międzygatunkowe w sekwencji aminokwasowej. Fakt ten determinuje odmienne funkcje fizjologiczne receptorów A_3 u poszczególnych organizmów i utrudnia interpretację wyników badań uzyskanych w modelach zwierzęcych, w tym eksperymentów z użyciem myszy typu *knock-out* [16, 27]. Podobnie jak podtyp A_{2B} , receptor A_3 ulega ekspresji na niskim poziomie w większości tkanek. Ilość receptorów ulega jednak zwiększeniu w stanach zapalnych i chorobach immunologicznych (reumatoidalne zapalenie stawów i choroba Crohna) [16, 27, 37]. Receptory te mogą pełnić uzupełniającą rolę względem podtypu A_1 w kardioprotekcyjnym profilu działania adenozyны. Jednak ze względu na niski poziom ekspresji w sercu, realizują tę aktywność prawdopodobnie w sposób pośredni, właśnie poprzez ingerencję w procesy odpowiedzi zapalnej, głównie poprzez modulację aktywności mastocytów i neutrofilii [15, 16].

Receptory adenozyновые są potencjalnym celem terapeutycznym w rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Badania wykazały podwyższony poziom ekspresji różnych

podtypów receptorów adenozynowych w komórkach rakowych. Sama adenozyzna również występuje w podwyższonym stężeniu w tkankach nowotworowych, które charakteryzują się zwiększoną aktywnością metaboliczną i występowaniem w nich deficytu tlenowego. Ponadto, jak zostało już wspomniane wcześniej, aktywacja receptorów adenozynowych jest źródłem sygnałów mitogennych, a więc prowadzi do nasilenia proliferacji komórek, w tym nowotworowych. Dodatkowo receptory adenozynowe uczestniczą w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, a także modulują odpowiedź układu immunologicznego i migrację komórek nowotworowych. Wszystkie te czynniki wskazują na istotną rolę sygnalizacji adenozynowej w procesach rozwoju i przerzutów nowotworów [38-40].

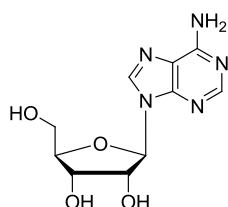
Ligandy receptorów adenozynowych o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym

Praktycznie wszyscy znani agoniści receptorów adenozynowych należą do grupy pochodnych nukleozydów purynowych - adenozyzny (**Rys. 1.4 A**) lub ksantozyny. Jedynym wyjątkiem od tej reguły są pochodne 2-aminopirydyno-3,5-dikarbonitrylu, wśród których również zidentyfikowani zostali agoniści o różnej selektywności względem poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych. W odróżnieniu od połączeń o charakterze agonistów, wymagania strukturalne stawiane związkom o charakterze antagonistycznym nie są tak ściśle ograniczone. Mimo że prototypowymi antagonistami receptorów adenozynowych są pochodne alkiloksantyn, to połączenia o tej aktywności wewnętrznej zostały zidentyfikowane również w grupach zawierających rdzeń strukturalny odmienny niż pochodne ksantyn (m.in. dla A₁ AR - pochodne pirazolopirydyny, 7-deazaadeniny, 2-aminotiazolu; dla A_{2A} AR - pochodne triazolochinoliny, triazolotriazyny, triazolopirymidyny, benzotiazolu; dla A_{2B} AR - pochodne 2-aminopirymidyny, 2-aminotiazolopirymidyny, benzotiazolu; dla A₃ AR - pochodne (1,4-dihydro)pirydyny i flawonu). Przykładami produktów pochodzenia naturalnego, które posiadają cechy słabych, nieselektywnych antagonistów receptorów adenozynowych są kofeina (**Rys. 1.4 E**) i teofilina (**Rys. 1.4 F**) [41-43].

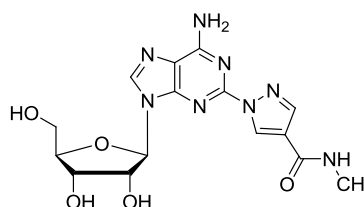
Intensywne badania prowadzone od lat 80-tych ubiegłego wieku doprowadziły do identyfikacji dużej liczby połączeń aktywnych w kierunku receptorów adenozynowych, jednak ich wprowadzenie do terapii jest bardzo utrudnione. Decyduje o tym szerokie rozpowszechnienie receptorów adenozynowych w organizmie oraz zaangażowanie szlaków adenozynowych w szereg istotnych procesów homeostatycznych. Ingerencja w układ sygnalizacji związany z receptorami adenozynowymi niejednokrotnie prowadzi do poważnych efektów niepożądanych, a dodatkowym czynnikiem utrudniającymi rozwój potencjalnych leków są trudności w uzyskaniu wysokiej selektywności połączeń. Jak do tej

pory jedynie kilka ligandów AR uzyskało zgodę na stosowanie w leczeniu [16, 27, 36, 44].

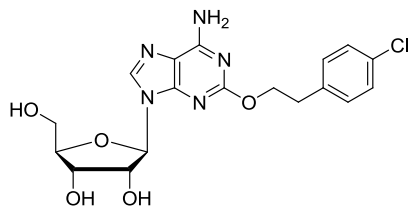
Endogenny ligand receptorów - adenozyzna jest używana klinicznie pod nazwami handlowymi Adenocard® i Adenoscan® (**Rys. 1.4 A**), odpowiednio w napadowym częstoskurczu nadkomorowym (ang.: *paroxysmal supraventricular tachycardia*) i diagnostycznym obrazowaniu przepływu krwi w mięśniu sercowym u pacjentów niezdolnych do testów wysiłkowych, gdzie wykorzystywany mechanizm działania opiera się na wazodilatacji naczyń w wyniku pobudzenia receptorów A_{2A} [16]. Innym dopuszczonym do obrotu ligandem jest regadenoson - agonista receptorów A_{2A} , stosowany również w diagnostyce zaburzeń przepływów wieńcowych (**Rys. 1.4 B**) [45].



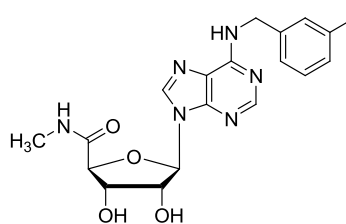
A) adenozyzna (Adenocard®, Adenoscan®)
agonista A_1/A_{2A}



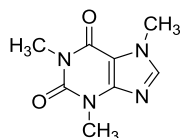
B) regadenoson (Lexiscan®, CV-3146)
agonista A_{2A}



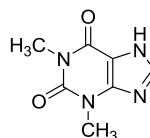
C) sonedenoson (MRE-0094)
agonista A_{2A}



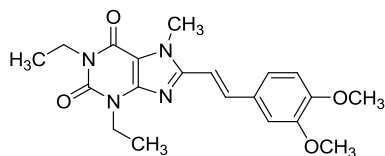
D) CF-101 (IB-MECA)
agonista A_3



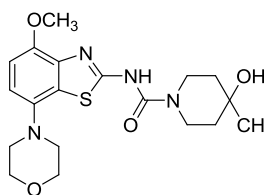
E) kofeina
nieselektywny antagonist AR



F) teofilina
nieselektywny antagonist AR



G) istradefilina (Nourias®, KW-6002)
antagonista A_{2A}



H) tozadenant (SYN-115)
antagonista A_{2A}

Rysunek 1.4 Struktury wybranych ligandów receptorów adenozynowych.

Niedawno zgodę na stosowanie w terapii wspomagającej leczenie choroby Parkinsona uzyskała istradefilina (**Rys. 1.4 G**) - antagonist receptorów A_{2A} [46]. Szansę na włączenie do terapii choroby Parkinsona ma również inny antagonist A_{2A} - tozadenant (**Rys. 1.4 H**), dla którego uzyskano satysfakcjonujące wyniki w II fazie badań klinicznych i planuje się badania III fazy [47]. Kolejny związek, otrzymany przez firmę Biovitrum - BVT.115959 (struktura nieujawniona) przeszedł pomyślnie II fazę badań klinicznych ze wskazaniem w leczeniu bólu neuropatycznego u pacjentów z cukrzycą. Cechą tego związku jest podwyższone powinowactwo do receptorów A_{2A} w pH 7,0, w porównaniu do fizjologicznego pH 7,4. Jest to ważna zaleta tego związku, ponieważ obniżone pH występuje w tkankach, w których toczy się proces zapalny, co może zapewnić selektywność tkankową działania leku [42]. Drugą fazę badań klinicznych zakończono również dla sonedenosonu (**Rys. 1.4 C**). Ten podawany zewnętrznie w postaci żelu agonista receptorów A_{2A} miał być stosowany w leczeniu owrzodzeń, związanych ze stopą cukrzycową. Mechanizm działania sonedenosonu polega na aktywacji angiogenezy i stymulacji produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej przez komórki skóry - fibroblasty. Niestety wyniki badań klinicznych nie potwierdziły istotnej statystycznie skuteczności sonedenosonu [36, 48]. Zastosowanie w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, a także łuszczycy ma wciąż szansę znaleźć związek – CF-101 (**Rys. 1.4 D**). Mechanizm jego działania, związany z pobudzeniem receptorów A_3 , obejmuje zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych. CF-101 został przebadany w serii badań klinicznych II fazy, osiągając założone cele badawcze w zakresie skuteczności i bezpieczeństwa terapii. Obecnie trwa rekrutacja pacjentów do kolejnych zaplanowanych badań klinicznych [49, 50].

1.1.2. Receptory kannabinoidowe

Receptory kannabinoidowe (CBR) stanowią centralny element układu endokannabinoidowego, w skład którego wchodzi także produkowane endogennie ligandy tych receptorów (endokannabinoidy) oraz enzymy odpowiadające za ich syntezę i degradację, a także transportery błonowe [51, 52]. Układ endokannabinoidowy jest zaangażowany w wiele złożonych procesów, których dokładne scharakteryzowanie znacznie wykracza poza tematykę niniejszej pracy, dlatego niektóre zagadnienia zostaną jedynie zasygnalizowane.

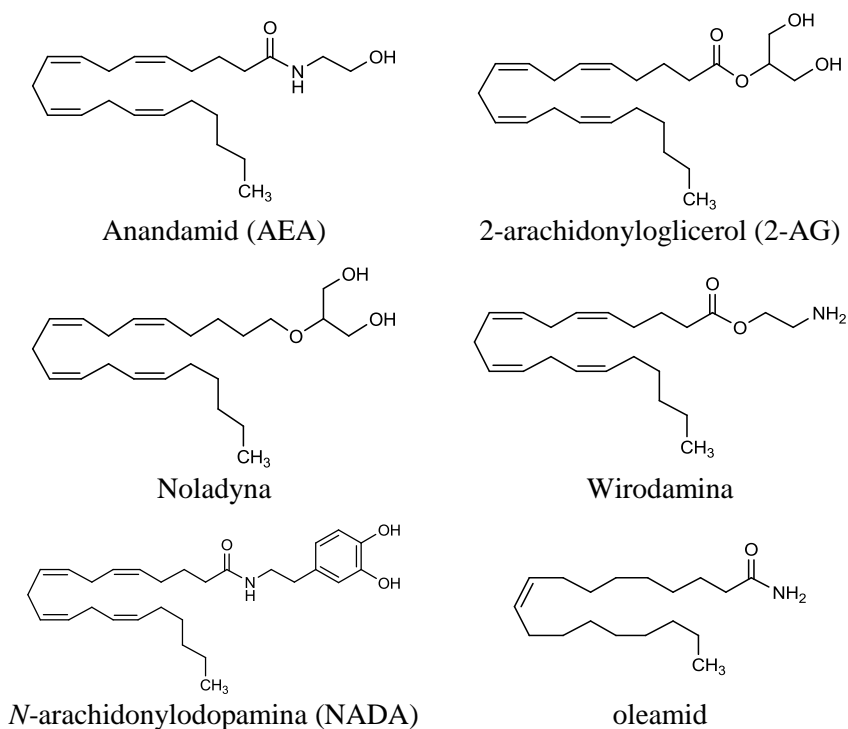
Właściwości neuromodulujące układu kannabinoidowego, a w szczególności jego zaangażowanie w krótkotrwałą oraz długotrwałą plastyczność synaptyczną, wiążą układ endokannabinoidowy z regulacją funkcji poznawczych i stanów emocjonalnych oraz możliwością wzmocnienia niektórych efektów działania substancji uzależniających [53-56]. Układ endokannabinoidowy uczestniczy również w modulacji przewodnictwa bólowego,

głównie poprzez wpływ na sygnalizację w neuronach pnia mózgu neuromodulujących czucie bólu oraz bezpośrednio oddziaływanie na obwodowe neurony nocycyptywne [57]. Ponadto endogenne kannabinoidy modyfikują reakcję organizmu na stres, m.in. poprzez wpływ na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Czynniki stresowe prowadzi do zwiększonej aktywności endokannabinoidów, które głównie poprzez receptory kannabinoidowe CB₁, prowadzą do zahamowania uwalniania kortykosteroidów [58]. Istotną rolę układu endokannabinoidowego w lęku i depresji częściowo potwierdzają objawy odstawienne, występujące u osób nadużywających kannabinoidów pochodzenia roślinnego [58]. Obserwacje te zostały potwierdzone również w licznych badaniach z wykorzystaniem zwierząt, w tym między innymi w uznanym teście podniesionego labiryntu krzyżowego z użyciem myszy typu *knock-out* (CB₁^{-/-}) [59]. Kolejnym procesem kontrolowanym przez centralny system nerwowy, na który wywiera wpływ układ endokannabinoidowy, jest przyjmowanie pokarmów. Kannabinoidy stymulują związany z podwzgórzem ośrodek głodu oraz budują motywację do przyjmowania pokarmów poprzez ośrodki związane z jądrem półleżącym [60]. Ważnym modulatorem układu kannabinoidowego jest leptyna (produkowane w tkance tłuszczowej białko pośrednio hamujące apetyt), która prowadzi m.in. do obniżenia poziomu endokannabinoidów [52].

Funkcje obwodowe układu kannabinoidowego można ujawnić poprzez farmakologiczne zablokowanie receptorów kannabinoidowych. W omawianej sytuacji obserwuje się wzrost oksydacji kwasów tłuszczowych, zahamowanie ich syntezy oraz uwalnianie insuliny i nasiloną perystaltykę jelit. Wykazano także zaangażowanie układu endokannabinoidowego w regulację układu sercowo-naczyniowego oraz funkcji rozrodczych [52].

Endokannabinoidy realizują swoje funkcje poprzez dwa uznane receptory kannabinoidowe CB₁ (CB₁R) i CB₂ (CB₂R), jednak szereg badań wskazuje także na istnienie dodatkowo kilku niezidentyfikowanych dotychczas receptorów dla endokannabinoidów [61, 62]. Do endokannabinoidów zalicza się dwa najwcześniej odkryte endogenne ligandy receptorów kannabinoidowych: *N*-arachidonyloetanolamina (AEA, anandamid) oraz 2-arachidonyloglicerol (2-AG), a także kolejne związki, co do których istnieje coraz więcej dowodów na ich zaangażowanie w układzie endokannabinoidowym, m.in.: 2-arachidonyloksyglicerol (noladyna), *O*-arachidonylo-etanolamina (wirodamina), *N*-arachidonylo-dopamina (NADA) i amid kwasu oleinowego (oleamid) (**Rysunek 1.5**) [53, 61]. Wszystkie dotychczas opisane endokannabinoidy są pochodnymi (amidowymi, estrowymi, eterowymi) długołańcuchowych (wielo-)nienasyconych kwasów tłuszczowych i charakteryzują się różną selektywnością względem podtypów receptorów kannabinoidowych

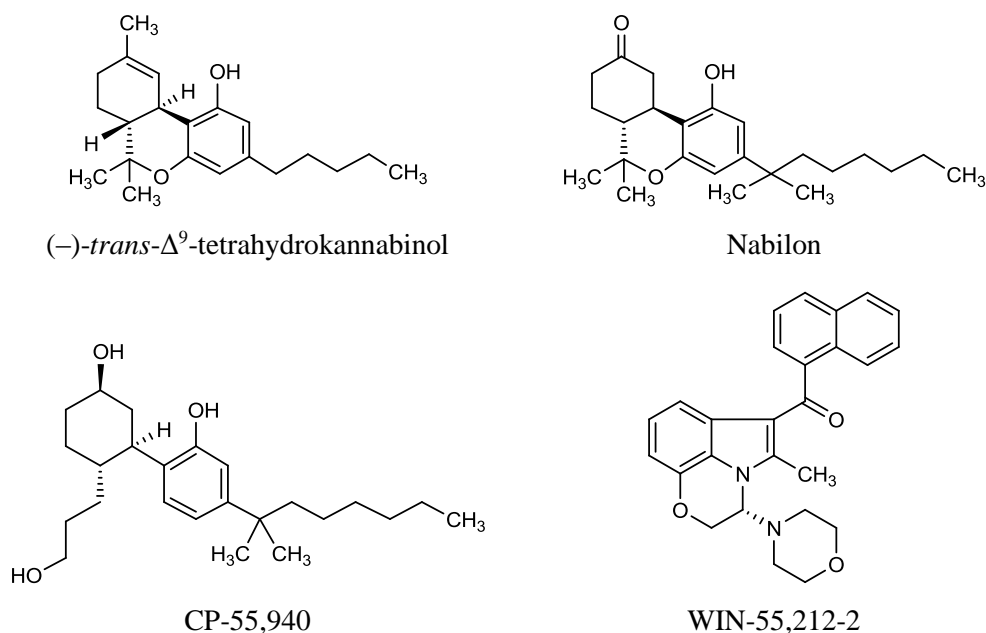
CB₁ oraz CB₂ (AEA, noladyna, NADA i oleamid są selektywne względem CB₁R, natomiast wiroadamina względem CB₂R, a 2-AG charakteryzuje się podobną siłą wiązania do obu receptorów), a także zdolnością do oddziaływania z innymi białkami, jak na przykład kanały jonowe (receptory waniloidowe TRPV1, kanały Ca²⁺ typu T), czy też potencjalne nowe receptory kannabinoidowe (np. GPR18, GPR55) [51].



Rysunek 1.5 Struktura chemiczna endokannabinoidów.

Początki poszukiwania egzogennych ligandów CBR wyznacza wyizolowanie w 1964r. głównego psychoaktywnego składnika marihuany, tj. Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC), które wyprzedziło identyfikację jego celów molekularnych [63]. Dalsze badania doprowadziły do uzyskania Δ^9 -THC na drodze syntezy chemicznej (dronabinol - czysty izomer (-)-*trans*- Δ^9 -tetrahydrokannabinolu) oraz otrzymania innych syntetycznych analogów trójcyklicznych kannabinoidów (m.in. nabilon). Przedstawicielami nowej grupy agonistów receptorów kannabinoidowych, tzw. nieklasycznych (pozbawionych pierścienia piranu) kannabinoidów jest CP-55,940. Kolejną grupę agonistów stanowią pochodne aminoalkiloindolowe, które reprezentuje WIN-55,212-2 (**Rysunek 1.6**). Wymienieni wyżej agoniści receptorów kannabinoidowych cechują się niską selektywnością względem podtypów CB₁R i CB₂R [61], ale znane są też przykłady związków bardziej selektywnych

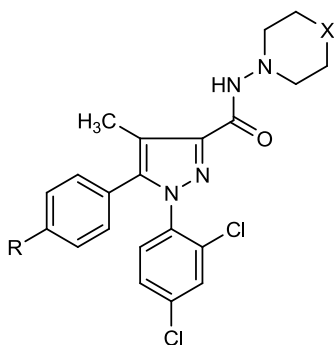
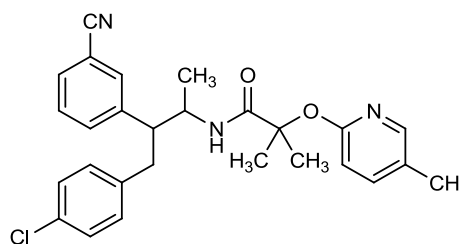
(m.in. M122, WO0128557 - selektywny agonista CB₁R i AM-1241 - selektywny agonista CB₂R) [53].



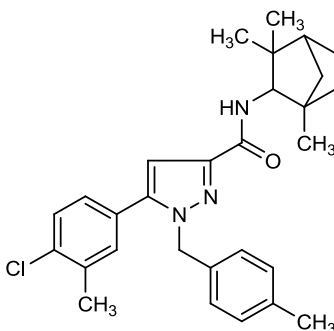
Rysunek 1.6 Egzogenni agoniści receptorów kannabinoidowych.

Główne zastosowania terapeutyczne agonistów receptorów kannabinoidowych, sformułowane na podstawie wskazań leczniczych zarejestrowanych produktów, obejmują odpowiednio: dronabinol i nabilon - zwalczanie nudności i wymiotów związanych z chorobą nowotworową i chemioterapią oraz stymulacja apetytu u chorych cierpiących na AIDS [64] oraz Sativex® (preparat zawierający standaryzowany wyciąg z konopii indyjskich, a dokładnie Δ^9 -THC i inny z klasycznych kannabinoidów - kannabidiol w stosunku 1:1) - leczenie objawów spastyczności u pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane [65].

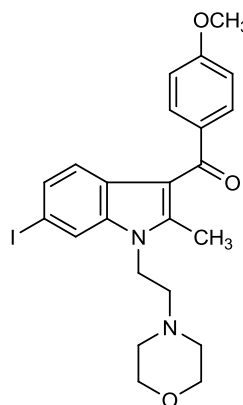
Wskazania terapeutyczne agonistów CBR, oczekujące aktualnie na zatwierdzenie, obejmują ponadto: ból neuropatyczny oraz ból towarzyszący chorobom nowotworowym, a także zaburzenia motoryczne związane z uszkodzeniem rdzenia kręgowego. Jeśli chodzi o selektywnych agonistów CB₂R, istnieje wiele dowodów naukowych na możliwość ich potencjalnego zastosowania w leczeniu niektórych form białaczek i glejaków, w odbudowie masy kostnej oraz w leczeniu bólu o podłożu zapalnym [66]. Szczególną zaletą tej grupy związków jest brak działania psychotropowego, ze względu na praktyczny brak ekspresji receptorów CB₂R w mózgu [53].

Selektywni antagoniści CB₁Rrimonabant (SR141716A) (*R*: -Cl, *X*: -CH₂-)AM251 (*R*: -I, *X*: -CH₂-)AM281 (*R*: -I, *X*: -O-)

taranabant

Selektywni antagoniści CB₂R

SR144528



AM630

Rysunek 1.7 Struktury antagonistów/odwrotnych agonistów receptorów kannabinoidowych.

Do najlepiej opisanych antagonistów receptorów kannabinoidowych CB₁ zalicza się: rimonabant, AM251, AM281 oraz taranabant (**Rysunek 1.7**). Związki te w niektórych modelach wykazują zdolność do hamowania konstytutywnej aktywności receptora CB₁R i dlatego zostały zakwalifikowane jako odwrotni agoniści receptora. Grupę selektywnych antagonistów receptorów CB₂R reprezentują SR144528 oraz AM630, które również wykazują cechy odwrotnych agonistów [61, 67]. Należy wspomnieć, że poszukiwania ligandów receptorów kannabinoidowych prowadzi się także w innych, niż opisane wyżej grupach chemicznych, obejmujących na przykład 3-benzyllokumaryny [68].

Podczas gdy na chwilę obecną niewiele wiadomo na temat potencjalnego znaczenia terapeutycznego antagonistów/odwrotnych agonistów receptora CB₂R, wskazania lecznicze dla antagonistów/odwrotnych agonistów receptora CB₁R obejmują - otyłość, uzależnienie od

nikotyny i leków, a także leczenie objawów lokomotorycznych w chorobach Parkinsona i Huntingtona [64, 66].

Jedynym jak do tej pory antagonistą/odwrotnym agonistą CBR, który został wprowadzony do lecznictwa był rimonabant (zatwierdzony przez Europejską Agencję Leków w 2006 roku, natomiast ze względu na niepokojące wyniki III fazy badań klinicznych niedopuszczony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków), ze wskazaniami w leczeniu otyłości przy współistniejących zaburzeniach gospodarki lipidowej. Prowadzone były również badania mające na celu potwierdzenia korzyści terapeutycznych w leczeniu uzależnienia od nikotyny. Rimonabant został niestety wycofany z obrotu w 2008r., ze względu na doniesienia o wywoływaniu poważnych działań niepożądanych, obejmujących stany lękowe i depresyjne, które mogły prowadzić do nasilenia epizodów prób samobójczych u osób przyjmujących rimonabant [64].

CB₁R

Gen receptora został sklonowany w 1990 roku i znajduje się na chromosomie 6 [69]. Białko receptorowe zbudowane jest z 472 aminokwasów, jednak stwierdzono również istnienie krótszych izoform receptora (CB₁R, wariant A - 411 aminokwasów i CB₁R, wariant B - 439 aminokwasów) [70, 71]. Gen kodujący receptor CB₁R charakteryzuje duża konserwatywność międzygatunkowa (97-99% homologii między człowiekiem, szczurem i myszą) [52].

Receptory kannabinoidowe CB₁ są jednymi z najliczniej występujących receptorów neuronalnych w mózgu, gdzie ich gęstość 10-50-krotnie przewyższa ilość receptorów dla klasycznych neurotransmiterów [52, 53]. W dominującej części są to receptory presynaptyczne i występują przede wszystkim w hipokampie, korze mózgowej, mózdzku oraz jądrach podstawy, czyli obszarach odpowiedzialnych m.in. za koordynację ruchową oraz funkcje poznawcze i emocje. Receptor CB₁ jest też obecny w pniu mózgu, podwzgórzu i przysadce, uczestnicząc w regulacji odczuwania bólu, termoregulacji oraz fizjologii układu sercowo-naczyniowego, pokarmowego i oddechowego [53, 57]. Obwodowo obecność podtypu 1 receptora kannabinoidowego stwierdzono w tkance tłuszczowej, wątrobie, przewodzie pokarmowym, trzustce, mięśniach, sercu i macicy, co wskazuje na jego rolę w utrzymaniu równowagi energetycznej, metabolizmie lipidów i funkcjach rozrodczych [52, 53, 57].

Receptor CB₁R zaliczany jest do rodziny receptorów siedmiotransbłonowych. W wyniku pobudzenia oddziałuje przede wszystkim z białkami G klasy G_{i/o}, prowadząc do zahamowania aktywności cyklazy adenylanowej i stymulacji kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK)

oraz, poprzez podjednostki $\beta\gamma$ białek G, do aktywacji wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych (inaczej: dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych; IRK lub K_{ir} , ang.: *inward-rectifier potassium channels*) i zahamowania kanałów wapniowych typu L, N i P/Q [51, 64, 66]. W niektórych modelach, zarówno natywnych jak i rekombinowanych, pobudzenie receptora CB_1R prowadziło do aktywacji białek G_s , co ma prawdopodobnie związek z heterodimeryzacją receptorów CB_1 i dopaminowych D_2 [64, 67]. Stwierdzono również, że CB_1R może oddziaływać z białkami klasy $G_{q/11}$ w następstwie zjawiska selektywności funkcjonalnej jednego z opisanych agonistów CB_1R - WIN-55,212-2 [72].

CB_2R

Gen receptora kannabinoidowego CB_2 zlokalizowany jest na chromosomie 1 i został sklonowany w 1993r [73, 74]. Sekwencja białkowa CB_2R (360 aminokwasów) wykazuje stosunkowo niską, 44-procentową homologię względem CB_1R [74]. Jedynie w regionach transbłonowych podobieństwo sekwencji aminokwasowych pomiędzy podtypami receptorów sięga w przybliżeniu 68%. Receptor CB_2R cechuje się większą niż CB_1R zmiennością międzygatunkową. Przykładowo, podobieństwo sekwencji między szczurzym a ludzkim receptorem CB_2R wynosi 81%, a między ludzkim i mysim - 82% [74, 75].

Receptory kannabinoidowe typu 2 występują głównie w komórkach układu odpornościowego. Ponadto, wbrew temu co pierwotnie uważano, receptory CB_2R charakteryzują się także występowaniem w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie obserwuje się wzrost ich ekspresji w komórkach mikrogleju oraz niewielkiej populacji neuronów w warunkach patologicznych, związanych z działaniem bodźców uszkadzających (przewlekły ból neuropatycznych, choroby neurodegeneracyjne, wylew). Może to wskazywać na neuroprotekcijną rolę tego podtypu receptorów [64, 76].

Receptory CB_2R (podobnie jak receptory CB_1R) oddziałują z klasą $G_{i/o}$ białek G, prowadząc do zahamowania aktywności cykazy adenylanowej oraz aktywacji kinaz MAPK. Jednak w przeciwieństwie do podtypu 1, nie wpływają one na kanały wapniowe i potasowe [64], prawdopodobnie ze względu na oddziaływanie z innymi podklasami białek $G_{i/o}$. Jest to spowodowane odmiennym profilem ekspresji podklas białek $G_{i/o}$ w tkankach obwodowych, w tym m.in. brakiem charakterystycznych dla neuronów białek G_o , odpowiedzialnych za aktywację wyżej wymienionych kanałów poprzez kompleks podjednostek $\beta\gamma$ [11].

Receptor GPR18

Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na pewne podobieństwo receptora sierocego GPR18 do klasycznych receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂. Stwierdzono między innymi, że endogenne agonisty receptorów kannabinoidowych - anandamid oraz egzogenne Δ^9 -THC oddziałują także z receptorem GPR18 [77, 78]. Badania wykazały również, że kannabidiol, będący odwrotnym agonistą receptorów CB₁ i CB₂ działa jak antagonistą w modelu komórek HEK z nadekspresją receptora GPR18 [77].

Na chwilę obecną niewiele wiadomo na temat (pato-)fizjologicznej roli receptora GPR18. Jego ekspresja została potwierdzona w tkankach jąder, śluznicy, endometrium, komórkach czerniaka złośliwego, a także w mniejszych ilościach w grasicy i leukocytach. Ze względu na opisane powyżej lokalizacje, postuluje się, że receptor GPR18 może odgrywać rolę w regulacji układu immunologicznego oraz procesach nowotworzenia [77, 79-83].

Opracowanie selektywnych ligandów receptora GPR18 jest niezbędne dla lepszego poznania funkcji tego receptora, zwłaszcza w kontekście identyfikacji potencjalnego celu terapeutycznego. Równie istotną kwestią jest ocena działania opisanych ligandów klasycznych receptorów kannabinoidowych pod kątem ich oddziaływania z potencjalnie „nowymi” członkami rodziny receptorów kannabinoidowych. Ma to szczególne znaczenie przy uwzględnieniu faktu, że niektóre z efektów wywoływanych przez ligandy receptorów CB₁ i CB₂ są także obecne w modelach *in vivo*, pozbawionych ekspresji tych receptorów [62, 84].

1.1.3. Receptory histaminowe H₄

Znane są cztery typy receptorów histaminowych: H₁, H₂, H₃ i H₄. Wszystkie są zaliczane do receptorów siedmiotransbłonowych [85]. W grupie tej receptor H₄ histaminowy (H₄R) został odkryty i opisany najpóźniej. Stało się to możliwe dzięki rozwojowi technik klonowania molekularnego, których wykorzystanie pozwoliło na identyfikację cDNA receptora histaminowego H₃, a następnie, w toku poszukiwań białek homologicznych względem tego receptora, doprowadziło do sklonowania niezależnie przez kilka grup badawczych receptora histaminowego H₄ [86-91]. Analiza sekwencji najnowszego członka rodziny receptorów histaminowych wykazała 58-procentową homologię względem receptora H₃ w obrębie domen transbłonowych oraz jedynie 35-procentową ogółem. Podobieństwo H₄R względem pozostałych podtypów receptorów histaminowych jest jeszcze mniejsze (ok. 19%). Stwierdzono również istotne różnice międzygatunkowe w sekwencji H₄R [85, 92-94].

Gen kodujący receptor histaminowy H₄ występuje w jednej kopii na chromosomie 18 i zawiera dwa dość duże introny (odpowiednio: 7867 i >17500 par zasad), co potencjalnie stanowi podstawę do występowania alternatywnych wariantów splicingowych [92, 95, 96]. Dotychczas zidentyfikowano jedynie dwie izoformy właściwego białka receptora (o długości 390 aminokwasów), które stanowią jego krótsze warianty, odpowiednio: izoforma H₄(67) - zawiera 67 początkowych aminokwasów sekwencji oraz izoforma H₄(302) - jest pozbawiona fragmentu 68-155 względem sekwencji referencyjnej. Obie izoformy są нефункционалне, zarówno w zakresie wiązania ligandów, jak i transmisji sygnału. Ich rola nie została jeszcze dokładnie poznana, jednak postuluje się, że pełnią one rolę regulatorową poprzez tworzenie heterodimerów z receptorem funkcjonalnym. W systemach rekombinowanych koekspresja izoform prowadziła do obniżenia wiązania naturalnego agonisty histaminy do funkcjonalnego H₄R [92, 97].

Zależna od białek G sygnalizacja receptora histaminowego H₄ realizowana jest poprzez białka G_{i/o}, prowadząc do aktywacji szeregu procesów związanych z tym szlakiem, takich jak: hamowanie cykazy adenylanowej i modulowanie transkrypcji genów regulowanych przez cAMP-zależne czynniki transkrypcyjne, aktywacja kinazy MAPK, czy też rekrutacja wewnątrzkomórkowych zasobów wapnia [98]. W indukcji tego ostatniego efektu uczestniczą także białka klasy G_{q/11}, a dokładniej zawierające podjednostki G $\alpha_{15/16}$, których ekspresja jest ograniczona głównie do komórek hematopoetycznych. Dlatego wewnątrzkomórkowy wyrzut wapnia, w odpowiedzi na pobudzenie receptora histaminowego H₄R, można przede wszystkim zaobserwować w komórkach krwi obwodowej [92, 99, 100].

Receptor histaminowy H₄ ulega ekspresji przede wszystkim w komórkach układu immunologicznego (bazofile, eozynofile, mastocyty i komórki dendrytyczne) [92, 101]. Wspomniany profil tkankowej ekspresji receptora wyznacza potencjalne zastosowanie terapeutyczne antagonistów H₄R w procesach chorobowych związanych ze stanem zapalnym i reakcjami immunologicznymi, zwłaszcza że poziom ekspresji tego białka ulega modyfikacji pod wpływem modulatorów stanu zapalnego [89, 96]. Rola receptora histaminowego w procesach zapalnych została potwierdzona *in vitro*, m.in. poprzez wykazanie jego udziału w chemotaksji mastocytów i eozynofili [99, 100, 102]. Stymulowana histaminą migracja tych komórek do miejsca stanu zapalnego jest ważnym elementem odpowiedzi immunologicznej. Potencjalna przydatność ligandów H₄R w modulacji procesów zapalnych i zaburzeń o charakterze immunologicznym, takich jak: alergia, astma, świąd oraz ból neuropatyczny, została potwierdzona również w szeregu badań *in vivo*, z wykorzystaniem modeli zwierzęcych [103-105].

Mimo pierwotnie sprzecznych doniesień odnośnie ekspresji H₄R w tkance nerwowej, obecność tych receptorów w centralnym systemie nerwowym została ostatecznie potwierdzona w niezależnych badaniach [106, 107]. Odkrycie to otwiera dyskusję na temat potencjalnego wykorzystania receptora histaminowego H₄ jako celu terapeutycznego w schorzeniach neurologicznych, typu ból neuropatyczny, czy demencja. Hipotetyczny obszar zastosowań terapeutycznych ligandów receptora histaminowego H₄ dodatkowo poszerza stwierdzenie obecności funkcjonalnych receptorów H₄R w komórkach raka piersi, jelita grubego i trzustki oraz potwierdzenie ich roli w regulacji proliferacji tych komórek, a także w procesach angiogenezy. W związku z powyższym sugeruje się, że związki o aktywności antyhistaminowej względem receptorów H₄ mogą stanowić również cenny obszar badań w poszukiwaniu nowych środków leczniczych o aktywności przeciwnowotworowej [108].

Ze względu na charakter procesów regulowanych przez H₄R, potencjalne znaczenie terapeutyczne ligandów tego receptora jest ograniczone do antagonistów. Stwierdzenie to dodatkowo wzmacniają wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem agonistów H₄R u zwierząt, wskazujące na zwiększone ryzyko zmian w obrazie morfologicznym krwi [103].

Intensywne badania w zakresie poszukiwania potencjalnych antagonistów receptorów histaminowych H₄ doprowadziły, w przeciągu ostatnich kilkunastu lat od jego odkrycia, do identyfikacji wielu obiecujących połączeń. Zaliczane są one do różnych grup chemicznych, obejmujących m.in. pochodne: indolowe, w tym referencyjnego antagonistę H₄R - JNJ7777120 (**Rysunek 1.8**) [109], benzimidazolowe [110], czy aminopirymidynowe i aminotriazynowe [111, 112]. Częstym elementem strukturalnym zidentyfikowanych antagonistów jest fragment metylopiperazynowy [92, 110, 113].



Rysunek 1.8 Referencyjny agonista – 4-metylhistamina (A) oraz antagonistę – JNJ7777120 (B) receptorów histaminowych H₄.

1.2. Farmakologia molekularna receptorów siedmiotransbłonowych

Rosnący w ostatnich latach dostęp do coraz bardziej rozbudowanych bibliotek związków pochodzenia naturalnego i syntetycznych, determinuje potrzebę opracowania szybkich i skutecznych metod przesiewowego badania aktywności różnorodnych struktur chemicznych, w celu identyfikacji ligandów receptorów GPCR o nowych i nieopisanych dotychczas właściwościach.

Jeszcze w ostatniej dekadzie XX wieku we wstępnych badaniach farmakologicznych dokonywano oznaczeń aktywności związków przede wszystkim z wykorzystaniem niemodyfikowanego genetycznie materiału, używając do tego celu tkanki zwierzęce, hodowle pierwotne i preparaty błon komórek natywnych [114]. Rozwój technik inżynierii genetycznej i postępy w poznaniu genomów różnych organizmów sprawiły, że obecnie coraz większy jest udział technik opierających się na modelach wykorzystujących receptory rekombinowane [115-117].

1.2.1. Modele wykorzystujące receptory natywne

Praca z modelami opierającymi się na receptorach natywnych najlepiej odtwarza warunki zbliżone do fizjologicznych. Wykorzystywany jest materiał biologiczny, w którym ekspresji badanych receptorów, towarzyszy obecność innych istotnych białek błonowych (m.in. izoform receptorów, innych podtypów receptorów), w ilościach charakterystycznych dla poszczególnych organizmów i tkanek. W tkankach natywnych zachowana jest także unikalna proporcja badanych receptorów i odpowiednich podtypów białek G, kluczowa w kontekście odpowiedzi komórkowej na działanie ligandów receptorów [12].

Mimo wyżej wymienionych zalet, wykorzystanie modeli, w których stosuje się receptory natywne, jest ograniczone do receptorów dobrze scharakteryzowanych, dla których opisane są odpowiednie selektywne ligandy. W związku z powyższym, technik tych nie można zastosować w odniesieniu do receptorów sierocych (tj. receptorów, dla których nie zidentyfikowano dotychczas endogennych ligandów), które również należy rozpatrywać jako istotny dział współczesnej farmakologii, zwłaszcza jeśli weźmie się pod uwagę, że grupa ta wciąż obejmuje przynajmniej 100 różnych podtypów receptorów [5, 118].

Kolejnym ograniczeniem w pracy z tkankami natywnymi jest często niski poziom ekspresji badanego receptora oraz występowanie w tkance innych receptorów o zbliżonym profilu farmakologicznym. W takiej sytuacji utrudnione jest zmierzenie parametrów farmakologicznych specyficznych dla danego receptora oraz konieczne jest wykonywanie eksperymentów z wykorzystaniem większej ilości materiału biologicznego [119].

Z oczywistych względów etycznych utrudnione jest pozyskiwanie dużych ilości materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego. W związku z powyższym, w przypadku modeli wykorzystujących receptory natywne, najczęściej używane są odpowiednie próbki zwierzęce. Interpretacja wyników, uzyskanych w eksperymentach przeprowadzonych na tkankach zwierzęcych i ich przeniesienie na receptory ludzkie jest znacznie utrudnione, w związku z różnicami międzygatunkowymi w farmakologii receptorów. Różnice te stanowią istotny problem w analizie wyników badań farmakologicznych przeprowadzanych na zwierzętach, w kontekście substancji, które mają być następnie podawane ludziom. Odmienna międzygatunkowa charakterystyka ligandów receptorów siedmiotransbłonowych została zaobserwowana i opisana także w odniesieniu do receptorów będących przedmiotem niniejszej pracy [17, 75, 93, 120].

Osobny problem farmakologii molekularnej opierającej się na receptorach natywnych jest związany z oceną aktywności wewnętrznej ligandów, dokonywaną poprzez określenie wpływu związków na wtórne przekaźniki lub odpowiedź całej komórki (np.: zmiana kształtu, migracja). W znacznej części przypadków uzyskanie informacji co do charakteru agonistycznego lub antagonistycznego badanych substancji opiera się na testach przeprowadzonych na żywych, nienaruszonych komórkach. Warunek ten, w przypadku wykorzystania preparatów tkanek lub hodowli pierwotnych, stanowi wielokrotnie poważny problem metodologiczny. Prowadzenie hodowli tego typu możliwe jest jedynie dla niektórych rodzajów tkanek i to przez ograniczony okres czasu [121].

1.2.2. Modele opierające się na receptorach rekombinowanych

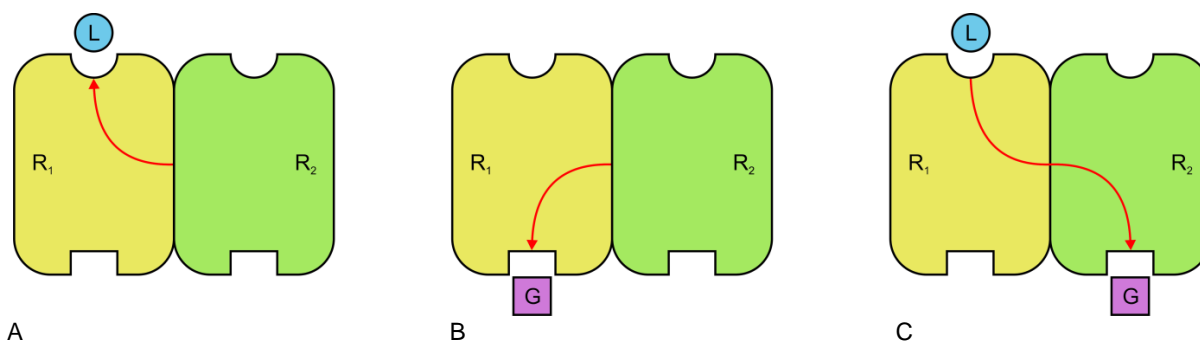
Alternatywą do wykorzystania w badaniach receptorowych niezmodyfikowanych tkanek zwierzęcych, jest najszerzej obecnie stosowana technika, opierająca się na otrzymywaniu receptorów rekombinowanych. U jej podstaw leżą osiągnięcia inżynierii genetycznej i opracowanie technik klonowania DNA, które pozwalają na uzyskiwanie ekspresji obcych genów w różnorodnych komórkach. Początek wykorzystania techniki białek rekombinowanych w badaniach nad receptorami GPCR wyznacza sklonowanie pierwszego receptora β 2-adrenergicznego (koniec lat 80-tych XX wieku) [122]. Dokładne poznanie sekwencji genów kolejnych receptorów pozwoliło na zastosowanie tej techniki do pozostałych białek receptorowych, a także umożliwiło identyfikację i charakteryzację wspomnianych wcześniej receptorów sierocych.

Jedną z największych zalet technik otrzymywania białek rekombinowanych jest możliwość dokonywania ściśle określonych zmian w wyjściowym materiale genetycznym. Zmiany te

mogą m.in. obejmować wprowadzenie konkretnych mutacji punktowych, czy też modyfikacje sekwencji receptorów w postaci tworzenia konstruktów fuzyjnych z białkami fluorescencyjnymi [123]. Otrzymywanie wariantów receptora z mutacjami punktowymi pozwala na przeprowadzenie eksperymentów mających na celu identyfikację aminokwasów uczestniczących w wiązaniu ligandów [124-126]. Z kolei zastosowanie znakowania białkami fluorescencyjnymi stwarza dodatkowe możliwości, m.in. w zakresie wykorzystania zjawiska FRET (ang.: *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - rezonansowy transfer energii fluorescencji) lub BRET (ang.: *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* - rezonansowy transfer energii bioluminescencji) do badań dimeryzacji receptorów [127, 128], czy też oddziaływań z białkami G lub badania interakcji receptor-ligand, gdy wykorzystana się również odpowiednie ligandy fluorescencyjne [129] lub dodatkowe znakowanie białka receptorowego małymi cząsteczkami fluorescencyjnymi [130]. Zastosowanie znakowania fluorescencyjnego receptorów ułatwia ponadto potwierdzenie ekspresji błonowej białek receptorowych, którą można w tych warunkach zweryfikować różnymi technikami fluorescencyjnymi (mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna, cytometria przepływowa) [131].

Rozpatrując zagadnienia związane z ekspresją receptorów rekombinowanych, należy zwrócić uwagę na aspekty wynikające bezpośrednio z charakterystyki komórek gospodarza. Czynniki takie jak: odmienny profil modyfikacji potranslacyjnych, skład błony komórkowej, czy obecność kompatybilnych białek G, mogą zmieniać aktywność receptorów rekombinowanych w porównaniu do naturalnie występujących odpowiedników [132].

Kolejnym zagadnieniem, związanym z modelami bazującymi na receptorach rekombinowanych, jest potencjalny brak naturalnie współwystępujących receptorów, które mogą uczestniczyć w tworzeniu dimerów receptorowych. Pary białek tworzące dimery mogą funkcjonować jako modulatory allosteryczne. W natywnych komórkach dimeryzacja może wpływać na powinowactwo ligandów oraz białek G względem receptorów i to zarówno w obecności ligandów receptorów, jak i w wyniku bezpośredniego oddziaływania między białkami receptorów tworzącymi dimer [133-136]. Przykładowe mechanizmy oddziaływań między dimeryzującymi receptorami, które mogą wpływać na zmianę wyników testów *in vitro* w modelach wykorzystujących receptory rekombinowane przedstawione są schematycznie na **Rysunku 1.9**.



Rysunek 1.9 Funkcjonalne efekty allosterycznego oddziaływania receptorów tworzących dimer. A) Bezpośrednie oddziaływanie białek receptorowych zmienia powinowactwo liganda względem receptora. B) Bezpośrednie oddziaływanie białek receptorowych zmienia powinowactwo białka G względem receptora. C) Trans-aktywacja - związanie liganda receptora R₁ powoduje zmianę powinowactwa białka G względem receptora R₂. R₁, R₂ - białka receptorowe, L - ligand, G - białko G.

Istotnym problemem związanym z wykorzystaniem komórek charakteryzujących się nadekspresją receptorów GPCR jest także zmieniająca się w porównaniu do komórek natywnych proporcja białek receptorowych względem białek G [137].

W obecności agonisty białko receptora siedmiotransbłonowego uczestniczy w wytworzeniu, składającego się z trzech elementów, kompleksu agonista-receptor w stanie aktywnym-białko G. Powstawanie stanu aktywnego receptora, do którego agonista wiąże się z większym powinowactwem niż do receptora w stanie podstawowym, jest promowane tworzeniem kompleksu receptora z białkiem G. W naturalnych układach ilość dostępnych białek G nie jest zwykle czynnikiem limitującym i znaczna populacja receptorów przekształca się w formę aktywną. Jednak w niektórych przypadkach ilość białek G jest niewystarczająca do utworzenia trójskładnikowego kompleksu z wykorzystaniem wszystkich dostępnych receptorów. W sytuacji tej obserwujemy różnice w gęstości receptorów (B_{max}) zmierzonej w obecności znakowanych antagonistów (cała pula receptorów) i agonistów (pula receptorów oddziałująca z białkami G). Zjawisko to jest szczególnie widoczne w przypadku modeli opierających się na nadekspresji receptorów rekombinowanych, w których ilość receptorów przekracza znacznie ilość białek G [138].

Konsekwencje istotnej dysproporcji białek receptorowych względem białek G dotyczą także testów funkcjonalnych, przeprowadzanych na modelach z nadekspresją receptorów. W eksperymentach tego typu można na przykład zaobserwować oddziaływanie receptora z białkami G, z którymi fizjologicznie się on nie wiąże, co prowadzi do aktywacji nietypowych wtórnych przekazywaczy [139]. Zdarza się również, że badany związek różni się całkowicie aktywnością wewnętrzną w dwóch układach eksperymentalnych. Tłumaczy się to faktem, że gdy agonista promuje tworzenie stanu aktywnego receptora (A-R*) o mniejszej skuteczności

oddziaływania z białkami G niż spontanicznie powstająca forma aktywna (R*), to związek ten będzie zachowywał się jak pełny/częściowy agonista w systemach o niskim poziomie ekspresji (nasilenie efektu w układzie o niskiej aktywności konstytutywnej) receptora oraz jak odwrotny agonista w układach o wyższym poziomie ekspresji receptora (osłabienie efektu w układzie o wysokiej aktywności konstytutywnej) [137].

1.2.3. Metody uzyskiwania ekspresji receptorów rekombinowanych

Białka rekombinowane otrzymuje się w różnych systemach ekspresyjnych. W celu uzyskania ekspresji receptorów GPCR można wykorzystywać zarówno komórki bakteryjne, drożdżowe, owadzie, jak i ssacze [132, 140]. Każdy z systemów ma odmienną charakterystykę, a więc swoje zalety i ograniczenia.

1.2.3.1. *Escherichia coli*

Wykorzystanie komórek bakteryjnych, w tym między innymi bakterii *Escherichia coli*, do ekspresji receptorów GPCR pozwala przede wszystkim na uzyskanie wysokiej wydajności produkcji białka, przy niewielkich nakładach finansowych [141]. Niestety organizmy prokariotyczne nie pozwalają na przeprowadzenie badań funkcjonalnych rekombinowanych receptorów siedmiotransbłonowych, ze względu na brak odpowiednich białek G w komórkach bakterii. Skutkuje to niemożliwością oznaczenia aktywacji wtórnych przekaźników, ale także może powodować brak występowania aktywnej konformacji receptora, względem której obserwuje się wiązanie agonistów z wyższym powinowactwem niż w przypadku konformacji nieaktywnej [142, 143]. Dodatkowo bakterie nie są zdolne do przeprowadzania licznych modyfikacji potranslacyjnych białek charakterystycznych dla eukariontów [144], które mogą odgrywać istotną rolę w ekspresji funkcjonalnych receptorów GPCR [145-147]. Należy jednak pamiętać, że modyfikacje potranslacyjne istotne dla jednego typu receptora, mogą mieć mniejsze znaczenie dla właściwego funkcjonowania innego podtypu. Dodatkowo nie zawsze można wywnioskować bezpośrednio z sekwencji aminokwasowej jakim modyfikacjom ulega białko natywne [140].

Z innych ograniczeń zastosowania bakterii jako modeli do ekspresji receptorów oddziałujących z białkami G należy wymienić: odmienny skład lipidowy błony komórkowej bakterii, wpływający na parametry wiązania ligandów receptorów znajdujących się w tej błonie [132] oraz toksyczność receptorów względem bakterii, obserwowaną niekiedy przy wysokim poziomie ekspresji białka [141].

1.2.3.2. Drożdże

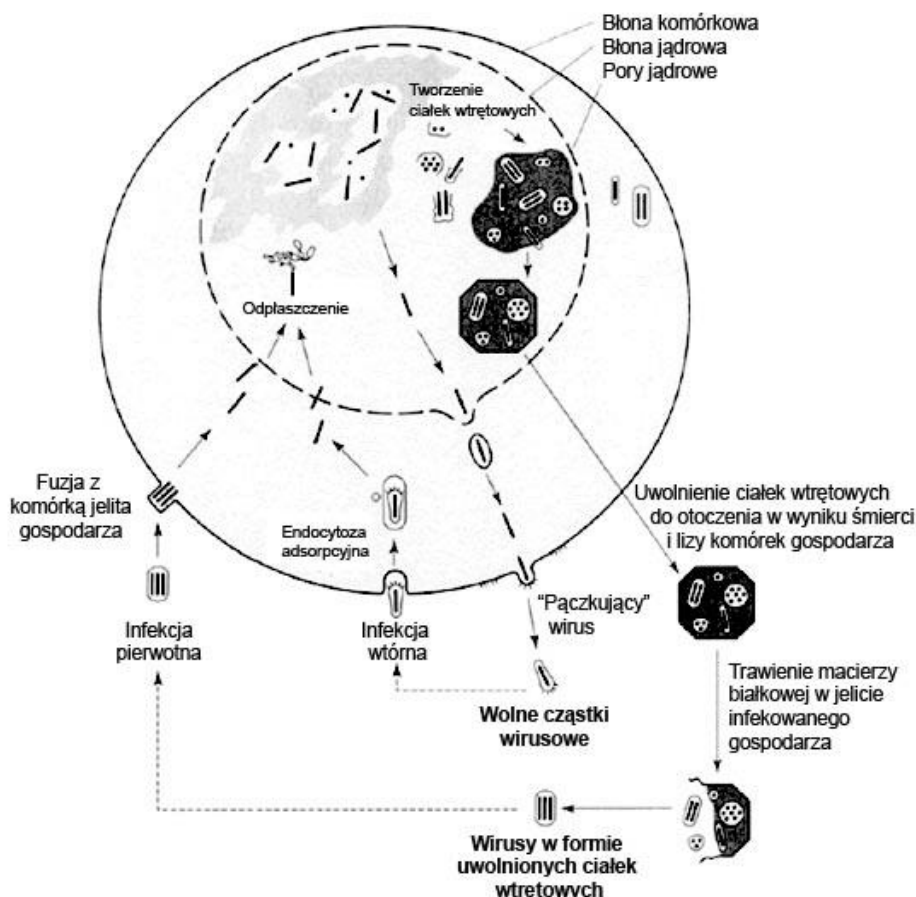
Gatunki drożdży najczęściej wykorzystywane do uzyskania ekspresji receptorów GPCR to *Saccharomyces cerevisiae* [148] oraz należący do organizmów metylotroficznych (tj. wykorzystujących metanol jako jedyne źródło węgla) gatunek *Pichia pastoris* [149]. Drożdże łączą zalety prokariotycznych i eukariotycznych systemów ekspresyjnych [132, 140, 150, 151]. Charakteryzuje je szybki wzrost i łatwość przeprowadzania modyfikacji genetycznych. Osiągają też znacznie większą biomasę w porównaniu do bakterii (szczególnie *Pichia pastoris*). Ponadto, w odróżnieniu od bakterii, drożdże posiadają zestaw endogennych białek G, które mogą w niektórych przypadkach oddziaływać z heterologicznymi receptorami rekombinowanymi [148, 150, 152], a także przeprowadzają większość modyfikacji potranslacyjnych białek charakterystycznych dla organizmów wyższych. Niestety w komórkach drożdży nie zawsze przebiegają one dokładnie tak, jak modyfikacje potranslacyjne natywnych receptorów w komórkach ssaczy [132, 140].

Jako kolejne z ograniczeń stosowania drożdży do produkcji receptorów rekombinowanych należy wymienić problematykę odpowiedniego kierowania białka do błony komórkowej i związane z tym ryzyko retencji receptora w wewnątrzkomórkowych kompartmentach błonowych [140], a także fakt, że endogenne białka G drożdży niekiedy nie gwarantują odpowiedniej aktywności receptorów rekombinowanych [148, 150, 153]. Ponadto skład lipidowy błony komórkowej, a zwłaszcza niska zawartość cholesterolu, który jest zastąpiony w komórkach grzybów ergosterolem, może wpływać na zmieniony profil farmakologiczny receptorów ulegających ekspresji w komórkach drożdży [154]. Innym utrudnieniem dla stosowania drożdży jako modelu do ekspresji receptorów GPCR jest ściana komórkowa, która może utrudniać dostęp niektórych ligandów do białek receptorowych zlokalizowanych w błonie komórkowej [150].

1.2.3.3. Komórki owadzie

W celu uzyskania ekspresji białek rekombinowanych w komórkach owadziach wykorzystuje się bakulowirusowy system ekspresji. Najpowszechniej stosowanym obecnie bakulowirusem jest wirus poliedrozy jądrowej ćmy *Autographa californica* (AcNPV, ang.: *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*). Jest to duży, otoczony osłonką lipidową wirus, zawierający materiał genetyczny w postaci kolistej cząsteczki DNA, która została całkowicie zsekwencjonowana (133 894 par zasad) [155, 156]. AcNPV infekuje komórki owadów (głównie ciem i motyli), realizując swój cykl życiowy, składający się z czterech umownych faz: wczesnej natychmiastowej, wczesnej, późnej i bardzo późnej (**Rysunek 1.10**).

Bakulowirusy wnikają do komórek na drodze endocytozy adsorpcyjnej i przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do uwolnienia DNA wirusowego i rozpoczęcia jego replikacji. Powstające następnie cząstki wirusowe mogą przybierać dwie formy: wolne cząstki wirusowe uwalniane bez lizy komórek (tzw. wirusy pączkujące w fazie późnej, tj. >12h od infekcji) oraz ciała wtrętowe, w przypadku których cząstki wirusowe zostają zamknięte w białkowej macierzy (bardzo późna faza cyklu wirusowego od ok. 18h po infekcji do śmierci i lizy komórki) [156, 157].



Rysunek 1.10 Cykl życiowy bakulowirusa (opis w tekście), wg [158].

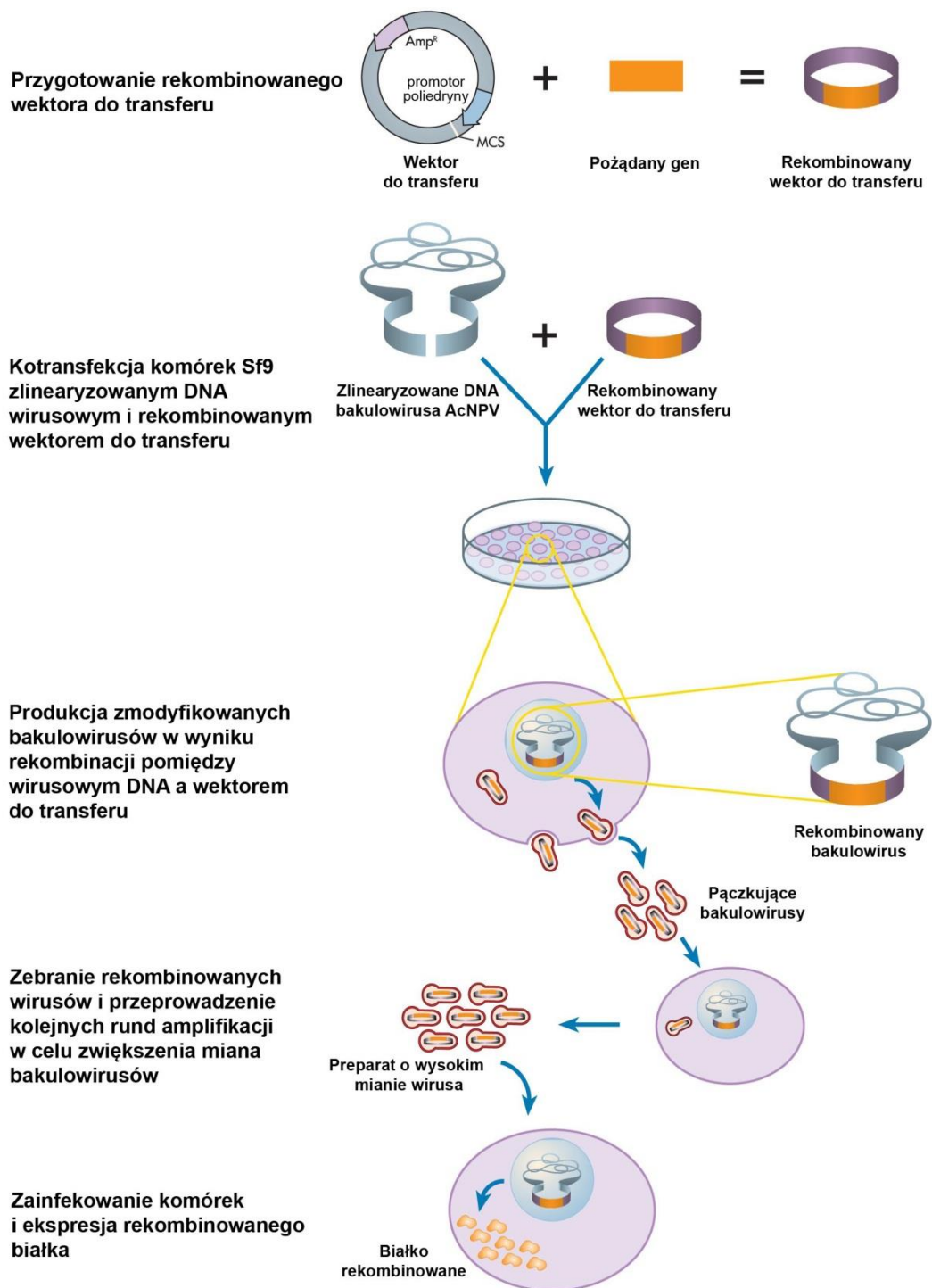
Głównym białkiem wchodzącym w skład macierzy ciałek wtrętowych jest poliedryna (29 kDa), która pełni funkcje ochronne, zabezpieczając wirusy przed działaniem enzymów uwalnianych w wyniku rozpadu komórek gospodarza. Do przekazania infekcji dochodzi w sytuacji, gdy kolejny organizm przyjmuje ciała wtrętowe z pokarmem. W środowisku alkalicznym jego przewodu pokarmowego poliedryna ulega hydrolizie, uwalniając wirusy, które infekują komórki nabłonkowe jelita. W kolejnych cyklach lizogennych wirusy uwalniane z komórek (bez ich rozpadu) infekują sąsiednie tkanki, powodując rozprzestrzenianie się zakażenia [155, 156].

Produkcja poliedryny, stanowiącej podstawowy budulec macierzy białkowej ciałek wtrętowych bakulowirusów, pozostaje pod kontrolą silnego promotora bardzo późnej fazy cyklu wirusowego i stanowi nawet 20% całkowitej syntezy białka. Mimo że poliedryna odgrywa istotną rolę w przetrwaniu wirusa w środowisku naturalnym, jej obecność nie jest niezbędna do replikacji wirusów w warunkach *in vitro*. Powyższe cechy sprawiły, że stała się ona obiektem modyfikacji genetycznych, mających na celu zastąpienie sekwencji genu poliedryny w genomie wirusa typu dzikiego sekwencją białka rekombinowanego. W ten sposób obcy gen umieszczony zostaje pod kontrolą silnego promotora, gwarantującego wysoki poziom ekspresji pożądanego białka [157, 159].

Strategia otrzymywania rekombinowanych wirusów obejmuje umieszczenie cDNA pożądanego genu pod kontrolą promotora poliedryny, w specjalnie skonstruowanym wektorze do transferu, a następnie zainicjowanie rekombinacji homologicznej między tym wektorem i DNA wirusowym we wnętrzu komórek gospodarza. Jednym z wariantów przeprowadzenia rekombinacji homologicznej jest kotransfekcja komórek owadzych wektorem do transferu, zawierającym gen rekombinowany oraz kolistym DNA wirusa typu dzikiego. Plazmid do transferu powinien zawierać sekwencje flankujące promotor poliedryny, aby umożliwić wystąpienie rekombinacji homologicznej. Nawet wtedy, przy zastosowaniu kolistego materiału genetycznego wirusa, rekombinacja przebiega z małą wydajnością (częstość - 0,1-0,5%) i wymusza na eksperymentatorze konieczność problematycznej identyfikacji wirusów rekombinowanych o fenotypie pozbawionym poliedryny (brak ciałek wtrętowych), przy dużej przewadze współtowarzyszących wirusów typu dzikiego [156, 159].

W celu zwiększenia wydajności rekombinacji oraz uproszczenia identyfikacji rekombinowanych wirusów opracowane zostały alternatywne techniki, w których wykorzystuje się zmodyfikowany, zlinearyzowany materiał DNA wirusowego. Pozwala on na uzyskanie wysokiego miana rekombinowanych wirusów, bez konieczności przeprowadzenia dodatkowego etapu skringu produkowanych wirusów pod kątem obecności niezrekombinowanych cząstek. Ideą tego systemu jest skonstruowanie genomu wirusa, który w wyniku trawienia odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi, przekształcony zostaje w liniową cząsteczkę, pozbawioną fragmentu istotnego dla replikacji wirusa (gen ORF 1629 wraz ze znajdującym się w bezpośrednim sąsiedztwie genem poliedryny). Odtworzenie cząsteczki zdolnej do replikacji jest możliwe jedynie w wyniku rekombinacji homologicznej liniowej cząsteczki z plazmidem do transferu, zawierającym usunięty gen ORF 1629. Plazmid ten zawiera także obcy gen (którego ekspresję planuje się uzyskać) pod kontrolą promotorową poliedryny i w ten sposób zostaje wprowadzony do genomu zrekombinowanego

wirusa [155, 156, 159]. Przykładem zastosowania omówionego wyżej systemu bakulowirusowego jest zestaw BaculoGold (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), który może być stosowany w kombinacji z licznymi kompatybilnymi wektorami do transferu, w tym pVL1392 [160]. Schemat przebiegu eksperymentu mającego na celu produkcję rekombinowanych białek z wykorzystaniem tego systemu przedstawia **Rysunek 1.11**.



Rysunek 1.11 Schemat procedury otrzymywania białek rekombinowanych z użyciem systemu bakulowirusowego - BaculoGold (Amp^R - gen oporności na ampicylinę, MCS - miejsce klonowania), wg [161].

Materiał genetyczny wirusa, zastosowany w systemie BaculoGold, zawiera dodatkowo wprowadzony gen białka zielonej fluorescencji (GFP, ang.: *green fluorescent protein*), który jeszcze bardziej upraszcza przeprowadzenie eksperymentów. Umożliwia on identyfikację komórek owadziach transfekowanych rekombinowanym materiałem za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego lub cytometrii przepływowej [160].

Wykorzystywane w bakulowirusowych systemach ekspresyjnych komórki owadzie to najczęściej linie Sf9 lub Sf21 [162]. Otrzymane one zostały z jajników larwy ćmy *Spodoptera frugiperda*, będącej pasożytem kukurydzy i innych roślin trawiastych, przy czym linia Sf9 jest klonem wyprowadzonym z linii Sf21. Linie te cechują się zdolnością do wzrostu w zawieszynie, a ponadto możliwe jest zaadoptowanie hodowli do wzrostu w pożywce bez surowicy. Cechy te ułatwiają hodowlę na większą skalę i produkcję dużej ilości materiału białkowego.

Zarówno komórki owadzie, jak i cały system ekspresji bakulowirusowej, zostały z powodzeniem zaadoptowane do produkcji rekombinowanych receptorów oddziałujących z białkami G. Należy jednak pamiętać o tym, że jego przydatność do uzyskania ekspresji danego białka, jak w każdym systemie ekspresyjnym, jest podyktowana specyfiką konkretnego receptora. Jako przykład może posłużyć eksperyment przeprowadzony z wykorzystaniem modelu komórek owadziach do ekspresji pięciu podtypów receptorów muskarynowych. Mimo że doświadczenia wykonane były dokładnie w tych samych warunkach, uzyskano różne poziomy ekspresji dla poszczególnych podtypów receptorów (blisko 30-krotna różnica pomiędzy receptorami, poziom ekspresji w zakresie 0,6 - 16 pmol/mg) [163].

W większości przypadków błonowy poziom ekspresji GPCR uzyskiwany z użyciem systemu bakulowirusowego jest zadowalający, niemniej jednak opisywano przypadki, w których istotna część z puli produkowanych białek ulegała zatrzymaniu w kompartmentach wewnątrzkomórkowych, takich jak aparat Golgiego czy retikulum endoplazmatyczne [164]. Problemy z lokalizacją błonową receptorów mogą być związane z obecnością znaczników peptydowych (ang.: *peptide tag*), połączonych z białkiem rekombinowanym. Na przykład znacznik histydynowy (*6-His-tag*) może wpływać na stopień lokalizacji błonowej receptora ze względu na obecność uprotonowanych reszt histydynowych. Jednym ze sposobów rozwiązywania problemów z lokalizacją błonową receptorów, jest wprowadzenie do cząsteczki białka odpowiedniej sekwencji sygnałowej. Przykładem takiej sekwencji jest fragment genu hemaglutyniny wirusa grypy, który może mieć pozytywny wpływ na lokalizację błonową receptorów GPCR otrzymywanych w komórkach owadziach [132, 165].

Do najważniejszych zalet bakulowirusowego systemu ekspresyjnego należy m.in. duży rozmiar materiału genetycznego bakulowirusów, który sprawia, że mogą one z łatwością pomieścić większe fragmenty obcego DNA. Ponadto, nie bez znaczenia pozostaje też fakt, że ekspresja genów z użyciem omawianego systemu odbywa się w późnej fazie cyklu wirusowego, co sprawia, że nawet białka potencjalnie toksyczne dla komórek owadzych mogą być tym sposobem produkowane z dużą wydajnością [132]. Kolejną zaletą modelu jest wąskie spektrum gospodarza dla bakulowirusów, warunkujące odpowiedni poziom bezpieczeństwa. Bakulowirusy mogą wprowadzić infekować komórki ssacze, w tym hepatocyty, ale nie stwierdzono zdolności wirusów do replikacji w tych komórkach [157]. Pożądaną cechą systemu bakulowirusowego jest możliwość badania wybranego podtypu receptora rekombinowanego w izolowanym modelu, pozbawionym ekspresji receptorów homologicznych. Zaletą jest także możliwość obserwacji aktywności konstytutywnej receptorów, ujawniającej się w związku z uzyskaniem wyższego poziomu ekspresji niż w modelach bazujących na komórkach ssaczy [157].

W komórkach owadzych linii Sf9 została potwierdzona obecność białek G_s i G_q , natomiast obecność białek $G_{i/o}$ pozostaje sprawą dyskusyjną [157]. Obecność endogennych białek G umożliwia przyjęcie przez receptor konformacji aktywnej, wiążącej agonistę i aktywację wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej. Niestety, w warunkach nadekspresji białka receptorowego, ilość endogennych białek G w komórkach owadzych jest niewystarczająca do uzyskania powyższego efektu. Dodatkowo funkcje endogennych białek G mogą ulegać zakłóceniu w wyniku zahamowania ich biosyntezy w następstwie infekcji bakulowirusem [157]. Możliwym rozwiązaniem opisanego problemu dysproporcji receptorów i białek G są próby koekspresji obu oddziałujących elementów. Uzyskanie w tego typu projektach właściwej proporcji składników nie jest jednak łatwe do osiągnięcia i wymaga kilku powtórzeń eksperymentu. Alternatywę w stosunku do powyższej metody stanowią rozwiązania polegające na: projektowaniu białek fuzyjnych, łączących w jednej ramce odczytu fragmenty receptora i białka G, dodaniu wyizolowanych białek G do preparatów błon uzyskanych z komórek z nadekspresją receptora lub rekonstytucji wszystkich elementów w sztucznej dwuwarstwie lipidowej liposomów [157].

Pewnym ograniczeniem opisywanych technik bakulowirusowych są różnice w składzie błony komórkowej komórek Sf9, w porównaniu do komórek ssaczy. Błona komórkowa komórek owadzych zawiera większe ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych i charakteryzuje się mniejszą zawartością cholesterolu niż komórki ssaków, co jest uwarunkowane koniecznością zapewnienia odpowiedniej płynności błony w optymalnej temperaturze wzrostu tych

komórek, tj. 27-28°C. Dodatkowo skład błony zmienia się w wyniku zainfekowania bakulowirusami, głównie w zakresie zwiększenia zawartości fosfatydylocholiny. Jest to o tyle ważne, że skład lipidowy błony komórkowej, a szczególnie zawartość cholesterolu, wywiera istotny wpływ na parametry farmakologiczne receptorów zlokalizowanych w tej błonie [157, 166].

W komórkach owadzie potwierdzono występowanie większości, charakterystycznych także dla organizmów wyższych, modyfikacji potranslacyjnych białek, warunkujących w wielu przypadkach ich właściwe funkcjonowanie [132, 140, 167]. Komórki owadzie są zdolne do przeprowadzania acylacji aminokwasów resztami kwasów tłuszczowych, fosforylacji białek oraz *O*- i *N*-glikozylacji, przy czym ta ostatnia modyfikacja przebiega odmiennie niż w komórkach ssaczych. Zamiast złożonych, rozbudowanych oligosacharydów, zakończonych resztami galaktozy lub kwasu sialowego u kręgowców, komórki Sf9 wytwarzają proste struktury, w których grupy trójmannozowe tworzą szkielet glikanu, a reszty boczne stanowi fukoza [167, 168]. Różnice w profilu modyfikacji potranslacyjnych odgrywają bardzo ważną rolę, przede wszystkim w badaniach strukturalnych GPCR, ale mogą też w niektórych przypadkach wpływać na profil farmakologiczny receptora.

1.2.3.4. Komórki ssacze

W badaniach nad receptorami oddziałującymi z białkami G, równie często jak komórki owadzie, wykorzystuje się ssacze linie komórkowe. System ten zapewnia odpowiednio zaawansowaną potranslacyjną modyfikację białek oraz możliwość uzyskania błonowej lokalizacji receptorów rekombinowanych. Charakteryzuje się ponadto obecnością całego garnituru kompatybilnych przekaźników wewnątrzkomórkowych, umożliwiających przeprowadzenie podstawowych testów funkcjonalnych dla receptorów o siedmiu helisach transbłonowych. W modelu tym zachowany jest również odpowiedni skład lipidowy błony komórkowej, warunkujący w wielu przypadkach właściwe funkcjonowanie receptorów rekombinowanych. Największymi ograniczeniami systemu ekspresyjnego wykorzystującego komórki ssacze są wymagające warunki hodowli oraz trudności związane z wprowadzeniem obcych genów do wnętrza komórki. Reasumując, zastosowanie omawianego modelu do uzyskania ekspresji receptorów GPCR jest najbardziej uzasadnione w przypadku planowania przeprowadzenia testów funkcjonalnych i testów wiązania w warunkach najbardziej zbliżonych do natywnych, natomiast, ze względu na koszt i problem niskiej wydajności produkcji rekombinowanego białka, nie jest zalecany w badaniach strukturalnych receptorów siedmiotransbłonowych [132, 140].

Ekspresja białek rekombinowanych w liniach ssaczych może mieć charakter przejściowy lub wiązać się z otrzymaniem tzw. stabilnych linii komórkowych [169]. W pierwszym przypadku uzyskuje się wprawdzie wyższy poziom ekspresji w pojedynczej komórce (większa liczba kopii genu), ale ograniczona jest ona do kilku dni i ulega wygaszeniu w wyniku śmierci komórki lub utraty wektora ekspresyjnego. W przypadku linii charakteryzujących się stabilną ekspresją genów receptora, obserwuje się z kolei niższy poziom ekspresji w pojedynczej komórce, ale z drugiej strony można uniknąć wielokrotnego powtarzania pracochłonnego eksperymentu wprowadzania obcych genów do wnętrza komórek, a ponadto zyskuje się powtarzalność warunków prowadzonych badań. W przypadku ekspresji przejściowej białek receptorowych, transkrypcja odbywa się w oparciu o niereplikujący materiał zlokalizowany w cytozolu (plazmid lub genom wirusa), natomiast przy ekspresji stabilnej dochodzi najczęściej do integracji cDNA receptorowego z genomem komórek gospodarza (wyjątek stanowią plazmidy episomalne, opisane dalej) [169], przy czym częstość występowania takiego zjawiska jest niewielka (zakłada się, że zaledwie w jednej na 10^4 komórek wprowadzony gen ulega integracji z materiałem genetycznym gospodarza) [170]. Jednocześnie, ilość kopii genu oraz miejsce integracji z chromosomem w sposób istotny determinują poziom ekspresji transgenu, a jednym z obniżających go czynników może być włączenie genu w nieaktywny transkrypcyjnie obszar genomu lub niestabilność genetyczna wynikająca z rekombinacji [171]. W związku z niską częstością zjawiska integracji transgenu z materiałem komórek gospodarza, aby wyprowadzić linię komórkową ze stabilną nadekspresją obcego genu, konieczne jest włączenie odpowiedniej presji selekcyjnej. W tym celu najczęściej stosuje się odpowiedni antybiotyk, dodawany do pożywki hodowlanej dla komórek po transfekcji/transdukcji. Oporność na antybiotyk selekcyjny warunkowana jest ekspresją genu oporności, najczęściej wprowadzanego do komórek za pomocą tego samego wektora, co gen białka rekombinowanego. Przykładem antybiotyku selekcyjnego dla komórek eukariotycznych jest genetycyna (G418). Jest to antybiotyk z grupy aminoglikozydów o strukturze zbliżonej do neomycyny, gentamycyny i kanamycyny. Aktywność cytotoksyczną w komórkach eukariotycznych realizuje hamując syntezę białka, poprzez interakcję z rybosomami. Komórki ssacze wykazują różną wrażliwość na działanie G418, dlatego eksperyment ekspresji białka rekombinowanego należy poprzedzić wyznaczeniem krzywej przeżywalności dla komórek typu dzikiego. Oporność na działanie genetycyny ujawnia się w następstwie ekspresji genu fosfotransferazy aminoglikozydów o pochodzeniu bakteryjnym, której aktywność odpowiada za dezaktywację antybiotyku znajdującego się z pożywcę selekcyjnej [171].

Wprowadzenie obcego DNA do komórek ssaczych można przeprowadzić na drodze transfekcji lub transdukcji, przy czym pojęciem transdukcji określane są techniki wirusowe, natomiast pojęciem transfekcji określa się wszystkie pozostałe metody służące wprowadzeniu genów do komórek eukariotycznych.

Transfekcja

Wektorami genetycznymi wykorzystywanymi do transfekcji komórek ssaczych są najczęściej cząsteczki plazmidowego DNA. Eukariotyczny plazmid ekspresyjny powinien zawierać:

- sekwencję promotora, wiążącą endogenne czynniki transkrypcyjne i kontrolującą transkrypcję genu - plazmidy eukariotyczne najczęściej zawierają konstytutywne promotory pochodzące z genomów wirusowych, np.: promotor cytomegalowirusa (CMV, ang.: *Cytomegalovirus*) lub małpiego wirusa nr 40 (SV40, ang.: *Simian virus 40*), przy czym zastosowanie promotora CMV daje zwykle lepsze rezultaty [172],
- miejsce poliadenylacji, warunkujące prawidłową terminację transkrypcji i stabilność powstającego mRNA,
- tzw. kasetę prokariotyczną, zawierającą prokariotyczne miejsce inicjacji replikacji i gen oporności na antybiotyk, umożliwiające amplifikację plazmidu w komórkach bakteryjnych,
- miejsce klonowania (MCS, ang.: *multi-cloning site*), zawierające sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne i umożliwiające wprowadzenie obcego genu,
- eukariotyczny gen oporności na antybiotyk (genetycyna, hygromycyna B), pozwalający na wytworzenie presji selekcyjnej przy otrzymywaniu stabilnej ekspresji rekombinowanego białka.

Opcjonalnie plazmid eukariotyczny może zawierać miejsce inicjacji replikacji wirusa Epsteina-Barr (EBV, ang.: *Epstein-Barr virus*) lub SV40. Plazmidy tego typu mogą ulegać episomalnej replikacji w komórkach ssaczych charakteryzujących się ekspresją, odpowiednio: jądrowego antygeny 1 wirusa Epsteina-Barr (ang.: *Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*) lub dużego antygeny T wirusa małpiego nr 40 (ang.: *SV40 large T antigen*). Replikacja episomalna plazmidu zwiększa wydajność ekspresji białek rekombinowanych, poprzez podniesienie liczby kopii genu w komórce [173].

Transfekcję komórek ssaczych można przeprowadzić korzystając z metod chemicznych lub fizycznych. Do czynników chemicznych wspomagających transfekcję można zaliczyć:

- Związki nieorganiczne, np. w technice koprecypitacji DNA z fosforanem wapnia, w której obce DNA zostaje zamknięte w strukturze wytrącających się kryształów fosforanu wapnia i w tej postaci podlega endocytozie do wnętrza komórek [174]. Prawidłowo przeprowadzony eksperyment pozwala na uzyskanie nawet 80-procentowej wydajności transfekcji w

przypadku komórek HEK293 [173]. Niestety opisywana technika ma swoje ograniczenia, wśród których wymienić należy: czasochłonność, konieczność ścisłej kontroli czasu formowania precypitatu (aby zapobiec powstawaniu dużych kryształów $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) oraz nieskuteczność w odniesieniu do niektórych linii komórkowych (metoda ta ma m.in. ograniczoną skuteczność przy transfekcji linii CHO, dla której konieczne jest zastosowanie dodatkowych zabiegów jak np. wywołanie wstrząsu osmotycznego komórek [175]). Parametrami kluczowymi dla wydajności omawianej metody są: odpowiednie pH stosowanego buforu fosforanowego, dodatek czynników ułatwiających pinocytozę kryształów (glicerol, DMSO, maślan sodu), a także jakość precypitatu, który powinien być możliwie drobny i jednorodny [169].

- Kationowe polimery, w tym pierwotnie stosowany dietyloaminoetylo-dekstran (DEAE-dekstran), którego podstawową wadą jest cytotoksyczność. Obecnie do transfekcji z użyciem kationowych polimerów coraz powszechniej stosowane są polietylenoiminy (PEI). Wykorzystuje się zarówno formy liniowe jak i usieciowane polietylenoiminy o średniej masie molowej od 25 kDa do nawet 800 kDa. PEI zawiera w każdym monomerze jeden atom azotu, który po uprotonowaniu, umożliwia utworzenie wiązań jonowych ze zdysocjowanymi resztami fosforanowymi cząsteczki DNA. Tworzące się kompleksy DNA:PEI mają średnicę pomiędzy 50 a 1000 nm, w zależności od środowiska, w którym przeprowadza się kompleksowanie oraz od tego, czy stosuje się usieciowaną, czy liniową polietylenoiminę. Powstałe polipleksy wnikają do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Następnie są uwalniane z endosomów i lizosomów do cytoplazmy, prawdopodobnie w związku z wysoką zawartością reszt aminowych w PEI, które uczestniczą w wytworzeniu wysokiej siły jonowej, odpowiedzialnej za pęcznienie i rozpad pęcherzyków endocytarnych [169, 176-178].

- Lipidy kationowe, wchodzące w skład znacznej części komercyjnych odczynników do transfekcji, w tym: FuGENE HD, Lipofectamine2000 i TurboFect. Większość tych odczynników zawiera mieszaninę kationowych (mono- lub poliwalentnych) i obojętnych lipidów (np. DOPE - dioleilo-fosfatydyloetanolamina, cholesterol), zawieszonych w środowisku wodnym, w którym wytwarzają liposomy lub w środowisku etanolowym, gdzie tworzą micelle. Transfekcja z użyciem kationów lipidowych, nazywana lipofekcją, jest techniką charakteryzującą się największą wydajnością wśród wszystkich opisanych wcześniej technik transfekcji chemicznej. Kationy lipidowe wytwarzają kompleksy z ujemnie naładowanymi cząsteczkami DNA w podobny sposób, jak w przypadku kationowych polimerów, ale dodatkową zaletę tego układu stanowi hydrofobowy charakter utworzonych polipleksów, który ułatwia przenikanie przez błony biologiczne [169, 179].

Do czynników krytycznych dla powodzenia eksperymentu lipofekcji zalicza się:

- stosowanie zdrowych, szybko dzielących się komórek,
- wspólną inkubację kationów lipidowych i DNA w pożywce pozbawionej surowicy, ponieważ zawiera ona sulfonowane proteoglikany oraz inne białka, które współzawodniczą z DNA w procesie tworzenia kompleksów z kationami lipidowymi,
- korzystanie w trakcie eksperymentu z pożywki bez dodatku antybiotyków,
- zapobieganie potencjalnej cytotoksyczności polipleksów lipofekcyjnych poprzez obniżenie ilości DNA i/lub kationów lipidowych w próbkach transfekcyjnych [169, 179].

Transfekcja komórek z wykorzystaniem czynników fizycznych obejmuje: mikroiniekcję, biolistykę oraz elektroporację, przy czym jedynie ostatnia metoda jest stosowana do modyfikacji genetycznych komórek eukariotycznych w większej skali w hodowli *in vitro*.

Elektroporacja polega na zadziałaniu impulsem elektrycznym o wysokim napięciu na zawiesinę komórek o dużej gęstości (od 10^6 do 10^7 komórek/ml), umieszczonych w specjalnych kuwetach w obecności obcego DNA. W wyniku chwilowego wzrostu przepuszczalności błon komórkowych materiał genetyczny wnika do wnętrza transfekowanych komórek. Stosuje się impuls elektryczny o napięciu w zakresie 100-1000V i pojemności elektrycznej 25-1000 μF , modyfikując amplitudę i czas trwania impulsu. Elektroporację stosuje się przede wszystkim do komórek zawiesinowych, które trudniej transfekować metodami chemicznymi, ale komórki adherentne, po przeprowadzeniu w zawiesinę, również mogą zostać poddane transfekcji z wykorzystaniem elektroporatora. Technika ta pozwala na uzyskanie zarówno przejściowej, jak i stabilnej ekspresji transgenu. Eksperyment wykonuje się zwykle w temperaturze pokojowej, a komórki następnie umieszcza się na lodzie, w celu wydłużenia czasu częściowej dezintegracji błony umożliwiającej wnikanie DNA do wnętrza komórek. Podstawowymi wadami elektroporacji są: konieczność używania większej ilości komórek i materiału genetycznego niż w przypadku chemicznych metod transfekcji oraz duża zmienność warunków eksperymentu pomiędzy różnymi liniami komórkowymi [121, 172].

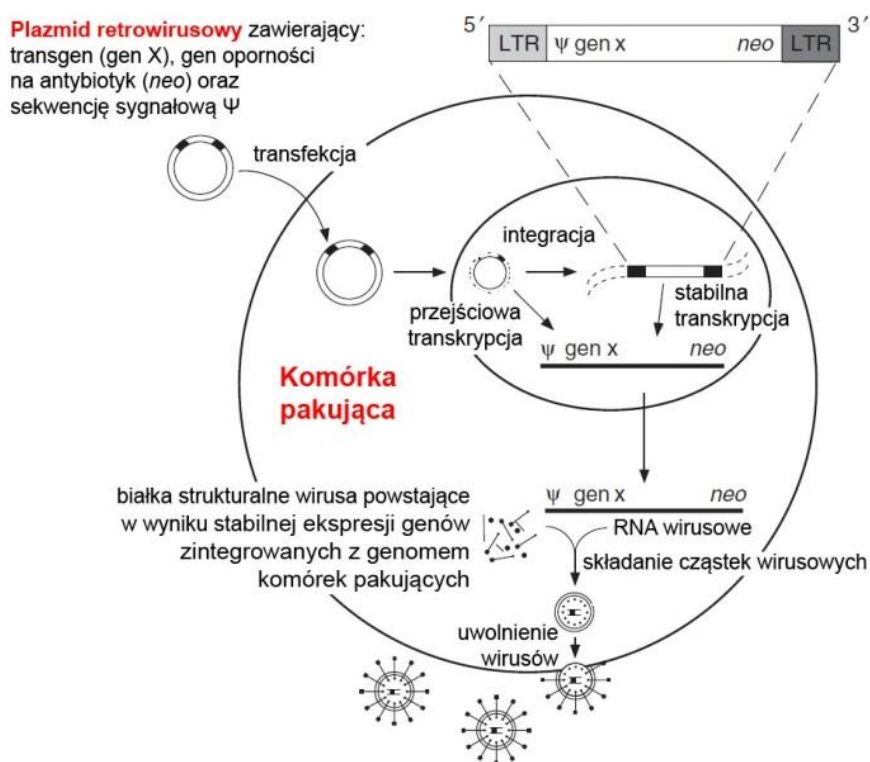
Istotnym aspektem każdego eksperymentu transfekcji jest czystość wykorzystywanego DNA, która wpływa znacząco na wydajność procesu. Materiał genetyczny do transfekcji powinien być pozbawiony zanieczyszczeń, takich jak: związki organiczne (fenol, chloroform), białka, bakteryjne RNA i endotoksyny oraz wysokie stężenie soli nieorganicznych [169, 172, 173]. Istotna jest też kondycja hodowanych komórek, które powinny być transfekowane w fazie logarytmicznego wzrostu oraz powinny być wolne od wszelkich zanieczyszczeń, w tym od zakażeń mykoplazmą [121].

Transdukcja

Transdukcja komórek eukariotycznych, a więc wprowadzenie transgenu do komórek z użyciem wektorów wirusowych, może prowadzić do uzyskania przejściowej ekspresji genu, jak to ma miejsce w przypadku zastosowania rekombinowanych alfawirusów (np. wirus gorączki lasu Semliki, ang.: *Semliki forest virus*) lub wirusów krowianki (ang.: *Vaccinia virus*), w związku z następującą po kilku dniach od infekcji śmiercią komórek. Z kolei, w przypadku systemów wykorzystujących wektory retrowirusowe, transdukcja komórek ssaczych prowadzi do stałego wbudowania obcego genu do chromosomu komórek gospodarza [132, 169, 173]. Stosowanie technik retrowirusowych jest ograniczone do klonowania fragmentów DNA o długości do 11 tys. par zasad, ponieważ większe fragmenty nie mogą zostać zamknięte w kapsydzie wirusa. Ponadto system ten umożliwia modyfikacje jedynie komórek aktywnych mitotycznie.

Genom retrowirusów stanowi jednociowe RNA, które zostaje zamknięte wraz z istotnymi dla replikacji enzymami w białkowym kapsydzie, otoczonym osłonką lipidową zawierającą specyficzne glikoproteiny wirusowe. Niezmodyfikowane genetycznie wirusy typu dzikiego wnikają do komórek w oparciu o mechanizm receptorowy (endocytoza receptorowa warunkowana rozpoznaniem glikoprotein osłonki lipidowej wirusa). Bezpośrednio po tym etapie dochodzi do utworzenia kopii DNA genomu wirusa, która powstaje w wyniku aktywności zarówno komórek gospodarza jak i czynników wirusowych (w tym - odwrotnej transkryptazy syntezowanej w oparciu o gen - *pol*). Materiał genetyczny wirusa ulega następnie włączeniu do chromosomu komórek gospodarza (m.in. przy użyciu kolejnego produktu genu *pol* - integrazy). Wirus w tej postaci określany jest jako prowirus i ulega replikacji wraz z genomem komórek gospodarza. W wirusach typu dzikiego, zdolnych do replikacji, materiał genetyczny zawiera wszystkie sekwencje kodujące poliproteiny wirusowe niezbędne do wytworzenia wirionów, a więc geny: *gag*, *pol* i *env*. Odpowiadają one za syntezę, odpowiednio: *gag* (ang.: group specific antigen) - białek kapsydu; *pol* - odwrotnej transkryptazy, proteazy i integrazy; *env* (ang.: envelope proteins) - glikoprotein osłonki lipidowej wirusa, rozpoznawanych przez receptory na powierzchni infekowanych komórek. Genomowe RNA wirusa zawiera także sekwencję ψ , która jest rozpoznawana przez białka uczestniczące w składaniu cząstek wirusowych i dlatego materiał genetyczny wirusa zostaje zamknięty w powstających wirionach. Infekcja wirusem typu dzikiego prowadzi do odtworzenia cząsteczek identycznych z materiałem wyjściowym, które następnie mogą rozprzestrzeniać się na kolejne komórki [180, 181].

W celu zapewnienia bezpieczeństwa, przy wykorzystaniu retrowirusów jako wektorów genetycznych, opracowano model transdukcji retrowirusowej, w którym stosuje się wirusy niezdolne do samodzielnej replikacji. Genom tych wirusów został pozbawiony genów istotnych dla tworzenia cząstek wirusowych. W celu utworzenia zdolnych do infekcji wirionów, niezbędne są specjalne linie komórek pakujących (ang.: *packaging cell lines*), do których wprowadzone zostały, na drodze transfekcji, geny kodujące kluczowe poliproteiny wirusowe: *gag*, *pol* i *env* (**Rysunek 1.12**). Drugim istotnym elementem omawianego systemu jest plazmid retrowirusowi, zawierający: sekwencję sygnałową Ψ ; odpowiedni promotor eukariotyczny; miejsce klonowania, w obrębie którego wprowadzany jest transgen oraz gen selekcyjny. Elementy te zawarte pomiędzy wirusowymi sekwencjami LTR (ang.: *long terminal repeats*), w których zlokalizowane są: promotor wirusowy oraz sekwencje - wzmacniająca, poliadenylacji i terminacji transkrypcji [181, 182].



Rysunek 1.12 Produkcja rekombinowanych cząstek retrowirusowych w komórce pakującej, w następstwie transfekcji plazmidem retrowirusowym (opis w tekście), wg [181].

Plazmid retrowirusowy wprowadzony zostaje do komórek pakujących na drodze transfekcji. Dochodzi wtedy do transkrypcji plazmidowego DNA na RNA w oparciu o sekwencję promotorową z fragmentu 5' LTR (transkrypcja kończy się na fragmencie 3' LTR). Równolegle dochodzi do ekspresji, stabilnie zintegrowanych z genomem komórek pakujących, genów *pol*, *gag* i *env*. Dzięki temu utworzone RNA wirusowe zostaje zamknięte

w białkowym kapsydzie, a powstające wirusy uwalniane są do pożywki hodowlanej. Należy podkreślić, że genom rekombinowanego wirusa zawiera jedynie sekwencje zawarte pomiędzy fragmentami 5' LTR i 3' LTR w plazmidzie retrowirusowym (w tym transgen i gen oporności na antybiotyki), natomiast sekwencje genów *gag*, *pol* i *env* nie zostają wbudowane w genom powstających wirusów [181].

Cząstki wirusowe, pozyskane z hodowli komórek pakujących, przenosi się następnie do naczynia hodowlanego z docelową linią komórkową. Rekombinowane wirusy infekują te komórki, a materiał genetyczny wirusa w pierwszej kolejności podlega odwrotnej transkrypcji. Następnie ulega on włączeniu do chromosomu zainfekowanych komórek. Na tym etapie (inaczej niż ma to miejsce w przypadku niezmienionych genetycznie wirusów typu dzikiego) kończy się cykl życiowy wirusa, który nie jest zdolny do odtworzenia zjadliwych wirionów i infekcji kolejnych komórek, m.in. ze względu na brak sekwencji kodujących białka kapsydu i otoczki lipidowej. W oparciu o wprowadzony do komórek linii docelowej materiał genetyczny wirusa dochodzi jedynie do ekspresji transgenu oraz genu oporności na antybiotyki [181].

Komórki pakujące otrzymuje się wykonując stabilną transfekcję genami *pol*, *env* i *gag*. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu linie: HEK293, COS lub mysie fibroblasty NIH/3T3 [181, 183]. Przykładem może być linia komórek pakujących - GP+*envAm12* [184]. Powstała ona w wyniku transfekcji linii NIH/3T3 plazmidem zawierającym geny *gag* i *pol*, pochodzącymi z wirusa białaczki mysiej Moloneya (ang.: *Moloney murine leukemia virus*). Następnie serię klonów otrzymanej linii, charakteryzujących się wysokim poziomem ekspresji genów *gag* i *pol* (w tym odwrotnej transkryptazy, która była wykorzystana jako marker), ponownie transfekowano - tym razem plazmidem zawierającym gen *env* amfotropowego wirusa mysiej białaczki 4070A (ang.: *4070A amphotropic murine leukemia virus*). Uzyskano w ten sposób linię wydajnie produkującą białka strukturalne i funkcjonalne retrowirusów. Sekwencje warunkujące utworzenie w pełni aktywnego wirusa zostały w linii GP+*enAm12* rozdzielone przestrzennie. Dlatego ryzyko potrójnej rekombinacji (pomiędzy sekwencjami *gag/pol* i *env* w genomie komórek pakujących oraz plazmidem retrowirusowym), która skutkowałaby utworzeniem wirusów zdolnych do replikacji, jest znikome [184].

Jak wspomniano wcześniej, retrowirusowe geny *env* kodują glikoproteiny otoczki lipidowej, które warunkują zdolność do infekcji różnych typów komórek, w ramach receptorowego mechanizmu endocytozy cząstek wirusowych.

Przyjmując za kryterium produkowane w komórkach pakujących białka *env*, systemy ekspresji retrowirusowej można sklasyfikować jako:

- ekotropowe - umożliwiające infekowanie tylko (lub preferencyjnie) komórek gatunków, z których zostały wyizolowane wirusy poddane manipulacjom genetycznym (najczęściej komórki myszy i szczurów),
- amfotropowe - mogą zakażać wiele gatunków, charakteryzują się szerszym spektrum potencjalnych komórek gospodarza.

Aby dodatkowo zwiększyć spektrum infekowanych komórek (m.in. o komórki chomika) dla wirusów produkowanych w amfotropowych komórkach GP+*env*Am12, należy przeprowadzić pseudotypowanie wirusów. Dokonuje się tego poprzez zastąpienie produktu genu *env* białkiem innego wirusa. Pseudotypowanie można przeprowadzić np. stosując białko G osłonki lipidowej wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV, ang.: *Vesicular Stomatitis Virus*). Białko to, w odróżnieniu od innych produktów genu *env*, w trakcie wnikania wirusa do komórki wchodzi w interakcję z fosfolipidowymi składnikami błony komórkowej, w sposób niezależny od białek receptorowych [185, 186]. Uzyskanie stabilnej ekspresji białka VSV-G w komórkach pakujących jest dla nich toksyczne, dlatego pseudotypowanie wirusów przeprowadza się na drodze przejściowej transfekcji komórek produkujących cząstki wirusowe plazmidem kodującym białko VSV-G. Uzyskane w ten sposób białko nie wymaga żadnych dodatkowych czynników, aby połączyć się z nukleokapsydem wirusa powstającego w oparciu o wektor retrowirusowy [185].

Linie komórkowe wykorzystywane do ekspresji GPCR

Większość opisanych prób uzyskania ekspresji receptorów GPCR w komórkach ssaczych dotyczyła linii wywodzących się z fibroblastów (CHO, HEK293, COS, A9, BHK-21, NIH/3T3, L-929, Rat-1) lub komórek pochodzących z centralnego układu nerwowego (C6, PC-12 czy SH-SY5Y) [172]. Wśród wymienionych linii najczęściej stosowane były linie CHO (ang.: *Chinese hamster ovary*) i HEK293 (ang.: *Human embryonic kidney*), co podyktowane jest łatwością transfekcji, prostymi warunkami hodowli, krótkim czasem podwojenia, bezpieczeństwem oraz względnie niewielką ilością receptorów endogennych [172, 173].

Linia CHO została pozyskana w latach pięćdziesiątych XX wieku z jajnika chomika chińskiego i została szybko zaadoptowana do badań podstawowych z zakresu metabolizmu i cyklu komórkowego, w następstwie czego komórki CHO zostały uznane za ssaczy odpowiedniki bakterii *E. coli*, ze względu na podobną powszechność ich wykorzystania [187]. Dobre poznanie biologii wzrostu i doświadczenia zdobyte w hodowli

linii CHO umożliwiły jej szersze wykorzystanie w biotechnologii oraz sprawiły, że szybko stała się jedną z najpowszechniej używanych do produkcji białek rekombinowanych linii komórkowych. Obecnie szacuje się, że nawet 70% rekombinowanych białek o zastosowaniu terapeutycznym jest produkowane z wykorzystaniem komórek CHO [187]. Z użyciem tej linii otrzymane zostało m.in. pierwsze rekombinowane białko o zastosowaniu terapeutycznym, zaakceptowane przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang.: *Food and Drug Administration*) jako lek do stosowania u ludzi - ludzki tkankowy aktywator plazminogenu [187, 188].

Linia HEK293, druga z linii ssaczych najczęściej wykorzystywanych do produkcji białek rekombinowanych, została wyprowadzona przez Grahama w 1977 roku [189]. Przeprowadzone w kolejnych latach badania pozwoliły na jej dokładną charakterystykę. Między innymi, z wykorzystaniem technik mikomacierzowych, określono poziomy mRNA dla ponad 100 genów kodujących GPCR, a to pozwoliło dokładniej zrozumieć kontekst molekularny, w którym przeprowadzana jest nadekspresja receptorów rekombinowanych [190]. Dodatkowo, w odniesieniu do linii HEK293, wykonano serię eksperymentów inżynierii genetycznej, mających na celu zwiększenie wewnątrzkomórkowej ilości kopii plazmidów zawierających wirusowe miejsca inicjacji replikacji. Wprowadzenie do komórek HEK293 genów kodujących jądrowy antygen 1 wirusa Epsteina-Barr lub duży antygen T wirusa małpiego nr 40 oraz uzyskanie ich stabilnej ekspresji doprowadziło do otrzymania linii, odpowiednio: HEK293EBNA i HEK293T. Wprowadzenie omawianych linii sprawiło, że kompatybilne plazmidy mogą ulegać episomalnej replikacji w tych komórkach. Prowadzi to do zwiększenia: liczby kopii genu w komórce, poziomu ekspresji, a także prawdopodobieństwa trwałej integracji transgeny do genomu gospodarza [173, 191].

1.2.4. Analizowane poziomy sygnalizacji receptorów siedmiotransbłonowych

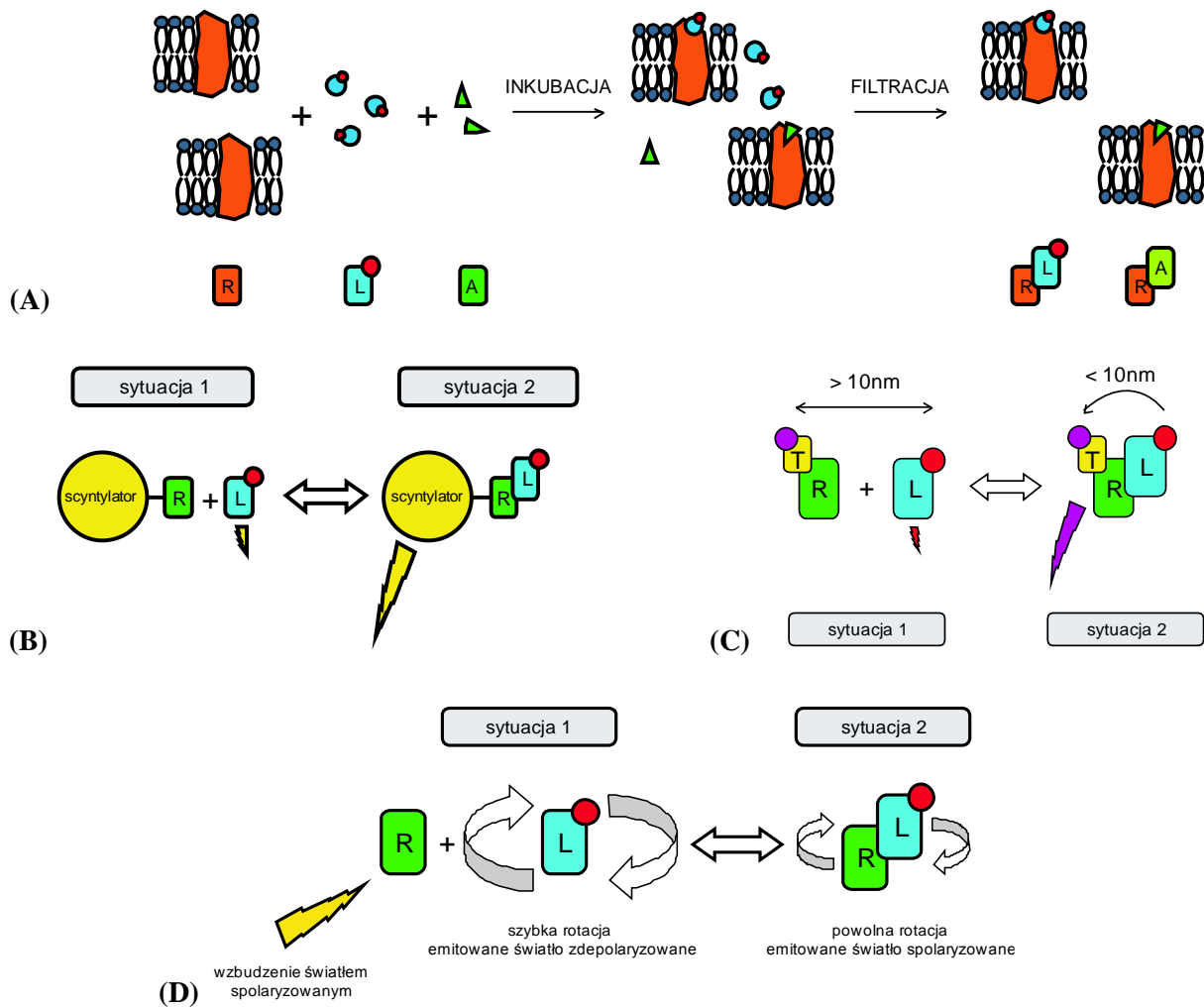
Aktywacja receptorów GPCR jest procesem wielostopniowym. Rozpoczyna się związaniem liganda, które prowadzi do zmian konformacyjnych receptora oraz aktywacji procesów fosforylacji, co skutkuje z kolei oddziaływaniem z I-rzędowymi białkami efektorowymi (białka G i β -arestyny). Opisana interakcja aktywuje kaskady sygnałowe, prowadzące do pobudzenia kolejnych poziomów wewnątrzkomórkowych białek sygnałowych. Strategia poszukiwania ligandów GPCR może opierać się na rejestracji każdego z wymienionych poziomów aktywacji receptorów [192-194]. Efektami związanymi z pierwszym etapem, a więc przyłączeniem liganda do odpowiedniej konformacji receptora zajmują się testy wiązania [195]. Pozostałe poziomy sygnalizacji opisują testy funkcjonalne, które mogą być

prowadzone w odniesieniu do białek efektorowych lub wtórnych przekaźników, zarówno w obrębie jednego szlaku sygnałowego, jak i wielu szlaków równocześnie, a także mogą skupiać się na końcowych efektach komórkowych (np. skurcz, migracja, apoptoza) [196].

Testy wiązania analizują bezpośrednią interakcję liganda z receptorem, pozwalając na oznaczenie siły tego oddziaływania, czyli powinowactwa [195, 197]. Wadą testów wiązania jest ich ograniczenie do badania oddziaływań ortosterycznych lub allosterycznej modyfikacji siły wiązania znakowanego liganda. Oznaczenia te nie pozwalają natomiast na identyfikację allosterycznych ligandów, wpływających na aktywność wewnętrzną ligandów ortosterycznych. Należy jednak zwrócić uwagę, że testy wiązania umożliwiają jako jedyne badanie kinetyki procesu wiązania liganda do receptora, która może odgrywać istotną rolę w obserwowanym efekcie terapeutycznym [198]. Przykładem mogą być różnice w działaniu antagonistów receptora angiotensynowego typu 1 (AT1) - losartanu i kandesartanu. Leki te, mimo podobnej siły wiązania do receptora oraz zbliżonych parametrów farmakokinetycznych, różnią się skutecznością w utrzymywaniu obniżonego ciśnienia. Z dwóch wymienionych antagonistów receptora AT1 - kandesartan umożliwia dłuższą kontrolę nadciśnienia po przyjęciu ostatniej dawki, co zostało wyjaśnione wolniejszą dysocjacją leku od białka receptorowego [199].

Oznaczenia wiązania ligandów mogą być prowadzone z wykorzystaniem znakowanych ligandów lub związków pozbawionych znacznika. Ligand może zostać wyznakowany: odpowiednim radioizotopem (najczęściej ^3H i ^{125}J), cząsteczką fluorofora lub znacznikiem luminescencyjnym [195, 200].

Testy wiązania można podzielić na heterogenne oraz homogenne. Pierwsze z nich, dla przeprowadzenia oznaczenia, wymagają oddzielenia niezwiązanego liganda znakowanego od frakcji liganda związanego z receptorem. Można tego dokonać na drodze filtracji, wirowania, adsorpcji lub dializy (**Rys. 1.13 A**). Testy homogenne można wykonywać na drodze pomiaru odpowiednich parametrów, w próbce zawierającej zarówno związany, jak i wolny ligand znakowany. Zaliczyć tu można zarówno testy wykorzystujące techniki radioreceptorowe - test SPA (**Rys. 1.13 B**) [201], jak i metody nieizotopowe. Do tej ostatniej grupy zaliczamy między innymi metody fluorescencyjne, obejmujące na przykład zastosowanie cytometrii przepływową [202, 203] oraz oznaczenia FRET (**Rys. 1.13 C**) [129] i polaryzacji fluorescencji (**Rys. 1.13 D**) [195].



Rysunek 1.13 Różne formaty testów wiązania znakowanych ligandów receptorów GPCR. **(A)** Klasyczny heterogeny test filtracyjny. W trakcie inkubacji białka receptorowego (R) w obecności znakowanego liganda (L*) oraz liganda nieznakowanego (A) dochodzi do utworzenia kompleksów receptor-ligand znakowany (R-L*) oraz receptor-ligand nieznakowany (R-A), które oddziela się od frakcji niezwiązanych ligandów na drodze filtracji. **(B)** Homogeny test SPA (ang.: *scintillation proximity assay*) - opiera się na detekcji emisji światła, jako efektu przeniesienia energii promieniowania radioaktywnego liganda do mikrosfery (o średnicy 5µm) zawierającej scyntylator, na której zimmobilizowane zostało białko receptorowe (w postaci całych komórek lub fragmentów błon). Emisja światła występuje jedynie w sytuacji, gdy znakowany ligand i białko receptorowe znajdują się w odległości nie większej niż 10µm od siebie (sytuacja 2). W innym przypadku energia promieniowania radioliganda zostaje zaabsorbowana przez bufor zawarty w próbce (sytuacja 1). **(C)** Technika rezonansowego transferu energii fluorescencji. W teście tym zarówno receptor, jak i ligand zostają wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi, dobranymi w ten sposób, że maksimum emisji jednego z nich pokrywa się z maksimum absorpcji drugiego. Do przeniesienia energii wzbudzenia donora na akceptor dochodzi w momencie, gdy oba fluorofory znajdą się dostatecznie blisko siebie (sytuacja 2). W przeciwnym wypadku energia fluorescencji donora ulega rozproszeniu i nie obserwuje się emisji fluorescencji drugiego fluorofora (sytuacja 1). **(D)** Polaryzacja fluorescencji. W oznaczeniu tym dokonuje się oceny stopnia polaryzacji światła emitowanego przez ligand fluorescencyjny jako konsekwencji zmiany jego ruchliwości w wyniku związania z białkiem receptorowym. W sytuacji wyjściowej (sytuacja 1) wzbudzenie liganda o stosunkowo niskiej masie molowej światłem spolaryzowanym skutkuje emisją światła zdepolaryzowanego w związku z szybką rotacją cząsteczek w roztworze. Związanie liganda z białkiem receptorowym o dużej masie prowadzi do zmniejszenia prędkości rotacji związku i dlatego emitowane światło pozostaje w części spolaryzowane (sytuacja 2). Według [195].

W odróżnieniu od testów wiązania, oznaczenia funkcjonalne zajmują się zdarzeniami zachodzącymi wewnątrzkomórkowo i dotyczą losów białek efektorowych (m.in. rekrutacja białek G - test wiązania [³⁵S]GTPγS, rekrutacja β-arestyn, fosforylacja kinaz ERK1/2), a także wtórnych przekaźników (np.: cAMP, Ca²⁺, IP₃). Opracowane metody pozwalają obecnie na monitorowanie aktywacji większości składowych klasycznego, zależnego od białek G oraz alternatywnego, związanego z β-arestynami, szlaku sygnałowego [192-194, 196].

Detekcja zmian wewnątrzkomórkowego poziomu 3',5'-cyklicznego adenozyνο-monofosforanu (cAMP) jest jedną z metod oceny aktywacji zależnej od białek G kaskady sygnałowej, związanej z pobudzeniem receptorów GPCR. Cykliczny AMP powstaje przy udziale cyklazy adenylanowej (CA), enzymu katalizującego reakcję cyklizacji, przekształcającej adenozyνο-5'-trifosforan (ATP) w cAMP z równoczesnym uwolnieniem pirofosforanu. Fizjologicznie, aktywność związanej z błoną komórkową CA, podlega regulacji w wyniku bezpośredniej interakcji z podjednostkami α białek G lub, w przypadku niektórych izoform cyklazy, dodatkowo w wyniku oddziaływania z jonami Ca²⁺ i kalmoduliną [204, 205]. Jeśli chodzi o wpływ heterotrimerycznych białek G na funkcje cyklazy adenylanowej to stwierdzono, że:

- pobudzenie receptorów oddziałujących z białkami G_s prowadzi do uwolnienia podjednostki G_{αs}, która bezpośrednio stymuluje aktywność CA, prowadząc do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP,
- odwrotnie, pobudzenie receptorów oddziałujących z białkami G_i prowadzi do zahamowania aktywności CA i obniżenia poziomu cAMP [11].

Oznaczenia w obrębie szlaku sygnałowego, związanego z modulacją aktywności cyklazy adenylanowej, można prowadzić poprzez bezpośrednie określenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP lub poprzez zastosowanie systemu genów reporterowych, pozostających pod kontrolą zależnych od cAMP czynników transkrypcyjnych, np. czynnika CREB (ang.: *cAMP response element-binding protein*) [192, 205].

Jeśli chodzi o sygnalizację receptorów siedmiotransbłonowych niezależną od białek G, to opracowane zostało również wiele testów, pozwalających na ocenę aktywacji szlaku β-arestynowego. Krótką charakterystykę tych oznaczeń przedstawia **Tabela 1.4**.

Tabela 1.4 Metody wykorzystywane do badania szlaków sygnałowych związanych z β -arestynami. Wg [206].

Rodzaj testu	Zasada oznaczeń	Silne strony	Słabe strony
Badanie wewnątrzkomórkowego przemieszczania wyznakowanych białek	Znakowanie fluorescencyjne β -arestyny lub receptora	Możliwość zastosowania w odniesieniu do receptora natywnego w sytuacji, gdy znacznik fluorescencyjny zostanie przyłączony do β -arestyny	Trudności w dokonaniu oceny ilościowej procesu redystrybucji makromolekuł. Niska czułość.
Ocena bezpośredniego oddziaływania wyznakowanych: receptora i β-arestyny	Zjawiska FRET, BRET i komplementacji fragmentów białkowych	Wysoka czułość	Wymuszona modyfikacja białka receptorowego, mogąca wpływać na jego właściwości.
Oznaczenie zmian konformacyjnych zaangażowanych białek	Wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania FRET lub BRET	Pozwala na równoczesną analizę rekrutacji i aktywacji β -arestyn	Problemy z interpretacją rejestrowanych sygnałów.
Analiza niższych poziomów szlaku sygnałowego	Aktywacja kinaz MAPK Tworzenie włókien stresowych Chemotaksja	Bezpośrednia analiza odpowiedzi funkcjonalnej o potencjalnie istotnym znaczeniu fizjologicznym	Niska przepustowość. Ryzyko obserwacji niespecyficznego pobudzenia endogennych receptorów.

FRET - rezonansowy transfer energii fluorescencji, BRET - rezonansowy transfer energii bioluminescencji, MAPK - kinaza aktywowana mitogenami (ang.: *mitogen-activated protein kinase*)

Problematyka testów funkcjonalnych w farmakologii molekularnej GPCR obejmuje także próby scharakteryzowania końcowych efektów komórkowych pobudzenia receptorów. Do oznaczanych zjawisk można zaliczyć migrację [99, 102, 207], degranulację [208] i apoptozę komórek [209] oraz inne niespecyficzne procesy, które nie zawsze udaje się powiązać z aktywacją konkretnego receptora o siedmiu helisach transbłonowych. Do oznaczeń funkcjonalnych zaliczamy również bezznacznikowe testy komórkowe (ang.: *label-free cell-based assays*). Techniki te pozwalają zarejestrować zmiany morfologiczne i stopień adhezji komórek, które mogą być interpretowane jako efekty końcowe, podlegające modulacji przez szereg różnych receptorów GPCR, kanałów jonowych i szlaków sygnałowych. W niektórych przypadkach, bezznacznikowe testy komórkowe pozwalają na rozróżnienie poszczególnych szlaków sygnałowych związanych z białkami G_s , $G_{i/o}$ i G_q , a ich wysoka czułość pozwala na badanie endogennych receptorów w komórkach natywnych. Z powyższego wynika najważniejsza zaleta omawianych technik - nie wymagają one dodawania odczynników służących detekcji sygnału oraz nie wymuszają modyfikacji genetycznych komórkowego materiału badawczego, stwarzając w ten sposób możliwość prowadzenia oznaczeń w

warunkach najbardziej zbliżonych do naturalnych. Zaletą jest też prowadzenie oznaczeń w czasie rzeczywistym, z zastosowaniem metod nieuszkodzających komórek, natomiast podstawową wadę stanowi niska specyficzność rejestrowanych sygnałów, które mogą być następstwem pobudzenia więcej niż jednego receptora [210, 211].

Obecnie dostępne instrumenty, dedykowane do testów bezznacznikowych, opierają się na pomiarach zmian impedancji komórek hodowanych na powierzchni specjalnych elektrod [212] oraz na rejestracji zmian długości fali świetlnej, odbitej od światłowodowej siatki dyfrakcyjnej, zatopionej w dnie naczynia hodowlanego [213, 214]. Mierzone wielkości zależą:

- dla pomiarów impedancji - od względnej gęstości komórek, stopnia przylegania do powierzchni wzrostowej oraz tworzenia połączeń międzykomórkowych,
- w przypadku oznaczeń z użyciem biosensorów optycznych - od dynamicznego przemieszczania biomasy (ang.: *dynamic mass redistribution*) w obszarze penetracji wiązki światła (strefa detekcji o wysokości do 150 nm), podyktowanego np. zmianą kształtu komórki, adhezją lub reorganizacją szkieletu.

Selektywność funkcjonalna ligandów

W analizie funkcjonalnej receptorów bardzo ważnym zagadnieniem jest konieczność oceny wielu poziomów aktywności potencjalnego leku. Wielopłaszczyznowa analiza różnych szlaków sygnałowych pozwala na pełniejsze scharakteryzowanie badanych połączeń i wielokrotnie umożliwia wyjaśnienie różnic w aktywności związków charakteryzujących się tą samą siłą wiązania do receptora. Uzasadnieniem prowadzenia wielokierunkowych oznaczeń funkcjonalnych jest zjawisko określone jako selektywność funkcjonalna ligandów (ang.: *biased signalling; functional selectivity*) [215, 216], czyli występowanie różnej aktywności wewnętrznej badanego związku, w odniesieniu do poszczególnych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Zjawisko to zostało opisane dla wielu receptorów GPCR, w tym dla będących przedmiotem niniejszej pracy receptorów adenozynowych [217], kannabinoidowych [72, 218, 219] i histaminowych [220, 221].

Selektywność funkcjonalną tłumaczy się istnieniem wielu konformacji białka receptorowego, z których każda cechuje się odmiennym powinowactwem do białek efektorowych. Część ligandów stabilizuje konformacje warunkujące równorzędną aktywację wszystkich szlaków sygnałowych, natomiast istnieje również grupa związków stabilizujących konformacje, które promują selektywnie aktywację wybranego szlaku sygnałowego [215]. Zjawisko to może dotyczyć zarówno selektywności funkcjonalnej w obrębie klasycznego szlaku sygnałowego

GPCR, związanego z białkami G [198, 222] lub może obejmować przekaznictwo sygnału, w które zaangażowane są inne białka efektorowe, np. β -arestyny [206, 223].

Ligandy charakteryzujące się selektywnością funkcjonalną mogą być szczególnie interesujące, jeśli chodzi o potencjalne znaczenie terapeutyczne. Można założyć, że ich zastosowanie będzie prowadziło do aktywacji szlaków pożądaných terapeutycznie, podczas gdy nie będą one oddziaływać lub nawet będą blokować aktywację przekazników odpowiedzialnych za działania niepożądane i efekty toksyczne [223-225]. Przykładowo, w wyniku działania agonistów receptorów o siedmiu helisach transbłonowych, obserwuje się procesy tachyfilaksji i desensytyzacji, związane z aktywnością β -arestyn. Związki o charakterze agonistów w odniesieniu do aktywacji białek G, mające jednocześnie aktywność antagonistyczną w szlaku rekrutacji β -arestyny, mogłyby zapobiegać wspomnianej utracie wrażliwości receptora. Korzystna może być też sytuacja odwrotna, gdzie mamy do czynienia z antagonistą szlaku związanego z białkami G, aktywującym jednocześnie sygnalizację β -arestynową. Klasycznym przykładem jest tu karwedilol, który charakteryzuje się szczególnie dużą skutecznością w stosowaniu przy niewydolności mięśnia sercowego, w porównaniu do innych stosowanych klinicznie β -blokerów [198]. Związek ten, podobnie jak pozostałe β -blokery, jest zdolny do stabilizowania konformacji receptorów β_2 -adrenergicznych o obniżonej zdolności do oddziaływania z białkiem G_s , wykazując cechy odwrotnego agonisty w tym szlaku sygnałowym (część β -blokerów została scharakteryzowana jako słabi agoniści). Dodatkowo jest on jednak zdolny do działania jako agonista w szlaku β -arestynowym. Jest to cecha wyróżniająca go od pozostałych znanych β -blokerów, która może służyć wyjaśnieniu jego szczególnych właściwości terapeutycznych i obserwowanej aktywności kardioprotekcyjnej [198, 226].

Dla zobrazowania złożoności problemu różnych stanów konformacyjnych receptorów GPCR, warunkujących selektywność względem poszczególnych białek efektorowych, warto przytoczyć przykład receptorów muskarynowych. Znane podtypy tych receptorów charakteryzują się występowaniem konserwatywnego ortosterycznego miejsca wiązania ligandów oraz obecnością, zróżnicowanych między podtypami, miejsc wiązania ligandów allosterycznych. O ile większość ligandów ortosterycznych cechuje brak istotnej selektywności funkcjonalnej względem potencjalnych szlaków sygnałowych związanych z białkami G_s lub $G_{i/o}$, o tyle selektywność funkcjonalną można ujawnić oddziałując na receptor muskarynowy poprzez miejsce allosteryczne, np. za pomocą duosterycznych ligandów (oddziałujących jednocześnie z miejscem allosterycznym i ortosterycznym), prowadząc do pobudzenia jedynie szlaku $G_{i/o}$ [213, 214].

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy koncentrują się wokół receptorów metabotropowych, związanych z trzema ważnymi grupami endogennych substancji biologicznie aktywnych - histaminą, adenozyzną i endokannabinoidami, pełniącymi funkcje zarówno neuroprzekaźników jak i hormonów tkankowych. Układy: histaminergiczny, adenozynowy i endokannabinoidowy odpowiadają za regulację szeroko rozumianej homeostazy. Uczestniczą m.in. w kontroli tak ważnych procesów jak: odczuwanie bólu, funkcje motoryczne organizmu, modulacja odpowiedzi układu immunologicznego, wydzielanie żołądkowe, praca serca, odczuwanie głodu, utrzymanie równowagi hormonalnej oraz integracja szlaków pamięciowych. Jedną ze wspólnych cech omawianych układów jest występowanie w obrębie każdego z nich podtypów receptorów o preferencyjnej lokalizacji w ośrodkowym układzie nerwowym, a także receptorów obwodowych, obecnych bardzo często w komórkach układu immunologicznego. Zaangażowanie szlaków związanych z receptorami adenozynowymi, histaminowymi i kannabinoidowymi w regulację odczynu zapalnego, stwarza potencjalne szanse na rozwój nowych terapii stanów patologicznych, wynikających z nadmiernej aktywacji układu immunologicznego. Dodatkowo histamina oraz adenozyzna występują w podwyższonym stężeniu w tkankach nowotworowych, co może wskazywać na potencjalne znaczenie układów adenozynowego i histaminergicznego w procesach rozwoju nowotworów. Rola receptorów kannabinoidowych w tym obszarze także została potwierdzona. Szczególnym wyznacznikiem powiązania funkcji receptorów adenozynowych i kannabinoidowych jest tworzenie heterodimerów tych receptorów, a także form oligomerycznych z receptorami dopaminowymi i jonotropowym receptorem GABA_A w jądrach podstawnych mózgu. Związana z powyższym zjawiskiem integracja różnych szlaków sygnałowych, odgrywa rolę m.in. w regulacji aktywności motorycznej, rozwoju uzależnień, a także może stanowić ważny cel terapeutyczny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Mimo bardzo szerokiego spektrum potencjalnych zastosowań terapeutycznych ligandów omawianych receptorów, wynikających z ważnej roli układów histaminergicznego, adenozynowego i endokannabinoidowego w organizmie, jak do tej pory niewiele środków leczniczych, oddziałujących z wymienionymi celami biologicznymi, zostało wprowadzonych do terapii (wyjątek stanowią ligandy receptorów histaminowych H₁ i H₂). Przyczyną takiego stanu rzeczy jest szerokie rozpowszechnienie receptorów histaminowych, adenozynowych i kannabinoidowych w organizmie oraz ich bardzo rozbudowane role w regulacji homeostazy. Farmakologiczna ingerencja w funkcjonowanie tych układów, poza wpływem na funkcje istotne z terapeutycznego punktu widzenia, oddziałuje również na szereg współistniejących procesów fizjologicznych, co może prowadzić do ujawnienia niekorzystnych efektów

niepożądanych terapii. Z tego powodu istnieje szczególne zapotrzebowanie na opracowanie nowych ligandów, o wysokiej selektywności względem poszczególnych podtypów receptorów oraz o nowych właściwościach funkcjonalnych (selektywność funkcjonalna, aktywność allosteryczna), które pozwolą na uniknięcie wspomnianych działań niepożądanych. Uzyskane połączenia, o zróżnicowanych cechach i strukturach, mogą być również bardzo przydatne jako narzędzia farmakologiczne, które pozwolą na lepsze zrozumienie funkcjonowania receptorów adenozynowych, kannabinoidowych i histaminowych.

W niniejszej pracy, do poszukiwania ligandów receptorów siedmiotransbłonowych, wykorzystano narzędzia farmakologii molekularnej, w dużej części opierając się na modelach komórkowych. W toku przeprowadzonych badań, wykorzystano dostępne modele badawcze lub, w miarę zapotrzebowania, podjęto próby opracowania nowych modeli komórkowych oraz testów do oceny aktywności potencjalnych ligandów receptorów adenozynowych, kannabinoidowych i histaminowego H₄. Modele komórkowe stanowią dobrą alternatywę dla testów *in vivo*, pozwalając na pełniejszą charakterystykę oznaczanych połączeń we wczesnych fazach rozwoju produktu leczniczego. Umożliwiają także ograniczenie użycia zwierząt laboratoryjnych do niezbędnego minimum oraz cechują się większą przepustowością oznaczeń. Połączenie hodowli komórek eukariotycznych *in vitro* z technikami inżynierii genetycznej pozwala na ukierunkowanie badań selektywnie na wybrane receptory i szlaki sygnałowe, a oznaczenia prowadzone są w warunkach eliminujących do minimum możliwość rejestracji artefaktów, wynikających z niespecyficznego pobudzenia receptorów endogennych. Metody te mają oczywiście również swoje ograniczenia, które szerzej opisano we wstępie niniejszej pracy.

W trakcie realizacji opisanych zadań badawczych dokonano oceny przydatności różnych technik ekspresji rekombinowanych białek receptorowych do otrzymania modeli komórkowych z nadekspresją receptorów oraz przeprowadzono ocenę wpływu znacznika białkowego na charakterystykę farmakologiczną receptorów siedmiotransbłonowych. Szczególną uwagę poświęcono także innemu istotnemu zagadnieniu farmakologii molekularnej, jakim są różnice międzygatunkowe w aktywności ligandów receptorów siedmiotransbłonowych. Dokładne zbadanie tych różnic jest niezbędne dla zrozumienia mechanizmów działania ligandów oraz może pozwolić na identyfikację (np. na drodze wspomnianych bioinformatycznie analiz) elementów strukturalnych białek receptorowych, odpowiedzialnych za odmienne efekty aktywacji receptorów u poszczególnych gatunków.

Przedstawione cele rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane w oparciu o szczegółowy plan pracy, na który składało się:

- Stworzenie konstruktów genetycznych i uzyskanie ekspresji znakowanych fluorescencyjnie receptorów adenozynowych A_{2A} w komórkach ssaczych.
- Opracowanie wydajnej metody transfekcji przejściowej komórek ssaczych cDNA receptorowym, pozwalającej na uzyskanie odpowiedniej ilości materiału do przeprowadzenia badań radioreceptorowych.
- Charakterystyka funkcjonalna rekombinowanych receptorów adenozynowych A_{2A}, znakowanych białkiem ECFP.
- Uzyskanie modeli komórkowych z nadekspresją receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz receptora histaminowego H₄.
- Optymalizacja warunków oznaczenia aktywności wewnętrznej ligandów receptorów adenozynowych i kannabinoidowych.
- Opracowanie testu funkcjonalnego do badania aktywności ligandów receptora GPR18 oraz identyfikacja potencjalnych agonistów receptora w grupie znanych ligandów receptorów kannabinoidowych.
- Badania zależności struktura-aktywność względem podtypów szczurzych i ludzkich receptorów adenozynowych dla trójcyklicznych pochodnych anelowanych purynodionów.
- Oznaczenia aktywności pochodnych imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu w kierunku receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz receptora sierocego GPR18.
- Walidacja testu kompetycyjnego wiązania [³H]histaminy w celu oznaczenia aktywności potencjalnych ligandów receptora histaminowego H₄.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1. Ekspresja w komórkach eukariotycznych ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A}, znakowanego fluorescencyjnym białkiem ECFP

Białka fluorescencyjne, będące jednym z najważniejszych narzędzi szeroko stosowanych technik fluorescencyjnych, mogą być wykorzystywane jako znaczniki dla innych niefluorescencyjnych białek, poprzez utworzenie technikami inżynierii genetycznej - białek fuzyjnych. Konstrukty te są cząsteczkami składającymi się z białka będącego przedmiotem zainteresowań badawczych, wraz z dołączonym do niego określonym białkiem fluorescencyjnym. Zastosowanie takiego modelu badawczego pozwala przede wszystkim na ocenę lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek, ale również na zaimplementowanie zaawansowanych technik biofizycznych (jak np. rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji i pomiar zaniku fluorescencji w czasie) do oceny zmian konformacyjnych i procesów oligomeryzacji białek. Punktem wyjściowym do wykorzystania białek fluorescencyjnych w naukach biologicznych było odkrycie i wyizolowanie białka zielonej fluorescencji (GFP, ang.: *green fluorescent protein*) z meduzy *Aequoria victoria* [227], które zostało docenione poprzez przyznanie jego odkrywcy - Osamu Shimomurze - Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2008 roku. Wprowadzenie szeregu mutacji punktowych w wyjściowym białku GFP pozwoliło na poprawę jego właściwości (m.in. większa wydajność fluorescencji oraz fotostabilność) i doprowadziło do otrzymania szeregu nowych odmian białek fluorescencyjnych, świecących na niebiesko, żółto i czerwono [228].

W nawiązaniu do prowadzonych w czołowych ośrodkach naukowych badań nad znakowanymi fluorescencyjnie receptorami GPCR [229-231], przeprowadzona została seria eksperymentów inżynierii genetycznej, które doprowadziły do uzyskania konstruktów genetycznych, zawierających sekwencję białka fuzyjnego receptora adenozynowego A_{2A} i białka wzmocnionej cyjanowej fluorescencji. Celem kolejnych badań było uzyskanie ekspresji omawianego białka fuzyjnego w komórkach eukariotycznych oraz ocena jego właściwości w testach farmakologicznych, co miało służyć ocenie wpływu znakowania fluorescencyjnego receptora na jego funkcjonalność.

3.1.1. Klonowanie genu ludzkiego receptora A_{2A} adenozynowego

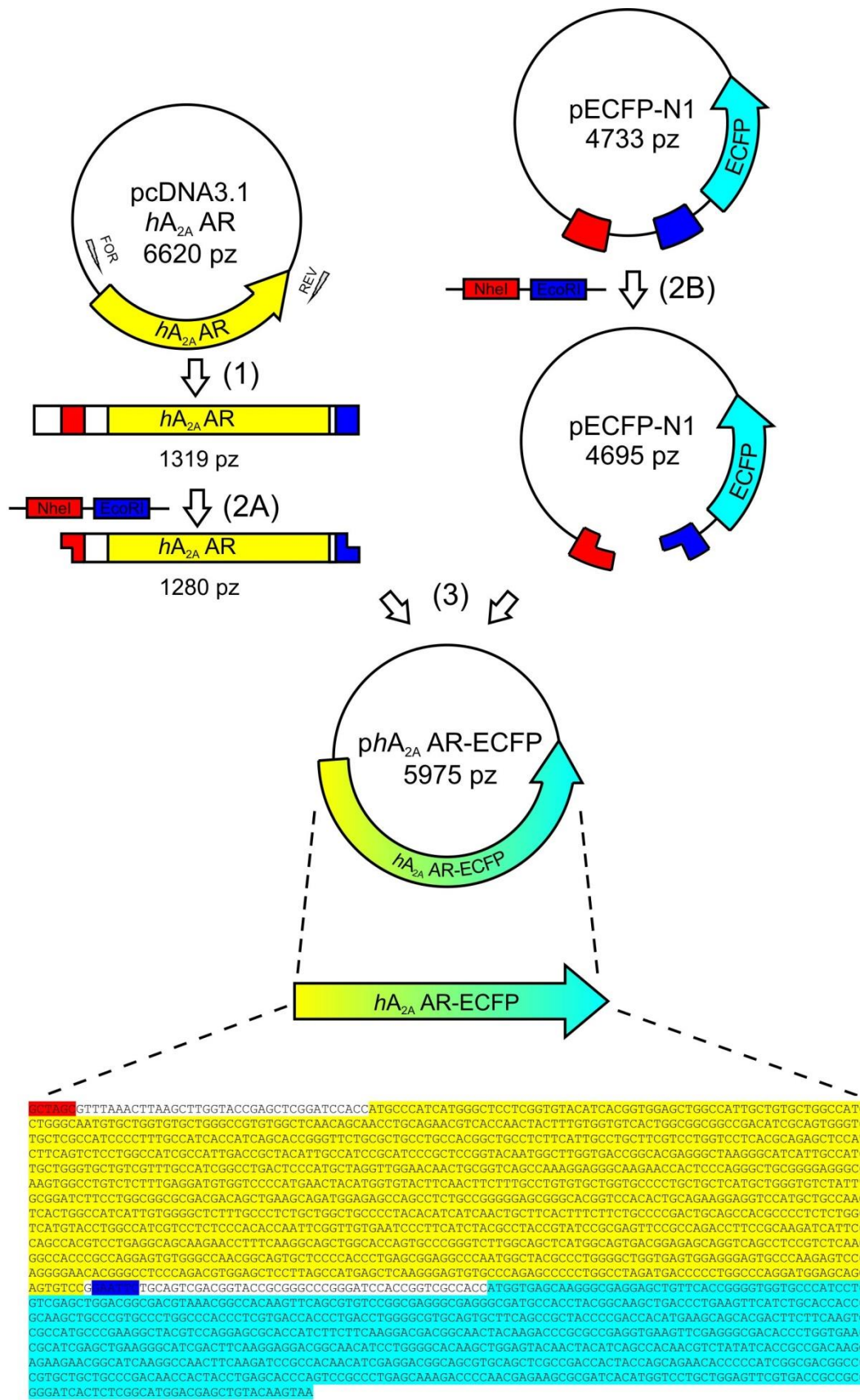
Plazmidy: pcDNA3.1-*hA_{2A}* AR (6620 pz), zawierający sekwencję cDNA ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} oraz pECFP-N1 (4733 pz), zawierający sekwencję białka wzmocnionej cyjanowej fluorescencji (ECFP, ang.: *enhanced cyan fluorescent protein*) zostały wprowadzone do komórek bakterii *E.coli* na drodze transformacji. Po namnożeniu materiału

biologicznego, plazmidy wyizolowano z komórek bakteryjnych w ilości umożliwiającej dalsze etapy klonowania molekularnego. Ogólną koncepcję przeprowadzonych eksperymentów inżynierii genetycznej przedstawia **Rysunek 3.1**.

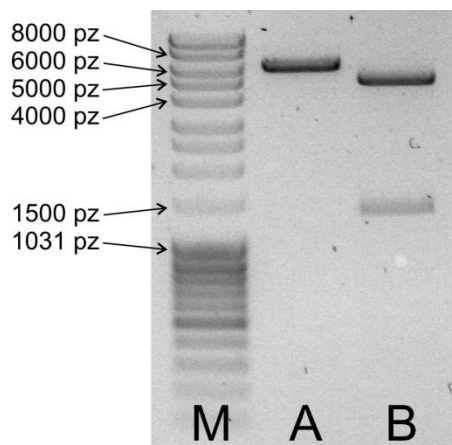
cDNA receptora adenozyнового zostało powielone z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang.: *polymerase chain reaction*, **pkt 1 na Rys. 3.1**), na matrycy pcDNA3.1-*hA_{2A}* AR, przy użyciu pary starterów: FOR - starter 1, uniwersalny starter dla plazmidów zawierających promotor T7, zgodny z sekwencją tego promotora oraz REV - starter 2, eliminujący kodon STOP w sekwencji powielanego genu receptora adenozyнового. Z wykorzystaniem startera REV została również wprowadzona sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny EcoRI oraz dodany został jeden nukleotyd (nukleotyd guaninowy, bezpośrednio po sekwencji genu receptora), w celu zachowania poprawnej otwartej ramki odczytu (ORF, ang.: *open reading frame*) dla projektowanego białka fuzyjnego (**Rozdział 5.4.2.3**). W wyniku przeprowadzonej reakcji PCR uzyskano fragment dwuniciowego DNA o długości 1319 pz, zawierający gen receptora, a także sekwencje rozpoznawane przez enzymy: NheI po stronie 5' nici wiodącej oraz EcoRI po stronie 3' nici wiodącej.

W kolejnych etapach eksperymentu, produkt reakcji PCR został poddany trawieniu enzymami restrykcyjnymi NheI oraz EcoRI (**pkt 2A na Rys. 3.1**). Tymi samymi enzymami trawiono plazmid pECFP-N1 (**pkt 2B na Rys. 3.1**). Po oczyszczeniu mieszaniny reakcyjnej uzyskane fragmenty wstawki i plazmidu połączono na drodze reakcji ligacji. Uzyskano plazmid o wielkości 5975 pz (**pkt 3 na Rys. 3.1**). Eksperyment został przeprowadzony w ten sposób, że w jednej, wspólnej otwartej ramce odczytu znalazły się sekwencje białka receptora i białka fluorescencyjnego. W uzyskanym konstrukcie białka fuzyjnego fragment białka ECFP został przyłączony do C-końca sekwencji aminokwasowej białka receptorowego. Otrzymane białko fuzyjne było kodowane przez sekwencję o długości 2004 pz, co w wyniku translacji daje produkt białkowy o długości 668 aminokwasów.

W celu zweryfikowania rezultatów inżynierii genetycznej, przeprowadzono analizę restrykcyjną (**Rysunek 3.2**) oraz zlecono sekwencjonowanie uzyskanego plazmidu *phA_{2A}* AR-ECFP (**Rozdział 5.4.2.8**).



Rysunek 3.1 Schemat tworzenia konstruktów fuzyjnych *phA_{2A} AR-ECFP*. (1) reakcja PCR, (2A) trawienie wstawki i (2B) wektora enzymami *NheI* oraz *EcoRI*, (3) ligacja uzyskanych fragmentów (szczegółowy opis w tekście).



Rysunek 3.2 Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA, uzyskanych w wyniku analizy restrykcyjnej plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP*. M - marker DNA (wzorzec wielkości cząsteczek DNA), A - plazmid *phA_{2A} AR-ECFP* trawiony enzymem NotI (teoretycznie jedno miejsce rozpoznawane przez ten enzym w cząsteczce plazmidu) - fragment o dł. 5975 pz, B - plazmid *phA_{2A} AR-ECFP* trawiony dwoma enzymami restrykcyjnymi: NheI i EcoRI - dwa fragmenty o długości 1280 i 4695 pz.

Analiza restrykcyjna potwierdziła zgodność uzyskanego produktu inżynierii genetycznej z założeniami teoretycznymi. W wyniku trawienia wektora enzymem NotI, dla którego zidentyfikowano jedno miejsce cięcia w obrębie analizowanej cząsteczki, uzyskano zlinearyzowaną formę plazmidu o długości równej 5975 par zasad. Natomiast jednoczesne trawienie plazmidu enzymami NheI i EcoRI dało w efekcie dwa fragmenty: jeden zawierający gen receptora adenozynowego A_{2A} i krótkie sekwencje dodatkowe (1280 pz) oraz drugi, odpowiadający pozostałej części plazmidu (4695 pz).

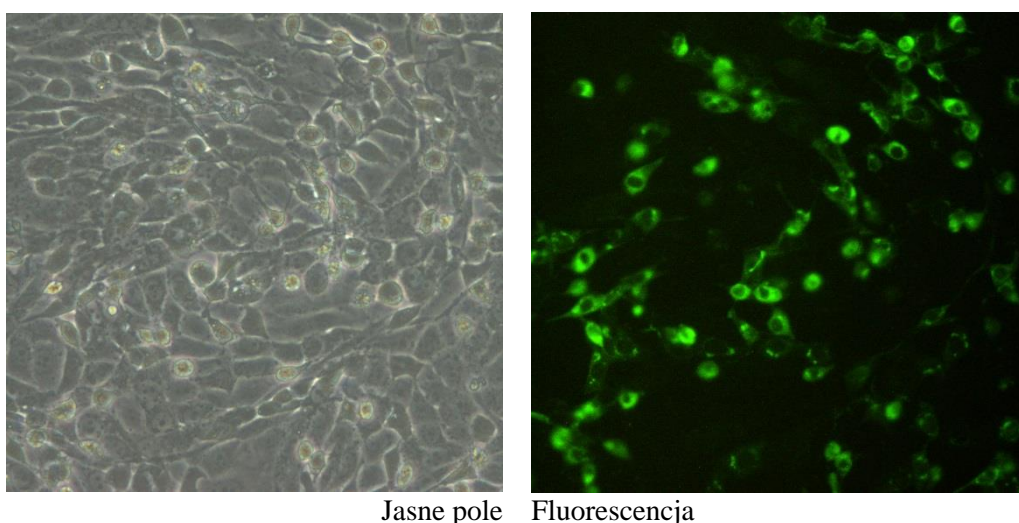
Rezultaty sekwencjonowania plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP* (**Załączniki 2-3**) zostały przeanalizowane z wykorzystaniem algorytmu BLAST (ang.: *Basic Local Alignment Search Tool*) [232]. Analizowana sekwencja (2050 zasad) porównywana była z sekwencją ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} , zdeponowaną w bazie danych GenBank (1239 zasad) [233]. Wynik uliniowienia sekwencji potwierdził, że uzyskany został poprawny konstrukt fuzyjny, zawierający niezmutowany gen ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} , zgodny z wpisem o numerze AY136747 w bazie GenBank. Przeprowadzone sekwencjonowanie konstruktów pozwoliło ostatecznie wykluczyć możliwe pomyłki, wynikające np. z niedokładności polimerazy Pfu lub błędnych założeń teoretycznych dotyczących zachowania otwartej ramki odczytu dla białka fuzyjnego.

3.1.2. Transfekcja przejściowa komórek CHO plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*

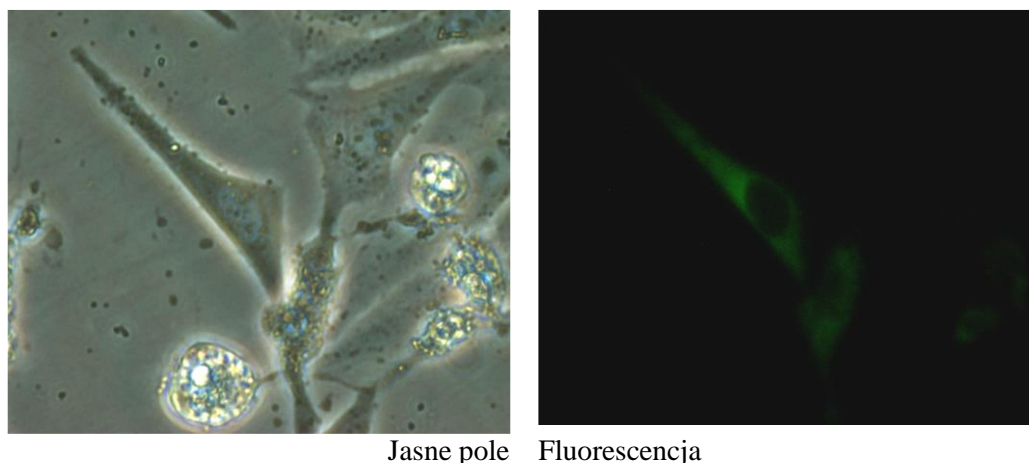
3.1.2.1. Transfekcja komórek z wykorzystaniem odczynnika *FuGENE HD*

W celu potwierdzenia możliwości uzyskania ekspresji zaprojektowanego białka fuzyjnego w komórkach eukariotycznych, przeprowadzono eksperyment transfekcji przejściowej. Linię komórek CHO (ang.: *Chinese Hamster Ovary*) transfekowano plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* z wykorzystaniem odczynnika *FuGENE HD*. Po 24 godzinach od transfekcji, kiedy poziom ekspresji białka rekombinowanego osiąga maksimum, przeprowadzono obserwacje linii komórkowej przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego oraz dokonano analizy cytometrycznej transfekowanych komórek.

Zjawisko fluorescencji w zakresie widmowym białka cyjanowej fluorescencji obserwowano za pomocą mikroskopu odwróconego, wyposażonego w system obrazowania fluorescencyjnego i filtr światła wzbudzającego: 460-490 nm. Fluorescencję stwierdzono w odniesieniu do znacznej części obserwowanych komórek (**Rysunek 3.3**). Wskazywało to na dużą wydajność zarówno samej transfekcji, jak i ekspresji fluorescencyjnego białka fuzyjnego pod kontrolą promotora CMV. Na podstawie obrazu mikroskopowego stwierdzono także, że znakowane fluorescencyjnie białko receptorowe lokalizowało się zarówno w obszarze błony komórkowej, jak i wewnątrz cytoplazmy (**Rysunek 3.4**). Obserwacje te mogą wskazywać na trwający proces fałdowania białka i transport receptorów do powierzchni błony. Mogą również wynikać z niskiej rozdzielczości mikroskopu i zbierania sygnału z kilku sąsiadujących płaszczyzn przekroju komórki.



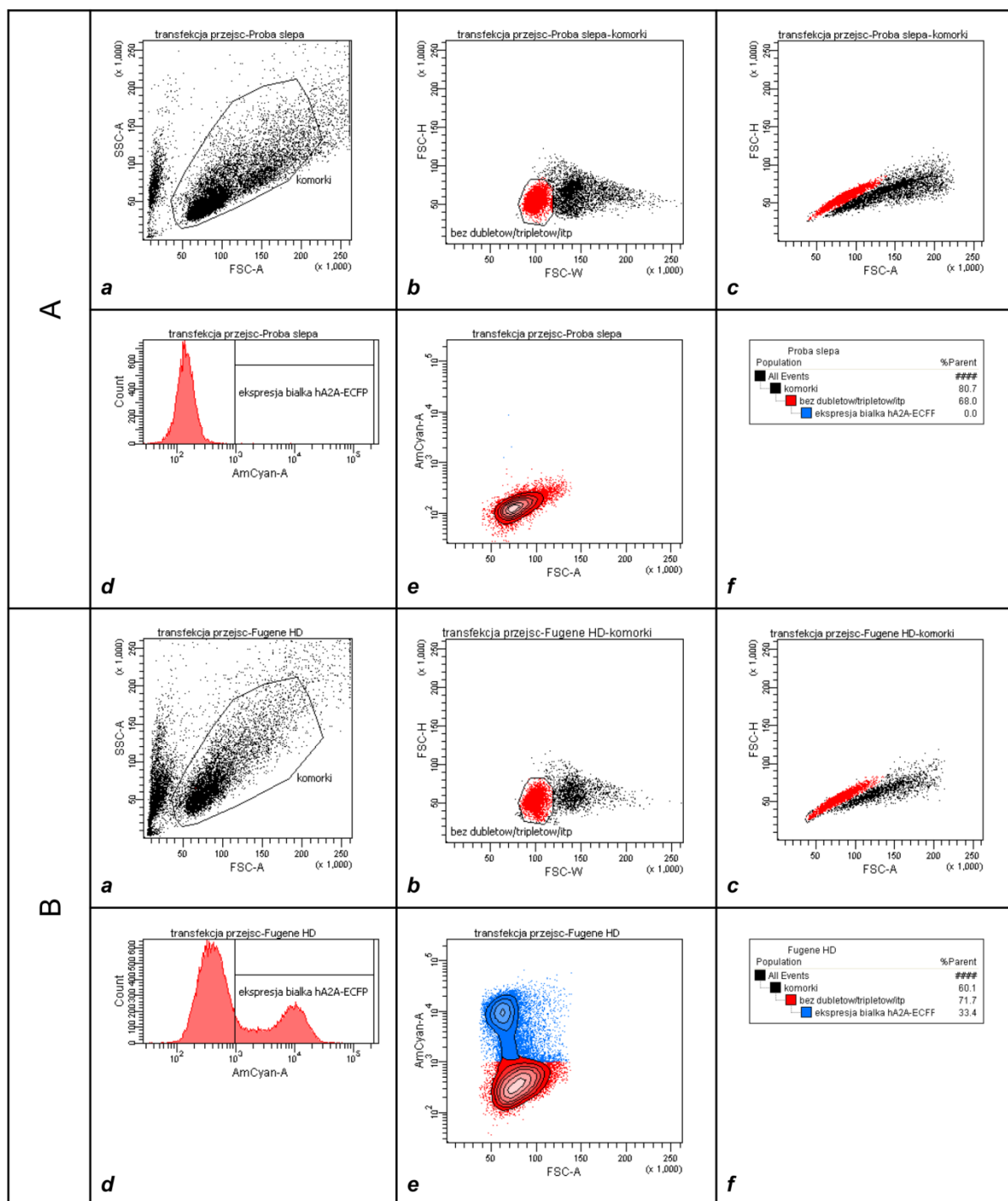
Rysunek 3.3 Obraz mikroskopowy komórek linii CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*, 24 godziny po transfekcji, powiększenie 200x.



Rysunek 3.4 Obraz mikroskopowy komórek linii CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*, 24 godziny po transfekcji, powiększenie: 400x.

Analiza cytometryczna została przeprowadzona dla komórek transfekowanych i komórek nietransfekowanych, które stanowiły kontrolę poziomu autofluorescencji. Rejestrowane były następujące parametry: FSC (wielkość), SSC (ziarnistość) i fluorescencja w kanale AmCyan (barwnikowi AmCyan przypisany jest filtr 525/50 nm). W całej populacji cząstek zarejestrowanych przez cytometr, pomiar fluorescencji przeprowadzono jedynie dla całych, pojedynczych komórek (w toku analizy wyeliminowano fragmenty uszkodzonych komórek, a także dublety, triplety, itp.). Wykorzystując histogram fluorescencji zmierzonej dla komórek nietransfekowanych, wyznaczono poziom odcięcia dla tego parametru, powyżej którego zmierzona fluorescencja wskazuje na ekspresję fluorescencyjnego białka fuzyjnego. Na podstawie przeprowadzonej analizy cytometrycznej stwierdzono, że eksperyment transfekcji został przeprowadzony z wydajnością 33,4%, ponieważ taki procent komórek transfekowanych charakteryzował się fluorescencją większą od nietransfekowanych komórek kontrolnych (**Rysunek 3.5**). Jednocześnie średnia fluorescencja, zmierzona w grupie komórek transfekowanych, była wyraźnie wyższa od zmierzonej w komórkach nietransfekowanych (2949 vs 146 [RFU - jednostki względne intensywności fluorescencji]).

Obserwacje poczynione z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej wskazują zgodnie na prawidłową konstrukcję zaprojektowanego wektora genetycznego oraz skuteczną ekspresję fluorescencyjnego białka fuzyjnego w komórkach CHO w następstwie przeprowadzonej transfekcji przejściowej plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*.



Rysunek 3.5 Analiza cytometryczna komórek nietransfekowanych (**A**) i transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* (**B**). **a**) Dwuwymiarowy wykres kropkowy parametrów rozproszenia (FSC i SSC) dla wszystkich zarejestrowanych cząstek, widoczna bramka obejmująca całe, nieuszkodzone komórki. **b**) Procedura odrzucenia dubletów komórek w oparciu o zależność parametrów FSC-W i FSC-H. **c**) Analiza występowania dubletów komórek w oparciu o parametry FSC-A i FSC-H. **d**) Histogram zmierzonej fluorescencji dla komórek po odrzuceniu dubletów, tripletów itp. W bramce „ekspresja białka *hA2A-ECFP*” znajdują się komórki charakteryzujące się zwiększoną fluorescencją względem komórek kontrolnych. **e**) Wykres konturowy dla parametrów FSC i fluorescencja. Kolorem niebieskim zaznaczony jest obszar, w którym występują komórki zakwalifikowane do bramki „ekspresja białka *hA2A-ECFP*”. **f**) Analiza statystyczna poszczególnych populacji cząstek na wykresach.

3.1.2.2. Transfekcja przejściowa komórek linii CHO z wykorzystaniem rozgałęzionej polietylenoiminy

Wykonanie testów wiązania radioligandów z wykorzystaniem receptorów rekombinowanych wymaga przygotowania znacznej ilości materiału biologicznego w postaci hodowli komórek charakteryzujących się ekspresją rekombinowanych receptorów. Przeprowadzenie przejściowej transfekcji komórek na dużą skalę na drodze lipofekcji lub przy użyciu dendrymerów jest ograniczone wysokim kosztem stosowanych odczynników. Z kolei w przypadku innej popularnej metody transfekcji komórek, polegającej na zastosowaniu fosforanu wapnia [174, 234], ograniczeniem jest jej niska wydajność i czasochłonność. W związku z powyższymi, konieczne było opracowanie alternatywnej metody transfekcji przejściowej, w skali umożliwiającej przeprowadzenie badań radioreceptorowych. Jako rozwiązanie przedstawionego problemu, wybrano technikę opierającą się na zastosowaniu rozgałęzionej polietylenoiminy (PEI) o średniej masie cząsteczkowej 25 kDa. Polietylenoimina jest polimerem kationowym, tworzącym kompleksy z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi. Powstające kompleksy, o wypadkowym ładunku obojętnym, łatwiej przenikają do wnętrza komórek eukariotycznych przez spolaryzowaną błonę komórkową. Wspomniane cechy czynią polietylenoiminę wartościowym odczynnikiem transfekcyjnym [176, 177].

Optymalizację protokołu transfekcji przejściowej komórek linii CHO z wykorzystaniem PEI przeprowadzono na szalkach hodowlanych o powierzchni hodowlanej 10 cm², przy konfluencji komórek ok. 80%. Testowane były różne proporcje DNA i PEI (0,5 – 5 µg DNA : 4 – 15 µl PEI o stęż. 1mg/ml w całkowitej objętości próbki równej 400 µl), a także zmienny czas inkubacji próbek (10 lub 20 minut). Oceny wydajności transfekcji dokonywano w oparciu o obserwacje mikroskopowe. Na podstawie zaobserwowanej ilości komórek fluoryzujących, przy uwzględnieniu populacji komórek nekrotycznych, stwierdzono, że optymalną wydajność transfekcji uzyskuje się używając plazmidowego DNA i PEI (1mg/ml) w ilościach odpowiednio: 4 µg i 10 µl, w całkowitej objętości 400 µl i przy inkubacji próbek przez 20 minut przed dodaniem do naczynia hodowlanego.

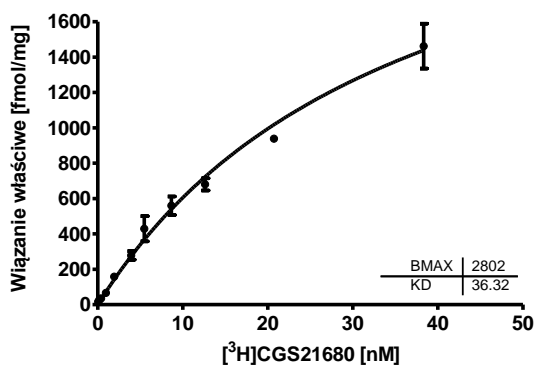
W następnej kolejności powiększono skalę eksperymentu, zwiększając ilość zużytych odczynników proporcjonalnie do rosnącej powierzchni hodowlanej stosowanych szalek. Przeprowadzono transfekcję komórek CHO plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* na 20 szalkach hodowlanych o powierzchni hodowlanej 175cm² każda, wykorzystując proporcjonalną ilość DNA i PEI. Opisana skala procesu pozwoliła na uzyskanie materiału biologicznego w ilości wystarczającej do przeprowadzenia testów wiązania radioligandów.

3.1.2.3. Charakterystyka farmakologiczna komórek przejściowo transfekowanych konstruktami fuzyjnymi receptora adenozynowego A_{2A} z białkiem cyjanowej fluorescencji

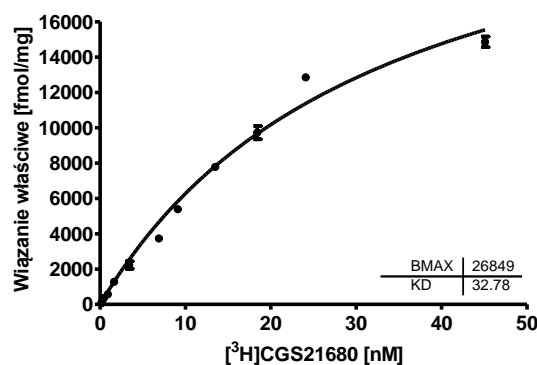
Komórki przejściowo transfekowane plazmidem phA_{2A} AR-ECFP przy użyciu PEI, zebrano z naczyń hodowlanych i przygotowano preparat błon komórkowych do testów wiązania znakowanych trytem ligandów receptora adenozynowego A_{2A} , zgodnie z opisem w **Rozdziale 5.4.5.1**. Metodą Lowry'ego oznaczono stężenie białka w uzyskanym preparacie błon, które wynosiło 5,28 mg/ml.

Testy wiązania radioligandów przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch ligandów receptorów A_{2A} adenozynowych: agonisty - [3 H]CGS21680 [235, 236] i selektywnego antagonisty - [3 H]MSX-2 [237]. W pierwszym przypadku wykonano testy saturacyjnego wiązania radioliganda, które w drugim przypadku zostały dodatkowo uzupełnione testami kompetycyjnego wiązania znakowanego i nieznakowanego liganda. Eksperymenty wykonano równolegle dla preparatu błon komórek przejściowo transfekowanych konstruktami genetycznymi białka fuzyjnego oraz komercyjnego preparatu błon komórek HEK293, stabilnie transfekowanych cDNA receptora adenozynowego A_{2A} typu dzikiego. W toku przeprowadzonych testów wyznaczono wartości parametrów K_d i B_{max} .

A)



B)

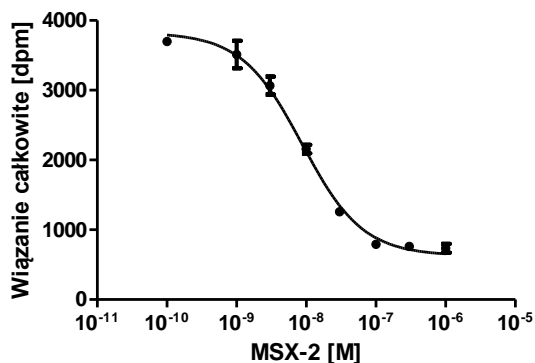


Rysunek 3.6 Krzywe wiązania saturacyjnego [3 H]CGS21680 do receptorów adenozynowych A_{2A} w: A) preparacie błon komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem phA_{2A} AR-ECFP; B) preparacie błon komórek HEK293 stabilnie transfekowanych cDNA receptora adenozynowego A_{2A} typu dzikiego.

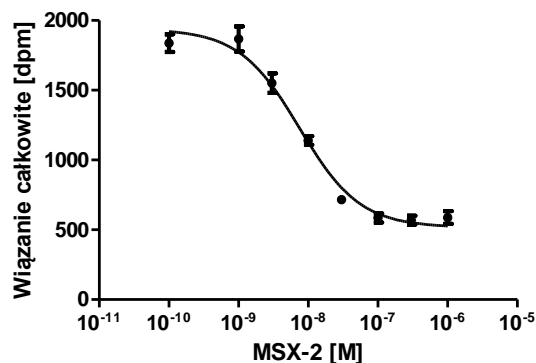
W eksperymencie saturacyjnego wiązania agonisty receptorów adenozynowych A_{2A} zaobserwowano, że wartość stałej wiązania liganda (K_d) jest zbliżona w przypadku obu badanych preparatów błon komórkowych (**Rysunek 3.6**). Wynika z tego, że fluorescencyjne znakowanie receptora adenozynowego nie wpływa na ten parametr wiązania liganda.

Rezultaty kompetycyjnego wiązania [³H]MSX-2, w obecności nieznakowanej pochodnej tego antagonisty receptorów adenozynowych A_{2A}, przedstawiono w postaci wykresu zależności wiązania całkowitego [³H]MSX-2 [dpm] od stężenia nieznakowanego liganda [M] dla obu stosowanych preparatów błon (**Rysunek 3.7**).

A.



B.



Rysunek 3.7 Krzywe wiązania kompetycyjnego [³H]MSX-2 do receptorów adenozynowych A_{2A} w funkcji zmiennego stężenia nieznakowanego liganda MSX-2 dla: A) preparatu błon komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* (30 µg białka/próbkę); B) preparatu błon komórek HEK293 stabilnie transfekowanych cDNA receptora adenozynowego A_{2A} typu dzikiego (2 µg białka/próbkę).

W następstwie analizy przedstawionych krzywych wiązania wyznaczono następujące wartości parametrów: K_d , B_{max} i wiązania niespecyficznego (NS):

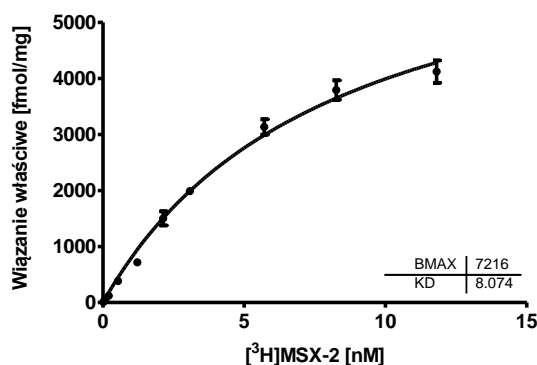
A) preparat błon komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* (30 µg białka/próbkę)

$$K_d = 8,04 \text{ nM}; B_{max} = 404999 \text{ dpm}; \text{NS} = 909 \text{ dpm}$$

B) komercyjny preparat błon komórek HEK293 stabilnie transfekowanych cDNA receptora adenozynowego A_{2A} typu dzikiego (2 µg białka/próbkę)

$$K_d = 6,83 \text{ nM}; B_{max} = 15497 \text{ dpm}; \text{NS} = 749 \text{ dpm}$$

W celu potwierdzenia wyników, uzyskanych na drodze wiązania kompetycyjnego liganda znakowanego i jego nieznakowanego odpowiednika, wykonano oznaczenie wiązania saturacyjnego [³H]MSX-2 przy użyciu preparatu błon komórek transfekowanych przejściowo plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* (**Rysunek 3.8**).



Rysunek 3.8 Krzywa wiązania saturacyjnego $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$ do receptorów adenozynowych $\text{A}_{2\text{A}}$ w preparacie błon komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem $ph\text{A}_{2\text{A}} \text{AR-ECFP}$.

Wartości parametrów K_d i B_{max} uzyskane w eksperymencie wiązania saturacyjnego $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$ są zgodne z rezultatami otrzymanymi na drodze kompetycyjnego wiązania homologicznych ligandów. Poniżej zestawiono wyniki wiązania $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$ dla wszystkich przeprowadzonych eksperymentów.

Tabela 3.1 Wartości parametrów K_d i B_{max} , uzyskane w testach wiązania $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$.

Preparat	Rodzaj testu wiązania	K_d [nM]	B_{max} [fmol/mg]
Komórki CHO przejściowo transfekowane plazmidem $ph\text{A}_{2\text{A}} \text{AR-ECFP}$	saturacyjny	$8,07 \pm 0,99$	$7\ 220 \pm 480$
Komórki CHO przejściowo transfekowane plazmidem $ph\text{A}_{2\text{A}} \text{AR-ECFP}$	kompetycyjny	$8,04 \pm 1,15$	$7\ 240 \pm 900$
Komórki HEK293 stabilnie transfekowane cDNA receptora adenozynowego $\text{A}_{2\text{A}}$ typu dzikiego	kompetycyjny	$6,83 \pm 1,23$	$41\ 600 \pm 7\ 600$

Podobnie jak w przypadku eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem $[^3\text{H}]\text{CGS21680}$ stwierdzono, że stała wiązania K_d dla $[^3\text{H}]\text{MSX-2}$ jest porównywalna dla receptorów znakowanych i nieznakowanych białkiem fluorescencyjnym, co wskazuje na prawidłową translację i fałdowanie białka fuzyjnego. Natomiast gęstość receptorów, wyrażona wartością parametru B_{max} , jest wyraźnie wyższa w przypadku komercyjnej linii charakteryzującej się stabilną ekspresją białka receptora typu dzikiego.

W opisanych eksperymentach zaobserwowano ponadto, że wartość parametru B_{max} w testach wiązania agonisty jest mniejsza, niż w testach wiązania antagonisty (por. np. B_{max} w preparacie linii CHO przejściowo transfekowanej plazmidem $ph\text{A}_{2\text{A}} \text{AR-ECFP}$:

dla [³H]CGS21680 - 2800 fmol/mg i dla [³H]MSX-2 - 7220 fmol/mg). Obserwacja ta jest zgodna z teorią występowania konformacji aktywnej i nieaktywnej receptora, różniących się powinowactwem względem ligandów o charakterze agonistów [238].

3.1.3. Stabilna ekspresja białka *hA_{2A} AR-ECFP*

3.1.3.1. Otrzymanie linii komórkowej charakteryzującej się stabilną ekspresją białka *hA_{2A} AR-ECFP*

Rezultaty potwierdzające ekspresję białka fuzyjnego ludzkiego receptora adenylicznego A_{2A} z białkiem cyjanowej fluorescencji, w wyniku transfekcji przejściowej komórek eukariotycznych, uzasadniły wykonanie kolejnego eksperymentu, a mianowicie próby uzyskania linii komórkowej charakteryzującej się stabilną ekspresją białka fuzyjnego.

Ponieważ wykorzystywany plazmid *phA_{2A} AR-ECFP* zawiera sekwencję kodującą gen 3'-fosfotransferazy aminoglikozydów, warunkujący oporność m.in. na genetycynę (G418), badania rozpoczęto od określenia stopnia przeżywalności komórek linii CHO i HEK293, w zależności od zastosowanego w pożywce hodowlanej stężenia tego antybiotyku selekcyjnego. Wyraźne objawy cytotoksyczności genetycyny ujawniły się po 5 dniach od jej dodania do pożywki. Obserwowano wyraźną zależność efektu działania antybiotyku od jego stężenia. Po 14 dniach prowadzenia hodowli komórek w pożywce z antybiotykiem, śmiertelność 100% zaobserwowano w przypadku zastosowania stężeń G418 ≥ 800 $\mu\text{g/ml}$ dla obu linii komórkowych. Na podstawie powyższych obserwacji stwierdzono, że do selekcji komórek transfekowanych należy użyć genetycyny w stężeniu 800 $\mu\text{g/ml}$.

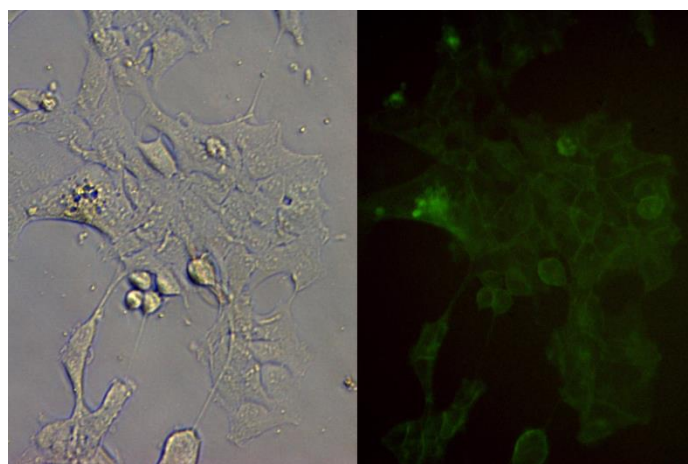
W pierwszej kolejności przeprowadzono transfekcję komórek linii CHO. Jednak po kilku dniach hodowli w pożywce selekcyjnej, obserwowano zanik ekspresji białka, mimo uzyskania wysokiej wydajności transfekcji przejściowej i kilkukrotnego powtórzenia eksperymentu.

W powyższej sytuacji podjęto próbę uzyskania stabilnej ekspresji konstruktów fuzyjnych w linii HEK293. Po transfekowaniu komórek i prowadzeniu hodowli w pożywce selekcyjnej przez dwa tygodnie, stwierdzono zakończenie procesu selekcji i nie obserwowano dalszej śmiertelności hodowanych komórek. Jednocześnie stwierdzono, na drodze obserwacji mikroskopowych, że znaczna część komórek opornych na działanie genetycyny nie wykazuje zjawiska fluorescencji, a więc stabilnej ekspresji ulega w nich jedynie gen oporności na antybiotyk, a nie sekwencja kodująca białko fuzyjne. Komórki tego typu charakteryzują się większą zdolnością do wzrostu i podziałów, przez co mogą zdominować w hodowli wolniej rosnące komórki charakteryzujące się stabilną ekspresją białka rekombinowanego.

W związku z tym konieczne było przeprowadzenie procedury prowadzącej do wyizolowania pojedynczego klonu komórek, a więc populacji komórek jednorodnych genetycznie, gwarantującej stabilność uzyskanej linii komórkowej.

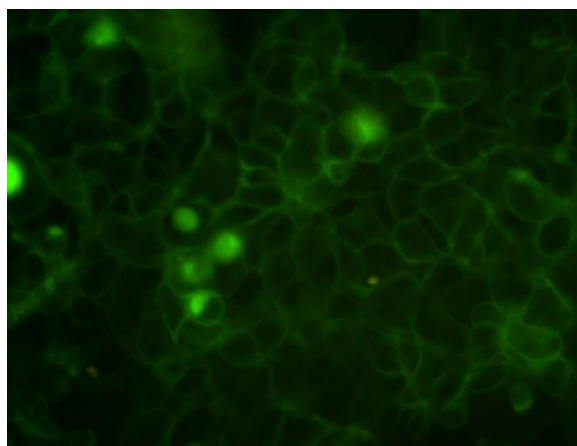
Klonowanie przeprowadzono metodą seryjnego rozcieńczenia zawiesiny komórek na płytce 96-cio dołkowej. Na podstawie obserwacji prowadzonych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, do dalszych badań wybrano klon charakteryzujący się największą fluorescencją, będącą wyznacznikiem poziomu ekspresji białka fuzyjnego.

Uzyskana linia komórkowa stanowiła jednorodną populację komórek, w której mimo mniejszego poziomu ekspresji w porównaniu z komórkami transfekowanymi przejściowo (wyrażonego względnie niższą intensywnością fluorescencji, a spowodowanego między innymi mniejszą ilością kopii genu w komórce), można zaobserwować bardziej selektywną lokalizację błonową receptorów znakowanych fluorescencyjnie (**Rysunek 3.9 i 3.10**).



Jasne pole Fluorescencja

Rysunek 3.9 Obraz mikroskopowy pojedynczej kolonii komórek HEK293, charakteryzujących się stabilną ekspresją białka *hA_{2A} AR-ECFP*, powiększenie: 400×.

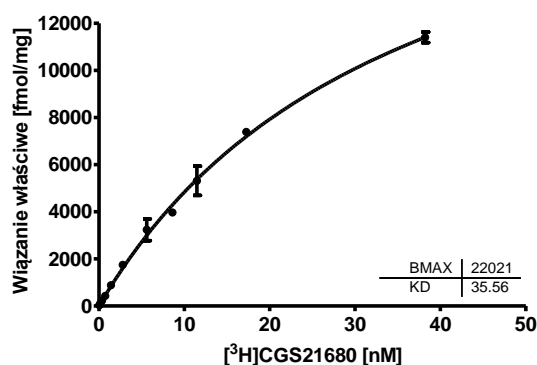


Rysunek 3.10 Obraz mikroskopowy fluorescencji linii komórek HEK293, charakteryzujących się stabilną ekspresją białka *hA_{2A} AR-ECFP*, konfluencja 100%, powiększenie: 400×.

3.1.3.2. Charakterystyka farmakologiczna linii stabilnej

Hodowlę komórek HEK293 stabilnie transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* prowadzono na szalkach o powierzchni hodowlanej 175cm² i po uzyskaniu odpowiedniej ilości materiału biologicznego, przygotowano preparat błon komórkowych, analogicznie jak w przypadku komórek transfekowanych przejściowo. Stężenie białka w uzyskanym preparacie wynosiło 5,83 mg/ml.

W następnej kolejności wykonano test saturacyjnego wiązania agonisty receptorów A_{2A} adenozynowych - [³H]CGS21680 (**Rysunek 3.11**).



Rysunek 3.11 Krzywa wiązania saturacyjnego [³H]CGS21680 do receptorów adenozynowych A_{2A} w preparacie błon komórek HEK293, charakteryzujących się stabilną ekspresją białka *hA_{2A} AR-ECFP*.

Wyznaczone wartości parametrów K_d i B_{max} zestawiono z wynikami uzyskanymi wcześniej dla preparatów błon: komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* oraz komórek HEK293 stabilnie transfekowanych cDNA receptora adenozynowego A_{2A} typu dzikiego (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 Wartości parametrów K_d i B_{max} , uzyskane w testach saturacyjnego wiązania [³H]CGS21680.

Preparat	K_d [nM]	B_{max} [fmol/mg]
Komórki CHO przejściowo transfekowane plazmidem <i>phA_{2A} AR-ECFP</i>	36,32 ± 5,71	2 800 ± 270
Komórki HEK293 stabilnie transfekowane plazmidem <i>phA_{2A} AR-ECFP</i>	35,56 ± 3,44	22 020 ± 1 300
Komórki HEK293 stabilnie transfekowane cDNA receptora adenozynowego A _{2A} typu dzikiego	32,78 ± 4,54	26 850 ± 2 130

Zaobserwowano, że mimo iż w przejściowej transfekcji poziom ekspresji w pojedynczej komórce jest wyższy, niż w przypadku transfekcji stabilnej (większa liczba kopii genu), to jednak wydajność przejściowej transfekcji jest czynnikiem limitującym ilość funkcjonalnych receptorów w całym preparacie błon. Fakt ten skutkuje znacznym obniżeniem wartości B_{max} w przypadku preparatu błon uzyskanego z komórek przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*, w porównaniu do preparatu uzyskanego z komórek linii stabilnej. W przypadku tej ostatniej, oznaczona gęstość receptorów była porównywalna z komercyjnym preparatem błon komórek charakteryzujących się stabilną ekspresją receptora typu dzikiego. Obserwacja ta wskazuje na akceptowalną wydajność zastosowanego systemu ekspresyjnego.

W ramach podsumowania opisanych eksperymentów stwierdzono, że metody ekspresji fluorescencyjnych białek fuzyjnych receptorów dają satysfakcjonujące wyniki. Uzyskuje się białka receptorowe o niezmienionej charakterystyce wiązania ligandów, co zostało potwierdzone w eksperymentach radioreceptorowych. Dodatkowo można w łatwy sposób śledzić ich lokalizację wewnątrzkomórkową. Zastosowanie znakowanych fluorescencyjnie receptorów pozwala ponadto na kontrolę poziomu ekspresji i stabilności uzyskanych linii komórkowych, co jest znacznie utrudnione w przypadku receptorów typu dzikiego.

Zaproponowana w niniejszej pracy metoda transfekcji przejściowej z wykorzystaniem rozgałęzionej polietylenoiminy, zadowalające rezultaty i może być wykorzystana w przypadkach, gdy konieczne jest szybkie pozyskanie większej ilości materiału biologicznego do badań radioreceptorowych, np. w eksperymentach służących ocenie wpływu mutacji punktowych na funkcjonalność receptorów. W rutynowych badaniach jej zastosowanie jest ograniczone potrzebą każdorazowego powtarzania transfekcji przy przygotowaniu materiału biologicznego do badań receptorowych, co wiąże się z koniecznością pozyskiwania dużych ilości plazmidu. Wad tych pozbawiona jest transfekcja stabilna, która z kolei jest techniką bardziej czasochłonną (długi etap selekcji i hodowli komórek po klonowaniu).

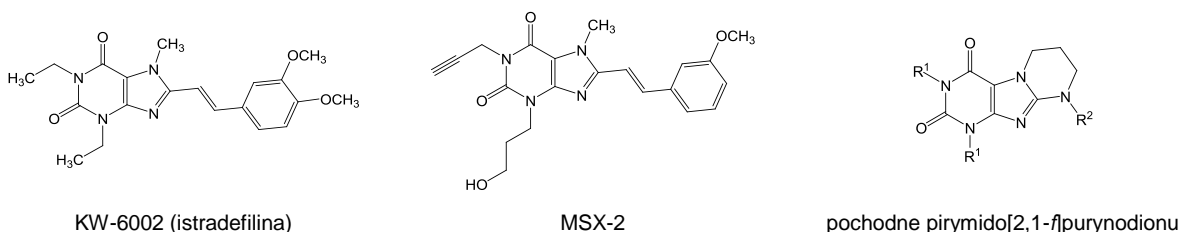
Brak powodzenia eksperymentu stabilnej transfekcji w przypadku linii CHO można tłumaczyć indywidualnymi właściwościami zastosowanych komórek. Wyjściowo w obu typach linii komórkowych obserwowano taką samą wydajność transfekcji, lecz jedynie linia HEK293 okazała się w pełni kompatybilna z zastosowanym systemem ekspresyjnym. Poziom ekspresji białka receptorowego był w tym przypadku porównywalny z komercyjnie dostępnym preparatem błon komórek HEK293, charakteryzujących się stabilną ekspresją ludzkiego receptora adenyzynowego A_{2A} typu dzikiego. W eksperymentach stosowany był wariant T linii HEK293 (ATCC nr CRL3216), charakteryzujący się ekspresją dużego

antygeny T małego wirusa nr 40 (ang.: *SV40 large T antigen*) [191]. Obecność tego białka warunkuje episomalną replikację transfekowanych plazmidów, zawierających fragment odpowiadający miejscu inicjacji replikacji wirusa SV40, przez co w znaczącym stopniu podnosi się wydajność transfekcji. Plazmid pECFP-N1 wykorzystany w opisanych eksperymentach jako wektor, do którego wprowadzono gen receptora adenylnego, zawiera sekwencję inicjacji replikacji SV40, więc może być utrzymywany wewnątrzkomórkowo przez dłuższy okres czasu po transfekcji linii HEK293T. Innym czynnikiem mogącym mieć niekorzystny wpływ na skuteczność stabilnej transfekcji linii CHO mógł być wysoki numer pasażu tej linii (>30). Niektóre publikacje wskazują na istotne znaczenie tego parametru dla wydajności transfekcji [121, 239, 240].

3.2. Badanie wpływu modyfikacji chemicznych w grupie podstawionych dialkilo-piryrido-purynodionów na aktywność względem ludzkich i szczurzych podtypów receptorów adenozynowych

Wśród dotychczas opisanych ligandów receptorów adenozynowych dominującą część stanowią analogi strukturalne adenozyny oraz ksantyny [16, 42]. W tej grupie pochodnych opisane zostały ligandy selektywne względem wszystkich podtypów receptorów adenozynowych, zarówno w odniesieniu do receptorów szczurzych jak i ludzkich [41, 42].

W grupie ksantyn, pochodne styrylowe zostały zidentyfikowane jako aktywni i selektywni antagoniści receptorów A_{2A} . Zaliczyć tu należy pierwszego wprowadzonego do leczenia antagonistę A_{2A} - istradefilinę [46], czy też wysoce selektywny względem A_{2A} związek - MSX-2, powszechnie używany w postaci rozpuszczalnych proleków jako substancja referencyjna w badaniach *in vivo* antagonizmu receptorów A_{2A} (**Rysunek 3.12**) [241, 242]. 8-styryloksantyny są aktywne w konfiguracji E. Izomery Z charakteryzują się natomiast obniżoną aktywnością i selektywnością w odniesieniu do receptorów A_{2A} . 8-styryloksantyny, jako względnie elastyczne cząsteczki, łatwo ulegają izomeryzacji (szczególnie rozpuszczone w niskich stężeniach w rozpuszczalnikach organicznych). Ponadto w stanie stałym związki te mogą również dimeryzować, co prowadzi do powstania cyklobutylowych pochodnych o znacznie obniżonej aktywności biologicznej [243].



Rysunek 3.12 Analogia strukturalna styryloksantyn i anelowanych purynodionów.

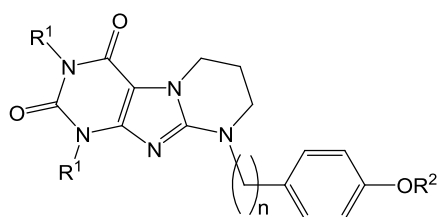
W ramach prowadzonych wcześniej badań, opracowane zostały w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM serie trójcyklicznych analogów styryloksantyn, zawierających ugrupowania: oksazolowe, oksazynowe, oksazepinowe, imidazolowe, pirymidynowe oraz diazepinowe [244-251]. Związki tej grupy charakteryzują się zwiększoną stabilnością w porównaniu do analogicznych struktur dwupierścieniowych, a układ wiązań dobudowanego pierścienia pokrywa się z organizacją przestrzenną wiązań 8-styryloksantyn w aktywnej konfiguracji E. Przeprowadzone testy kompetycyjnego wiązania radioligandów umożliwiły wskazanie w badanych połączeniach elementów strukturalnych o kluczowym znaczeniu dla aktywności ligandów receptorów adenozynowych. Wśród przebadanych

trójcyklicznych pochodnych ksantyn związki o największej aktywności zostały zidentyfikowane w grupie pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionów (**Rysunek 3.12**) [244, 247, 250].

Prowadzone w kolejnych etapach badań modyfikacje struktury wyjściowej pirymido[2,1-*f*]purynodionu obejmowały wprowadzanie w położeniu 9 podstawników: alkilowych, cykloalkilowych i arylowych (bezpośrednio lub poprzez łącznik alifatyczny). Jeden z obranych kierunków badań polegał na wprowadzeniu grupy hydroksylowej w położeniu *para* ugrupowania fenyłowego lub fenyloetyłowego, przyłączonego do azotu *N9* szkieletu trójcyklicznego, co miało na celu zwiększenie rozpuszczalności tych połączeń w wodzie. Ponieważ omawiana modyfikacja doprowadziła do zwiększenia powinowactwa w kierunku receptorów adenozytowych A_{2A} , w kolejnym etapie badań zaplanowane zostało uzyskanie pochodnych z podstawionym wodorem grupy fenolowej.

3.2.1. Ocena powinowactwa względem podtypów receptorów adenozytowych

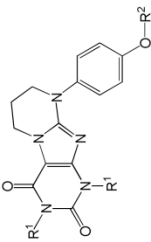
W ramach kontynuacji prowadzonych badań farmakologicznych, oznaczone zostało powinowactwo serii 61 fenyłowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionów w kierunku podtypów A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 szczurzych (*r* - ang.: *rat*) oraz ludzkich (*h* - ang.: *human*) receptorów adenozytowych. Ogólny wzór strukturalny badanych związzków, które zostały zsyntetyzowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM, przedstawiony jest na **Rysunku 3.13**.



R^1 = metyl, etyl, propyl, butyl; n = 0, 2

Rysunek 3.13 Ogólny wzór badanych podstawionych dialkilo-pirymido[2,1-*f*]purynodionów.

W testach radioreceptorowych oznaczony został % hamowania wiązania radioliganda do białka receptorowego w obecności badanych połączeń o stężeniu 1 μ M, a dla najbardziej aktywnych związzków wyznaczona została wartość stałej K_i , będącej miarą powinowactwa związzków do receptorów. Wyniki przeprowadzonych badań zebrane są w **Tabeli 3.3** i **3.4** oraz **Załączniku 8**.

Tabela 3.3 Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenozynowych dla fenylowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.


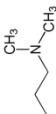
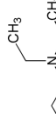
Związek	R ²	K _i ± SEM [nM] (% hamowania ± SEM w stężeniu 1 μM)						
		rA ₁ vs. [³ H]CCPA	rA _{2A} vs. [³ H]MSX-2	rA _{2B} vs. [³ H]PSB-603	rA ₃ vs. [³ H]NECA	hA ₁ vs. [³ H]CCPA	hA _{2A} vs. [³ H]MSX-2	hA _{2B} vs. [³ H]PSB-603
KD-31	-H	35000 ± 2 000	1620 ± 310	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (5 ± 5)	>>1000 (6 ± 3)
KD-367	-CH ₂ -COO-CH ₃	>1000 (5 ± 5)	>>1000 (11 ± 7)	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-4 ± 9)	>>1000 (4 ± 3)
KD-376	-C ₆ H ₅ -COO-C ₂ H ₅	>1000 (1 ± 5)	>1000 (21 ± 14)	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-9 ± 5)	>>1000 (9 ± 4)
KD-359		>1000 (2 ± 2)	>>1000 (3 ± 8)	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (1 ± 6)	>>1000 (-1 ± 5)
KD-360		>1000 (-3 ± 3)	>>1000 (12 ± 10)	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-5 ± 2)	>>1000 (3 ± 5)

Tabela 3.3, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenyzynowych dla fenylowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.


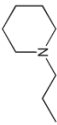
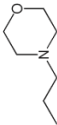
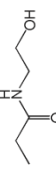
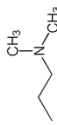
KD-365		>1000 (3 ± 3)	>>1000 (13 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (3 ± 3)	>>1000 (0 ± 5)	
KD-364		>1000 (0 ± 1)	>>1000 (-4 ± 9)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-1 ± 3)	>>1000 (6 ± 8)	
KD-362		>1000 (-1 ± 4)	>>1000 (14 ± 7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-7 ± 3)	>>1000 (-5 ± 4)	
KD-368		>1000 (5 ± 1)	>>1000 (2 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-11 ± 5)	>>1000 (2 ± 9)	
R¹ - etyl											
KD-411	-H	>1000 (14 ± 2)	893 ± 97 (53 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (34 ± 9)	>>1000 (1 ± 2)	
KD-428		297 ± 32 (36 ± 2)	>1000 (27 ± 4)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (29 ± 4)	>>1000 (-1 ± 7)	
R¹ - propyl											
KD-371	-H	>500 (25 ± 3)	785 ± 253 (53 ± 8)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (20 ± 9)	>>1000 (18 ± 2)	

Tabela 3.3, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenyzynowych dla fenylowych pochodnych pirymido[2,1-f]purynodionu.



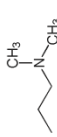
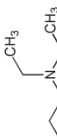
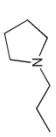
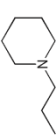
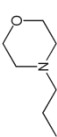
KD-386		>1000 (6 ± 1)	>1000 (25 ± 7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (22 ± 8)	>>1000 (19 ± 2)
KD-378		>1000 (3 ± 5)	>1000 (24 ± 4)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (10 ± 9)	496 ± 40 (65 ± 3)
KD-373		180 ± 22 (47 ± 3)	>1000 (44 ± 7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (17 ± 2)	>>1000 (17 ± 5)
KD-374		567 ± 106 (30 ± 3)	1790 ± 510 (51 ± 7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (22 ± 7)	>1000 (20 ± 3)
KD-372		175 ± 44 (53 ± 5)	>1000 (28 ± 4)	>1000 (4 ± 2)	>1000 (10 ± 9)	1990 ± 140 (22 ± 3)	2380 ± 450 (29 ± 6)	n.d.	n.d.	>1000 (10 ± 4)	>1000 (20 ± 3)
KD-381		254 ± 24 (44 ± 3)	>1000 (44 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (18 ± 6)	>1000 (29 ± 4)
KD-380		>1000 (14 ± 2)	1930 ± 460 (45 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (3 ± 3)	>1000 (23 ± 3)
R¹ - butyl											
KD-370	-H	174 ± 19 (48 ± 1)	738 ± 141 (64 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (33 ± 7)	>1000 (40 ± 4)

Tabela 3.3, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenzynowych dla fenylnych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.

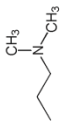
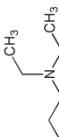

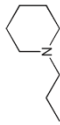
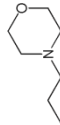
KD-387	-CH ₂ -COO-CH ₃	>1000 (13 ± 1)	>1000 (29 ± 10)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>500 (41 ± 4)	>1000 (35 ± 4)
KD-379	-C ₃ H ₆ -COO-C ₂ H ₅	>1000 (7 ± 3)	>1000 (30 ± 8)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (16 ± 5)	267 ± 52 (73 ± 5)
KD-375		56 ± 8 (72 ± 2)	1050 ± 90 (47 ± 2)	>1000 (9 ± 4)	>1000 (15 ± 8)	539 ± 74 (43 ± 5)	1030 ± 130 (52 ± 1)	>1000 (40 ± 5)	>1000 (38 ± 8)	>1000 (38 ± 8)
KD-382		137 ± 9 (55 ± 2)	1460 ± 250 (49 ± 6)	>1000 (6 ± 3)	>1000 (16 ± 7)	1190 ± 130 (30 ± 5)	1010 ± 180 (54 ± 4)	>1000 (33 ± 5)	>1000 (44 ± 2)	>1000 (44 ± 2)
KD-385		72 ± 8 (69 ± 1)	989 ± 200 (49 ± 4)	>1000 (15 ± 1)	>1000 (20 ± 4)	658 ± 69 (41 ± 5)	666 ± 128 (68 ± 2)	>1000 (34 ± 1)	>1000 (34 ± 1)	813 ± 140 (48 ± 2)
KD-384		127 ± 25 (65 ± 3)	1480 ± 170 (49 ± 8)	>1000 (9 ± 11)	>1000 (20 ± 2)	713 ± 119 (42 ± 4)	921 ± 29 (53 ± 4)	>500 (41 ± 2)	>500 (41 ± 2)	854 ± 69 (48 ± 2)
KD-383		268 ± 14 (35 ± 2)	>1000 (31 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (27 ± 8)	>1000 (27 ± 8)	>1000 (38 ± 5)

Tabela 3.4 Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenozynowych dla fenyletylowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.

Związek	R ²	K _i ± SEM [nM] (% hamowania ± SEM w stężeniu 1 μM)									
		rA ₁ vs. [³ H]CCPA	rA _{2A} vs. [³ H]MSX-2	rA _{2B} vs. [³ H]PSB-603	rA ₃ vs. [³ H]NECA	hA ₁ vs. [³ H]CCPA	hA _{2A} vs. [³ H]MSX-2	hA _{2B} vs. [³ H]PSB-603	hA ₃ vs. [³ H]PSB-11		
KD-114	-H	ca. 25000	230 ± 10	n.d.	n.d.	>25000	630 ± 350	7200 ± 600	>10000		
KD-389	-CH ₂ -COOH	>1000 (3 ± 5)	>1000 (43 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-4 ± 4)	>>1000 (2 ± 1)		
KD-424	-CH ₂ -CH ₂ -COOH	>1000 (0 ± 7)	>1000 (39 ± 8)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (4 ± 8)	>>1000 (1 ± 3)		
KD-353	-CH ₂ -COO-CH ₃	>1000 (0 ± 2)	>1000 (33 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-8 ± 6)	>>1000 (-13 ± 2)		
KD-392	-C ₃ H ₆ -COO-C ₂ H ₅	>1000 (3 ± 2)	490 ± 27 (67 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (13 ± 3)	>>1000 (-1 ± 6)		

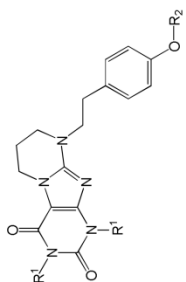


Tabela 3.4, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenozynowych dla fenyloetylowych pochodnych pirymido[2,1-f]purynodionu.

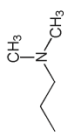
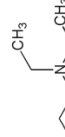

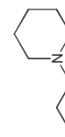
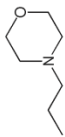
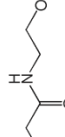

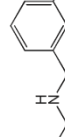
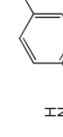
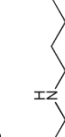
KD-358		>1000 (-2 ± 3)	653 ± 84 (49 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (9 ± 4)	>>1000 (-5 ± 7)
KD-357		>1000 (4 ± 2)	339 ± 48 (53 ± 4)	>1000 (-2 ± 5)	>1000 (6 ± 3)	>1000 (1 ± 4)	559 ± 89 (57 ± 4)	>1000 (6 ± 3)	>1000 (6 ± 3)	>1000 (6 ± 3)	>>1000 (-3 ± 4)
KD-366		>1000 (7 ± 2)	>1000 (34 ± 11)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (13 ± 6)	>>1000 (3 ± 4)
KD-363		>1000 (3 ± 1)	645 ± 244 (65 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (2 ± 4)	>>1000 (1 ± 7)
KD-361		>1000 (0 ± 1)	585 ± 150 (71 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (-5 ± 2)	>>1000 (-3 ± 3)
KD-352		>1000 (1 ± 3)	>1000 (25 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (6 ± 7)	>>1000 (-10 ± 4)
KD-356		>1000 (5 ± 3)	450 ± 98 (61 ± 4)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (6 ± 2)	>>1000 (-7 ± 2)
KD-416		>1000 (14 ± 1)	665 ± 96 (66 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (13 ± 7)	>>1000 (5 ± 6)
KD-421		>1000 (13 ± 3)	457 ± 64 (68 ± 8)	>1000 (11 ± 2)	>1000 (8 ± 9)	>1000 (0 ± 2)	1610 ± 420 (37 ± 1)	>1000 (0 ± 7)	>1000 (0 ± 7)	>1000 (0 ± 7)	>>1000 (-4 ± 3)
KD-422		>1000 (5 ± 5)	>1000 (38 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (13 ± 2)	>>1000 (0 ± 8)

Tabela 3.4, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenozynowych dla fenyletylowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.

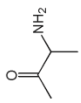
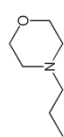
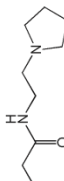
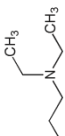
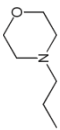
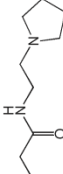
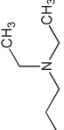
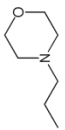
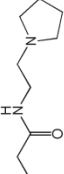
ID	Chemical Structure	R ¹ - etyl						R ¹ - propyl								
		Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n			
KD-417		464 ± 35 (72 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	464 ± 35 (72 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>>1000 (-3 ± 4)
KD-390	-H	271 ± 16 (80 ± 2)	>1000 (14 ± 2)	>1000 (14 ± 1)	>1000 (19 ± 4)	2020 ± 70 (20 ± 3)	2180 ± 390 (30 ± 5)	271 ± 16 (80 ± 2)	>1000 (14 ± 2)	>1000 (14 ± 1)	>1000 (19 ± 4)	2020 ± 70 (20 ± 3)	2180 ± 390 (30 ± 5)	>500 (42 ± 3)	>>1000 (6 ± 4)	
KD-406	-CH ₂ -COO-CH ₃	480 ± 77 (69 ± 3)	>1000 (10 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	480 ± 77 (69 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (29 ± 8)	>>1000 (2 ± 1)	
KD-426		859 ± 23 (51 ± 2)	>1000 (17 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	859 ± 23 (51 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (36 ± 9)	>>1000 (7 ± 3)	
KD-427		328 ± 81 (74 ± 3)	264 ± 32 (40 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	328 ± 81 (74 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	672 ± 30 (61 ± 6)	>>1000 (13 ± 6)	
KD-354	-H	464 ± 66 (67 ± 1)	370 ± 37 (33 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	464 ± 66 (67 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	663 ± 130 (58 ± 4)	>1000 (24 ± 2)	
KD-410	-CH ₂ -COO-CH ₃	>1000 (21 ± 12)	>1000 (13 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (21 ± 12)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1100 ± 290 (50 ± 4)	>1000 (21 ± 4)	
KD-413	-C ₃ H ₆ -COO-C ₂ H ₅	>1000 (23 ± 6)	>1000 (18 ± 2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (23 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (40 ± 2)	>1000 (33 ± 2)	
KD-388		658 ± 115 (65 ± 3)	347 ± 33 (31 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	658 ± 115 (65 ± 3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	338 ± 14 (66 ± 4)	633 ± 52 (53 ± 3)	

Tabela 3.4, cd. Wyniki testów powinowactwa do podtypów receptorów adenozynowych dla fenyletylowych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.

KD-407		>500 (26 ± 3)	>1000 (44 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	853 ± 73 (50 ± 2)	>1000 (20 ± 4)			
KD-425		113 ± 4 (61 ± 1)	551 ± 140 (68 ± 3)	>1000 (32 ± 4)	1740 ± 170 (28 ± 1)	1260 ± 170 (46 ± 4)	193 ± 39 (74 ± 3)	509 ± 98 (62 ± 4)									
R¹ - butyl																	
KD-355	-H	184 ± 57 (51 ± 3)	518 ± 79 (63 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	619 ± 110 (44 ± 4)									
KD-431	-CH ₂ -COOH	268 ± 36 (35 ± 2)	>1000 (35 ± 1)	n.d.	n.d.	n.d.	>1000 (39 ± 6)	>>1000 (19 ± 5)									
KD-409	-CH ₂ -COO-CH ₃	>1000 (18 ± 1)	>>1000 (17 ± 6)	n.d.	n.d.	n.d.	352 ± 56 (73 ± 6)	>1000 (39 ± 4)									
KD-412	-C ₃ H ₆ -COO-C ₂ H ₅	>1000 (17 ± 4)	>1000 (25 ± 8)	n.d.	n.d.	n.d.	>500 (43 ± 2)	>1000 (42 ± 3)									
KD-423		80 ± 5 (69 ± 2)	566 ± 43 (64 ± 2)	1100 ± 100 (38 ± 3)	1550 ± 180 (27 ± 3)	546 ± 67 (64 ± 4)	109 ± 11 (87 ± 1)	310 ± 48 (75 ± 2)									
KD-415		172 ± 35 (47 ± 3)	1370 ± 270 (47 ± 5)	n.d.	n.d.	n.d.	337 ± 79 (62 ± 4)	890 ± 84 (48 ± 5)									
KD-414		161 ± 33 (64 ± 5)	779 ± 159 (54 ± 10)	1310 ± 80 (43 ± 2)	1110 ± 60 (28 ± 8)	560 ± 94 (61 ± 6)	69 ± 8 (81 ± 1)	268 ± 15 (73 ± 3)									

W ramach przeprowadzonych eksperymentów, analizowany był wpływ następujących modyfikacji na aktywność związków (**Rysunek 3.13**):

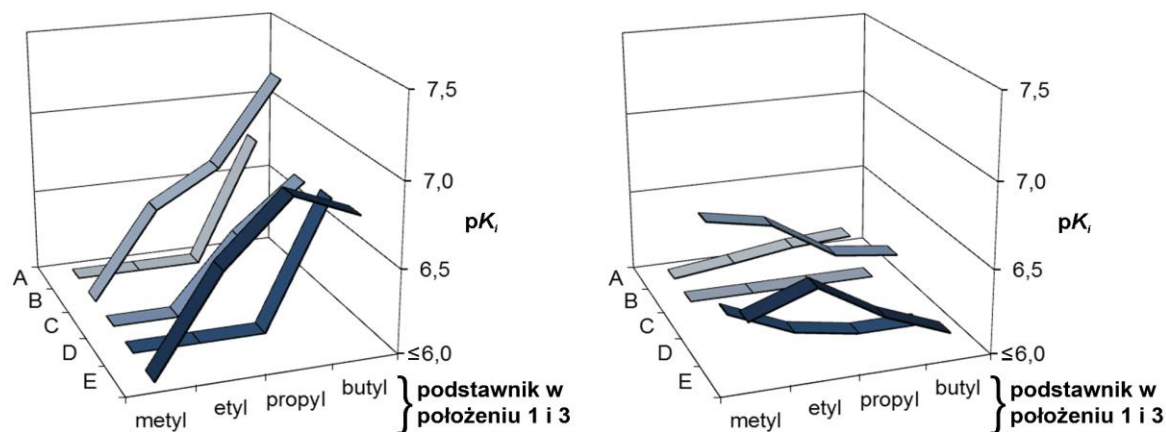
1. Długość łańcucha alifatycznego w położeniu 1 i 3 (R^1), w tym podstawnika butylowego, który dotychczas nie był opisany dla tej grupy połączeń.
2. Długość łącznika alifatycznego między ugrupowaniem fenyłowym a ugrupowaniem trójcyklicznym ($n = 0$ lub 2 - odpowiednio: pochodne fenyłowe i fenyloetyłowe).
3. Charakter podstawnika przy pierścieniu benzenowym (R^2) - pochodne kwasowe, estrowe, aminowe i amidowe.
4. Dodatkowo przeprowadzona została analiza różnic międzygatunkowych w wiązaniu badanych związków do receptorów szczurzych i ludzkich.

Ad. 1. Rola podstawników alkilowych przy pierścieniu ksantynowym.

We wszystkich analizowanych przypadkach wydłużanie podstawnika alifatycznego w położeniu 1 i 3 skutkowało wzrostem powinowactwa względem szczurzego receptora adenozyнового A_1 . Powyższe stwierdzenie jest poparte zarówno analizą wyznaczonych stałych wiązania związków, jak i porównaniem zdolności do hamowania wiązania radioliganda w sytuacji, gdy stała wiązania nie była oznaczana ($K_i > 1 \mu\text{M}$). W konsekwencji wzrastającego, wraz z wydłużeniem podstawnika, powinowactwa w grupie pochodnych dibutyłowych, zaobserwowano wartości K_i względem rA_1 AR poniżej 300 nM dla wszystkich połączeń, z wyjątkiem czterech związków z ugrupowaniem estrowym jako podstawnik R^2 .

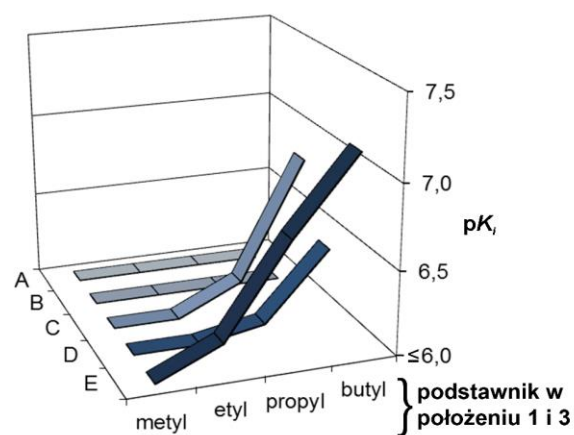
Wzrost powinowactwa towarzyszący wydłużaniu podstawników przy pierścieniu ksantynowym obserwowano również dla ludzkich receptorów A_{2B} i A_3 , jednak w tym przypadku stwierdzono, że powinowactwo zmienia się w większym stopniu w grupie pochodnych fenyloetyłowych. Dla połączeń, w których ugrupowanie fenyłowe było bezpośrednio przyłączone do układu trójcyklicznego, zidentyfikowano tylko dwa związki, dla których wartość K_i w kierunku hA_{2B} i hA_3 była mniejsza niż $1 \mu\text{M}$.

W odniesieniu do szczurzych receptorów A_{2A} , różnice między pochodnymi fenyłowymi i fenyloetyłowymi były jeszcze wyraźniej zaznaczone. W pierwszej grupie wydłużenie podstawników alkilowych przy pierścieniu ksantynowym skutkowało nieznacznym wzrostem powinowactwa względem rA_{2A} AR, natomiast w grupie pochodnych fenyloetyłowych obserwowano efekt odwrotny. Omówione zależności zostały zaprezentowane w postaci wykresów, przedstawiających zależność wartości pK_i od długości łańcucha alkilowego w położeniu 1 i 3 dla wybranych pięciu serii związków, zarówno z grupy pochodnych fenyłowych (A-B), jak i pochodnych fenyloetyłowych (C-E) (**Rysunek 3.14**).

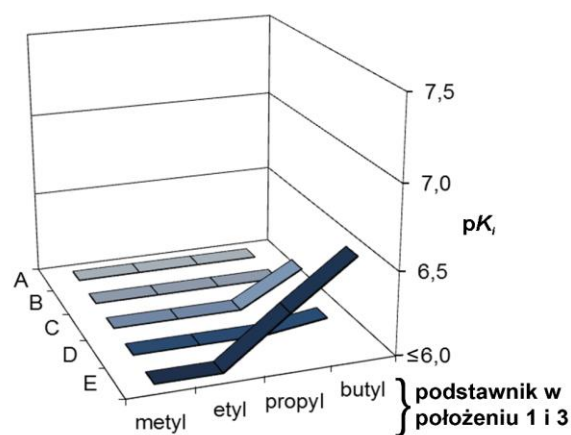


a. Wartości pK_i dla receptora rA_1

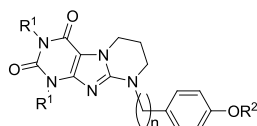
b. Wartości pK_i dla receptora rA_{2A}



c. Wartości pK_i dla receptora hA_{2B}



d. Wartości pK_i dla receptora hA_3



Seria związków	n	R ²	R ¹			
			metyl	etyl	propyl	Butyl
A	0		KD-31	KD-411	KD-371	KD-370
B	0		KD-359	KD-428	KD-373	KD-375
C	2		KD-114	KD-390	KD-354	KD-355
D	2		KD-361	KD-426	KD-407	KD-415
E	2		KD-356	KD-427	KD-425	KD-414

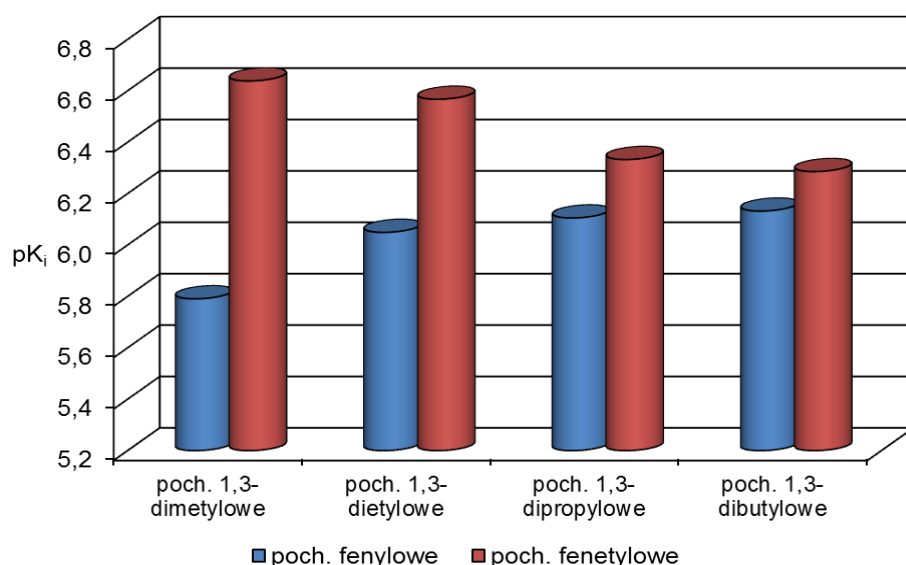
Rysunek 3.14 Analiza wpływu długości podstawnika w położeniu 1 i 3 pirymido[2,1-f]purynodionu na powinowactwo względem receptorów: a - rA_1 , b - rA_{2A} , c - hA_{2B} i d - hA_3 . (poch. fenylowe: serie - A i B; poch. fenyletylowe: serie - C, D i E.

Observacje poczynione na tym etapie są zgodne z wynikami otrzymanymi wcześniej dla analogicznych pirymido[2,1-*f*]purynodionów, w przypadku których zastąpienie grup metylowych podstawnikami propylowymi w położeniu 1 i 3 wiązało się ze spadkiem selektywności względem rA_{2A} AR, w następstwie wzrastającego powinowactwa względem pozostałych podtypów receptora adenozyнового [245, 248-250]. W toku omawianych badań potwierdzono, że tendencja ta jest zachowana również dla pochodnych dibutyłowych.

Ad 2. Zestawienie aktywności pochodnych fenyłowych i fenyloetyłowych.

Porównanie analogicznych struktur, różniących się długością łącznika pomiędzy pierścieniem benzenowym a ugrupowaniem trójcyklicznym, wskazuje na istotną rolę tego elementu strukturalnego dla aktywności względem szczyrych receptorów adenozyновых A_{2A} . Wprowadzenie mostka etylowego, łączącego fragmenty aromatyczne cząsteczki, w miejsce bezpośredniego przyłączenia grupy fenyłowej do struktury pirymido[2,1-*f*]purynodionu, skutkuje wyraźnym wzrostem powinowactwa względem receptorów rA_{2A} , szczególnie dla pochodnych dimetyłowych (**Rysunek 3.15**). Podobna zależność została już wcześniej opisana dla serii niepodstawionych pochodnych fenylo-, benzylo- i fenyloetylo-pirymido[2,1-*f*]purynodionów [245].

Omawiana modyfikacja w mniejszym stopniu wpływa na zmianę aktywności względem pozostałych podtypów receptorów adenozyowych. Wzrost powinowactwa w kierunku receptorów rA_1 i hA_{2B} jest zauważalny jedynie w przypadku wprowadzenia łącznika etylowego dla pochodnych 1,3-dipropylowych i 1,3-dibutyłowych.



Rysunek 3.15 Zestawienie wartości pK_i względem rA_{2A} AR dla niepodstawionych analogów hydroksyfenyłowych i hydroksyfenyloetyłowych badanych pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu.

Ad 3. Znaczenie podstawnika w pierścieniu benzenowym.

W grupie badanych pochodnych kwasowych, estrowych, aminowych oraz amidowych hydroksyfenylo- i hydroksyfenyloetylo-piryrido[2,1-f]purynodionu podstawienie wodoru ugrupowania fenolowego nie poprawiło aktywności w kierunku receptora adenozyнового rA_{2A} , przy czym najlepiej tolerowany był podstawnik dietyloaminoetylowy. Jednocześnie wpływ podstawienia wodoru grupy fenolowej był znacznie korzystniejszy, jeśli brać pod uwagę powinowactwo względem receptora rA_1 . Jednoznacznie negatywne oddziaływanie na ten profil aktywności wywierały jedynie podstawniki z wolną grupą karboksylową lub podstawniki o charakterze estrowym. Pozostałe modyfikacje, zwłaszcza w grupie pochodnych dietylowych, dipropylowych i dibutylowych, skutkowały zwykle wzrostem powinowactwa względem szczurzych receptorów adenozyновых A_1 .

Najkorzystniejszy wpływ na aktywność badanych połączeń w kierunku receptora hA_{2B} uzyskano wprowadzając ugrupowanie pirolidynyloetylo-acetamidowe. Modyfikacja ta była również sprzyjająca dla aktywności w kierunku receptorów hA_3 wśród pochodnych fenylowych. Podstawienie wodoru grupy fenolowej ugrupowaniem estru etylowego kwasu masłowego było z kolei korzystne dla aktywności pochodnych fenyloetylowych do tego podtypu receptora.

Ad. 4. Różnice międzygatunkowe w aktywności badanych połączeń.

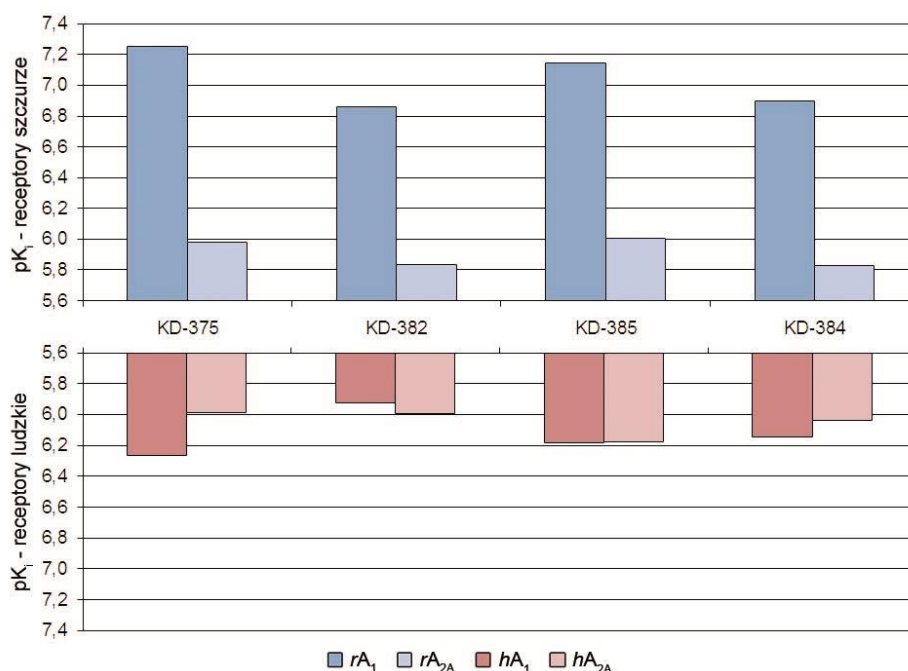
W grupie receptorów adenozyowych, podtyp A_3 charakteryzuje się najmniejszym stopniem homologii sekwencji pomiędzy formą ludzką a formą szczurzą. Różnice w składzie aminokwasowym sekwencji wynoszą w tym wypadku prawie 30% [18]. Fakt ten znajduje bezpośrednie przełożenie na parametry farmakologiczne ligandów receptora A_3 [17]. Przykładowo, antagoniści z grupy ksantyn: XAC (poch. 8-fenyloksantyny), a także DPCPX (poch. 8-cyklopentyloksantyny) nie wykazują aktywności w kierunku szczurzego receptora A_3 (IC_{50} w testach wiązania radioligandów $>100,000$ nM), mimo że oddziałują z receptorem ludzkim (wartości K_i odpowiednio: XAC - 71 nM i DPCPX - 759 nM) [252]. Doniesienia literaturowe o szczególnych różnicach międzygatunkowych w farmakologii receptora adenozyowego A_3 znajdują potwierdzenie w prezentowanych wynikach badań, a mianowicie: żadna z przeanalizowanych pochodnych, dla których stwierdzono submikromolowe powinowactwo względem ludzkiego receptora A_3 , nie była aktywna względem szczurzej formy receptora.

Istotne różnice międzygatunkowe we właściwościach farmakologicznych można zaobserwować również dla innych podtypów receptora adenozyowego, mimo znacznie

wyższej homologii niż w przypadku receptora A_3 . Klasycznym przykładem jest antagonistą A_{2B} AR - MRS1754 (N-(4-cyjanofenilo)-2-(4-(2,6-diokso-1,3-dipropylo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-puryn-8-yl)fenoksy)acetamid), który w przypadku ludzkich receptorów charakteryzuje się ponad 200-krotną selektywnością względem pozostałych podtypów receptorów (K_i dla $hA_1 = 403$ nM; K_i dla $hA_{2A} = 503$ nM; K_i dla $hA_{2B} = 1,97$ nM; K_i dla $hA_3 = 570$ nM). Selektywność tego związku ulega zmniejszeniu w przypadku receptorów szczurzych, w następstwie wyraźnego wzrostu powinowactwa względem podtypu A_1 ($K_i = 16,8$ nM), przy jednoczesnym spadku aktywności względem podtypu A_{2B} ($K_i = 12,8$ nM) [253].

Wzrost aktywności względem szczurzych receptorów A_1 w porównaniu do ludzkiej formy opisano również w przypadku pochodnych 8-styryloksantyn, będących analogami strukturalnymi omawianych w ramach niniejszej pracy pirymido[2,1-f]purynodionów (MSX-2: hA_1 $K_i = 2500$ nM, rA_1 $K_i = 900$ nM; KW-6002: hA_1 $K_i = 841$ nM, rA_1 $K_i = 230$ nM) [17]. Analiza wyników, uzyskanych dla badanych pochodnych 1,3-dipropylo- i 1,3-dibutylo-pirymido[2,1-f]purynodionu, potwierdziła i w tym wypadku występowanie podobnej zależności.

W grupie pochodnych fenylowych, związki silniej oddziałujące ze szczurzym receptorem A_1 (selektywność do rA_1 względem rA_{2A} , odpowiednio: KD-375 - 18,8; KD-382 - 10,7; KD-385 - 13,7; KD-384 - 11,7), wiązały się nieselektywnie do ludzkich receptorów A_1 i A_{2A} (zbliżone powinowactwo względem obu podtypów ludzkich receptorów adenozynowych) (Rysunek 3.16).

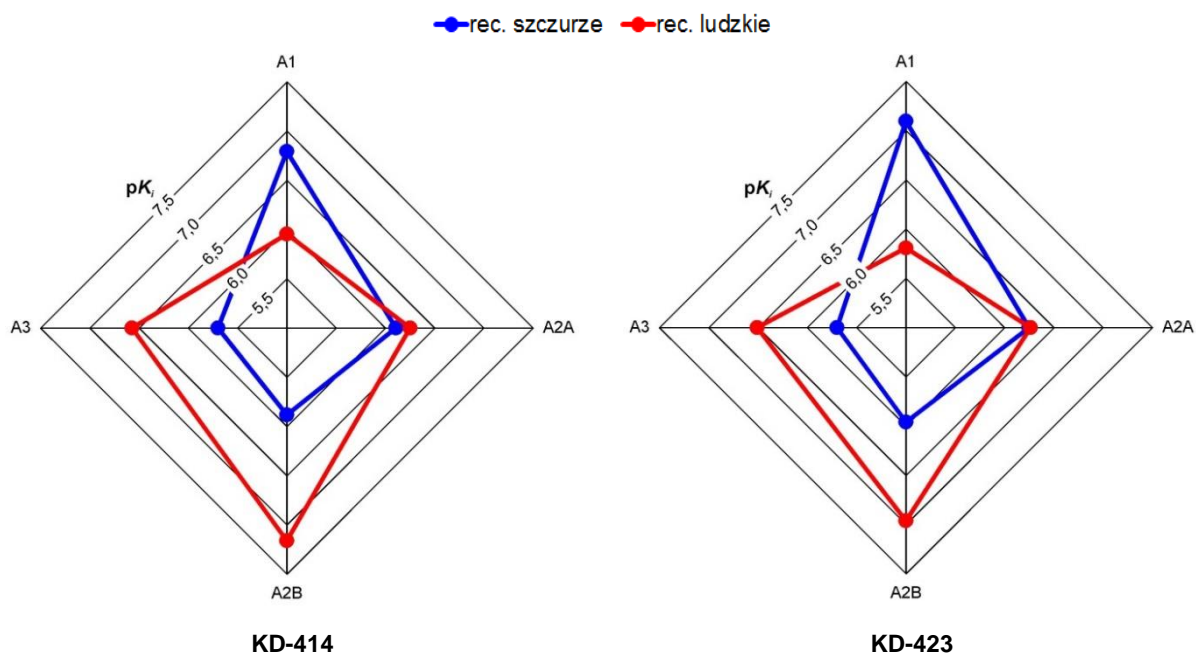


Rysunek 3.16 Porównanie aktywności wybranych fenylowych pochodnych 1,3-dibutylo-pirymido[2,1-f]purynodionu względem szczurzych i ludzkich receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A} .

Spowodowane to było faktem, że powinowactwo względem receptora A_{2A} zmieniało się w niewielkim stopniu pomiędzy gatunkami, natomiast wyraźnie spadało powinowactwo względem A_1 , gdy porównywano wyniki dla receptorów szczurzych i ludzkich. Dla pochodnych fenyloetylowych zaobserwowano podobne zjawisko. Tutaj również stwierdzono zmianę powinowactwa względem receptorów A_1 dla przebadanych pochodnych dipropyloowych i dibutyloowych, podczas gdy powinowactwo względem A_{2A} zmieniało się w niewielkim stopniu (**Rysunek 3.17**).

Siła wiązania do receptorów A_{2A} zmieniała się dla odmiany wyraźniej w przypadku pochodnych dimetyloowych i dietyloowych. Związki te wiążą się zdecydowanie słabiej do ludzkich receptorów A_{2A} niż do form szczurzych.

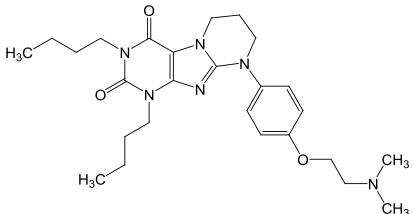
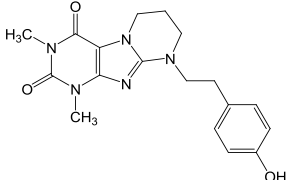
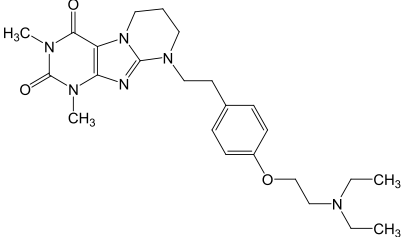
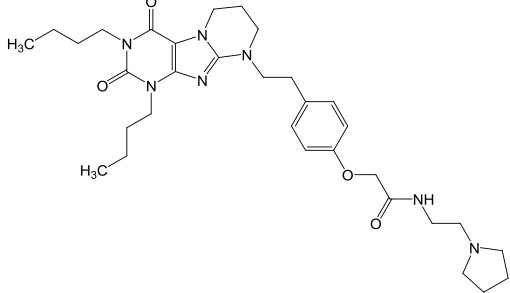
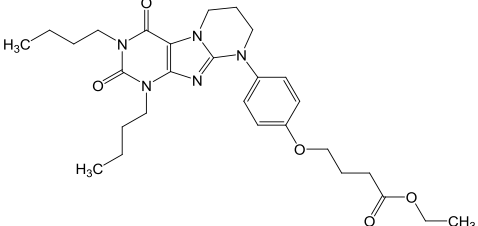
W ramach uzupełnienia do stwierdzenia, że związki z grupy pirymido[2,1-*f*]purynodionu nie oddziałują z receptorem szczurzym A_3 stwierdzono także, że w każdym z analizowanych przypadków powinowactwo do receptora rA_{2B} było gorsze niż dla receptora hA_{2B} .



Rysunek 3.17 Porównanie profilu aktywności związków KD-414 i KD-423 dla szczurzych i ludzkich podtypów receptorów adenylicznych.

Przeprowadzone badania farmakologiczne pozwoliły wskazać w analizowanej grupie **związki specyficzne względem poszczególnych podtypów receptorów** (Tabela 3.5). Najbardziej aktywny ligand szczurzego receptora A_1 w badanej grupie to KD-375 (K_i dla $rA_1 = 56$ nM, ponad 20-krotna selektywność względem innych podtypów szczurzych receptorów adenylicznych). Związek ten jest jednocześnie najlepszym ligandem ludzkiego receptora A_1 jednak ze względu na blisko 10-krotny spadek aktywności wobec receptora ludzkiego, jest on też mniej selektywny (K_i dla $hA_1 = 539$ nM, przy K_i dla $hA_{2A} = 1030$ nM).

Tabela 3.5 Charakterystyka farmakologiczna najaktywniejszych ligandów receptorów adenozynowych.

Związek	Wartości K_i	
 <p>KD-375</p>	<p>rA_1 - 56 nM</p> <p>rA_{2A} - 1050 nM</p> <p>rA_{2B} > 1000 nM</p> <p>rA_3 >> 1000 nM</p>	<p>hA_1 - 539 nM</p> <p>hA_{2A} - 1030 nM</p> <p>hA_{2B} > 1000 nM</p> <p>hA_3 > 1000 nM</p>
 <p>KD-114</p>	<p>rA_1 - ok. 25000 nM</p> <p>rA_{2A} - 230 nM</p>	<p>hA_1 > 25000 nM</p> <p>hA_{2A} - 630 nM</p> <p>hA_{2B} > 7200 nM</p> <p>hA_3 > 10000 nM</p>
 <p>KD-357</p>	<p>rA_1 > 1000 nM</p> <p>rA_{2A} - 339 nM</p> <p>rA_{2B} > 1000 nM</p> <p>rA_3 >> 1000 nM</p>	<p>hA_1 > 1000 nM</p> <p>hA_{2A} - 559 nM</p> <p>hA_{2B} > 1000 nM</p> <p>hA_3 >> 1000 nM</p>
 <p>KD-414</p>	<p>rA_1 - 161 nM</p> <p>rA_{2A} - 779 nM</p> <p>rA_{2B} - 1310 nM</p> <p>rA_3 >> 1000 nM</p>	<p>hA_1 - 1100 nM</p> <p>hA_{2A} - 560 nM</p> <p>hA_{2B} - 69 nM</p> <p>hA_3 - 268 nM</p>
 <p>KD-379</p>	<p>rA_1 > 1000 nM</p> <p>rA_{2A} > 1000 nM</p>	<p>hA_{2B} > 1000 nM</p> <p>hA_3 - 267 nM</p>

Selektywne ligandy receptora A_{2A} zidentyfikowano przede wszystkim w grupie dimetylowych i dietylowych pochodnych fenyloetylo-pirymido-purynodionu. Związek KD-114, z niepodstawioną grupą fenolową, jest najaktywniejszym ligandem rA_{2A} . W grupie połączeń selektywnych względem hA_{2A} najlepszy okazał się związek KD-357 (K_i dla $hA_{2A} = 559$ nM, dla pozostałych podtypów $K_i > 1000$).

Z receptorem hA_{2B} najsilniej oddziałuje KD-414 ($K_i = 69$ nM), ale charakteryzuje się, jak i inne zidentyfikowane w toku przeprowadzonych badań ligandy hA_{2B} , istotną aktywnością w kierunku pozostałych podtypów ludzkich receptorów adenozynowych.

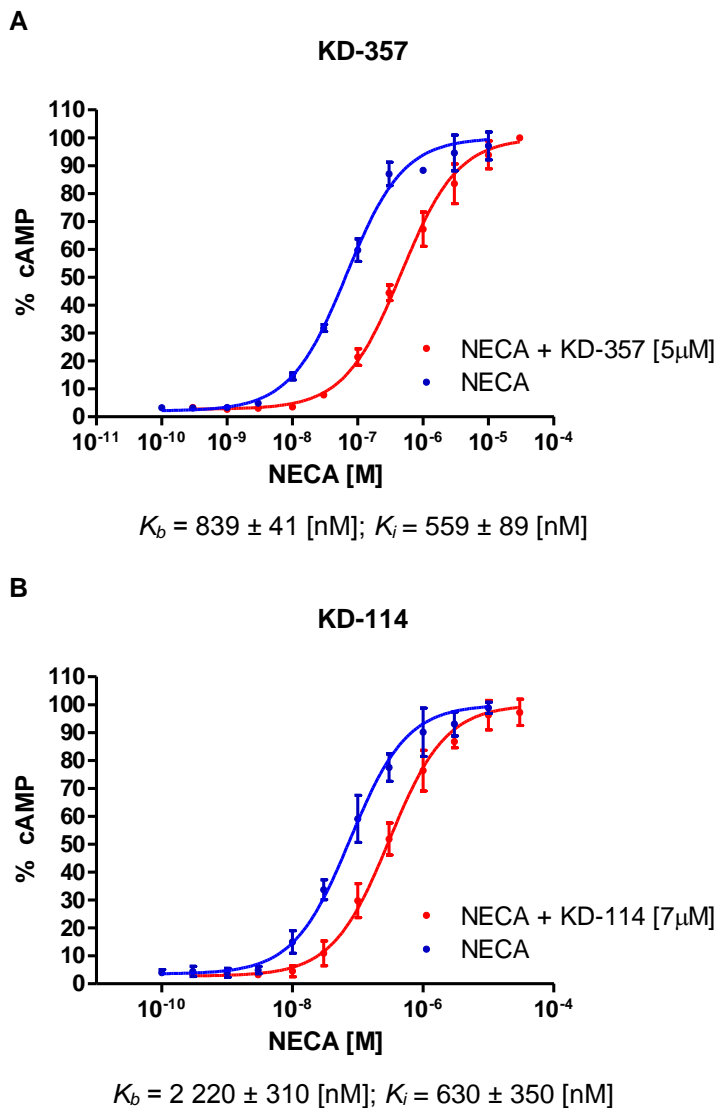
Najsilniej oddziałującym z receptorem hA_3 , a przy tym selektywnym w porównaniu do rA_1 , rA_{2A} i hA_{2B} , jest związek KD-379 (K_i dla $hA_3 = 267$ nM).

Podsumowując, uzyskane wyniki badań kompetycyjnego wiązania radioligandów pozwoliły na identyfikację istotnych elementów strukturalnych, odpowiedzialnych za specyficzność otrzymanych związków względem poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych oraz na wskazanie fragmentów odpowiedzialnych za znaczne różnice w aktywności międzygatunkowej badanych ligandów. Ostateczna aktywność i selektywność połączeń była wypadkową wszystkich trzech rozważanych kierunków modyfikacji w badanej grupie.

3.2.2. Ocena aktywności wewnętrznej wybranych połączeń

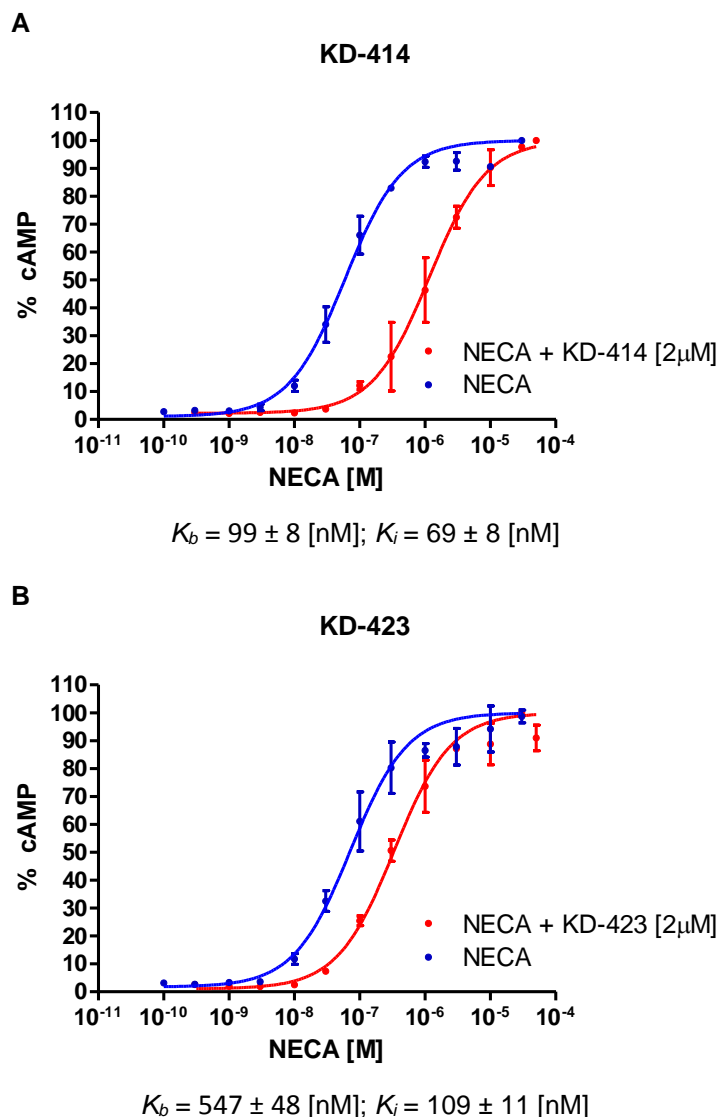
Uzupełnieniem dla przeprowadzonych badań powinowactwa było wykonanie oznaczenia aktywności wewnętrznej wybranych połączeń. Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowych z nadekspresją ludzkich receptorów adenozynowych A_{2A} lub A_{2B} , a więc obu podtypów oddziałujących z rodziną białek G_s . W powyższych modelach możliwa jest obserwacja bezpośredniego wpływu ligandów receptora na produkcję cyklicznego AMP, bez konieczności wstępnej stymulacji komórek w kierunku produkcji cAMP za pomocą forskoliny, jak to ma miejsce w przypadku eksperymentów dla receptorów oddziałujących z białkami G_i . Ponieważ wcześniejsze badania wskazywały, że wybrane ligandy z grupy pirymido[2,1-*f*]purynodionów mają charakter antagonistów w kierunku receptorów adenozynowych A_{2A} [245, 247, 250, 251], zaplanowane eksperymenty miały na celu weryfikację tego mechanizmu działania dla najbardziej aktywnych i jednocześnie selektywnych ligandów A_{2A} AR i A_{2B} AR w omawianej serii połączeń. W związku z powyższym, w przeprowadzonych testach akumulacji cAMP, badano wpływ obecności badanego związku na przebieg krzywych stymulacji produkcji wtórnego przekaźnika przez nieselektywnego agonistę receptorów adenozynowych - NECA, w liniach komórkowych z nadekspresją jednego lub drugiego podtypu receptora.

Stwierdzono, że badane ligandy - KD-357 i KD-114 działają jak antagoniści receptora adenyzyowego A_{2A} . Oba związki powodują przesunięcie krzywych stężenie-odpowiedź dla agonisty w kierunku wyższych stężeń (**Rysunek 3.18**). Zmiana wartości EC_{50} dla NECA wynosiła odpowiednio: 460 nM wobec 68 nM, dla związku KD-357 zastosowanego w stężeniu 5 μ M oraz 302 nM wobec 77 nM, dla związku KD-114 w stężeniu 7 μ M.



Rysunek 3.18 Oznaczenie zmian poziomu cAMP w komórkach linii CHO z nadekspresją ludzkiego receptora adenyzyowego A_{2A} w odpowiedzi na różne stężenia agonisty - NECA, wobec braku i w obecności związków: KD-357 (**A**) i KD-114 (**B**). Przedstawione krzywe oraz wartości K_b zostały wyznaczone w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w dwóch powtórzeniach.

Stwierdzono ponadto, że wyznaczona w toku analizy wyników wartość parametru K_b dla związku KD-357 (839 nM) jest porównywalna z wartością K_i wyznaczoną w testach radioreceptorowych (559 nM). Natomiast związek KD-114, prawdopodobnie w wyniku gorszej rozpuszczalności, charakteryzował się słabszym działaniem w teście funkcjonalnym ($K_b = 2220$ nM) niż w teście kompetycyjnego wiązania radioliganda ($K_i = 630$ nM).



Rysunek 3.19 Oznaczenie zmian poziomu cAMP w komórkach linii CHO z nadekspresją ludzkiego receptora adenylozynowego A_{2B} w odpowiedzi na różne stężenia agonisty - NECA, wobec braku i w obecności związków: KD-414 (A) i KD-423 (B). Przedstawione krzywe oraz wartości K_b zostały wyznaczone w oparciu o trzy niezależne eksperymenty, każdy wykonany w dwóch powtórzeniach.

Podobnie jak w przypadku receptora A_{2A} , dla badanych ligandów receptora adenylozynowego A_{2B} (KD-414 i KD-423), stwierdzono efekty charakterystyczne dla aktywności antagonistycznej (**Rysunek 3.19**). Związek KD-414, zastosowany w stężeniu $2 \mu\text{M}$, powodował zmianę wartości EC_{50} dla agonisty z 60 nM do 1164 nM . Natomiast związek KD-423, o niższym powinowactwie względem receptora A_{2B} , zastosowany w identycznym stężeniu co związek KD-414, powodował mniejsze przesunięcie krzywej stężenie-efekt dla NECA ($EC_{50} - 73 \text{ nM}$ vs. 335 nM).

3.3. Opracowanie modeli badawczych i ocena aktywności potencjalnych ligandów receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz receptora sierocego GPR18

Celem kolejnego etapu badań było opracowanie modeli komórkowych do badań farmakologii molekularnej ludzkich receptorów kannabinoidowych CB₁ (*hCB₁R*) i CB₂ (*hCB₂R*). Zaplanowano uzyskanie ekspresji rekombinowanych białek receptorowych w komórkach linii CHO z wykorzystaniem systemu ekspresji retrowirusowej. Transdukcja retrowirusowa stanowi interesującą alternatywę dla klasycznych technik transfekcji stabilnej. Zastosowanie cząstki wirusa jako nośnika dla cDNA receptora skutkuje satysfakcjonującym poziomem ekspresji oraz wysoką wydajnością produkcji stabilnych klonów.

W ramach badań związanych z receptorami kannabinoidowymi, przeprowadzono również optymalizację modelu badawczego do testów farmakologii molekularnej receptora sierocego GPR18, spokrewnionego z receptorami kannabinoidowymi oraz dokonano oceny właściwości farmakologicznych pochodnych imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu jako ligandów receptorów CB₁R, CB₂R oraz GPR18.

3.3.1. Otrzymanie linii CHO-*hCB₁R* i CHO-*hCB₂R*

W eksperymentach inżynierii genetycznej wykorzystane zostały plazmidy: pLXSN-*hCB₁R* i pLXSN-*hCB₂R*, zawierające sekwencje cDNA ludzkich receptorów kannabinoidowych, wprowadzone do wektora retrowirusowego pLXSN. Sekwencje genów receptorów były zgodne z wpisami bazy danych GenBank, odpowiednio: AF107262 i X74328, co zostało potwierdzone na drodze sekwencjonowania.

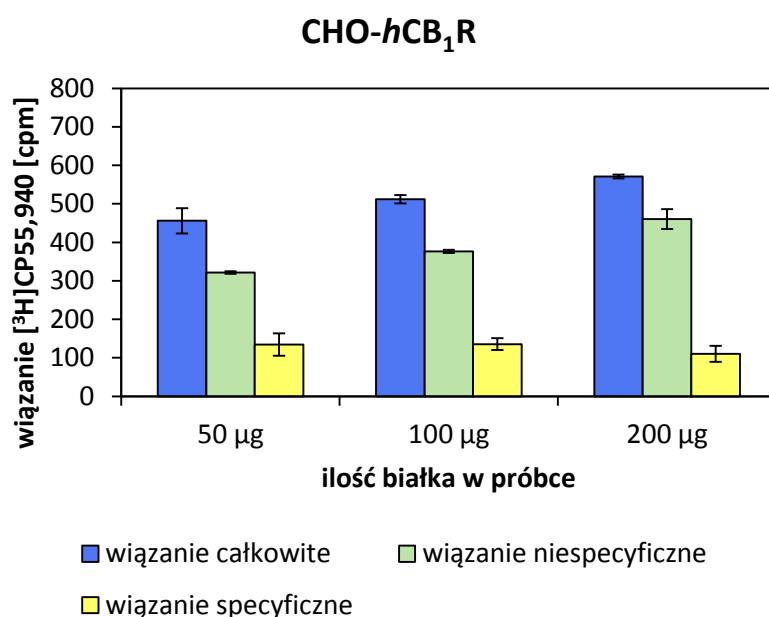
W pierwszej kolejności linia komórek pakujących GP+*envAm12* została kotransfekowana w dwóch osobnych eksperymentach: jednym z plazmidów zawierającym sekwencję receptora kannabinoidowego CB₁ lub CB₂ (odpowiednio: pLXSN-*hCB₁R* lub pLXSN-*hCB₂R*) oraz plazmidem pcDNA3.1-VSV-G, zawierającym sekwencję białka G osłonki lipidowej wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV-G), którego zadaniem jest zwiększenie wydajności infekcji różnych linii komórek docelowych.

Po 48 godzinach od transfekcji, cząstki wirusowe wytwarzane do pożywki przez komórki pakujące zostały wykorzystane do zainfekowania komórek linii docelowej - CHO. W kolejnym etapie prowadzona była selekcja transdukowanej linii komórkowej z wykorzystaniem genetycyny w stężeniu 800 µg/ml, która zakończona została po okresie 2 tygodni. W efekcie uzyskano dwie linie komórkowe: CHO-*hCB₁R* i CHO-*hCB₂R*, które scharakteryzowano dokładniej w kolejnych eksperymentach.

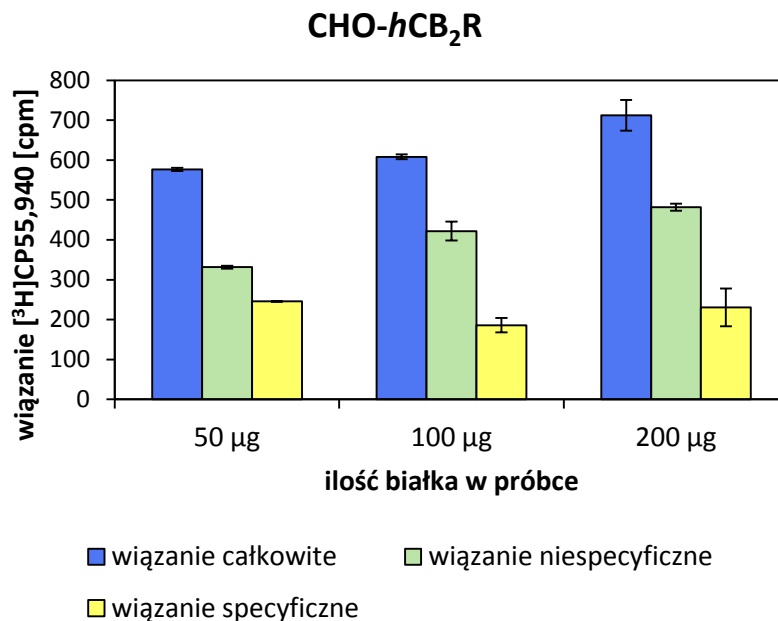
3.3.2. Ocena parametrów wiązania [^3H]CP99,540 do preparatu błon komórek CHO-*hCB*₁R i CHO-*hCB*₂R

W badaniach radioreceptorowych receptorów kannabinoidowych wykorzystany został ligand: [^3H]CP55,940 ([^3H]-(-)-*cis*-3-[2-hydroksy-4-(1,1-dimetylo-heptylo)fenylo]-*trans*-4-(3-hydroksy-propylo)cykloheksanol) [254]. Związek ten jest nieselektywnym agonistą receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂. Wartości stałej K_d tego liganda wynoszą odpowiednio: 0,58 nM dla *rCB*₁R, 2,4 nM dla *hCB*₁R i 0,7 nM dla *hCB*₂R. Parametry fizykochemiczne CP55,940, a w szczególności wysoka lipofilowość tego związku, skutkują względnie wysokim poziomem niespecyficznego wiązania radioliganda, co w pewnym stopniu utrudnia przeprowadzenie badań radioreceptorowych. W związku z powyższym konieczne jest wprowadzenie szczególnych warunków eksperymentu, pozwalających na zminimalizowanie tego zjawiska (stosowanie dodatku 0,1% surowicy albuminy wołowej - BSA do buforu płuczącego, preinkubacja filtrów w 0,3% roztworze PEI i suszenie ich w temperaturze 50°C przez 1,5 godziny przed dodaniem płynu scyntylacyjnego).

Wstępne badania radioreceptorowe dla otrzymanych linii komórkowych, przeprowadzone z wykorzystaniem zmiennych ilości białka w próbce, potwierdziły występowanie specyficznego wiązania radioliganda, związanego z obecnością receptorów kannabinoidowych w preparatach błon uzyskanych z rekombinowanych komórek (**Rysunek 3.20** i **3.21**). Wiązanie całkowite zostało wyznaczone w obecności DMSO, natomiast wiązanie niespecyficzne w obecności 10 μM stężenia nieznakowanego CP55,940.



Rysunek 3.20 Całkowite, niespecyficzne i specyficzne wiązanie radioliganda [^3H]CP55,940 do receptorów kannabinoidowych CB₁ w funkcji ilości białka w próbce (50, 100 i 200 μg). Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach.



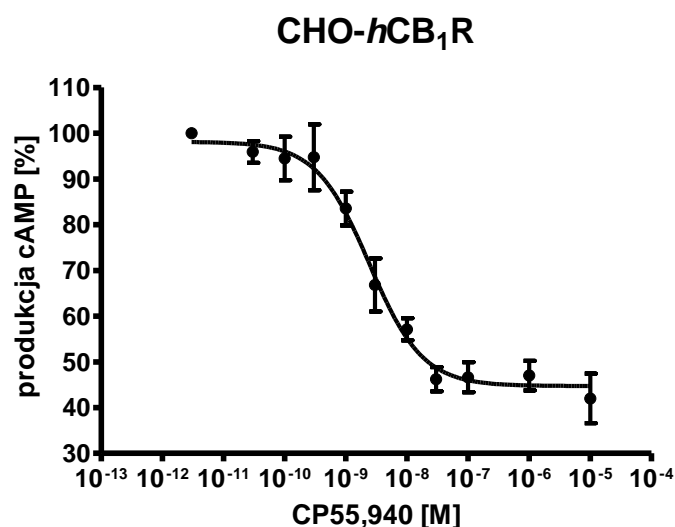
Rysunek 3.21 Całkowite, niespecyficzne i specyficzne wiązanie radioliganda [³H]CP55,940 do receptorów kannabinoidowych CB₂ w funkcji ilości białka w próbce (50, 100 i 200 µg). Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach.

W oparciu o uzyskane wyniki, wyznaczona została optymalna ilość białka, jaka powinna być użyta w dalszych eksperymentach farmakologii molekularnej. W przypadku obu podtypów receptorów kannabinoidowych procent wiązania specyficznego [³H]CP55,940 (wyznaczony ze wzoru - wiązanie specyficzne / wiązanie całkowite × 100%) był najwyższy w przypadku zastosowania 50 µg białka/próbkę i wynosił odpowiednio: 29% dla CB₁R i 43% dla CB₂R. Mimo względnie wysokiego wiązania niespecyficznego, uzyskany w tych warunkach zakres pomiarowy umożliwia wykorzystanie otrzymanych preparatów błon w testach kompetycyjnego wiązania ligandów receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂.

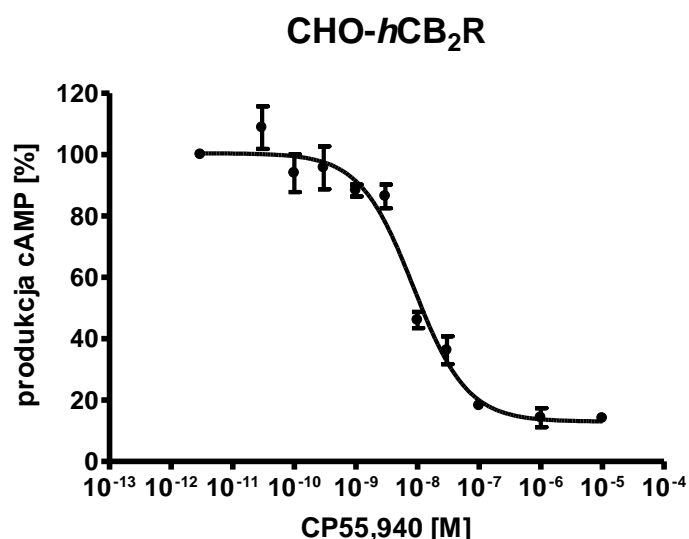
3.3.3. Ocena funkcjonalna otrzymanych linii CHO-*hCB*₁R i CHO-*hCB*₂R w teście akumulacji cAMP

W celu sprawdzenia, czy rekombinowane receptory ulegające stabilnej ekspresji w otrzymanych liniach komórkowych umożliwiają aktywację wtórnych przekaźników wewnątrzkomórkowych, wykonano oznaczenie zmian wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP w odpowiedzi na działanie nieselektywnego agonisty receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ - CP55,940. Ponieważ oba podtypy receptora oddziałują z białkiem G_i, konieczne było zastosowanie w eksperymentach forskoliny, bezpośrednio stymulującej cyklazę adenylanową.

W toku przeprowadzonych testów wykazano, że w przypadku obu opracowanych wcześniej linii komórkowych, powstają w pełni funkcjonalne białka receptorowe. Zastosowanie agonisty receptorów kannabinoidowych, skutkowało obniżeniem aktywności cyklazy adenylanowej. Otrzymane krzywe zależności poziomu cAMP od stężenia CP55,940 przedstawione zostały na **Rysunku 3.22** i **3.23**. Wartości parametrów EC_{50} wyznaczonych dla badanego liganda są zgodne z danymi literaturowymi (**Tabela 3.6**) [255].



Rysunek 3.22 Wykres zależności poziomu cAMP od stężenia CP55,940 w komórkach linii CHO-*hCB*₁R preinkubowanych z 10 μ M roztworem forskoliny. Wykres reprezentuje średnią trzech niezależnych eksperymentów, przeprowadzonych każdorazowo w dwóch powtórzeniach. Produkcja cAMP wyrażona została jako procent poziomu wtórnego przekaźnika uzyskanego w próbie kontrolnej bez dodatku CP55,940.



Rysunek 3.23 Wykres zależności poziomu cAMP od stężenia CP55,940 w komórkach linii CHO-*hCB*₂R preinkubowanych z 10 μ M roztworem forskoliny. Wykres reprezentuje średnią trzech niezależnych eksperymentów, przeprowadzonych każdorazowo w dwóch powtórzeniach. Produkcja cAMP wyrażona została jako procent poziomu wtórnego przekaźnika uzyskanego w próbie kontrolnej bez dodatku CP55,940.

Tabela 3.6 Zestawienie wyników przeprowadzonych testów akumulacji cAMP dla otrzymanych linii komórkowych ze stabilną ekspresją receptorów kannabinoidowych oraz analogicznych danych literaturowych dla rekombinowanych linii komórek CHO [255].

Badany receptor	EC_{50} dla CP55,940 [nM] na podstawie niniejszej pracy	EC_{50} dla CP55,940 [nM] wg C.C. Felder, et al. 1995
CB ₁ R	2,45 ± 0,36	1,83 ± 0,24
CB ₂ R	8,76 ± 0,84	2,89 ± 0,01

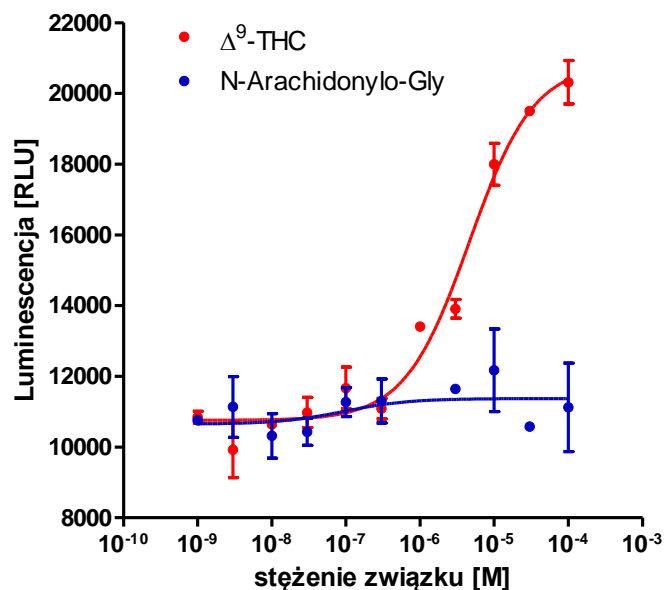
Podsumowując przeprowadzone badania farmakologiczne stwierdzono, że linie komórkowe CHO-*hCB*₁R i CHO-*hCB*₂R charakteryzują się satysfakcjonującym poziomem ekspresji białek rekombinowanych, który pozwala na ich zastosowanie w radioreceptorowych testach powinowactwa. Dodatkowo wykazano, że rekombinowane receptory pozostają funkcjonalne, co umożliwia wykorzystanie opracowanych linii komórkowych także w testach oceniających aktywność wewnętrzną nowych połączeń.

3.3.4. Charakterystyka referencyjnych ligandów receptora GPR18 w teście aktywacji szlaku β -arrestynowego

Ze względu na brak dostępności aktywnych radioligandów receptora GPR18, nie jest możliwe przeprowadzenie oznaczeń powinowactwa nowych połączeń w kierunku tego receptora klasycznymi metodami radioreceptorowymi. Alternatywą jest zastosowanie odpowiednich testów funkcjonalnych. Przykładem może być test, opierający się na chemiluminescencyjnej detekcji kompleksów: receptor sierocy- β -arrestyna, powstających w następstwie działania ligandów receptora [256]. Podstawą zjawiska chemiluminescencji w omawianym teście jest komplementacja dwóch fragmentów β -galaktozydazy, występująca przy aktywacji β -arrestynowego szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego. Mierzony sygnał jest wysoce specyficzny dla rekombinowanych receptorów sierocych, a konstrukcja testu eliminuje ryzyko artefaktów wynikających z aktywacji innych endogennych receptorów (p. opis testu β -arrestin PathHunter™ w **Rozdziale 5.4.6.2**).

Opisany test został wykorzystany do oznaczenia aktywności badanych związków w kierunku receptora GPR18. We wstępnych etapach optymalizacji testu rekrutacji β -arrestyny podjęto próbę potwierdzenia aktywności dwóch potencjalnych ligandów receptora GPR18, wytypowanych w oparciu o dostępne doniesienia literaturowe, a mianowicie: Δ^9 -THC i *N*-arachidonyloglicyny (NAGly) [77, 78, 80].

Wynik przeprowadzonych eksperymentów przedstawia **Rysunek 3.24**.



Rysunek 3.24 Krzywa zależności zmierzonych sygnałów luminescencji od stężenia badanych związków w teście aktywacji szlaku β -arrestynowego (β -arrestin PathHunter™). Oznaczenie wykonano w dwóch powtórzeniach dla Δ^9 -THC i NAGly.

Uzyskane rezultaty potwierdziły postulowaną aktywność Δ^9 -THC jako agonisty receptorów GPR18. Uzyskana wartość $EC_{50} = 4,61 \mu\text{M}$ była porównywalna z wynikami badań opisującymi aktywność agonistyczną Δ^9 -THC w teście aktywacji kinazy MAPK w komórkach HEK293 ze stabilną nadekspresją receptorów GPR18 ($EC_{50} = 0,96 \mu\text{M}$) [77]. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań, Δ^9 -THC w stężeniu $10 \mu\text{M}$ został wytypowany do wykorzystania w dalszych eksperymentach jako referencyjny agonista GPR18 w teście rekrutacji β -arrestyny.

Drugi z analizowanych związków - NAGly, nie wykazywał aktywności w zaproponowanym modelu badawczym. Obserwacja ta dodaje argumentów do dyskusji, w której niektóre doniesienia literaturowe kwestionują zdolność NAGly do wywołania odpowiedzi związanej z receptorami GPR18 [257, 258]. Z całą pewnością konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań pozwalających wyjaśnić rolę tego związku w sygnalizacji zależnej od GPR18.

3.3.5. Pochodne imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu jako ligandy receptorów CB₁R, CB₂R oraz GPR18

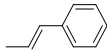
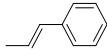

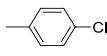



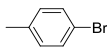
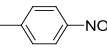
Wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM doprowadziły do otrzymania pochodnych imidazolu, oddziałujących z receptorem GABA_A. Uzyskane zostały ligandy o mikromolowym powinowactwie do wspomnianych receptorów [259, 260].


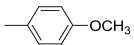

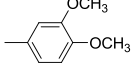
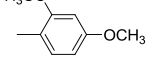
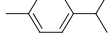
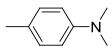
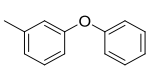
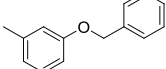
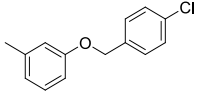
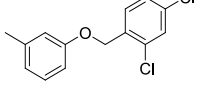
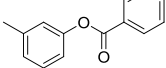
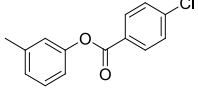
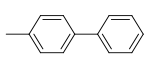
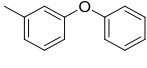
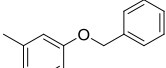
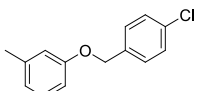
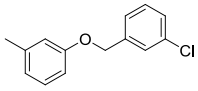
Biorąc pod uwagę lipofilowy charakter tych połączeń oraz doniesienia wskazujące na interakcję wybranych endokannabinoidów z receptorem GABA_A [261], podjęto decyzję o przebadaniu dostępnej biblioteki dwupierścieniowych pochodnych imidazol-4-onu w kierunku ich zdolności do oddziaływania z klasycznymi receptorami kannabinoidowymi CB₁ i CB₂ oraz spokrewnionym receptorem GPR18.

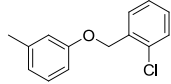
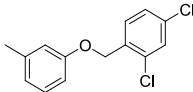
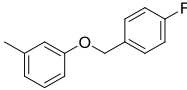
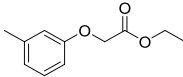
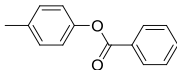
Seria 41 pochodnych imidazo[2,1-*b*]tiazolu, imidazo[2,1-*b*]tiazyny i imidazo[2,1-*b*]tiazepiny została oznaczona w testach kompetycyjnego wiązania radioliganda do preparatów błon komórek: kory mózgowej szczura (szczurzy receptor kannabinoidowy CB₁) oraz opracowanych wcześniej linii CHO-*h*CB₁R i CHO-*h*CB₂R, charakteryzujących się stabilną ekspresją ludzkich receptorów kannabinoidowych. Zastosowanym radioligandem był związek: [³H]CP55,940 [254]. We wstępnym etapie przeprowadzono ocenę zdolności badanych połączeń (w stężeniu 10 μM) do hamowania wiązania radioliganda do receptorów CB₁R w korze mózgowej szczura oraz do rekombinowanych ludzkich receptorów CB₂R. W sytuacji gdy uzyskano wynik większy niż 50%, oznaczenia były wykonywane w pełnym zakresie stężeń, w połączeniu z wyznaczeniem stałej powinowactwa *K_i*. Ponadto dla najbardziej aktywnych ligandów szczurzego receptora CB₁, stała *K_i* wyznaczona została również dla ludzkiego receptora CB₁. Wyniki testów powinowactwa zostały przedstawione w Tabeli 3.7 oraz Załączniku 8.

Tabela 3.7 Wyniki testów kompetycyjnego wiązania [³H]CP55,940 do receptorów *r*CB₁R, *h*CB₁R i *h*CB₂R.

Związek	R ¹	Testy wiązania [³ H]CP55,940	
		szczurzy CB ₁ R <i>K_i</i> ± SEM [μM]	ludzki CB ₂ R <i>K_i</i> ± SEM [μM]
wzór ogólny A; n=1			
ChM-53	H	>> 10 (13 % ± 12) ^a	>> 10 (6 % ± 12) ^a
ChM-51	COOC ₂ H ₅	>> 10 (0 % ± 8) ^a	>> 10 (-5 % ± 13) ^a

wzór ogólny B; n=1			
ChM-54	H	>> 10 (15 % ± 2) ^a	>> 10 (3 % ± 10) ^a
ChM-52	COOC ₂ H ₅	> 10 (38 % ± 2) ^a	>> 10 (-3 % ± 5) ^a
wzór ogólny A; n=2			
ChM-50	H	>> 10 (4 % ± 5) ^a	>> 10 (9 % ± 6) ^a
wzór ogólny B; n=2			
ChM-49	H	7.68 ± 1.68	>> 10 (5 % ± 4) ^a
wzór ogólny A; n=3			
ChM-48	H	21.3 ± 2.17	>> 10 (10 % ± 2) ^a
wzór ogólny B; n=3			
ChM-18	H	3.94 ± 0.10^b 1.34 ± 0.37^b (<i>hCb₁</i>)	>> 10 (14 % ± 1) ^a
wzór ogólny C			
ChM-44		>> 10 (-14 % ± 3) ^a	>> 10 (19 % ± 4) ^a
wzór ogólny D			
ChM-43		>> 10 (18 % ± 4) ^a	≈ 10 (43 % ± 10) ^a
ChM-13		>> 10 (1 % ± 6) ^a	≈ 10 (52 % ± 16) ^a
B-54		>> 10 (15 % ± 2) ^a	>> 10 (23% ± 13) ^a
ChM-6		>> 10 (6 % ± 6) ^a	>> 10 (2% ± 11) ^a
ChM-1		>> 10 (5% ± 5) ^a	>> 10 (21% ± 5) ^a
ChM-40		>> 10 (6 % ± 7) ^a	≈ 10 (45 % ± 3) ^a
ChM-3		>> 10 (21 % ± 6) ^a	≈ 10 (60 % ± 9) ^a
B-56		>> 10 (23 % ± 5) ^a	≈ 10 (45 % ± 14) ^a

ChM-20		>> 10 (8 % ± 4) ^a	>> 10 (10 % ± 6) ^a
ChM-2		>> 10 (5 % ± 10) ^a	>> 10 (6 % ± 3) ^a
ChM-12		>> 10 (4 % ± 3) ^a	≈ 10 (45 % ± 12) ^a
ChM-33		>> 10 (3 % ± 9) ^a	≈ 10 (46 % ± 15) ^a
ChM-32		>> 10 (12 % ± 4) ^a	≈ 10 (64 % ± 18) ^a
ChM-47		>> 10 (6 % ± 5) ^a	>> 10 (17 % ± 9) ^a
ChM-4		>> 10 (6 % ± 6) ^a	≈ 10 (57 % ± 3) ^a
ChM-46		6.58 ± 1.77	>> 10 (9 % ± 6) ^a
CB-3		4.22 ± 1.36^b	1.11 ± 0.01
CB-5		8.24 ± 4.11^b	4.03 ± 0.51
CB-4		0.55 ± 0.22^b 2.09 ± 0.08 (hCB₁)	0.95 ± 0.27
CB-2		>> 10 (13 % ± 4) ^a	≈ 10 (61 % ± 10) ^a
CB-1		>> 10 (24 % ± 3) ^a	≈ 10 (54 % ± 10) ^a
wzór ogólny E			
ChM-76		≈ 10 (48 % ± 4) ^a	5.43 ± 1.31
ChM-64		3.63 ± 0.21^b	≈ 10 (58 % ± 7)
CB-6		2.01 ± 2.25^b 2.13 ± 0.47 (hCB₁)	1.81 ± 0.34^b
ChM-72		0.82 ± 0.09^b 0.25 ± 0.06^b (hCB₁)	4.15 ± 0.39^b
CB-8		2.46 ± 0.21^b 2.16 ± 0.07 (hCB₁)	> 10 (37 % ± 8) ^a

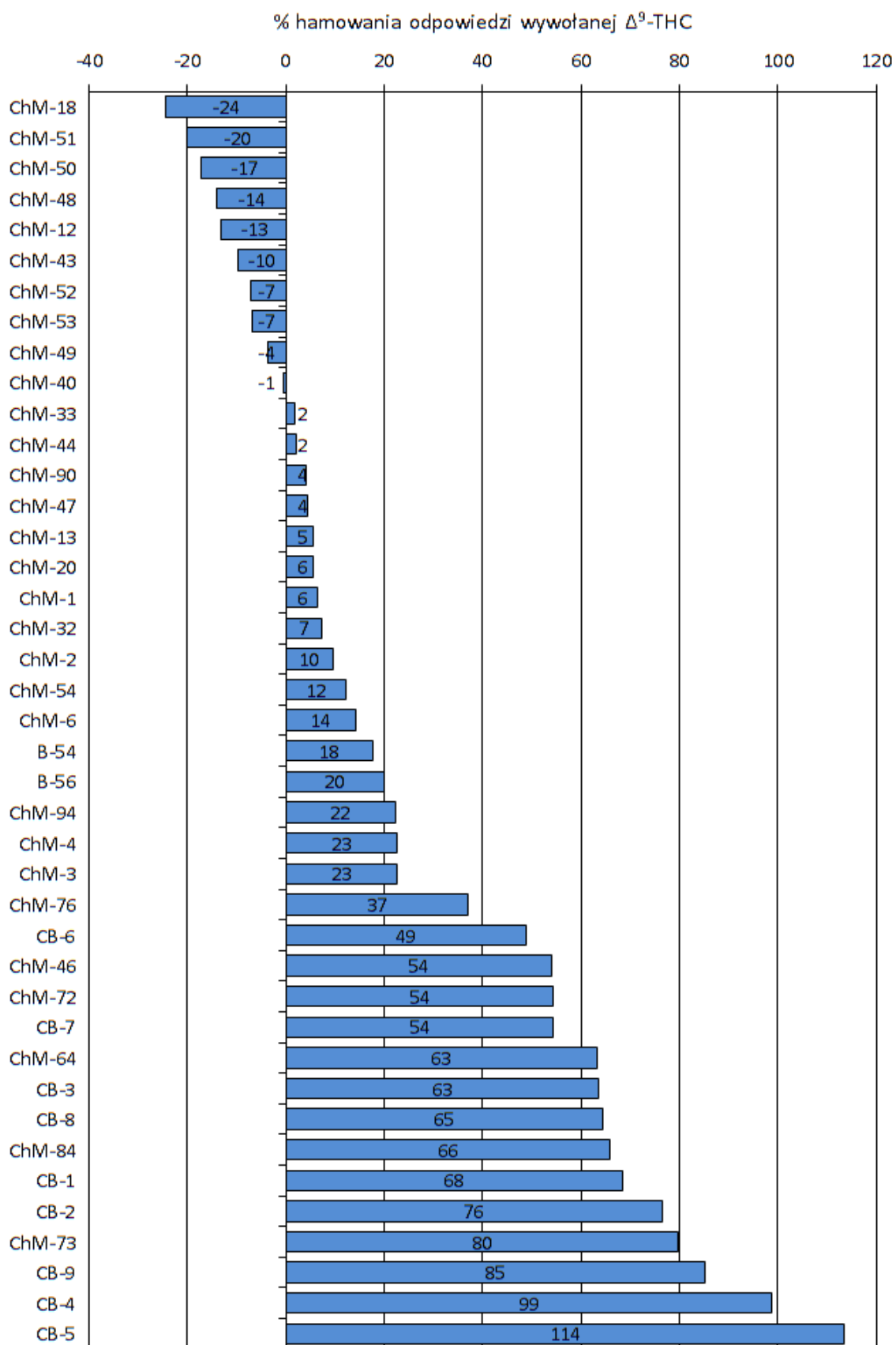
CB-9		> 10 (37 % ± 7) ^a	0.98 ± 0.23^b
ChM-73		2.53 ± 0.89^b 3.18 ± 0.49 (hCB₁)	1.65 ± 0.71
CB-7		0.73 ± 0.04^b 0.85 ± 0.03 (hCB₁)	1.56 ± 0.34^b
ChM-94		>> 10 (27 % ± 3) ^a	> 10 (39 % ± 3) ^a
ChM-84		>> 10 (4 % ± 7) ^a	≈ 10 (53 % ± 7) ^a
wzór ogólny F			
ChM-90		>> 10 (3 % ± 5) ^a	>> 10 (17 % ± 4) ^a

^a % hamowania wiązania [³H]CP55,940 w obecności badanych związków w stężeniu 10 μM

^b wyniki uzyskane we współpracy z Viktorem Rempel z Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Bonn.

Do oceny aktywności badanej serii związków w kierunku receptorów GPR18 został wykorzystany opisany wcześniej model, wraz ze scharakteryzowanym ligandem Δ⁹-THC. Związki zostały przebadane w stężeniu 10 μM pod kątem potencjalnej aktywności wewnętrznej. Żaden z przebadanych związków nie dawał istotnej statystycznie odpowiedzi w „trybie agonisty” (**Załącznik 6**), a więc w teście bezpośredniego pobudzenia szlaku β-arrestynowego. W „trybie antagonisty” oceniana była zdolność badanych związków do zahamowania działania agonisty GPR18 - Δ⁹-THC. Wyniki tych oznaczeń przedstawione są na **Rysunku 3.25**.

Przeprowadzone badania wykazały, że rozważana seria połączeń stanowi uzasadniony obszar poszukiwań nowych, selektywnych ligandów receptorów kannabinoidowych. Związki o takim charakterze zostały zidentyfikowane zarówno w grupie pochodnych 5,5-difenylo-imidazol-4-onu (ChM-49, ChM-48, ChM-18), jak i w grupie pochodnych 3-fenoksy- (ChM-46 lub ChM-64) i 3-benzylloksy-benzylidenowych (struktury wyjściowe: CB-3 lub CB-6) imidazo[2,1-b]tiazyny oraz imidazo[2,1-b]tiazepiny.



Rysunek 3.25 Stopień hamowania odpowiedzi wywołanej przez Δ^9 -THC w β -arrestynowym teście funkcjonalnym dla GPR18 w obecności $10\mu\text{M}$ stężenia badanych związków.

Dla badanych 5,5-difenylo-imidazol-4-onów stwierdzono, że powinowactwo do receptorów kannabinoidowych zależy od wielkości dobudowanego pierścienia heterocyklicznego. O ile połączenia zawierające pierścień tiazolu nie wykazują aktywności w kierunku receptorów kannabinoidowych, tak w grupie imidazo[2,1-b]tiazyn zidentyfikowano związek (ChM-49), charakteryzujący się wartością K_i dla receptora rCB_1R poniżej 10 μM . Dalsza rozbudowa anelowanego pierścienia w omawianej grupie połączeń skutkuje jeszcze większym wzrostem powinowactwa do receptora CB_1R (ChM-18).

Zaplanowane szlaki syntezy badanych związków prowadzą do powstawania (w różnych, zależnych od reakcji, proporcjach) dwóch izomerycznych produktów: 1,2-podstawionych i 2,3-podstawionych imidazolonów. W następstwie wykonanych badań farmakologicznych, stwierdzono znamienne różnice w aktywności poszczególnych izomerów konstytucyjnych w kierunku receptorów kannabinoidowych CB_1 . 2,3-podstawione imidazolony (ChM-54, ChM-52, ChM-49, ChM-18) charakteryzowały się wyższym powinowactwem, niż ich 1,2-podstawione analogi (ChM-53, ChM-51, ChM-50, ChM-48). Powinowactwo do ludzkiego receptora CB_1R , wyrażone wartością K_i , dla najbardziej aktywnego związku w tej serii połączeń - ChM-18, wynosiło 1,34 μM . Przebadane pochodne 5,5-difenylo-imidazol-4-onu nie wykazywały aktywności w kierunku receptorów CB_2R ani GPR18.

Zastąpienie podstawników 5,5-difenylowych ugrupowaniem styrylowym (ChM-44, ChM-43) lub ugrupowaniem benzylidenowym zawierającym podstawnik niearomatyczny (w Tabeli 3.7 - zw.: ChM-13 do ChM-4), prowadzi w grupie analizowanych pochodnych imidazol-4-onu, do utraty aktywności w kierunku receptorów kannabinoidowych. Aktywność ta jest dla odmiany zachowana w przypadku wprowadzenia do ugrupowania benzylidenowego, poprzez wiązanie eterowe, podstawnika zawierającego drugi pierścień aromatyczny (w Tabeli 3.7 - zw.: ChM-46 do CB-4 oraz ChM-64 do CB-7).

W grupie pochodnych benzylideno-imidazol-4-onu, rozbudowa anelowanego pierścienia heterocyklicznego z tiazyny (wzór ogólny C i D) do tiazepiny (wzór ogólny E i F) skutkuje w większości przypadków podwyższonym powinowactwem do receptorów CB_1R i względnie stałą aktywnością w odniesieniu do ludzkich receptorów CB_2R (por.: CB-3 vs. CB-6 i CB-5 vs. ChM-72).

Wprowadzając fragment *orto*-chlorobenzoksyłowy do ugrupowania benzylidenowego (CB-9: rCB_1R - $K_i > 10 \mu M$, hCB_2R - $K_i = 0,98 \mu M$), można zaobserwować pewną selektywność otrzymanego związku w kierunku receptorów CB_2R , podczas gdy podstawienie

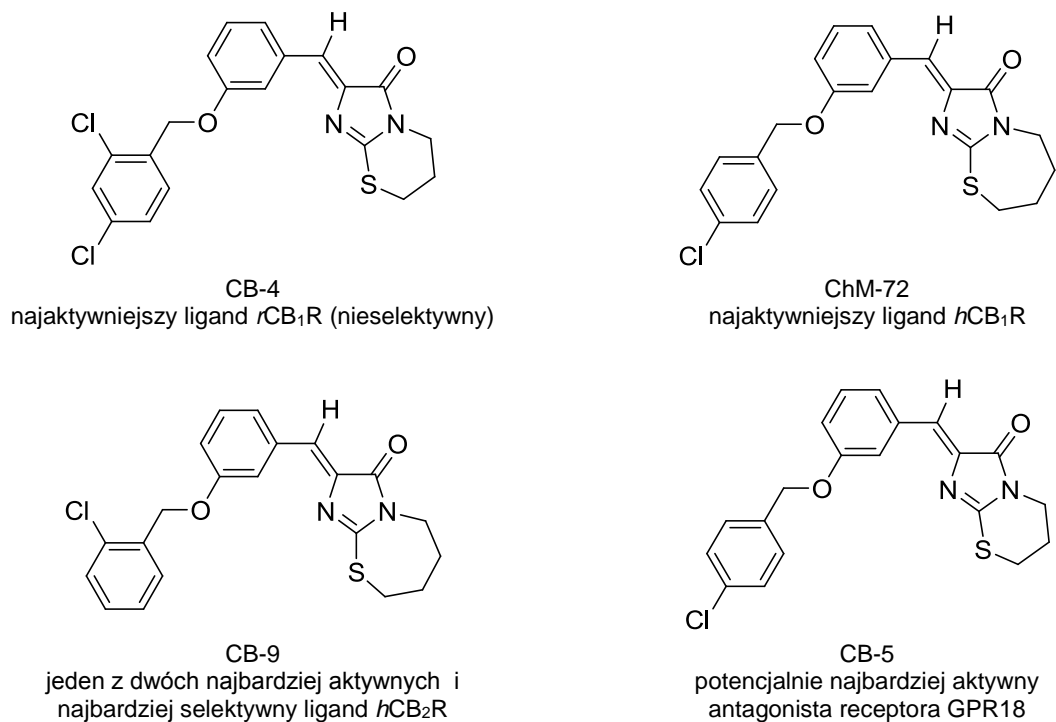
chlorem w położeniu *meta*- (CB-8: rCB_1R - $K_i = 2,46 \mu M$, hCB_1R - $K_i = 2,16 \mu M$, hCB_2R - $K_i > 10 \mu M$) i *para*- (ChM-72: rCB_1R - $K_i = 0,82 \mu M$, hCB_1R - $K_i = 0,25 \mu M$, hCB_2R - $K_i = 4,15 \mu M$) prowadzi do większej specyficzności w kierunku receptorów CB_1R .

Porównując aktywność analizowanych połączeń w kierunku szczurzej i ludzkiej formy receptora CB_1R , stwierdzono, że jest ona w większości przypadków zbliżona. Wyraźną poprawę parametrów wiązania do ludzkiej formy receptora stwierdzono jedynie dla związków ChM-72 (hCB_1R : $K_i = 0,25 \mu M$, rCB_1R : $K_i = 0,82 \mu M$) i ChM-18 (hCB_1R : $K_i = 1,34 \mu M$, rCB_1R : $K_i = 3,94 \mu M$).

Badania przeprowadzone w odniesieniu do rozważanej serii związków z wykorzystaniem zaproponowanego testu funkcjonalnego dla receptora GPR18 potwierdziły, że połączenia aktywne względem receptorów CB_1R i CB_2R oddziałują również z receptorem GPR18 (**Rysunek 3.25**). Wskazuje to na podobieństwo strukturalne farmakoforów wspomnianych receptorów. We wszystkich przypadkach, dla zachowania aktywności wymagana jest obecność rozbudowanego podstawnika przy pierścieniu imidazo[2,1-b]tiazyny (w **Tabeli 3.7**: ChM-46 do CB-1) lub imidazo[2,1-b]tiazepiny (w **Tabeli 3.7**: ChM-76 do CB-7). Związki z tych grup, zastosowane w stężeniu $10 \mu M$, charakteryzowały się (z dwoma wyjątkami) przynajmniej 50% zdolnością do hamowania odpowiedzi wywołanej przez referencyjnego agonistę w modelu funkcjonalnym receptora GPR18. Z porównania wyników dla analogicznych pochodnych tiazynowych (wzór ogólny D) i tiazepinowych (wzór ogólny E) wynika, że pierwsze z nich cechują się generalnie większą aktywnością w kierunku receptora GPR18 (por.: CB-3 vs. CB-6, CB-5 vs. ChM-72 i CB-4 vs. ChM-73 na **Rysunku 3.25**). Pozytywny wpływ na analizowaną aktywność biologiczną omawianych połączeń ma również wprowadzenie chloru do ugrupowania benzyloksybenzylidenowego (por.: CB-3 vs. CB-5 i CB-4 oraz CB-6 vs. ChM-72 i CB-8 i CB-9 i ChM-73 na **Rysunku 3.25**). *para*-chloro-benzyloksy-benzylidenowa pochodna imidazo[2,1-b]tiazyny - CB-5 jest najsilniejszym antagonistą GPR18 w ramach omawianej serii połączeń. Zastosowany w stężeniu $10 \mu M$, CB-5 całkowicie redukuje efekt wywołany przez referencyjnego agonistę GPR18 - Δ^9 -THC.

Należy zwrócić uwagę, że zastąpienie ugrupowania benzyloksyloвого (CB-3) grupą benzoiloksylową (CB-2, CB-1) w serii benzylidenowych pochodnych imidazo[2,1-b]tiazyn, prowadzi do wyraźnego spadku powinowactwa do receptorów CB_1R i CB_2R , jest natomiast względnie dobrze tolerowane w przypadku receptora GPR18. Z tego powodu ten kierunek modyfikacji jest szczególnie interesujący przy planowaniu syntezy nowych selektywnych ligandów GPR18.

Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest poniższe zestawienie, przedstawiające najaktywniejsze związki zidentyfikowane w ramach skriningu farmakologicznego.



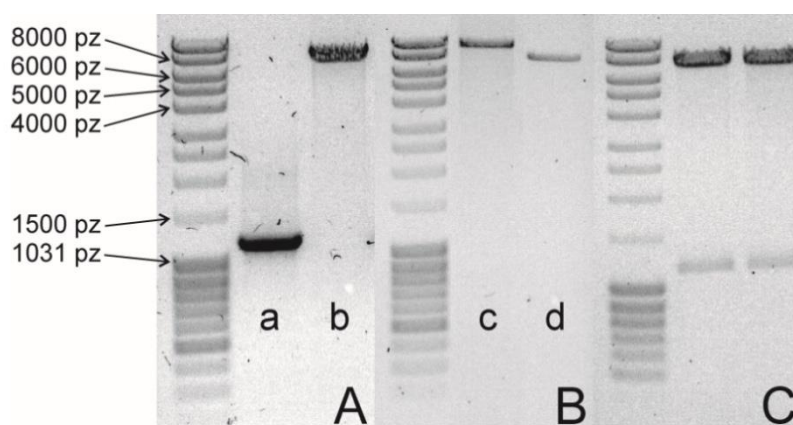
Rysunek 3.26 Struktury najaktywniejszych ligandów receptorów kannabinoidowych, zidentyfikowanych w grupie pochodnych imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu.

3.4. Opracowanie modelu komórkowego do badań aktywności potencjalnych ligandów receptora histaminowego H₄

W grupie receptorów histaminowych, eksperymenty wykonane w ramach niniejszej pracy, ukierunkowane były na otrzymanie modelu komórkowego do badania powinowactwa potencjalnych ligandów receptorów histaminowych H₄. Do realizacji powyższego celu wykorzystany został system transdukcji retrowirusowej, dzięki któremu otrzymana została nowa linia komórkowa z nadekspresją rekombinowanego białka receptorowego. Opracowana linia komórkowa została następnie scharakteryzowana farmakologicznie w testach wiązania radioligandów. Jej przydatność w badaniach powinowactwa receptorowego nowych połączeń chemicznych została poddana ocenie w teście porównawczym z wykorzystaniem alternatywnego systemu ekspresyjnego, opierającego się na hodowli komórek owadzych *Spodoptera frugiperda* - Sf9.

3.4.1. Klonowanie receptora histaminowego H₄ i otrzymanie stabilnej linii komórkowej

Sekwencja cDNA ludzkiego receptora histaminowego H₄, zgodna z wpisem o numerze AY136745 w bazie danych GenBank [233] i zawarta w plazmidzie pcDNA3.1-*hH₄R*, została powielona w toku łańcuchowej reakcji polimerazy. Wykorzystano parę primerów wprowadzających do powielanego materiału fragmenty rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne NotI i BamHI, odpowiednio bezpośrednio przed kodonem START i po kodonie STOP genu receptora.



Rysunek 3.27 Klonowanie molekularne genu ludzkiego receptora histaminowego H₄. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelu agarozowym, przeprowadzony każdorazowo w obecności identycznego wzorca wielkości cząsteczek. A) Fragmenty przygotowane do ligacji: wstawka zawierająca gen receptora (a - 1180 pz) oraz plazmid pQCXIN (b - 7346 pz), po trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi - BamHI i NotI; B) Formy liniowe: produktu ligacji wektora i wstawki (c - 8526 pz) oraz pustego plazmidu pQCXIN (d - 7381 pz), uzyskane na drodze trawienia enzymem BamHI; C) Analiza restrykcyjna dwóch próbek otrzymanego plazmidu pQCXIN-*hH₄R*. Widoczne fragmenty o długości odpowiednio 1180 pz i 7346 pz, powstałe w wyniku trawienia plazmidu enzymami BamHI i NotI.

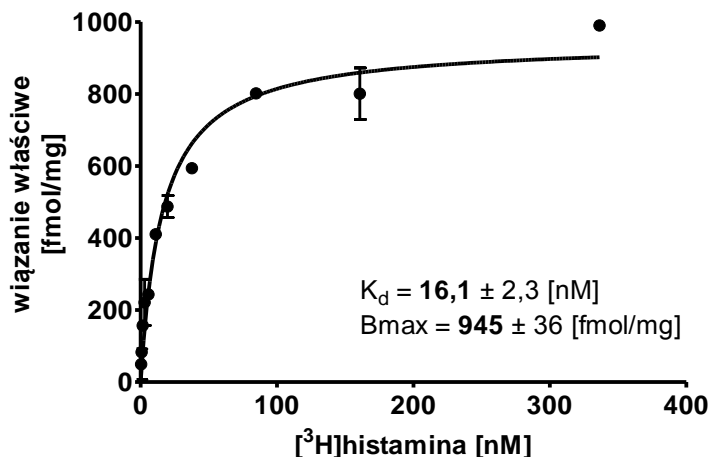
Uzyskany produkt reakcji PCR został poddany trawieniu przez wspomniane enzymy restrykcyjne, a otrzymana w ten sposób wstawka (1180 pz) została wprowadzona, na drodze reakcji ligacji, do uprzednio przygotowanego wektora retrowirusowego pQCXIN (7346 pz) (**Rys. 3.27 A**). W wyniku otrzymano plazmid pQCXIN-hH4R (8256 pz) (**Rys. 3.27 B**). Poprawność przeprowadzonych eksperymentów biologii molekularnej została potwierdzona na drodze analizy restrykcyjnej (**Rys. 3.27 C**) oraz sekwencjonowania (**Rozdział 5.4.2.8 i Załączniki 4-5**).

Po zakończeniu eksperymentów inżynierii genetycznej, które doprowadziły do uzyskania wektora retrowirusowego zawierającego gen ludzkiego receptora histaminowego H₄, przeprowadzono transdukcję docelowej linii komórek CHO z wykorzystaniem cząstek retrowirusa, wytwarzanych w komórkach pakujących GP+envAm12. Eksperyment przeprowadzono w sposób analogiczny, jak w opisanym wcześniej przypadku linii z nadekspresją receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂. Transdukowane komórki linii CHO zostały poddane selekcji z wykorzystaniem antybiotyku -genetycyny (G418), w wyniku czego uzyskano pozytywne klony komórek CHO-hH4R, w których dochodzi do stabilnej koekspresji genów receptora i oporności na antybiotyk w oparciu o system bicistronowy.

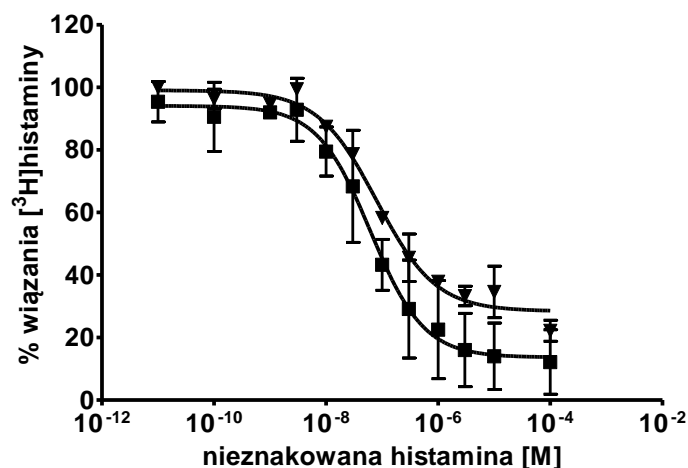
3.4.2. Charakterystyka farmakologiczna uzyskanej linii komórkowej CHO-hH4R

Opracowana linia komórkowa została scharakteryzowana w teście saturacyjnego wiązania [³H]histaminy do preparatu błon komórkowych. Otrzymane wyniki potwierdziły ekspresję rekombinowanego białka receptorowego w wyprowadzonej linii. Obserwowano specyficzne i ulegające wysyceniu wiązanie liganda znakowanego trytem (**Rysunek 3.28**). W oparciu o uzyskaną krzywą saturacyjną wiązania, wyznaczona została stała wiązania K_d dla zaproponowanych warunków eksperymentu. Wynosiła ona 16,1 nM i była zgodna z doniesieniami literaturowymi (11,7 nM) [262]. Otrzymana stała była później wykorzystywana do oznaczania wartości K_i badanych ligandów receptora histaminowego H₄ w testach kompetycyjnego wiązania radioliganda.

W celu porównania właściwości preparatu błon otrzymanego z opracowanej linii komórkowej z referencyjnym materiałem pochodzącym ze źródła komercyjnego (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), wykonano równolegle dla obu preparatów test kompetycyjnego wiązania znakowanej trytem i nieznakowanej histaminy. Uzyskane wyniki potwierdziły spodziewane właściwości wyprowadzonej linii komórkowej z nadekspresją receptora histaminowego H₄ (**Rysunek 3.29**).



Rysunek 3.28 Krzywa saturacyjnego wiązania [³H]histaminy do ludzkich receptorów histaminowych H₄ w preparacie błon komórek CHO-*h*H₄R, uzyskanych na drodze transdukcji retrowirusowej.



Rysunek 3.29 Krzywe homologicznego wiązania kompetycyjnego [³H]histaminy do różnych preparatów błon komórek, charakteryzujących się stabilną ekspresją ludzkiego receptora histaminowego H₄. W eksperymentach wykorzystany został preparat błon komórek nowej linii otrzymanej z użyciem systemu transdukcji retrowirusowej (▼) oraz referencyjny preparat błon ze źródła komercyjnego (■). Wykres reprezentuje średnią dwóch niezależnych eksperymentów, przeprowadzonych każdorazowo w trzech powtórzeniach.

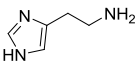
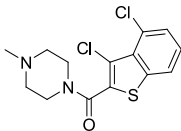
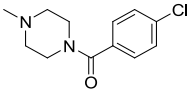
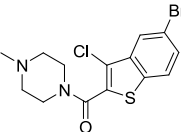
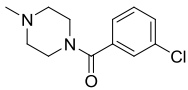
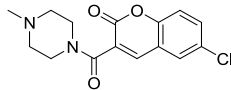
Parametry K_d wyznaczone w testach wiązania homologicznego [³H]histaminy były w tym samym zakresie wartości dla obu preparatów błon (dla nowo otrzymanej linii komórkowej - $K_{d \text{ homol.}} = 35,4 \pm 17,2$ nM, a dla referencyjnej linii komercyjnej $K_{d \text{ homol.}} = 41,8 \pm 23,3$ nM), niemniej jednak poziom ekspresji receptora był zauważalnie niższy w przypadku otrzymanej linii komórkowej ($B_{max \text{ homol.}}$ odpowiednio: 985 ± 291 fmol/mg vs. 14600 ± 2000 fmol/mg). Skutkowało to koniecznością użycia większej ilości białka w próbce, w celu uzyskania poziomu wiązania radioliganda porównywalnego do komercyjnego preparatu błon (100 µg/próbkę vs. 15 µg/próbkę). Niestety zwiększenie ilości zużywanego w eksperymencie

białka, znajdowało również odzwierciedlenie w podniesionym poziomie wiązania niespecyficznego (por. dolne plateau krzywych na **Rysunku 3.29**). Umiarkowany poziom ekspresji białka receptorowego w wyprowadzonej linii komórkowej może być związany z błędnym fałdowaniem powstającego białka lub też zaburzonym procesem kierowania białka rekombinowanego do błony komórkowej i jego retencją w kompartmentach wewnątrzkomórkowych.

3.4.3. Wykorzystanie uzyskanej linii CHO-*hH₄R* do oznaczania powinowactwa potencjalnych ligandów receptora histaminowego H₄

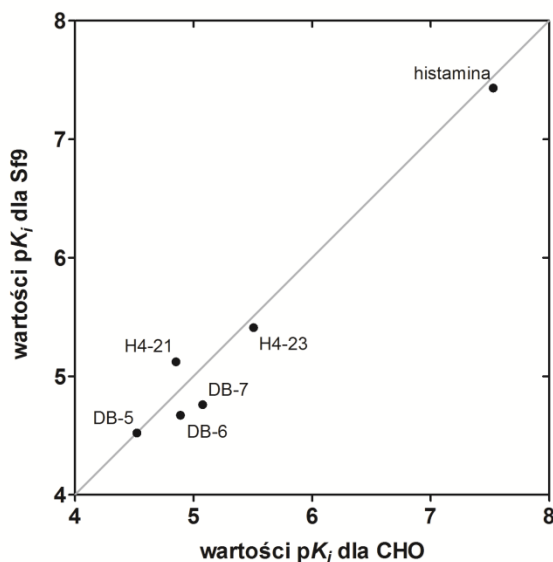
Przeprowadzono oznaczenia powinowactwa serii związków w teście kompetycyjnego wiązania [³H]histaminy do receptora histaminowego H₄, w preparacie błon komórkowych uzyskanym z linii CHO-*hH₄R*. Otrzymane wyniki porównano z rezultatami analogicznych eksperymentów, w których materiał biologiczny stanowił preparat błon uzyskany z komórek owadzych Sf9, zainfekowanych bakulowirusem zawierającym sekwencję genu ludzkiego receptora histaminowego H₄ (**Tabela 3.8**).

Tabela 3.8 Porównanie wartości K_i ligandów receptora histaminowego H₄, wyznaczonych w oparciu o różne modele ekspresji białek rekombinowanych. Badania wiązania kompetycyjnego [³H]histaminy zostały przeprowadzone z użyciem preparatów błon, uzyskanych odpowiednio z: CHO - linii komórek CHO charakteryzujących się stabilną ekspresją *hH₄R*, uzyskaną na drodze transdukcji retrowirusowej oraz Sf9 - komórek owadzych zainfekowanych bakulowirusem zawierającym sekwencję *hH₄R*. Wyniki w tabeli reprezentują wartości średnie oraz odchylenie standardowe uzyskane w wyniku dwóch niezależnych eksperymentów, przeprowadzonych każdorazowo w dwóch powtórzeniach.

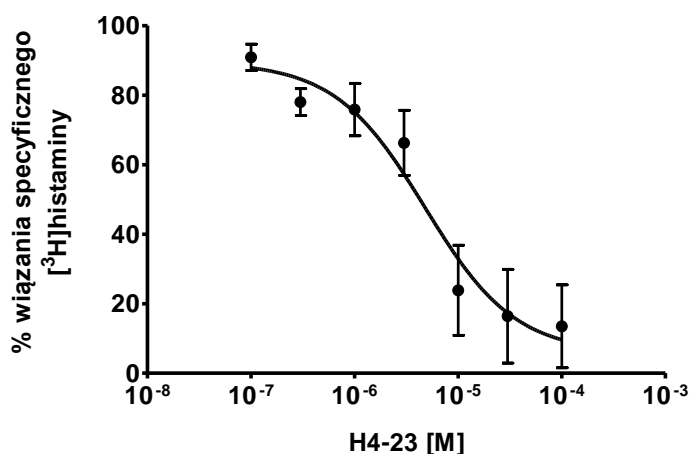
Związek	CHO $K_i \pm \text{SEM}$	Sf9 $K_i \pm \text{SEM}$	Związek	CHO $K_i \pm \text{SEM}$	Sf9 $K_i \pm \text{SEM}$
 histamina	29,7 ± 4,2 [nM]	36,9 ± 1,5 [nM]	 DB-6	12,9 ± 3,2 [μM]	21,3 ± 10,5 3 [μM]
 H4-21	14,1 ± 1,8 [μM]	7,55 ± 4,22 [μM]	 DB-7	8,36 ± 0,43 [μM]	17,3 ± 5,9 [μM]
 H4-23	3,12 ± 0,80 [μM]	3,88 ± 2,34 [μM]	 DB-5	> 30 [μM]	> 30 [μM]

Przedmiotem przeprowadzonych testów powinowactwa była seria pochodnych amidowych 4-metylopiperazyny [263]. Dodatkowo, jako związek referencyjny, uwzględniona została nieznakowana histamina, dla której wyznaczona wartość K_i była zgodna z doniesieniami literaturowymi [92].

Stwierdzono, że wyniki uzyskane w porównywanych modelach ekspresji receptora histaminowego H_4 dobrze korelowały ze sobą (**Rysunek 3.30**).



Rysunek 3.30 Korelacja wartości pK_i uzyskanych dla rozpatrywanej serii ligandów w porównywanych modelach ekspresji receptora histaminowego H_4 . Wartości pK_i wyznaczone dla badanych związków (histamina, H4-21, H4-23, DB-5, DB-6 i DB-7) przy użyciu preparatu błon rekombinowanych komórek CHO otrzymanych techniką transdukcji retrowirusowej (CHO) zostały porównane z odpowiednimi wynikami uzyskanymi w oparciu o preparat błon zainfekowanych bakulowirusem komórek *Spodoptera frugiperda* (Sf9).



Rysunek 3.31 Krzywa wiązania kompetycyjnego $[^3H]$ histaminy względem związku H4-23 - najbardziej aktywnego połączenia w badanej serii amidowych pochodnych 4-metylopiperazyny, uzyskana w oparciu o preparat błon komórek linii CHO, charakteryzującej się stabilną ekspresją ludzkiego receptora histaminowego H_4 . Punkty krzywej reprezentują wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym, wyznaczone w dwóch niezależnych eksperymentach, przeprowadzonych każdorazowo w dwóch powtórzeniach.

Wartości powinowactwa dla wszystkich przebadanych amidowych pochodnych 4-metylpiperazyny przypadają na mikromolowy zakres stężeń. Najbardziej aktywnym w rozważanej serii połączeń okazał się związek H4-23 ((3-chlorofenylo)karbonylo-4-metylpiperazyna), dla którego wartości K_i wynosiły odpowiednio: 3,12 μM w przypadku testów z użyciem rekombinowanej linii komórek CHO (**Rysunek 3.31**) oraz 3,88 μM w modelu komórek owadzych.

Przeprowadzone testy wiązania radioligandów potwierdziły, że założenia eksperymentu inżynierii genetycznej okazały się słuszne i udało się otrzymać nową linię komórkową z potwierdzoną stabilną ekspresją funkcjonalnego receptora histaminowego H_4 , a charakterystyka farmakologiczna rekombinowanego białka jest zgodna z doniesieniami literaturowymi. W toku wykonanych testów potwierdzono również, że opracowana linia komórkowa może być z powodzeniem wykorzystywana do oznaczania aktywności potencjalnych ligandów, a uzyskane w ten sposób wyniki znajdują potwierdzenie w rezultatach analogicznych testów z użyciem alternatywnych modeli komórkowych.

4. PODSUMOWANIE

W badaniach do niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano techniki otrzymywania rekombinowanych białek receptorowych w komórkach eukariotycznych. Przeprowadzono eksperymenty prowadzące do uzyskania zarówno przejściowej, jak i stabilnej ekspresji genów receptorowych, wykorzystując do tego celu metody transfekcji (odczynniki o charakterze polikationów i lipofekcyjne) oraz transdukcji (wektory retrowirusowe i bakulowirusowe). Zaplanowane badania doprowadziły do otrzymania nowych linii komórkowych z nadekspresją ludzkich receptorów adenozynowych A_{2A}, kannabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz histaminowych H₄. Wykazano przydatność otrzymanych linii do przeprowadzenia testów wiązania radioligandów, a w przypadku linii z nadekspresją receptorów CB₁R i CB₂R dodatkowo dokonano walidacji funkcjonalnego testu akumulacji cAMP. Test ten był następnie wykorzystywany w kolejnych projektach mających na celu identyfikację potencjalnych ligandów receptorów kannabinoidowych [68, 264].

Najprostszym i najmniej czasochłonnym sposobem uzyskiwania ekspresji rekombinowanych białek receptorowych w komórkach eukariotycznych jest wykonanie transfekcji, jednak wydajniejszą metodą wydaje się być transdukcja retrowirusowa, która dodatkowo prowadzi bezpośrednio do stabilnej integracji transgenu z genomem komórek gospodarza. Wydajność ekspresji genów, w toku otrzymywania rekombinowanych linii komórkowych, zależy jednak nie tylko od zastosowanej techniki i charakteru białka, ale również od rodzaju komórek gospodarza, co zostało potwierdzone w przypadku transfekcji komórek CHO i HEK293 konstruktem *phA_{2A} AR-ECFP*.

Badania przeprowadzone dla receptorów histaminowych H₄ z użyciem zarówno przejściowo transdukowanych komórek owadzych, jak i komórek ssaczych ze stabilną ekspresją H₄R, przyniosły porównywalne wyniki testów kompetycyjnego wiązania ligandów, a więc rodzaj zastosowanej metody ekspresji białek rekombinowanych nie miał, w przypadku omawianego receptora, wpływu na jego właściwości farmakologiczne [265]. Podobnie wykazano, że znakowanie receptora adenozynowego A_{2A} białkowym znacznikiem fluorescencyjnym również nie wpływa na parametry wiązania ligandów. Generalnie jednak, na podstawie wyników otrzymanych dla receptorów H₄R i A_{2A} AR, nie można wnioskować czy obserwowany brak wpływu metody transfekcji/transdukcji oraz znakowania receptora białkiem fluorescencyjnym na parametry wiązania ligandów ma zastosowanie również do innych receptorów siedmiotransbłonowych. Złożoność struktur poszczególnych receptorów oddziałujących z białkami G oraz mnogość czynników wpływających na ich parametry farmakologiczne uniemożliwia formułowanie uogólnionych założeń.

W ramach poszukiwania nowych ligandów receptorów adenozynowych, w prezentowanej pracy przebadano 61 pochodnych dialkylpirymidyno-purynodionu pod kątem oddziaływania z tą rodziną receptorów siedmiotransbłonowych. W badanej grupie zidentyfikowano związki aktywne (o stałej K_i w nanomolarnym i submikromolarnym zakresie stężeń) o zróżnicowanej selektywności w kierunku poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych. Zgromadzony materiał badań farmakologicznych pozwolił na identyfikację elementów strukturalnych odpowiedzialnych za obserwowaną selektywność i umożliwił wskazanie modyfikacji chemicznych korzystnych dla uzyskania wysokiego powinowactwa względem receptorów adenozynowych. Testy funkcjonalne wykonane dla najbardziej aktywnych ligandów wykazały, że zgodnie z założeniami, badane związki mają charakter antagonistów receptorów adenozynowych A_{2A} i A_{2B} . Przeprowadzone badania ujawniły ponadto istotne różnice międzygatunkowe w aktywności poszczególnych ligandów. Wprawdzie rozbieżność powinowactwa związków między szczurzymi, a ludzkimi receptorami A_{2A} była niewielka, ale już dla pozostałych podtypów różnice w wielkości stałych K_i bywały 10-krotne, a nawet większe, szczególnie dla receptora adenozynowego A_3 .

Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na identyfikację agonistycznych właściwości Δ^9 -THC względem receptora sierociego GPR18. Jednocześnie potwierdzone zostały rezultaty części wcześniejszych badań, wskazujących na brak aktywności NAGly w szlaku β -arrestynowym dla tego receptora. Zoptymalizowany test funkcjonalny dla receptora GPR18, wraz z opracowanymi testami wiązania [3 H]CP55,940 do receptorów CB_1R i CB_2R , wykorzystane zostały do charakteryzacji pochodnych imidazotiazolonu, imidazotiazynonu oraz imidazotiazepinonu jako potencjalnych ligandów podtypów receptorów kannabinoidowych oraz receptora sierociego GPR18. Badania te, poszerzone o kolejne testy w kierunku innego receptora spokrewnionego z receptorami kannabinoidowymi - receptora GPR55, stanowią podstawę opublikowanego artykułu naukowego [266]. Największym osiągnięciem tej pracy jest identyfikacja w grupie dwucyklicznych pochodnych imidazolonu nowych struktur wiodących dla opracowania antagonistów receptorów GPR18 i GPR55. Przeprowadzone badania doprowadziły do opisanie pierwszego selektywnego antagonisty receptorów GPR18 - pochodnej chlorobenzylloksybenzylidenowej imidazotiazynonu - związku CB5 (GPR18: $IC_{50} = 0,279\mu M$, ponad 36-krotna selektywność względem CB_1R i GPR55 oraz 14-krotna selektywność względem CB_2R), a także innych ciekawych ligandów drugiego receptora sierociego GPR55 [266].

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

5.1. Miejsce prowadzenia badań

Zadania badawcze w ramach niniejszej pracy doktorskiej były realizowane w następujących laboratoriach:

1. Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie:

- Klonowanie ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} i uzyskanie konstruktów genetycznych *phA_{2A} AR-ECFP*.
- Uzyskanie przejściowej i stabilnej ekspresji w komórkach eukariotycznych znakowanego fluorescencyjnie receptora adenozynowego A_{2A}.
- Przygotowanie materiału biologicznego do testów wiązania radioligandów do znakowanego fluorescencyjnie receptora adenozynowego A_{2A}.
- Pozyskanie nadnerczy krowich i przygotowanie preparatu tkanki do oznaczania poziomu cAMP w testach funkcjonalnych z wykorzystaniem linii komórkowych.
- Wprowadzenie sekwencji ludzkiego receptora histaminowego H₄ do wektora retrowirusowego oraz przeprowadzenie transdukcji komórek CHO cząstkami wirusa.
- Przygotowanie preparatu błon komórek linii CHO-*hH₄R* do testów wiązania radioligandów

2. Katedra Chemii Farmaceutycznej I, Instytut Farmaceutyczny Uniwersytetu w Bonn, Niemcy:

- Testy wiązania [³H]GS21680 oraz [³H]MSX-2 do preparatu błon komórek przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*.
- Uzyskanie stabilnej ekspresji receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ w komórkach linii CHO metodą transdukcji retrowirusowej oraz charakterystyka farmakologiczna otrzymanych linii komórkowych.
- Badania wiązania kompetycyjnego radioligandów do podtypów ludzkich i szczurzych receptorów adenozynowych i kannabinoidowych.
- Testy aktywności wewnętrznej wybranych ligandów receptorów adenozynowych.
- Opracowanie testu do badania potencjalnej aktywności ligandów receptora sierozego GPR18 w oparciu o ocenę aktywacji β-arrestynowego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

3. Pracownia Farmakologii Biochemicznej, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie:
 - Test wiązania saturacyjnego [³H]CGS21680 do preparatu błon, otrzymanego z linii komórkowej ze stabilną nadekspresją białka fuzyjnego receptora adenozynowego A_{2A} i białka wzmocnionej cyjanowej fluorescencji.

4. Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Biochemii, Chemii i Farmacji, Uniwersytet Johanna Wolfganga Goethego we Frankfurcie, Niemcy:
 - Przygotowanie preparatu błon komórek Sf9 z nadekspresją ludzkiego receptora histaminowego H₄ oraz testy wiązania kompetycyjnego potencjalnych ligandów tego receptora.

5. Pracownia Badań Receptorowych, Katedra Farmakobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie:
 - Testy wiązania saturacyjnego i kompetycyjnego [³H]histaminy do preparatów błon komórek linii CHO, charakteryzujących się ekspresją ludzkiego receptora histaminowego H₄.

5.2. Aparatura

1. Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum w Krakowie:

- Aparat fotograficzny EOS 350D	Canon
- Cytometr przepływowy LSR II	Becton Dickinson
- Czytnik mikropłytek Enspire	PerkinElmer, Inc.
- Homogenizator UltraTurrax T18	IKA Werke GmbH
- Inkubator HERAcell 240	Heraeus Instruments
- Komora laminarna MN 120	Nüve
- Spektrofotometr BioPhotometer	Eppendorf AG
- Termocykler Mastercycler	Eppendorf AG
- Termomikser TS-100	Biosan
- Transiluminator UV	Ultra-Violet Products Ltd.
- Wirówka laboratoryjna Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH
- Wirówka laboratoryjna MiniSpin	Eppendorf AG
- Wyrząsarka orbitalna 358A	Elpin Plus s.c.
- Wyrząsarka orbitalna KS 130 control	IKA Werke GmbH
- Zestaw do elektroforezy w żelu agarozowym Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc.

2. Katedra Chemii Farmaceutycznej I, Instytut Farmaceutyczny Uniwersytetu w Bonn, Niemcy:

- Homogenizator Ultraturrax T25	IKA Werke GmbH
- Inkubator CO ₂ HERAcell 240	Heraeus Instruments
- Inkubator CO ₂ INC246med	Memmert GmbH
- Komora laminarna klasy II	Astec Microflow
- Licznik scyntylicyjny i czytnik luminescencyjny TopCount NXT	Perkin Elmer, Inc.
- Licznik scyntylicyjny Tricarb 2900 TR	PerkinElmer, Inc.
- Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
- Spektrofotometr DU 530 Life Science	Beckman Coulter, Inc.
- Systemy filtracji próżniowej M48, M96	Brandel
- Termomikser Comfort	Eppendorf AG

- Ultrawirówka Avanti J-20I Beckman Coulter, Inc.
 - Wirówka laboratoryjna Allegra 21R Beckman Coulter, Inc.
 - Wirówka laboratoryjna Biofuge pico Heraeus Instruments
 - Wirówka laboratoryjna Rotofix 32 Andreas Hettich GmbH
 - Wyrząsarka na mikroplastyki z inkubatorem DTS-4 Elmi Ltd.
3. Pracownia Farmakologii Biochemicznej, Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie:
- Licznik scyntylicyjny LS6500 Beckman Coulter, Inc.
 - System do filtracji próżniowej M-24 Brandel
4. Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Biochemii, Chemii i Farmacji, Uniwersytet Johanna Wolfganga Goethego we Frankfurcie, Niemcy:
- Inkubator z chłodzeniem KB240 Binder GmbH
 - Komora laminarna HeraSafe KS 15 ThermoScientific, Inc.
 - Licznik scyntylicyjny MicroBeta Trilux PerkinElmer, Inc.
 - Mieszadło magnetyczne RH digital IKA Werke GmbH
 - System do filtracji próżniowej Innotech Standard Inotech AG
 - System wody oczyszczonej Simplicity Merck Millipore
 - Ultrawirówka Avanti J-25I Beckman Coulter, Inc.
 - Wirówka 320R Andreas Hettich GmbH
5. Pracownia Badań Receptorowych, Katedra Farmakobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie:
- Licznik scyntylicyjny MicroBeta Trilux PerkinElmer, Inc.
 - System doczyszczania wody TOC/UF/UV Hydrolab, Sp. z o.o.
 - System do filtracji próżniowej MicroBeta FilterMate-96 Harvester PerkinElmer, Inc.
 - Ultrawirówka 3K30 SIGMA Laborzentrifugen GmbH

5.3. Materiały

5.3.1. Uniwersalne odczynniki chemiczne i sole nieorganiczne

- Chlorek magnezu ($MgCl_2$)	Carl Roth, HN03; Sigma Aldrich, M2670
- Chlorek potasu (KCl)	Sigma Aldrich, 60128; POCH, 739740114
- Chlorek sodu (NaCl)	Carl Roth, 9265; POCH, 794121116
- Chlorek wapnia ($CaCl_2$)	Sigma Aldrich, 21097
- Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Carl Roth, 4720; Chempur, CHEM*113635509
- Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	Carl Roth, P018; POCH, 742020112
- EDTA (sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego)	Carl Roth, X986; Sigma Aldrich, E5134
- Etanol, 96%	Chempur, CHEM*113964800
- Glicerol	AppliChem, A1123; Pharma-Cosmetics
- Glukoza	Sigma Aldrich, G7021
- HEPES	Carl Roth, 9105
- Izopropanol	Chempur, CHEM*117515002
- Kwas octowy, stężony	Chempur, CHEM*115687607
- Kwas solny, stężony (HCl)	Sigma Aldrich, 30721; Chempur, CHEM*115752837
- Sacharoza	Carl Roth, 4621
- Siarczan magnezu ($MgSO_4$)	Sigma Aldrich, M2643
- Siarczan miedzi ($CuSO_4$)	AppliChem, 1034
- Tris-HCl (Trihydroksymetyloaminoetan)	Carl Roth, 9090; Sigma Aldrich, 93363
- Tris, w postaci wolnej zasady	Sigma Aldrich, T1503
- Węglan sodu (Na_2CO_3)	AppliChem, A1881
- Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4)	BioShop Canada, SPD600; Carl Roth, P030
- Wodorowęglan sodu ($NaHCO_3$)	Sigma Aldrich, S5761
- Wodorotlenek sodu (NaOH)	Sigma Aldrich, 71689; Chempur, CHEM*118109252
- Winian sodu	Sigma Aldrich, 228729

5.3.2. Odczynniki i materiały wykorzystane do hodowli bakteryjnych

- Ampicylina	Sigma Aldrich, A9518
- Agar	Merck Millipore, 101614
- Ekstrakt z drożdży	Merck Millipore, 103753

- Kanamycyna Sigma Aldrich, K4000
- Pepton kazeinowy Merck Millipore, 107213
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA
w małej skali (QIAprep Spin Miniprep Kit) QIAGEN, 27104
- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA
w dużej skali (GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit) Sigma Aldrich, NA300

5.3.3. Odczynniki i materiały do biologii molekularnej

- Agarozą Prona, BS100
- Błękit bromofenolowy Sigma, B8026
- Bromek etydyny Sigma Aldrich, E1510
- Enzym BamHI Fermentas, #ER0051
- Enzym EcoRI Fermentas, #ER0271
- Enzym NheI Fermentas, #ER0971
- Enzym NotI Fermentas, #ER0591
- Kuwety do spektrofotometru (UVette) Eppendorf, 0030 106
- Ligaza DNA faga T4 Fermentas, #EL0014
- Mieszanka deoksynukleotydów (dNTP Mix) Fermentas, #R0192
- Polimeraza Pfu Fermentas, #EP0501
- Primery do klonowania Genomed
- Roztwór do nanoszenia DNA na żel agarozowy
(bufor obciążający) Fermentas, #R0621
- Woda do biologii molekularnej 5Prime, 2500010
- Wzorzec masy DNA do elektroforezy Fermentas, #SM0403
- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego
(QIAquick Gel Extraction Kit) QIAGEN, 28704
- Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach
enzymatycznych (QIAquick PCR Purification Kit) QIAGEN, 28104

5.3.4. Plazmidy

W niniejszej pracy plazmidy wykorzystane były jako matryce do reakcji PCR w procedurze klonowania genów receptorów lub jako wektory genetyczne, do których wprowadzono zamplifikowane cDNA receptorowe. Mapy plazmidów pECFP-N1 oraz pQCXIN, wykorzystanych jako wektory genetyczne zostały przedstawione w załączniku.

Tabela 5.1 Zestawienie plazmidów wykorzystanych w pracy.

Plazmid	Źródło	Antybiotyk selekcyjny dla: - bakterii - kom. eukariotycznych	Opis
pCDNA3.1- <i>hA_{2A}</i> AR	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA	- Ampicylina - Genetycyna	plazmid zawierający sekwencję cDNA genu receptora adenozynowego A _{2A} , wykorzystany jako matrycowe DNA do klonowania genu receptora na drodze reakcji PCR
pCDNA3.1- <i>hH₄</i> R	Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA	- Ampicylina - Genetycyna	plazmid zawierający sekwencję cDNA genu receptora histaminowego H ₄ , wykorzystany jako matrycowe DNA do klonowania genu receptora na drodze reakcji PCR
pLXSN- <i>hCB₁</i> R	Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet w Bonn, Niemcy	- Ampicylina - Genetycyna	wektor retrowirusowy zawierający sekwencję ludzkiego receptora kannabinoidowego CB ₁ , otrzymany w laboratorium Prof. C.E. Müller w Bonn
pLXSN- <i>hCB₂</i> R	Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet w Bonn, Niemcy	- Ampicylina - Genetycyna	wektor retrowirusowy zawierający sekwencję ludzkiego receptora kannabinoidowego CB ₂ , otrzymany w laboratorium Prof. C.E. Müller w Bonn
pQCXIN	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA	- Ampicylina - Genetycyna	wektor retrowirusowy, do którego została wprowadzona sekwencja cDNA receptora histaminowego H ₄
pECFP-N1	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA	- Kanamycyna - Genetycyna	eukariotyczny plazmid ekspresyjny umożliwiający uzyskanie białek fuzyjnych zawierających fragment białka fluorescencyjnego ECFP

5.3.5. Linie komórkowe

Linie komórkowe CHO i HEK 293T typu dzikiego oraz linia komórek owadzych Sf9 i linia komórek pakujących retrowirusy - GP+*envAm12* pochodzą z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC, ang.: *American Type Culture Collection*).

Linie komórkowe CHO z nadekspresją podtypów receptorów adenozynowych zostały wyprowadzone w laboratorium Prof. C.E. Müller w Bonn

Linia Path Hunter z nadekspresją receptora sierociego GPR18 została zakupiona w firmie DiscoverX, Fremont, CA, USA.

5.3.6. Odczynniki i materiały stosowane w eksperymentach z hodowlami komórkowymi

- Benzamidyna	Sigma Aldrich, B6506
- Błękit trypanu	Sigma Aldrich, T8154
- DMSO do hodowli komórkowych	AppliChem, A3672; Sigma Aldrich, D2650
- Filtry strzykawkowe 0,22µm i 0,45µm	Sarstedt
- Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma Aldrich, 78830
- Fugene HD	Roche, 04709691001
- Genetycyna (G418)	Merck Millipore, 345810
- GlutaMAX	Gibco, 35050-061
- Hipoksantyna	Sigma Aldrich, H9377; Alfa Aesar, A11481
- Hygromycyna B	Gibco, 10687-010
- Komora hemocytometryczna typu Fuchs/Rosenthala	Heinz Herenz Hamburg, 1080302
- Krioprobówki z gwintem wewnętrznym	Sarstedt, 72380, Nunc, 377267
- Ksantyna	AppliChem, A0665; MP Biomedicals, 0210329005
- Kwas mykofenolowy	Tocris, 1505; Merck Millipore, 475913
- Leupeptyna	Sigma Aldrich, L2884
- Lipofetamine 2000	Invitrogen, 11668-019
- Maślan sodu	Alfa Aesar, A11079; Merck Millipore, TR-1008-G
- Naczynia hodowlane (25-175cm ²)	Sarstedt, Nunc
- Odczynnik Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich, F9252
- Penicylina/Streptomycyna	Gibco, 15140-122; Polfa Tarchomin
- Płodowa surowica bydlęca (FBS, ang.: <i>fetal bovine serum</i>)	Gibco, 10500-064, Sigma Aldrich, F3018
- Pojemnik do kontrolowanego mrożenia komórek (Mr Frosty)	Nalgene, 5100
- Polibren	Sigma Aldrich, 107689; Merck Millipore, TR-1003-G
- Polietylenoimina (PEI), rozgałęziona o średniej masie cząsteczkowej 25kDa	Sigma Aldrich, 408727
- Pożywka Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, 41966-029

- Pożywka Dulbecco's Modified Eagle Medium/
/Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12) Gibco, 31330-038
- Pożywka Opti-MEM Gibco, 31985-070
- Pożywka SF 900 II Gibco, 10902-088
- Trypsyna-EDTA Gibco, 15400-054
- TurboFect Fermentas, #R0531

5.3.7. Preparaty błon komórek

- HEK-293-*hA*_{2A}, Perkin Elmer, Nr kat.: RBHA2A-M400UA, Nr serii: 647-164-A
- CHO-K1-*hH*₄, Perkin Elmer, Nr kat.: ES-393-M400UA, Nr serii: 1637686

5.3.8. Tkanki zwierzęce

- Mózgi szczurze zwierząt szczepu Sprague-Dawley zostały zakupione w firmie Pel-Freez Biologicals (Rogers, AR, USA).
- Nadnercza krowie zostały pozyskane z Zakładu Wędliniarskiego z Ubojnią - Władysław Gugulski (Ratajów, Polska).

5.3.9. Materiały wykorzystane w badaniach radioreceptorowych i testach funkcjonalnych

- cAMP, roztwór wzorcowy Enzo Life Sciences, 80-0056
- Filtry z włókna szklanego GF/B i GF/C Whatman
- Filtry z włókna szklanego - Filtermat B Perkin Elmer
- Merkaptoetanol Sigma Aldrich, M6250
- Płyny scyntylicyjne Lumasafe, Perkin Elmer
- Microscint-20, Perkin Elmer
- Aquascint, BioCare
- Ultima Gold MV, Perkin Elmer
- Polietylenoimina (PEI), 50% (w/v) roztwór w H₂O do preinkubacji filtrów z włókna szklanego Sigma Aldrich, P3143
- Surowicza albumina wołowa, frakcja V (BSA) AppliChem, A1391; Carl Roth, 8076
- Triton X-100 Sigma Aldrich, X100
- Wielodołkowa płytka filtracyjna (Unifilter GF/B) Perkin Elmer
- Zestaw odczynników do oznaczania rekrutacji β -arrestyny (PathHunter GPCR β -arrestin assay) DiscoverX, 93-0446

5.3.10. Radioligandy

Tabela 5.2 Zestawienie radioligandów wykorzystanych w pracy.

Radioligand	Aktywność specyficzna	Struktura
Nazwa chemiczna	Aktywność wewnętrzna	
Dostawca		
[³ H]CCPA 2-chloro- <i>N</i> ⁶ - cyklopentyladenozyna PerkinElmer	42,6 Ci/mmol agonista	
[³ H]CGS21680 (2-[4-(karboksyetylo) fenyloetyloamino]-5'- <i>N</i> - etylokarboksamidoadenozyna PerkinElmer	39 Ci/mmol lub 40,5 Ci/mmol agonista	
[³ H]MSX-2 (3-(3-hydroksypropylo)-8-(<i>m</i> - metoksystyrylo)-7-metylo-1- propargyloksantyna Amersham Life Science	84 Ci/mmol antagonista	
[³ H]PSB-603 8-[4-[4-(4-chlorofenylo) piperazyno-1-sulfonylo]fenylo]- 1-propyloksantyna Amersham Life Science	73 Ci/mmol antagonista	
[³ H]PSB-11 8-etylo-4-metylo-2-fenylo-(8 <i>R</i>)- 4,5,7,8-tetrahydro-1 <i>H</i> - imidazo[2,1- <i>f</i>]puryn-5-on Amersham Life Science	53 Ci/mmol antagonista	
[³ H]NECA 5'- <i>N</i> -etylokarboksamido adenozyna Amersham Life Science	15,9 Ci/mmol agonista	

Tabela 5.2, cd. Zestawienie radioligandów wykorzystanych w pracy.

Radioligand Nazwa chemiczna Dostawca	Aktywność specyficzna Aktywność wewnętrzna	Struktura
[³ H]CP55,940 (-)-cis-3-[2-hydroksy-4-(1,1-dimetyloheptylo)fenylo]-trans-4-(3-hydroksypropylo)cykloheksanol PerkinElmer	158 Ci/mmol agonista	
[³ H]histamina 2-(1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)-etyloamina PerkinElmer	15,3 Ci/mmol lub 10,6 Ci/mmol agonista	
[³ H]cAMP 3',5'-cykliczny adenylozynomonofosforan PerkinElmer	34 Ci/mmol nie dotyczy	

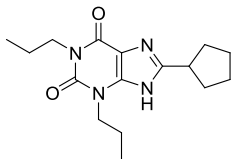
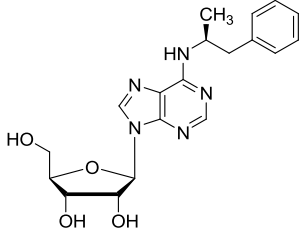
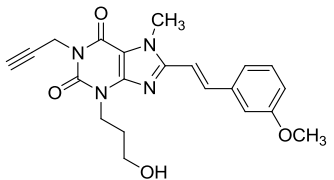
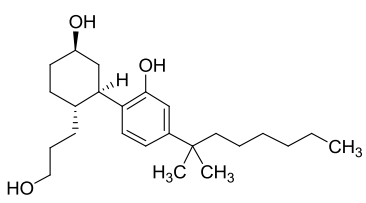
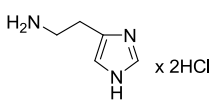
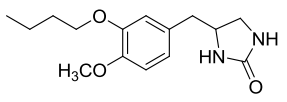
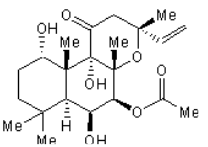
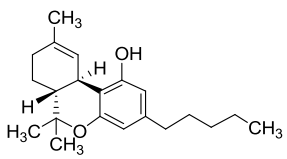
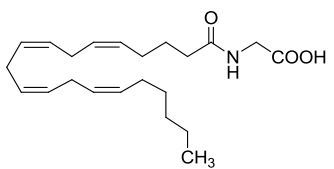
* - miejsca wprowadzenia trytu

5.3.11. Związki referencyjne

Tabela 5.3 Zestawienie związków referencyjnych wykorzystanych w pracy.

Związek	Wzór	Właściwości	Dostawca
CADO 2-chloroadenozyna		selektywny agonista A ₁ AR hA ₁ AR: K _i = 1,39 nM rA ₁ AR: K _i = 6,7 nM	Fluka, 22997
NECA 5'- <i>N</i> -etylokarboksamido adenozyna		nieselektywny agonista receptorów adenozynowych hA ₁ AR: K _i = 14 nM rA ₁ AR: K _i = 5,1 nM hA _{2A} AR: K _i = 20 nM rA _{2A} AR: K _i = 9,7 nM hA _{2B} AR: K _i = 11890 nM rA _{2B} AR: K _i = 1110 nM hA ₃ AR: K _i = 25 nM rA ₃ AR: K _i = 113 nM	Sigma Aldrich, E-2387

Tabela 5.3, cd. Zestawienie związków referencyjnych wykorzystanych w pracy.

Związek	Wzór	Właściwości	Dostawca
DPCPX 8-cyklopentyl- 1,3-dipropyloksantyna		selektywny antagonistą A ₁ AR hA ₁ AR: K _i = 3 nM rA ₁ AR: K _i = 0,5 nM	Sigma Aldrich, C-101
R-PIA (R)-N ⁶ -(1-metylo- 2-fenyletylo)adenozyna		agonista A ₁ AR i A ₃ AR hA ₁ AR: K _i = 2,04 nM rA ₁ AR: K _i = 1,2 nM hA ₃ AR: K _i = 33 nM rA ₃ AR: K _i = 158 nM	Sigma Aldrich, P4532
MSX-2 (3-(3-hydroksypropylo)- 8-(m-metoksystyrylo)- 7-metylo-1-propargylo ksantyna		selektywny antagonistą A _{2A} AR rA _{2A} AR: K _i = 8,04 nM hA _{2B} AR: K _i = 5,38 nM	Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet w Bonn, Niemcy
CP55,940 (-)-cis-3-[2-hydroksy- 4-(1,1-dimetyloheptylo) fenylo]-trans-4-(3-hydroksy propylo)cykloheksanol		nieselektywny agonista receptorów kannabinoidowych hCB ₁ R: K _i = 1,28 nM rCB ₁ R: K _i = 1,24 nM hCB ₂ R: K _i = 1,42 nM	Tocris, 0949
histamina		endogenny agonista receptorów histaminowych	Sigma Aldrich, H7250
RO-201724 4-(3-butoksy-4-metoksy fenylo)metylo-2- imidazolidon		selektywny inhibitor PDE4 IC ₅₀ = 2,0 μM	Tocris, 0415
forskolina		bezpośredni aktywator cyklazy adenylanowej	Applichem, 66575-29-9
Δ ⁹ -THC (-)-trans-Δ ⁹ - tetrahydrokannabinol		agonista receptorów kannabinoidowych	Dronabinol, Fagron Group
N-AGly N-arachidonyloglicyna		postulowany endokannabinoid	Tocris, 1445

5.3.12. Związki do badań

Związki do badań farmakologicznych - potencjalne ligandy receptorów: adenozynowych, kannabinoidowych i histaminowego H₄, zostały zsyntezowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM w Krakowie, przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz, dr hab. Jadwigę Handzlik, dr Annę Drabczyńską i p. Marię Kaleta.

Roztwory podstawowe związków o stężeniu 10mM przygotowywano w DMSO i przechowywano w temperaturze 4°C.

5.4. Metody

5.4.1. Hodowla komórek bakteryjnych

5.4.1.1. Wprowadzenie bakterii w stan kompetencji

Hodowlę bakterii *E.coli DH5a* prowadzono na szalkach z pożywką LB, zawierającą 1,5% agaru. Po okresie całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C, pobierano pojedynczą kolonię bakteryjną o średnicy 2-3 mm i przenoszono do kolby stożkowej zawierającej 100ml płynnej pożywki LB. Hodowlę intensywnie wytrząsano. Wzrost bakterii monitorowano dokonując w półgodzinnych odstępach czasu pomiarów gęstości optycznej hodowli przy długości fali 600 nm. Gdy zmierzona wartość OD₆₀₀ osiągała 0,350 hodowlę, przenoszono do dwóch zimnych polipropylenowych probówek o pojemności 50 ml i umieszczano na lodzie na okres 10 min. Po tym czasie hodowlę wirowano (2700×g, 10 min, 4°C). Supernatant odrzucano, a osad bakteryjny osuszano, ustawiając probówki do góry dnem na ręcznikach papierowych. Następnie bakterie w obu probówkach zawieszano w 30 ml zimnego roztworu 80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, delikatnie worteksując i ponownie wirowano (2700×g, 10 min, 4°C) oraz usuwano supernatant. Uzyskany osad zawieszano w całkowitej objętości 4 ml zimnego 100 mM CaCl₂ i pozostawiano na 16 godzin w temperaturze 4°C. Po okresie inkubacji zawiesinę bakterii kompetentnych dzielono na porcje po 200 µl, które używano bezpośrednio w eksperymentach transformacji lub przechowywano w temperaturze -80°C do czasu ich wykorzystania.

5.4.1.2. Transformacja bakterii

W zimnej probówce typu eppendorf umieszczano 100 ng plazmidu lub 10 µl mieszaniny ligacyjnej i dodawano 200 µl zawiesiny bakterii kompetentnych. Probówkę inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 42°C na 90 s. Po tym czasie probówki umieszczano ponownie na lodzie na 2 minuty, a następnie dodawano 1 ml ciepłej pożywki SOC i inkubowano w temperaturze 37°C, intensywnie mieszając przez 1 godzinę. Po zakończonej inkubacji, transformowane bakterie wirowano (2700×g, 5 min, 25°C), a uzyskany osad zawieszano w 400 µl pożywki SOC. Następnie przenoszono 40 µl uzyskanej zawiesiny bakterii na szalki hodowlane z pożywką LB-agar i dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego. Bakterie rozprowadzano po powierzchni pożywki za pomocą jałowej głaszczki. Hodowlę powierzchniową prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godzin i po tym czasie dokonywano oceny wydajności transformacji.

5.4.1.3. Bankowanie bakterii

Bakterie hodowane na pożywce stałej z dodatkiem agaru przechowywano w warunkach chłodniczych przez okres do 3 miesięcy w temperaturze 4°C, zabezpieczone parafilmem. W celu dłuższego przechowywania i tworzenia banków szczepów - 850 µl całonocnej hodowli zawiesinowej łączono w jałowej probówce typu eppendorf ze 150 µl glicerolu i umieszczano w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°C).

5.4.1.4. Izolacja plazmidowego DNA w małej skali

Pojedynczą kolonię uzyskaną w wyniku posiewu redukcyjnego bakterii transformowanych plazmidem lub 20 µl jednorodnej genetycznie hodowli zawiesinowej przenoszono do 5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego (25 µg/ml kanamycyny lub 100 µg/ml ampicyliny) i kontynuowano hodowlę przez noc w temperaturze 37°C z intensywnym wytrząsaniem. Izolację plazmidowego DNA prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników - QIAprep Spin Miniprep Kit, opierającego się na dwuetapowej procedurze, obejmującej:

- lizę alkaliczną bakterii, połączoną z nieodwracalną denaturacją białek bakteryjnych i genomowego DNA, które usuwane są z próbki na drodze odwirowania powstającego osadu,
- oczyszczanie plazmidów z uzyskanego supernatantu, z wykorzystaniem wirówkowych kolumniek ze złożem krzemionkowym o pojemności do 20 µg DNA.

W ramach stosowanego protokołu, 5 ml całonocnej hodowli transformowanych bakterii *E.coli* wirowano (10 min, 3800×g, temp. pok.), a następnie bakterie zawieszano w buforze 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, zawierającym 100 µg/ml RNazy A i dalej postępowano zgodnie z protokołem producenta odczynników. Analiza jakościowa i ilościowa otrzymanego preparatu plazmidu prowadzona była metodą spektrofotometryczną oraz na drodze elektroforezy w żelu agarozowym.

5.4.1.5. Izolacja plazmidowego DNA w dużej skali

W celu otrzymania plazmidu w większych ilościach wykorzystywano zestaw odczynników GenElute Plasmid Maxiprep Kit, pozwalający na izolację plazmidu z wykorzystaniem kolumniek ze złożem krzemionkowym o pojemności do 1,2 mg DNA. Zasada działania tego zestawu była analogiczna, jak w przypadku metodyki izolacji plazmidu w małej skali, a więc obejmowała w pierwszym etapie lizę bakterii w środowisku alkalicznym i denaturację białek oraz genomowego DNA, które w odróżnieniu od opisanego wcześniej protokołu, były eliminowane jako serowaty osad w wyniku filtracji przez specjalny filtr strzykawkowy, a nie

na drodze wirowania. Drugi etap oczyszczania plazmidowego DNA w dużej skali wykonywany był identycznie jak w przypadku wcześniej opisanego zestawu odczynników, a więc w oparciu o wiązanie plazmidów do złożeń krzemionkowych w specjalnych kolumnkach wirówkowych w obecności wysokiego stężenia soli chaotropowych (m.in. chlorowodorek guanidyny). Optymalną ilość całonocnej hodowli zawiesinowej *E.coli* jaką należało wykorzystać w procedurze izolacji plazmidu w dużej skali wyliczano, zgodnie z zaleceniami producenta odczynników, ze wzoru - objętość [ml] = 750 / A600, gdzie: A600 - gęstość optyczna hodowli (OD) zmierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 600 nm. Wyliczona objętość mieściła się w zakresie 150-300 ml.

5.4.2. Biologia molekularna

5.4.2.1. Analiza spektrofotometryczna DNA

Roztwór DNA umieszczany był w kuwetach, przystosowanych do pomiaru absorbancji w mikroobjętościach próbki (min. 50 μ l) przy długości fali z zakresu ultrafioletu. Pomiar wykonywany był względem próby ślepej, zawierającej rozpuszczalnik (wodę), przy długościach fali 260 nm i 280 nm. W oparciu o stałą zależność: $A = 1$ dla preparatu dwunucowego DNA o stężeniu 50 ng/ μ l, przy grubości warstwy absorbującej - 10 mm, wyznaczano stężenie próbki zawierającej plazmid. Dzieląc wartość zmierzoną przy długości fali 260 nm (maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych) przez wartość przy długości fali 280 nm (maksimum absorpcji dla białek) uzyskiwano informację o czystości preparatu. W optymalnych warunkach wartość parametru A260/A280 wynosiła 1,8.

5.4.2.2. Elektroforeza DNA

Rozdział DNA prowadzony był na drodze elektroforezy w żelu agarozowym o stężeniu 1% w/v. Żel agarozowy otrzymywano poprzez rozpuszczenie na gorąco odpowiedniej ilości agarozy w buforze TAE (1 g agarozy na 100 ml buforu do elektroforezy). Po rozpuszczeniu agarozy, uzyskany roztwór oziębiany do temperatury ok. 60°C, dodawano 2 μ l wodnego roztworu bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ml na każde 40 ml żelu (końcowe stężenie bromku etydyny - 0,5 μ g/ml) i wylewano do saneczek na żel umieszczonych w statywie. Następnie w odpowiednich uchwytach saneczek umieszczano grzebień w celu odciśnięcia studzienek na próbki w zastygającym żelu. Żel pozostawiano na okres 45 minut w temperaturze pokojowej w celu poprawnego zestalenia. Po tym czasie usuwano grzebień, a saneczki z żelem agarozowym umieszczano w aparacie do elektroforezy. Do komory aparatu

dodawano buforu TAE w takiej ilości, by bufor całkowicie przykrywał powierzchnię żelu. Próbki DNA łączono z buforem obciążającym, zawierającym m.in. glicerol (ułatwiający ze względu na większą gęstość niż bufor TAE nakładanie próbek do studzienek żelu) oraz błękit bromofenolowy, pozwalający śledzić postęp rozdziału elektroforetycznego (prędkość migracji błękitu bromofenolowego w żelu agarozowym o stężeniu 1% jest zbliżona do fragmentów DNA o długości 400-500 par zasad) i umieszczano w studzienkach odcisniętych w żelu. W brzeżnych studzienkach umieszczano próbkę wzorca – marker zawierający fragmenty DNA o ściśle określonej wielkości i ilości poszczególnych fragmentów. Po zmontowaniu urządzenia, rozdziel elektroforetyczny inicjowano poprzez przyłożenie napięcia do elektrod aparatu. Rozdział prowadzono przez 45-60 min przy napięciu 80 V. Wynik rozdziału obserwowano z wykorzystaniem transiluminatora ze światłem UV. Dokumentacji obrazu dokonywano za pomocą aparatu fotograficznego Canon EOS 350D, wyposażonego w obiektyw EFS 18-55 mm, przy następujących ustawieniach: czas naświetlania - 6 s, wartość przesłony - f/36, czułość ISO - 1600. Półilościowej analizy stężenia DNA dokonywano na podstawie porównania intensywności fluorescencji w badanej próbce i prążków markera masy, ponieważ intensywność obserwowanej fluorescencji jest proporcjonalna do całkowitej masy DNA w danym prążku.

5.4.2.3. Reakcja PCR

Primery do reakcji PCR

W każdej reakcji PCR wykorzystywana jest przynajmniej jedna para primerów (starterów), wiążąca się specyficznie (hybrydująca) z określonymi miejscami w obrębie matrycowego DNA. Stosowane primery, odpowiednio: primer wiodący (ang. *forward primer* - FOR) i primer odwrotny (ang. *reverse primer* - REV) hybrydują z miejscami na obydwu niciach powielanego materiału genetycznego. Projektuje się je w ten sposób, aby flankowały odcinek DNA, który ma być zreplikowany. Primer wiodący przyłącza się do nici antysensownej, a powstający w toku reakcji PCR fragment jednoniciowy ma sekwencję zgodną z nicią sensowną. Z kolei primer odwrotny jest komplementarny względem nici sensownej, a nukleotydy przyłączane kolejno w kierunku 5' → 3' dają sekwencję zgodną z nicią antysensowną. Primery do reakcji PCR mogą zawierać dodatkowe, niekomplementarne względem matrycy, fragmenty po stronie końca 5' primera, za pomocą których można na przykład wprowadzać do powstającej w reakcji PCR cząsteczki DNA sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne (należy uwzględnić także włączenie dodatkowej, zmiennej w zależności od danego enzymu restrykcyjnego ilości nukleotydów na końcu

powielanej sekwencji, w sąsiedztwie miejsca rozpoznawanego przez enzym, gdyż ma to wpływ na wydajność reakcji trawienia DNA). W ten sam sposób można dołączać do matrycowego DNA dodatkowe nukleotydy, które najczęściej służą zachowaniu otwartej ramki odczytu w konstruktach genetycznych wykorzystywanych do otrzymywania białek fuzyjnych. Przy produkcji białek fuzyjnych konieczne jest również zaprojektowanie primerów, które pozwolą na usunięcie kodonu STOP z powielanej sekwencji genu, po stronie fragmentu N-końcowego białka.

Przy projektowaniu primerów wykorzystanych w niniejszej pracy stosowano ogólnie przyjęte zasady:

- Primery do reakcji PCR powinny być długości 15-30 nukleotydów.
- Zalecana zawartość guaniny i cytozyny w primerze wynosi 40–60%.
- Należy unikać sekwencji trzech lub więcej kolejnych powtórzeń nukleotydów guaninowych i cytozynowych w pobliżu końca 3' primera, ze względu na ryzyko niespecyficznej hybrydyzacji do matrycowego DNA.
- Zaleca się, by primery były pozbawione wewnątrzcząsteczkowych lub międzycząsteczkowych fragmentów wzajemnie komplementarnych, gdyż może to prowadzić do tworzenia dimerów primerów oraz wewnątrzcząsteczkowych struktur drugorzędowych. Oba zjawiska mogą wpływać negatywnie na wydajność reakcji PCR.
- Temperatura topnienia primerów (T_m), a więc temperatura, przy której dochodzi do dysocjacji 50% dupleksów primer-matryca, powinna być niższa niż 65°C, a różnica temperatur topnienia primerów stosowanych w jednej reakcji PCR nie powinna przekraczać 5°C.

Syntezę zaprojektowanych primerów zlecano komercyjnemu usługodawcy. W ten sposób pozyskiwano liofilizowany materiał, oczyszczony na drodze precypitacji etanolem. Uzyskany preparat liofilizowanego primera rozpuszczano w ściśle określonej ilości wody do biologii molekularnej, otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 100 μ M. W przeprowadzonych reakcjach PCR wykorzystane zostały następujące primery:

- Klonowanie genu ludzkiego receptora adenozyнового A_{2A}.

Primer 1 (uniwersalny starter dla promotora T7) - FOR

5' TAATACGACTCACTATAGGGAG 3' $T_m = 51,1^\circ\text{C}$

Primer 2 (miejsce cięcia przez enzym EcoRI, brak kodonu STOP) - REV

5' AGAATTCCGGACACTCCTGC 3' $T_m = 53,8^\circ\text{C}$

- Klonowanie genu ludzkiego receptora histaminowego H₄.

Primer 3 (miejsce cięcia przez enzym NotI) - FOR

5' CAGCGGCCGCATGCCAGATACTAATAG 3' T_m = 62,8°C

Primer 4 (miejsce cięcia przez enzym BamHI) - REV

5' CGCGGATCCTTAAGAAGATACTGACCGAC 3' T_m = 62,9°C

Warunki reakcji PCR

Jako matrycowe DNA w reakcjach PCR wykorzystywano następujące plazmidy:

- pcDNA3.1-*hA_{2A}* AR - klonowanie ludzkiego receptora adenyzyнового A_{2A},
- pcDNA3.1-*hH₄R* - klonowanie ludzkiego receptora histaminowego H₄.

Reakcje PCR prowadzono w całkowitej objętości próbek - 50 µl. Skład próbek do reakcji PCR przedstawia **Tabela 5.4**.

Tabela 5.4 Skład mieszanin do reakcji PCR

Składnik (stężenie wyjściowe)	Ilość składnika	Stężenie końcowe składnika
Matrycowe DNA (10 ng/µl)	1 µl	0,2 ng/µl (w sumie 10 ng)
Primer FOR (100 µM)	0,4 µl	0,8 µM
Primer REV (100 µM)	0,4 µl	0,8 µM
Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP) (10 mM dla każdego dNTP)	1 µl	każdy dNTP - 0,2 mM
Bufor Pfu (st. Mg ²⁺ - 20 mM)	5 µl	st. końcowe Mg ²⁺ - 2 mM
Polimeraza <i>Pfu</i> (2,5 u/µl)	1 µl	0,05 u/µl (w sumie 2,5 u)
Woda do biologii molekularnej	do 50 µl	---

W pierwszej kolejności próbkę plazmidowego DNA o oznaczonym spektrofotometrycznie stężeniu, stanowiącą matrycę w danej reakcji PCR, rozcieńczano wodą do biologii molekularnej do końcowego stężenia 10 ng/µl. Następnie do polipropylenowej probówki odpipetowywano kolejno składniki zgodnie z tabelą, z wyjątkiem polimerazy, którą dodawano na końcu. Otrzymane próbki niezwłocznie umieszczano w termobloku termocyklera podgrzanego do 95°C (temperatura pokrywy termocyklera wynosiła 105°C, co zapobiegało kondensacji wody na zatyczce probówek w trakcie reakcji) i rozpoczynano realizację zaprogramowanej sekwencji temperatur.

We wstępnych etapach eksperymentów przeprowadzono optymalizację warunków reakcji PCR w zakresie: temperatury hybrydyzacji, czasu trwania poszczególnych etapów oraz całkowitej ilości cykli reakcji. **Tabele 5.6 i 5.7** przedstawiają warunki reakcji, dla których otrzymywano specyficzne produkty z najwyższą wydajnością.

Tabela 5.6 Profil temperaturowy reakcji PCR do amplifikacji cDNA ludzkiego receptora adenyzynowego A_{2A}.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja	95	60	29
Hybrydyzacja primerów	53	60	
Synteza DNA (elongacja)	72	3	
Końcowe wydłużanie produktu	72	10	1

Tabela 5.7 Profil temperaturowy reakcji PCR do amplifikacji cDNA ludzkiego receptora histaminowego H₄.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja	95	30	35
Hybrydyzacja primerów	58	30	
Synteza DNA (elongacja)	72	4	
Końcowe wydłużanie produktu	72	5	1

5.4.2.4. *Trawienie enzymami restrykcyjnymi*

Reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi poddawano materiał w postaci produktów reakcji PCR oraz plazmidowego DNA. Każdy z zaplanowanych eksperymentów inżynierii genetycznej wymagał trawienia wykorzystywanego materiału DNA dwoma różnymi enzymami restrykcyjnymi. Reakcje te prowadzono osobno dla każdego enzymu, oczyszczając

produkty uzyskane w poszczególnych etapach. Wybór zastosowanej metodyki był spowodowany problemami z doбором optymalnych, wspólnych dla stosowanych enzymów, warunków reakcji, co uniemożliwiło przeprowadzenie podwójnego trawienia w jednej próbce (w pilotażowych badaniach obserwowano niespecyficzną lub obniżoną aktywność przynajmniej jednego ze stosowanych łącznie w pojedynczym eksperymencie enzymów).

W **Tabeli 5.7** przedstawiono sekwencje rozpoznawane przez wykorzystane w pracy enzymy oraz skład buforów reakcyjnych, stosowanych zgodnie z zaleceniami producenta, w celu uzyskania maksymalnej wydajności prowadzonych reakcji.

Tabela 5.7 Enzymy restrykcyjne wykorzystane w pracy.

Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Rekomendowany bufor reakcyjny
NheI	5' G [^] CTAGC 3'	Bufor Tango: 33 mM Tris-octan (pH 7,9 w temp. 37°C), 10 mM octan magnezu, 66 mM octan potasu, 0,1 mg/ml BSA
EcoRI	5' G [^] AATTC 3'	Indywidualny bufor EcoRI: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 w temp. 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA
BamHI	5' G [^] GATCC 3'	Indywidualny bufor BamHI: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0 w temp. 37°C), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/mL BSA
NotI	5' GC [^] GGCCGC 3'	Bufor Orange: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 w temp. 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA

Próbki DNA do trawienia przygotowywano w całkowitej objętości 10 lub 20 µl, w zależności od ilości trawionego materiału genetycznego. Zawierały one odpowiednio 1 lub 2 µl enzymu, co w przypadku stosowanych preparatów odpowiadało 1 lub 2 jednostkom aktywności (1 jedn. aktywności enzymu - ilość enzymu zdolna do całkowitego strawienia 1 µg materiału DNA faga λ w ciągu 1 godz.). Reakcje prowadzono w temperaturze 37°C. Czas trwania reakcji modyfikowano każdorazowo, przy uwzględnieniu definicji jednostki aktywności oraz ilości stosowanego enzymu i materiału genetycznego, wykorzystując do obliczeń wzór:

$$\text{czas prowadzenia reakcji [h]} = \text{il. mat. genet. [\mu g]} / \text{il. jedn. aktywności enzymu} \quad (5.1)$$

Po zakończonym trawieniu, enzym restrykcyjny inaktywowano termicznie przez 20 min. (NheI i EcoRI: 65°C; BamHI i NotI: 80°C) i oczyszczano uzyskane produkty trawienia za pomocą zestawu do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych.

5.4.2.5. *Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych*

Oczyszczanie produktów reakcji PCR oraz produktów trawienia enzymami restrykcyjnymi prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników - QIAquick PCR Purification Kit. Oddzielenie zanieczyszczeń białkowych oraz składników buforów reakcyjnych było konieczne dla odpowiedniej wydajności kolejnych etapów eksperymentów inżynierii genetycznej (kolejne reakcje enzymów restrykcyjnych, reakcje ligacji). Zasada oczyszczania materiału genetycznego była analogiczna, jak w opisanej wcześniej procedurze izolacji plazmidów. Próbkę DNA po reakcji enzymatycznej rozcieńczano 6-krotnie buforem wiążącym, zawierającym 5 M chlorowoderek guanidyny i nakładano na powierzchnię mikrokolumny wirówkowej, zawierającej złożo krzemionkowe. Po odwirowaniu próbki, w trakcie którego DNA wiązało się do złoża mikrokolumny, niespecyficznie związane zanieczyszczenia usuwano stosując bufor płuczący (10 mM Tris-HCl, 80% v/v etanolu). W ostatnim etapie, selektywnie związane DNA o długości 100-10 000 par zasad, eluowano ze złoża za pomocą wody do biologii molekularnej.

5.4.2.6. *Izolacja DNA z żelu agarozowego*

Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników - QIAquick Gel Extraction Kit, postępując zgodnie z instrukcjami producenta. Po zakończonym rozdiale elektroforetycznym próbek materiału genetycznego, żel agarozowy umieszczony był na transiluminatorze UV w celu identyfikacji interesujących fragmentów DNA, fluoryzujących w obecności dodanego do żelu bromku etydyny. Właściwy fragment agarozy z zawartym w nim DNA był wycinany z żelu za pomocą skalpela w ten sposób, aby jego objętość była możliwie jak najmniejsza. Uzyskane bloki agarozy umieszczano w probówce typu eppendorf i dodawano buforu zawierającego tiocjanian guanidyny (skład nieujawniony, ochrona patentowa), a następnie inkubowano w temperaturze 55°C do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Uzyskaną próbkę oczyszczano za pomocą mikrokolumn wirówkowych w oparciu o odwracalne wiązanie DNA do złoża krzemionkowych.

5.4.2.7. *Ligacja fragmentów DNA*

Ligację prowadzono przy stosunku molowym wektora i wstawki - 1:3. W pojedynczym eksperymencie wykorzystywano 100 ng wektora. Niezbędną ilość wstawki obliczano ze wzoru:

$$\text{ilość wstawki [ng]} = \frac{\text{wielkość wstawki [pz]}}{\text{wielkość wektora [pz]}} \times \text{ilość wektora [ng]} \times \text{stosunek molowy} \frac{\text{wstawka}}{\text{wektor}} \quad (5.2)$$

Wartości wyliczone dla przeprowadzonych eksperymentów przedstawia **Tabela 5.8**.

Tabela 5.8 Obliczenia ilości składników mieszanin ligacyjnych.

Produkt ligacji	Ilość wektora [ng]	Wielkość wstawki [pz]	Wielkość wektora [pz]	Wymagana ilość wstawki [ng]
p <i>hA</i> _{2A} AR-ECFP	100	1280	4695	82
pQCXIN- <i>hH</i> ₄ R	100	1180	7346	48

W pierwszej kolejności rozcieńczano odpowiednią ilość wektora i wstawki do 8 µl wodą do biologii molekularnej. Uzyskaną próbkę podgrzewano w temperaturze 45°C przez 5 min, a następnie, po oziębieniu do temperatury pokojowej, dodawano 1 µl ligazy DNA faga T4 (5 jedn. Weissa) oraz 1 µl 10-krotnie stężonego buforu dla ligazy (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP) i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 16°C. Całością mieszaniny ligacyjnej transformowano przygotowane równolegle bakterie kompetentne i po 24 godzinach dokonywano oceny wydajności ligacji.

5.4.2.8. Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie produktów reakcji ligacji było prowadzone na zlecenie przez firmę Genomed Sp. z o.o. Rezultaty sekwencjonowania przekazywane były w postaci elektronicznej, jako zapis uzyskanych fluorogramów wraz ich interpretacją w postaci kodu jednoliterowego. Sekwencjonowanie było prowadzone z wykorzystaniem następujących primerów:

Produkt ligacji: **p*hA*_{2A} AR-ECFP**

Primer 1 (FOR) - sekwencjonowanie nr 1
5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
(uniwersalny primer dla bezpośrednio-wczesnego promotora CMV)

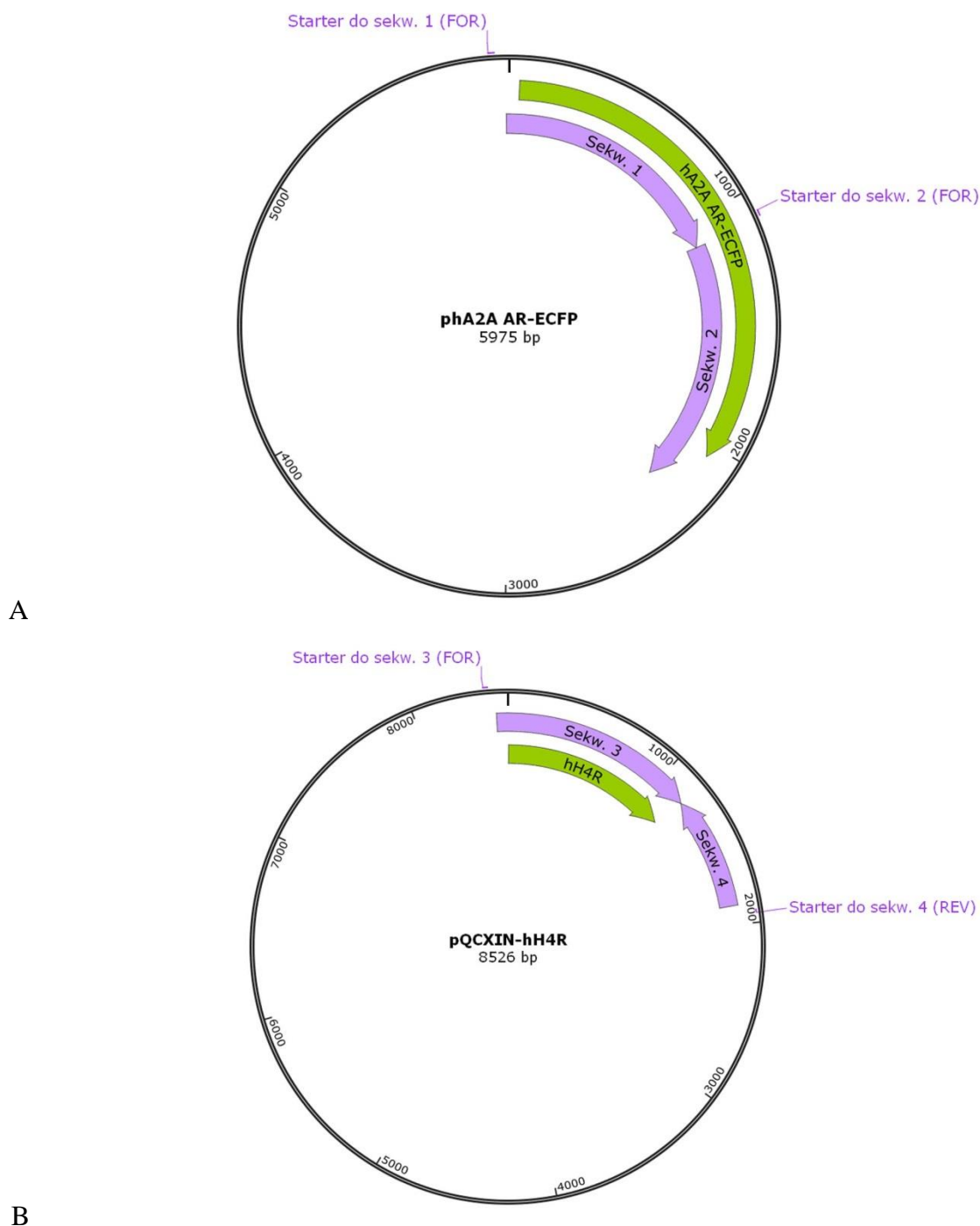
Primer 2 (FOR) - sekwencjonowanie nr 2
5' GTGGGCCAACGGCAGTGCTC 3'

Produkt ligacji: **pQCXIN-*hH*₄R**

Primer 3 (FOR) - sekwencjonowanie nr 3
5' AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC 3'
(uniwersalny primer dla sekwencji LNCX)

Primer 4 (REV) - sekwencjonowanie nr 4
5' ACCGGACAGGTCGGTCTTGA 3'

Fluorogramy uzyskane w wyniku procedur sekwencjonowania nr 1-4 są przedstawione w **Załącznikach 2-5**. Miejsca przyłączenia primerów do sekwencjonowania są zaznaczone na prezentowanych poniżej mapach plazmidów *phA_{2A} AR-ECFP* i *pQCXIN-hH_{4R}* wraz z fragmentami sekwencji objętymi analizą, która została udokumentowana fluorogramami przedstawionymi w załącznikach.



Rysunek 5.1 Mapy plazmidów: A - *phA_{2A} AR-ECFP* i B - *pQCXIN-hH_{4R}*, wraz z zaznaczonymi: miejscami przyłączenia primerów do sekwencjonowania (startery do sekw. 1 - 4); wynikami sekwencjonowania, udokumentowanymi fluorogramami (fioletowe strzałki); sekwencjami kodującymi rekombinowane białka receptorowe (zielone strzałki).

5.4.3. Hodowla komórek eukariotycznych.

5.4.3.1. Warunki hodowli

Hodowlę komórek eukariotycznych prowadzono w sterylnych naczyniach, stosując jałowe pipety i składniki pożywek. Wszelkie operacje związane z hodowlą komórek wykonywano w komorze laminarnej II klasy bezpieczeństwa, z zachowaniem zasad pracy w warunkach aseptycznych. W rutynowej hodowli komórek adherentnych stosowano opisane poniżej standardowe procedury. Różnice w protokołach, wykorzystywanych względem poszczególnych linii komórkowych, dotyczyły przede wszystkim stosowanych pożywek oraz dopuszczalnej maksymalnej konfluencji komórek i proporcji pasażowania. Specyficzne warunki hodowli dla wykorzystywanych komórek przedstawia **Tabela 5.9**.

Tabela 5.9 Specyficzne warunki hodowli dla poszczególnych linii komórkowych.

Linie komórkowe	Skład pożywki	Maksymalna konfluencja, maksymalna proporcja pasażowania
HEK293T WT	DMEM, 10% FBS, P/S	80-90%, 1:20
HEK293- <i>hA</i> _{2A} -ECFP	DMEM, 10% FBS, 200 µg/ml G418, P/S	
CHO-K1 WT	DMEM/F12, 10% FBS, P/S	80-90%, 1:40
CHO- <i>hA</i> ₁ , CHO- <i>hA</i> _{2A} , CHO- <i>hA</i> _{2B} , CHO- <i>hA</i> ₃ , CHO- <i>rA</i> _{2B} , CHO- <i>rA</i> ₃ , CHO- <i>hCB</i> ₁ , CHO- <i>hCB</i> ₂ , CHO- <i>hH</i> _{4R}	DMEM/F12, 10% FBS, 200 µg/ml G418, P/S	
GP+ <i>envAm</i> 12	I pasaż po rozbankowaniu: DMEM, 10% FBS, 2 mM Glutamax, P/S Kolejne pasażę: DMEM, 10% FBS, 200 µg/ml Hygromycyny B, 250 µg/ml Ksantyny, 15 µg/ml Hipoksantyny, 25 µg/ml Kwasu mykofenolowego, 2 mM Glutamax, P/S	60-70%, 1:6
CHO-GPR18- β -arrestin	Opti-MEM, 2% FBS, P/S, 800 µg/ml G418, 300 µg/ml Hygromycyny B	80-90%, 1:20

WT - komórki typu dzikiego

5.4.3.2. Rozbankowanie komórek

Próbki komórek przechowywane w ciekłym azocie, po wyciągnięciu z dewara inkubowano w temperaturze 37°C do rozmrożenia, a następnie zawiesinę komórek rozcieńczano 15-krotnie ciepłą pożywką hodowlaną i wirowano (180×g, 10 min, temp. pok.). Otrzymany osad komórek zawieszano w świeżej porcji ciepłej pożywki i przenoszono do naczynia hodowlanego, które umieszczano w inkubatorze o temperaturze 37°C, atmosferze 5% CO₂ i wilgotności 85-95%. W razie konieczności, po kilku godzinach hodowli, gdy komórki częściowo przyczepiły się do podłoża, zmieniano pożywkę na nową w celu usunięcia martwych komórek.

5.4.3.3. Pasażowanie komórek

Komórki hodowano do uzyskania odpowiedniej konfluencji. Usuwano pożywkę, a następnie przepłukiwano jałowym buforem PBS. Miało to na celu usunięcie pozostałości płodowej surowicy bydłowej, której składniki hamują aktywność proteaz, w tym trypsyny. Po przepłukaniu hodowli, dodawano roztwór: 0,05% trypsyny, 5 mM EDTA w PBS w ilości - 0,5; 1 lub 3 ml, w zależności od wielkości stosowanego naczynia hodowlanego (odpowiednio dla naczyń o powierzchni hodowlanej: 25, 75 i 175 cm²). Następnie naczynie umieszczano na 2-5 min w inkubatorze o temperaturze 37°C, w celu zwiększenia aktywności enzymatycznej trypsyny. Stopniowe odrywanie się komórek od podłoża obserwowano za pomocą mikroskopu odwróconego. W razie potrzeby wstrząsano naczynie dla przyspieszenia tego procesu. Natychmiast po całkowitym oddzieleniu komórek od podłoża, do naczynia dodawano pożywkę w takiej ilości, by uzyskać całkowitą objętość 5-10 ml i komórki zawieszano poprzez kilkukrotne pipetowanie. W zależności od planowanej proporcji pasażowania, właściwą objętość zawiesiny komórek przenoszono do nowego naczynia, zawierającego 5, 12 lub 25 ml świeżej pożywki, odpowiednio w butelkach o powierzchni hodowlanej 25, 75 i 175 cm².

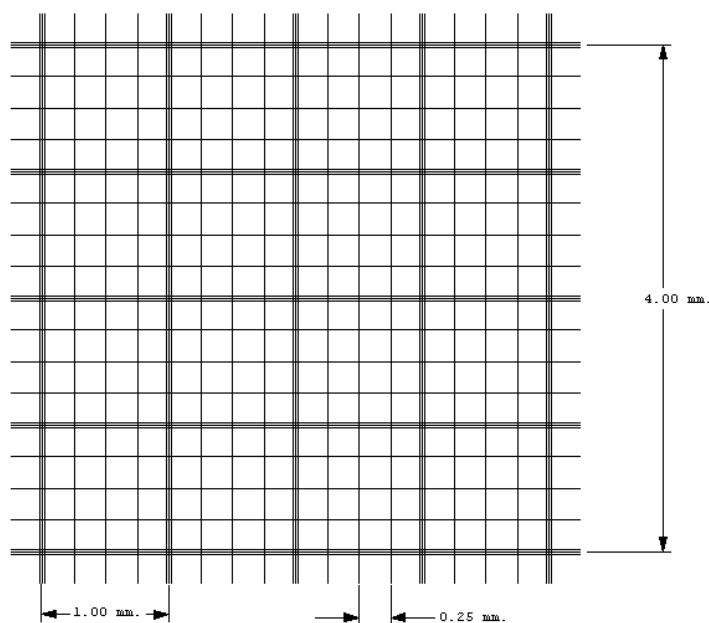
5.4.3.4. Bankowanie komórek

W celu uzyskania próbek w formie umożliwiającej długotrwałe przechowywanie linii komórkowych w ciekłym azocie, komórki o odpowiedniej konfluencji zbierano z naczyń hodowlanych, postępując w pierwszym etapie, jak w przypadku pasażowania hodowli. Zawiesinę komórek zebranych z butelki wirowano (180×g, 10 min, temp. pok.), a następnie uzyskany osad zawieszano w roztworze do mrożenia o składzie: 10% DMSO, 90% FBS i przenoszono po 1 ml do zakręczanych krioprobówek z gwintem wewnętrznym, które

umieszczano w pojemniku do powolnego zamrażania, wypełnionego izopropanolem (Mr.Frosty™, Nalgene). Pojemnik wraz z krioprobówkami umieszczany był w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°C), co gwarantowało łagodne obniżanie temperatury próbek w tempie ok. -1°C/min. Probówki z komórkami pozostawiano w zamrażarce na minimum 2 godziny, a następnie przenoszono do dewara z ciekłym azotem.

5.4.3.5. Zliczanie komórek

Oceny ilości komórek dokonywano za pomocą komory Fuchs-Rosenthala, której schemat przedstawia **Rysunek 5.2**. Na szkiełku podstawowym komory naniesione są graweracje tworzące siatkę, którą stanowi 16 dużych kwadratów oddzielonych liniami potrójnymi, każdy o powierzchni 1 mm². Duże kwadraty podzielone są liniami pojedynczymi na 16 małych kwadratów, o długości krawędzi wynoszącej 0,25 mm. Głębokość komory wynosi 0,1 mm. Objętość płynu, zawartego w przestrzeni wyznaczonej przez potrójne linie siatki (16 małych kwadratów) oraz odpowiednio przytwierdzone szkiełko nakrywkowe (w miejscu łączenia szkiełek na mokro powinny być obserwowane pierścienie Newtona), wynosi 0,2 μl.



Rysunek 5.2 Schemat obrazu mikroskopowego komory Fuchs-Rosenthala, z zaznaczonymi wymiarami siatki graweracji.

W celu dokonania zliczenia, zawieszinę komórek łączono w probówce typu eppendorf z roztworem błękitu trypanu w stosunku objętościowym 1:1 i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 1 minutę. Po tym czasie, 20 μl uzyskanej próbki przenoszono do przygotowanej komory Fuchs-Rosenthala. Na podstawie obserwacji mikroskopowych, liczono komórki

niewybarwione na niebiesko, leżące wewnątrz dużego kwadratu o boku 1 mm, a także na górnych i lewych liniach ograniczających. Nie liczone komórki znajdujących się na dolnych i prawych liniach ograniczających, aby uniknąć dwukrotnego zliczania tych samych komórek. Analizowano komórki w trzech dużych kwadratach i wyznaczano średnią. Uzyskany wynik pomnożono przez 10 (uwzględniając objętość płynu w przestrzeni o podstawie wyznaczonej potrójnymi liniami, równą 0,2 μl oraz 2-krotne rozcieńczenie próbki wyjściowej błękitem trypanu) dla obliczenia ilości komórek w 1 μl zawiesiny.

5.4.4. Ekspresja rekombinowanych białek w komórkach eukariotycznych

5.4.4.1. Transfekcja przejściowa z użyciem *FugeneHD*

Dwadzieścia cztery godziny przed planowaną transfekcją, na szalki hodowlane o powierzchni 10 cm^2 wysiewano 2×10^5 komórek linii CHO-K1 lub 3×10^5 komórek linii HEK293T w 2 ml kompletnej pożywki wzrostowej, bez dodatku antybiotyków (odpowiednio: DMEM, 10% FBS lub DMEM/F12, 10% FBS). W dniu eksperymentu, roztwór zawierający 2 μg plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP* rozcieńczano w jałowej probówce typu eppendorf odpowiednią pożywką hodowlaną bez surowicy do objętości 100 μl , a następnie dodawano 5 μl odczynnika *FugeneHD* i dokładnie mieszano. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 15 minut i dodawano kroplami do szalki hodowlanej, rozprowadzając roztwór po całej powierzchni szalki. Analizy wydajności transfekcji dokonywano po 48 godzinach, w oparciu o obraz mikroskopii fluorescencyjnej dla hodowli. Po tym okresie wykonywano także analizę cytometryczną lub rozpoczynano procedurę selekcji komórek w eksperymentach transfekcji stabilnej.

5.4.4.2. Transfekcja przejściowa z użyciem *PEI*

Optymalizację protokołu transfekcji przejściowej komórek linii CHO z wykorzystaniem *PEI* przeprowadzono na szalkach o powierzchni hodowlanej 10 cm^2 . Testowano różne proporcje DNA i *PEI*, a także zmienny czas inkubacji próbek. Postępowano według następującego protokołu: 24 godziny przed transfekcją na szalki wysiewano 3×10^5 komórek linii CHO w 2 ml pożywki DMEM/F12, 10% FBS, a następnie, w dniu właściwego eksperymentu, w jałowych probówkach typu eppendorf łączono roztwór plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP*, rozcieńczony do objętości 400 μl pożywką DMEM/F12 bez surowicy (całkowita ilość DNA w zakresie 0,5 - 5 μg) oraz 4 - 15 μl roztworu *PEI* o stężeniu 1 mg/ml . Następnie próbki inkubowano 10 lub 20 minut w temperaturze pokojowej i dodawano do hodowli. Obserwację

mikroskopową komórek prowadzono za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego 48 godzin po transfekcji i na jej podstawie dokonano wyboru optymalnych warunków eksperymentu.

Aby uzyskać odpowiednią ilość materiału komórkowego do testów wiązania radioliganda, przeprowadzono transfekcję komórek CHO plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* w większej skali - na 20 szalkach o powierzchni 175 cm². W tym celu do naczyń hodowlanych wysiewano $5,4 \times 10^6$ komórek, a następnie po 24 godzinach, przygotowywano mieszaninę transfekcyjną o składzie (w przeliczeniu na jedną szalkę): 72 µg plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP* rozcieńczone do 6 ml pożywką DMEM/F12 bez surowicy i 180 µl roztworu PEI o stężeniu 1 mg/ml. Uzyskaną mieszaninę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej i dodawano do komórek. Po dwóch dniach od eksperymentu dokonywano oceny wydajności transfekcji i postępowano dalej zgodnie z protokołem otrzymywania preparatu błon komórek eukariotycznych do testów wiązania radioligandów.

5.4.4.3. *Transfekcja stabilna*

Dwie doby po transfekcji z wykorzystaniem odczynnika FugeneHD, komórki zbierano z szalek hodowlanych o powierzchni 10 cm² i wirowano (180×g, 10 min, temp. pok.). Osad komórkowy zawieszano w świeżej pożywce zawierającej antybiotyk selekcyjny - genetycynę (G418) w stężeniu 800 µg/ml i przenoszono do dużej butelki hodowlanej o powierzchni 175 cm². Hodowlę kontynuowano przez 14 dni, do momentu zakończenia pojawiania się komórek nekrotycznych. W tym okresie pożywkę zmieniano co 2 dni, w celu usunięcia odcepionych od podłoża martwych komórek.

W przypadku linii HEK293T, dla której uzyskano satysfakcjonujący wynik transfekcji stabilnej, wykonano procedurę subklonowania, która miała na celu uzyskanie jednorodnej linii komórkowej, wywodzącej się z pojedynczej komórki. W oparciu o wyniki przeprowadzonego wcześniej eksperymentu dla linii HEK293T typu dzikiego (który wykazał że wydajność posiewu wynosi 50%), po zakończonym etapie selekcji z wykorzystaniem G418, przygotowano zawiesinę komórek HEK293-*hA_{2A}-ECFP* o gęstości 20 komórek/ml i rozpipetowano po 100 µl do dołków 5 płytek 96-dołkowych. Po tygodniu hodowli, gdy obserwowano wyraźnie zarysowane kolonie komórek, dokonywano oceny ekspresji białka fuzyjnego w poszczególnych klonach za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Jednorodne, intensywnie fluoryzujące kolonie przenoszono do większego naczynia hodowlanego, a następnie z części materiału tworzącego bank linii, natomiast pozostałe komórki hodowano dalej do uzyskania odpowiedniej ilości materiału do testów wiązania radioliganda.

5.4.4.4. Transdukcja retrowirusowa

Jeden dzień przed planowaną transfekcją, linię komórek pakujących (GP+envAm12) spasażowano w ilości 1×10^6 komórek do butelki o powierzchni 25 cm² w pożywce DMEM, 10% FBS. Komórki transfekowano przy użyciu odczynników TurboFect lub Lipofectamine2000. Postępując zgodnie z zaleceniami producentów, przygotowano próbki do transfekcji jak w **Tabeli 5.10**.

Tabela 5.10 Skład próbek do transfekcji komórek GP+envAm12 w procedurze transfekcji retrowirusowej komórek eukariotycznych

Eksperyment	DNA	Odczynnik transfekcyjny
	Rozpuszczalnik do rozcieńczenia DNA	Czas inkubacji DNA i odczynnika transfekcyjnego przed dodaniem do komórek
hCB₁R	15 µg, w tym: 9,37 µg pLXSN-hCB1R 5,63 µg pcDNA3.1-VSV-G DMEM do 625 µl	Lipofectamine2000 25 µl + 600 µl DMEM 20 min
hCB₂R	15 µg, w tym: 9,37 µg pLXSN-hCB1R 5,63 µg pcDNA3.1-VSV-G DMEM do 625 µl	Lipofectamine2000 25 µl + 600 µl DMEM 20 min
hH₄R	18 µg, w tym: 11,25 µg pQCXIN-hH4R 6,75 µg pcDNA3.1-VSV-G DMEM do 600 µl	TurboFect 24 µl 15 min

Po 14 godzinach od transfekcji, zmieniano pożywkę w hodowli komórek pakujących (3 ml - DMEM, 10% FBS, 100 U/ml penicyliny G, 100 µg/ml streptomycyny) i dodawano 30 µl roztworu maślanu sodu (500 mM w H₂O). Hodowlę komórek kontynuowano przez 48 godzin w obniżonej temperaturze 32°C, a następnie zbierano 3 ml nadsącza z nad hodowli, który filtrowano przez filtr o średnicy porów 45 µm. Uzyskany w ten sposób jałowy supernatant, zawierający cząstki wirusa, łączono z 2,4 µl roztworu polibrenu (10 mg/ml w H₂O) i przenoszono do butelki z komórkami linii CHO (konfluencja 80% w naczyniu o powierzchni 25 cm²). Po 2 godzinach zmieniano pożywkę na nową, a dwa dni po transdukcji, komórki CHO pasażowano w pożywce zawierającej 800 µg/ml genetycyny i prowadzono selekcję pozytywnych klonów przez okres dwóch tygodni, identycznie jak przypadku opisanej

wcześniej transfekcji stabilnej z wykorzystaniem plazmidu *phA_{2A} AR-ECFP*. W wyniku eksperymentów transdukcji retrowirusowej otrzymano następujące linie komórkowe: CHO-*hCB_{1R}*, CHO-*hCB_{2R}* i CHO-*hH_{4R}*.

5.4.4.5. Transdukcja komórek owadzych

Cząstki wirusów wykorzystane w eksperymencie zostały otrzymane w oparciu o komercyjny zestaw BaculoGOLD (Becton Dickinson) i wektory pVL1392, zawierające sekwencje odpowiednio: ludzkiego receptora histaminowego H₄ oraz podjednostek białka G - G α_{i2} i G $\beta_{1\gamma 2}$. Do transdukcji komórek owadzych wykorzystano, charakteryzujące się wysokim mianem bakulowirusów, supernatanty hodowlane po dwóch rundach amplifikacji wirusów, otrzymane w grupie prof. Rolanda Seiferta (Instytut Farmakologii, Uniwersytet Medyczny, Hanover, Niemcy).

Komórki linii Sf9, wywodzącej się z komórek jajnikowych ćmy *Spodoptera frugiperda*, były hodowane w kolbach o pojemności 250 ml z łopatkowym systemem mieszania, napędzanym za pomocą mieszadła magnetycznego przy prędkości obrotów 100 rpm, w temperaturze 28°C. Stosowano pożywkę hodowlaną SF 900 II z dodatkiem 5% FBS oraz antybiotyków (penicylina - 50 U/ml, streptomycyna - 50 μ g/ml). Po osiągnięciu gęstości 3×10^6 komórek/ml, do hodowli dodawano (w 100-krotnym rozcieńczeniu) każdy z trzech roztworów podstawowych zawierających cząstki bakulowirusów, które kodowały białko receptorowe i podjednostki białka G. Hodowlę zainfekowanych komórek prowadzono przez 48 godzin. Następnie komórki zbierano na drodze wirowania (180 \times g, 10 min, 4°C) i kontynuowano procedurę przygotowania preparatu błon do testów wiązania radioliganda.

5.4.4.6. Analiza cytometryczna

W celu przeprowadzenia analizy cytometrycznej komórek CHO przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP* - 48 godzin po wprowadzeniu plazmidu do wnętrza komórek, hodowlę płukano buforem PBS i zbierano komórki za pomocą 5 mM roztworu EDTA w PBS (stosowanie trypsyny jest niewskazane przy analizie ekspresji białek błony komórkowej), a następnie wirowano (180 \times g, 10 min, temp. pok.). Osad komórkowy zawieszano w buforze PBS z dodatkiem 1% FBS. Otrzymaną zawiesinę przepuszczano kilkakrotnie przez igłę strzykawkową - rozmiar 26 G, a następnie przez jednorazowe, jałowe sitko nylonowe o średnicy oczek - 40 μ m, w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Otrzymane próbki analizowano za pomocą cytometru przepływowego Becton Dickinson LSRII.

W pierwszej kolejności ustalono aparaturowe wzmocnienie sygnału. Dokonywano zmiany napięcia fotopowielaczy (PMT Voltage) dla wszystkich analizowanych parametrów (FSC, SSC i fluorescencja) w ten sposób, aby rejestrowane sygnały mieściły się w oknie pomiarowym urządzenia. Następnie, w pełnej populacji zarejestrowanych cząstek, zidentyfikowano wyraźną subpopulację, która w oparciu o wartość parametrów FSC i SSC, została zakwalifikowana jako frakcja całych, nieuszkodzonych komórek. Dalszej analizie poddana została wzajemna relacja parametrów FSC-H i FSC-W oraz FSC-A i FSC-H (sygnał pochodzący od cząstki trafiającej w światło lasera jest rejestrowany jako impuls elektryczny, opisany dwoma mierzonymi parametrami: H - ang.: *height* - maksimum piku oraz W - ang.: *width* - czas trwania impulsu; trzeci z parametrów jest obliczany na podstawie dwóch poprzednich - A - ang. *area* - powierzchnia piku). W pierwszym przypadku, na zarejestrowanym dwuwymiarowym wykresie kropkowym FSC-H vs. FSC-W, zabramkowano właściwą, zagęszczoną populację obserwowanych komórek, ignorując wyraźne „ogonowanie” utworzone przez komórki o podwyższonej wartości parametru FSC-W. Analizując kolejną zależność - FSC-A vs. FSC-H stwierdzono, że zgodnie z oczekiwaniami, populacja odpowiadająca pojedynczym komórkom układała się na osi diagonalnej dwuwymiarowego wykresu kropkowego dla tych parametrów, natomiast dublety, triplety, itd. znajdowały się wyraźnie poza osią diagonalną. Właściwej analizie intensywności fluorescencji poddawane były jedynie, zidentyfikowane w opisanej wyżej procedurze, populacje pojedynczych komórek. Zmierzoną intensywność fluorescencji poszczególnych komórek przedstawiono w postaci histogramów. Posłużyły one do wskazania wartości progowej zmierzonej fluorescencji, poniżej której obserwowano autofluorescencję komórek. Ostatecznie, komórki o fluorescencji wyższej niż założona wartość progowa, zostały przedstawione na dwuwymiarowym wykresie konturowym dla parametrów FSC i fluorescencji AmCyan FL (filtr 525/50 nm, zgodny z widmem emisyjnym białka ECFP). Podana została także statystyka poszczególnych populacji zarejestrowanych cząstek, wyliczona w programie do obsługi cytometru - FACSDiva Software.

5.4.5. Testy wiązania radioligandów

5.4.5.1. Preparaty błon komórkowych z adherentnych komórek eukariotycznych

Komórki linii CHO z nadekspresją ludzkich i szczurzych podtypów receptorów adenozynowych, ludzkich receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂ oraz ludzkiego receptora histaminowego H₄, a także komórki HEK293-*hA_{2A}*-ECFP były hodowane na szalkach o

powierzchni 175 cm² we właściwej pożywce wzrostowej, do uzyskania konfluencji 80%. Następnie usuwano pożywkę, a powierzchnię szalek przemywano 5 ml buforu PBS i po usunięciu pozostałości buforu, przenoszono do zamrażarki o temperaturze -80°C, gdzie pozostawiano je na minimum 2 godz. Po wyjęciu szalek z zamrażarki, komórki zbierano w zimnym buforze 5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4 (2 ml na szalkę) korzystając z gumowych głaszczek. Zawiesinę komórek homogenizowano przy użyciu dyspergatora Ultra-Turrax z zainstalowanym ostrzem 10G, przy prędkości obrotów 24 000 rpm (ustawienie nr 6) przez 45 s, a następnie uzyskany preparat wirowano (1000×g, 10 min, 4°C), aby usunąć jądra komórkowe i niehomogenizowane komórki. Supernatant po wirowaniu ponownie homogenizowano w identycznych jak wcześniej warunkach. Otrzymany preparat po raz kolejny wirowano (45 000×g, 60 min, 4°C), a uzyskany osad zawieszano w buforze 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, w ilości 0,1 ml na każdą szalkę wykorzystaną w eksperymencie. Następnie oznaczano stężenie białka i otrzymany preparat przenoszono do probówek polipropylenowych z zakrętką, które następnie umieszczano na 30 s w ciekłym azocie w celu szybkiego zamrożenia. Otrzymany preparat błon przechowywano w temperaturze -80°C.

5.4.5.2. Preparat błon komórkowych z komórek owadzych

Osad komórkowy otrzymany przez odwirowanie transdukowanych komórek Sf9, przemywano buforem PBS i ponownie wirowano (180×g, 10min, 4°C), a następnie zawieszano w buforze do homogenizacji, o składzie: benzamidyna 10 µg/ml, leupeptyna 10 µg/ml, 200 µM PMSF, 12,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 75 mM Tris-HCl w wodzie ultraczystej, pH 7,4 (15 ml buforu na każde 100 ml wyjściowej hodowli komórek). Zawiesinę homogenizowano z użyciem szklanego homogenizatora tkankowego z teflonowym tłuczkiem (25 posunięć) i wirowano (40×g, 5 min, 4°C). Nadsącz przenoszono za pomocą pipety serologicznej do probówek wirówkowych i wirowano (40 000×g, 20 min, 4°C). Uzyskany osad ponownie zawieszano w identycznej objętości buforu do homogenizacji i 10-krotnie przepuszczano przez igłę strzykawkową - rozmiar 21G. Etap wirowania i homogenizacji powtarzano jeszcze raz, a uzyskany preparat dzielono na mniejsze porcje, które umieszczano w probówkach propylenowych i przechowywano w temperaturze -80°C.

5.4.5.3. Preparaty błon z tkanek zwierzęcych

Kora mózgowa szczura

Mózgi szczurów szczepu Sprague-Dawley przechowywano w temperaturze -80°C. Przed rozpoczęciem preparacji, tkankę umieszczano w zimnym roztworze soli fizjologicznej do

czasu rozmrożenia. Oddzieloną za pomocą skalpela korę mózgową homogenizowano w 320 mM roztworze sacharozy, z użyciem szklanego homogenizatora tkankowego z teflonowym tłuczkiem. Uzyskany homogenat wirowano (1000×g, 10 min, 4°C) i pobierano supernatant, który ponownie wirowano przy większej prędkości (37 000×g, 1 h, 4°C). Osad, stanowiący frakcję synaptosomalno-mitochondrialną preparatu, homogenizowano w buforze Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, za pomocą dyspergatora Ultra-Turrax z zainstalowanym ostrzem 10G, przy prędkości obrotów 16 000 rpm (ustawienie nr 3) przez 10 s. Potem wirowano próbkę, a uzyskany osad zawieszano w buforze 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 i przechowywano w temperaturze -80°C. Stężenie białka w uzyskanym preparacie oznaczano metodą Lowry'ego.

Prądkowie z mózgu szczura

Po usunięciu kory z mózgu szczura, wypreparowano znajdującą się przed sklepieniem, ciemniejszą tkankę odpowiadającą prądkowiu i umieszczono ją w naczyniu z zimnym buforem Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Tkankę homogenizowano przy użyciu stosowanego wcześniej homogenizatora Ultra-Turrax, przy prędkości obrotów ostrza - 16 000 rpm przez kilka sekund. Otrzymaną zawiesinę wirowano (48 400×g, 15 min, 4°C). Po usunięciu nadsącza, uzyskany osad zawieszano w świeżej porcji buforu Tris-HCl i ponownie homogenizowano oraz wirowano w identycznych jak wcześniej warunkach. Po zakończeniu drugiego etapu wirowania i zawieszeniu osadu w buforze Tris-HCl, preparat porcjowano do próbek polipropylenowych, oznaczano zawartość białka i umieszczano w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°C).

5.4.5.4. Oznaczenie stężenia białka metodą Lowry'ego

Stężenie białka w preparatach błon linii komórkowych i tkanek zwierzęcych było oznaczane w oparciu o metodę Lowry'ego. Technika ta obejmuje reakcję siarczanu miedzi i winianu sodu w środowisku zasadowym, skutkującą utworzeniem kompleksu miedzi (Cu^{2+}) i białka. W kolejnym etapie, do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest odczynnik Folina-Ciocalteu (kompleks kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego), który w obecności aminokwasów aromatycznych białka, ulega powolnej redukcji w ilości proporcjonalnej do skompleksowanych jonów miedzi, a tym samym proporcjonalnie do stężenia białka w badanej próbce. Powstający w wyniku redukcji odczynnik Folina-Ciocalteu rozpuszczalny w wodzie, barwny produkt, jest oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali 750 nm. Stężenie białka w badanej próbce wyznaczane jest w oparciu o krzywą standardową,

wykreślona dla preparatu referencyjnego białka, najczęściej albuminy (BSA). Zakres pomiarowy metody obejmuje stężenie białka pomiędzy 1-100 $\mu\text{g/ml}$.

Odczynniki niezbędne dla przeprowadzenia oznaczania białka metodą Lowry'ego przygotowano według następujących przepisów:

Odczynnik A

Na_2CO_3 10 g
 NaOH (0,1 M) 500 ml

Odczynnik B

$\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
winian sodu 0,5 g
woda dejonizowana 50 ml

Odczynnik C

Przygotowany bezpośrednio przed oznaczeniem, poprzez połączenie 50 cz. obj. odczynnika A z 1 cz. obj. odczynnika B

Odczynnik D

Roztwór roboczy odczynnika Folin-Ciocalteu otrzymano poprzez połączenie 90 ml wody dejonizowanej i 18 ml stężonego odczynnika oraz umieszczono w ciemnej butelce w celu ochrony przed światłem.

Roztwór wzorcowy albuminy otrzymano odważając 5 mg białka i rozpuszczając je w 5 ml wody ultraczystej. Następnie dokonano pomiaru absorbancji uzyskanego roztworu przy długości fali 280 nm względem próby ślepej, którą stanowiła woda. Zakładając, że współczynnik absorpcji właściwej dla albuminy przy tej długości fali wynosi $\alpha = 0,66 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, wyznaczono rzeczywiste stężenie uzyskanego roztworu korzystając ze wzoru: $c [\text{mg/ml}] = A / 0,66$.

Oznaczone stężenie roztworu wzorcowego albuminy wykorzystano przy obliczaniu rzeczywistego stężenia białka w poszczególnych rozcieńczeniach roztworu podstawowego, wykonanych jak w **Tabeli 5.11** na potrzeby wyznaczenia krzywej wzorcowej.

Tabela 5.11 Przygotowanie rozcieńczeń roztworu wzorcowego albuminy do krzywej wzorcowej w metodzie Lowry'ego.

Lp.	Objętość roztworu wzorcowego albuminy [μl]	Objętość wody dejonizowanej [μl]	Stężenie białka w próbce [$\mu\text{g/ml}$] ^a
1	10	190	50
2	20	180	100
3	40	160	200
4	60	140	300
5	80	120	400

^a - przy założeniu stężenia wyjściowego roztworu albuminy - 1 mg/ml.

Właściwe oznaczenie stężenia białka w preparacie błon przeprowadzono, dodając w pierwszej kolejności 1 ml odczynnika Lowry’ego (odczynnik C) do 0,2 ml próby badanej, próby ślepej lub próby o znanym stężeniu albuminy i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do wszystkich próbek dodawano odczynnik Folin-Ciocalteu (odczynnik D), dokładnie mieszano i pozostawiano na 30 minut. Po tym czasie dokonywano pomiaru absorbancji próbek, wykreślano krzywą standardową dla próbek o znanym stężeniu albuminy i na jej podstawie wyliczano stężenie białka w oznaczanym preparacie. Schemat całego eksperymentu przedstawia **Tabela 5.12**.

Tabela 5.12 Schemat oznaczania stężenia białka metodą Lowry’ego

	Próba ślepa	Próba standardowa albuminy	Próba badana (rozc. 1:20)
Woda dejonizowana	200 μ l	-	190 μ l
Preparat błon	-	-	10 μ l
Rozcieńczenia roztworu wzorcowego BSA	-	200 μ l	-
Odczynnik C	1000 μ l		
Inkubacja	20 min, temp. pok.		
Odczynnik D	100 μ l		
Inkubacja	30 min, temp. pok.		

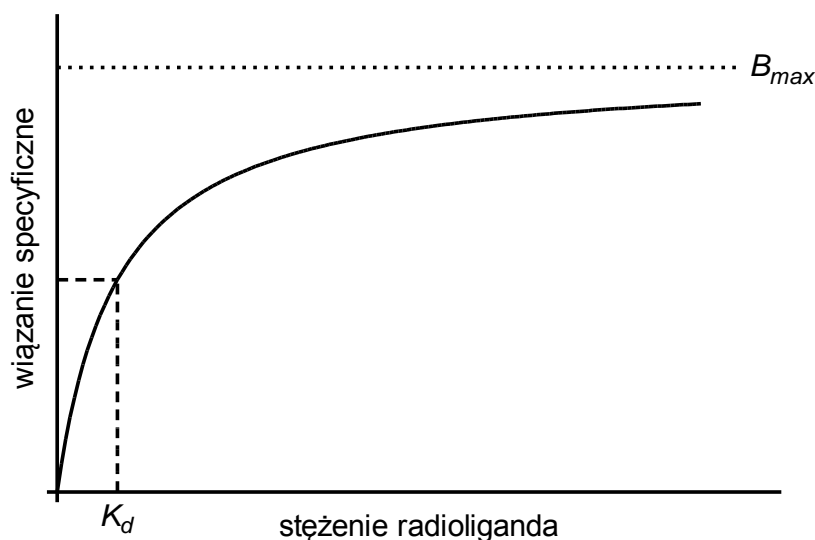
5.4.5.5. Założenia analizy saturacyjnej

Analiza saturacyjnego wiązania radioligandów jest testem, w którym oznaczane jest specyficzne wiązanie radioliganda do receptorów, ulegające wysyceniu wraz ze wzrostem stężenia znakowanego liganda w kolejnych próbkach. Specyficzne wiązanie radioliganda można opisać za pomocą równania:

$$SB = \frac{B_{max} \times c_{RL}}{K_d + c_{RL}}, \quad (5.3)$$

gdzie: SB - wiązanie specyficzne radioliganda (ang.: *specific binding*), B_{max} - gęstość receptorów, K_d - stała dysocjacji radioliganda, c_{RL} - stężenie niezwiązanego radioliganda.

Zobrazowaniem **równania 5.3** jest krzywa saturacyjnego wiązania radioliganda (**Rys. 5.3**). Z interpretacji wykresu wynika, że wartość stałej K_d odpowiada stężeniu radioliganda, dla którego obserwuje się wysycenie 50% specyficznych miejsc wiążących, natomiast wartość B_{max} to teoretyczny poziom wiązania radioliganda, odpowiadający całkowitemu wysyceniu receptorów.



Rysunek 5.3 Standardowa krzywa saturacyjnego wiązania radioliganda.

Celem testów saturacyjnego wiązania radioligandów jest wyznaczenie powinowactwa znakowanego liganda względem badanego receptora, wyrażonego poprzez stałą dysocjacji K_d , a także określenie ilości receptorowych miejsc wiążących w wykorzystanym preparacie tkankowym lub komórkowym, opisanych za pomocą parametru B_{max} . Porównanie parametrów wiązania K_d i B_{max} , wyznaczonych dla różnych preparatów błon, pozwala m.in. odpowiedzieć na pytanie jak modyfikacja białka receptorowego lub też zmiana systemu ekspresyjnego wpływa na charakterystykę farmakologiczną i poziom ekspresji receptora.

W ramach niniejszej pracy, eksperymenty wiązania saturacyjnego radioligandów wykonywano, inkubując stałą, określoną ilość wyizolowanej frakcji błonowej receptorów ze zmiennym stężeniem znakowanego liganda receptora, wyznaczając w ten sposób całkowite wiązanie radioliganda (TB , ang.: *total binding*) dla całego badanego zakresu stężeń. Równolegle przygotowywano próbki zawierające, oprócz białka receptorowego i radioliganda, także ligand nieznakowany, w stężeniu gwarantującym całkowite wyparcie radioliganda ze specyficznych miejsc wiązania. Wyznaczano w ten sposób poziom wiązania niespecyficznego (NSB , ang.: *non-specific binding*), za które odpowiadać może m.in. wiązanie radioliganda do pokrewnych receptorów, obecnych w wykorzystanym materiale biologicznym lub też interakcja z innymi komponentami próbki (wiązanie do warstwy

lipidowej błony komórkowej, materiału filtrów i próbek, w których przeprowadza się oznaczenia). Różnica pomiędzy wiązaniem całkowitym a wiązaniem niespecyficznym wyznacza poziom wiązania specyficznego dla danego stężenia radioliganda:

$$SB = TB - NSB, \quad (5.4)$$

gdzie: SB - wiązanie specyficzne, TB - wiązanie całkowite, NSB - wiązanie niespecyficzne.

Radioaktywność niezwiązanego radioliganda w próbkach oznaczano, dokonując pomiaru radioaktywności rozcieńczeń radioliganda, dodawanych do preparatu błon komórkowych (TA , ang.: *total added*) i odejmując od zmierzonej wartości całkowitą frakcję związanego radioliganda:

$$RL_{niezw.} [dpm] = TA [dpm] - TB [dpm], \quad (5.5)$$

gdzie: $RL_{niezw.}$ - radioaktywność niezwiązanego radioliganda w stanie równowagi, TA - radioaktywność całkowitej ilości radioliganda dodanego do próbki, TB - wiązanie całkowite radioliganda w stanie równowagi.

Na podstawie wyznaczonej radioaktywności niezwiązanego radioliganda, wyliczano jego stężenie w próbce, korzystając ze **wzoru 5.6**.

$$c_{RL} [nM] = \frac{RL_{niezw.} [dpm]}{SA [dpm / fmol] \times V_{pr} [\mu l]}, \quad (5.6)$$

gdzie: c_{RL} - stężenie niezwiązanego radioliganda, $RL_{niezw.}$ - radioaktywność niezwiązanego radioliganda, SA - aktywność specyficzna radioliganda (ang.: *specific activity*), V - objętość próbki, przy czym aktywność specyficzną wyrażoną w [dpm/fmol] obliczano na podstawie wartości podanej przez producenta i wyrażonej w jednostkach [Ci/mmol], korzystając z zależności $1 \text{ Ci} = 2,22 \times 10^{12} \text{ dpm}$. Stąd:

$$SA [dpm/fmol] = SA [Ci/mmol] \times 2,22. \quad (5.7)$$

Ostatecznie, wyznaczoną wcześniej wartość wiązania specyficznego, wyrażano jako ilość zajętych miejsc specyficznie wiążących radioligand [fmol] w przeliczeniu na ilość zastosowanego białka [mg], korzystając z zależności:

$$B [fmol / mg] = \frac{SB [dpm]}{SA [dpm / fmol] \times m_{prot.} [mg]}, \quad (5.8)$$

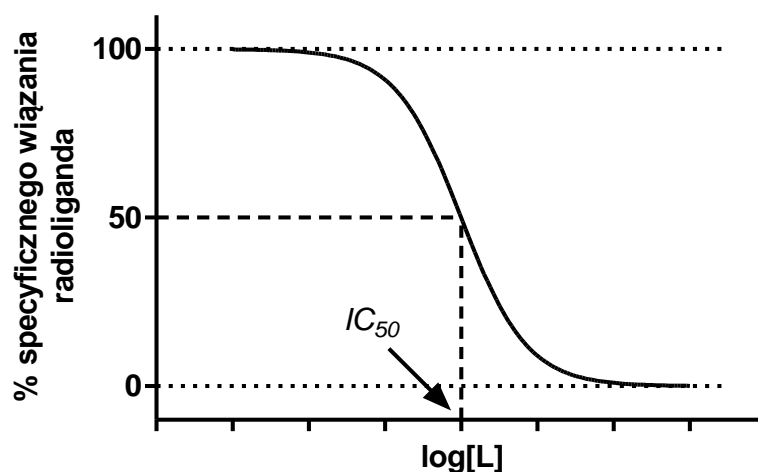
gdzie: B - wiązanie właściwe (ang.: *binding*), SB - wiązanie specyficzne, SA - aktywność specyficzna radioliganda, $m_{prot.}$ - ilość białka w próbce.

Uzyskane wyniki przedstawiano na wykresie jako zależność wiązania właściwego w funkcji stężenia wolnego radioliganda. Względem otrzymanych punktów przeprowadzono analizę regresji nieliniowej z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism, stosując model wiązania saturacyjnego z jednym miejscem wiążącym (ang.: *saturation binding - one site model*). Na podstawie przeprowadzonej analizy, wyznaczano wartości stałej K_d , będącej miarą powinowactwa liganda oraz parametr B_{max} , będący miarą maksymalnej liczby miejsc specyficznie wiążących radioligand w przeliczeniu na miligram białka w badanym preparacie błon komórkowych [238, 267-269].

5.4.5.6. Założenia analizy kompetycyjnej

W ramach testów kompetycyjnego wiązania radioligandów, możliwe jest pośrednie wyznaczenie powinowactwa receptorowego nieznakowanych połączeń, poprzez pomiar ich zdolności do współzawodnictwa z radioaktywnym ligandem o kieszeń wiążącą receptora. W testach tego typu stosuje się stałe stężenie związku znakowanego izotopowo, natomiast zmianie podlega stężenie konkurencyjnego liganda nieznakowanego, który wypiera radioligand z połączeń z białkiem receptorowym, prowadząc do obniżenia stężenia kompleksów radioligand-receptor. Obserwowane zmiany poziomu wiązania specyficznego radioliganda w zależności od stężenia testowanego związku nieznakowanego przedstawia

Rysunek 5.4.



Rysunek 5.4 Krzywa hamowania wiązania radioliganda do białka receptorowego w funkcji rosnącego stężenia nieznakowanego związku (L). IC_{50} - stężenie L , przy którym obserwuje się 50% zahamowanie wiązania radioliganda.

Testy kompetycyjnego wiązania radioligandów prowadzono, inkubując badane związki i selektywny ligand znakowany izotopowo wraz z preparatem białkowym, zawierającym odpowiedni receptor.

W każdym eksperymencie uwzględniono odpowiednie kontrole, w postaci:

- próbek zawierających DMSO, czyli rozpuszczalnik wykorzystywany do przygotowania roztworów podstawowych związków badanych w ramach niniejszej pracy - wyznaczenie wiązania całkowitego radioliganda (*TB*),
- próbek zawierających nieznakowany, selektywny względem danego typu receptora ligand referencyjny, zastosowany w stężeniu, przy którym radioligand zostawał całkowicie wyparty z miejsc wiążących w białkach receptorowych - wyznaczenie wiązania niespecyficznego (*NSB*).

Obliczona różnica pomiędzy wiązaniem całkowitym a niespecyficznym ($SB_{DMSO} = TB - NSB$), wyznaczała wartość wiązania specyficznego radioliganda, która stanowiła poziom odniesienia (100%) w procedurze normalizacji uzyskanych wyników. W celu jej przeprowadzenia, dla każdego pomiaru wiązania radioliganda w obecności badanego związku, po odjęciu wiązania niespecyficznego, wyliczano procent wiązania specyficznego na podstawie równania:

$$\%SB_L = \frac{SB_L[cpm] \times 100\%}{SB_{DMSO}[cpm]}, \quad (5.9)$$

gdzie: $\%SB_L$ - % specyficznego wiązania radioliganda w obecności badanego związku, SB_L - specyficzne wiązanie radioliganda w obecności badanego związku, SB_{DMSO} - specyficzne wiązanie radioliganda w obecności DMSO.

Uzyskane wyniki przekształcano dodatkowo w oparciu o **wzór 5.10**, uzyskując w ten informację o stopniu hamowania wiązania radioliganda do receptora w obecności badanego związku, będącą wstępną miarą siły oddziaływania danego połączenia z receptorem.

$$\%hamowania = 100\% - \%SB_L \quad (5.10)$$

We wstępnych etapach badania powinowactwa rozważanych połączeń, analizę kompetycyjną przeprowadzano dla jednego stężenia związku (najczęściej 1 μ M lub 10 μ M, w zależności od typu receptora). Jeśli związek spełniał kryteria włączenia do dalszych badań (opisane dalej szczegółowo dla poszczególnych receptorów), wykonywano dla niego oznaczenia w szerszym zakresie stężeń. Uzyskane w toku tych oznaczeń wyniki przedstawiano na wykresie jako zależność % wiązania specyficznego radioliganda od stężenia badanego związku. Względem uzyskanych danych przeprowadzano analizę regresji nieliniowej w modelu krzywej sigmoidalnej, typu dawka-efekt (ang.: *sigmoidal dose-response curve*), w wyniku

której wyznaczano parametr IC_{50} , a następnie, korzystając z równania Cheng-Prusoffa [270], obliczano wartość stałej dysocjacji K_i dla badanego liganda:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{c_{RL}}{K_d}} \quad (5.11)$$

gdzie: K_i - stała dysocjacji liganda, IC_{50} - stężenie liganda przy którym obserwuje się 50-procentowe zahamowanie wiązania radioliganda, c_{RL} - stężenie radioliganda, K_d - stała dysocjacji radioliganda.

W celu wyznaczenia stężenia radioliganda, dokonywano pomiaru radioaktywności próbki roztworu podstawowego radioliganda o takiej objętości, jaka była dodawana do właściwych mieszanin inkubacyjnych w danym teście, a następnie przy założeniu, że wiązanie radioliganda do receptorów nie obniża istotnie jego stężenia w próbce, wyliczano stężenie radioliganda ze wzoru:

$$c_{RL} [nM] = \frac{TA[cpm]}{22,2 \times SA[Ci / mmol] \times V[ml] \times Eff}, \quad (5.12)$$

gdzie: c_{RL} - stężenie radioliganda, TA - wynik pomiaru radioaktywności próbki roztworu podstawowego radioliganda w liczniku scyntylicyjnym, SA - aktywność specyficzna radioliganda, V - objętość całkowita mieszaniny inkubacyjnej w danym teście kompetycyjnego wiązania radioliganda, Eff - wydajność licznika scyntylicyjnego.

Powyższy wzór wyprowadzono, podstawiając podaną wcześniej **zależność 5.7** oraz równanie opisujące wydajność licznika scyntylicyjnego:

$$Eff [\%] = \frac{TA[cpm] \times 100\%}{TA[dpm]}, \quad (5.13)$$

do wzoru:

$$c_{RL} [nM] = \frac{TA[dpm]}{SA[dpm / fmol] \times V[ml] \times 1000}. \quad (5.14)$$

Szczególnym przypadkiem analizy wiązania kompetycyjnego jest test wiązania ligandów homologicznych, czyli eksperyment, w którym stosuje się równocześnie wybrany radioligand i jego analog nieznakowany. W testach tego typu zakłada się, że powinowactwo obu ligandów względem badanego receptora jest takie samo, a ponadto wiązanie ligandów nie ma charakteru kooperatywnego i nie skutkuje ono wyraźnym obniżeniem frakcji niezwiązanych ligandów. W takich warunkach możliwe jest wyznaczenie, za pomocą omawianego testu,

wszystkich parametrów charakterystycznych dla oznaczenia saturacyjnego wiązania radioliganda, a więc stałej K_d i gęstości receptorów - B_{max} .

W ramach wykonanych analiz, po oznaczeniu eksperymentalnym wiązania radioliganda, przeprowadzano analizę regresji nieliniowej dla punktów na wykresie przedstawiającym zależność wiązania całkowitego (TB) względem stężenia nieznakowanego liganda (c_{RL}). Dopasowanie krzywej przeprowadzano w oparciu o model krzywej sigmoidalnej wiązania homologicznego, przy założeniu występowania jednorodnej populacji miejsc wiążących (ang.: *one site - homologous binding*), który jest opisany równaniem:

$$TB[dpm] = \frac{B_{max} [dpm] \times c_{RL} [nM]}{c_{RL} [nM] + c_L [nM] + K_d [nM]} + NS[dpm], \quad (5.15)$$

gdzie: TB - wiązanie całkowite radioliganda, B_{max} - teoretyczny poziom wiązania radioliganda, odpowiadający całkowitemu wysyceniu receptorów, c_{RL} - stałe stężenie radioliganda, c_L - zmienne stężenie nieznakowanego analogu radioliganda, K_d - stała dysocjacji radioliganda, NS - wiązanie niespecyficzne radioliganda.

W wyniku dopasowania krzywej wyznaczano parametry: B_{max} - wyrażony liczbą rozpadów na minutę (dpm, ang.: *disintegrations per minute*), poziom wiązania niespecyficznego (NS) w tych samych jednostkach oraz wartość stałej dysocjacji radioliganda - K_d . Przeliczenia jednostek parametru B_{max} z [dpm] na [fmol/mg] dokonywano w oparciu o **wzór 5.8**.

5.4.5.7. Testy saturacyjnego wiązania ligandów receptorów adenozytowych A_{2A}

Wiązanie agonisty receptorów adenozytowych A_{2A} - [3H]CGS21680

Testy saturacyjnego wiązania radioliganda [3H]CGS21680 zostały przeprowadzone względem: a) komercyjnego preparatu błon komórek HEK293, charakteryzujących się stabilną ekspresją receptora adenozykowego A_{2A} typu dzikiego (10 μ g białka/próbkę); b) preparatu błon komórek linii CHO, przejściowo transfekowanych plazmidem kodującym białko fuzyjne receptora adenozykowego A_{2A} z białkiem cyjanowej fluorescencji (30 μ g białka/próbkę); c) preparatu błon komórek linii HEK293, stabilnie transfekowanych tym samym plazmidem (100 μ g białka/próbkę). Dwa pierwsze eksperymenty wykonano w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Bonn, natomiast ostatnie z wymienionych badań zostało przeprowadzone w Pracowni Farmakologii Biochemicznej Zakładu Farmakologii w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

W badaniach wykorzystano radioligand o aktywności specyficznej 39 Ci/mmol (oznaczenia a i b) lub 40,5 Ci/mmol (oznaczenie c), który stosowano w stężeniu od 0,06 do 40 nM. Górna

granica zakresu stężeń była podyktowana koniecznością użycia dużej ilości radioliganda o względnie wysokiej aktywności specyficznej, niezbędnej do uzyskania pożądanego stężenia znakowanego liganda w objętości próbki 400 μ l. Poziom wiązania niespecyficznego radioliganda był oznaczany w obecności 2-chloradenozyny (CADO) o stężeniu 20 μ M.

Próbki testowe przygotowywano w probówkach polipropylenowych, dodając kolejno następujące składniki mieszaniny inkubacyjnej:

- Bufor Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 90 μ l
- 40 mM roztwór MgCl₂ w wodzie ultraczystej 100 μ l
- DMSO lub 800 μ M roztwór CADO w DMSO 10 μ l
- Roztwór radioliganda w 50 mM buforze Tris-HCl 100 μ l
- Rozcieńczony preparat błon komórkowych 100 μ l

Po dodaniu preparatu białkowego, próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę do osiągnięcia stanu równowagi. Następnie niezwiązany radioligand oddzielano na drodze filtracji przez filtry z włókna szklanego (GF, ang.: *glass fiber*) klasy B, korzystając z urządzenia do filtracji próżniowej (ang.: *vacuum harvester*), pozwalającego na jednoczesną filtrację 48 próbek. Zastosowanie takiego układu skutkuje zwiększoną powtarzalnością wyników oraz skróceniem czasu płukania filtrów, zapobiegając w ten sposób oddysocjowaniu związanego radioliganda od białka. Filtry z osadzonymi na nich kompleksami radioligand-receptor, przenoszono do naczynek scyntylicyjnych i po dodaniu płynu scyntylicyjnego, oznaczano radioaktywność próbek. Wyniki analizowano zgodnie z wcześniejszym opisem, korzystając z oprogramowania GraphPad Prism.

Wiązanie antagonisty receptorów adenozynowych A_{2A} - [³H]MSX-2

Materiałem biologicznym wykorzystanym w eksperymencie był preparat błon komórek CHO, przejściowo transfekowanych plazmidem *phA_{2A} AR-ECFP*. Stosowano 30 μ g białka na próbkę. Wiązanie znakowanego trytem związku MSX-2, o aktywności specyficznej 84 Ci/mmol, badano w zakresie stężeń od 0,01 do 12 nM. Do wyznaczenia poziomu wiązania niespecyficznego radioliganda wykorzystano 5'-(*N*-etylokarboksyamido)adenozynę (NECA) w stężeniu 50 μ M.

Skład przygotowywanych mieszanin inkubacyjnych był następujący:

- Bufor Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 190 μ l
- DMSO lub 2 mM roztwór NECA w DMSO 10 μ l
- Roztwór radioliganda w 50 mM buforze TRIS-HCl 100 μ l
- Rozcieńczony preparat błon komórkowych 100 μ l

Odpowiednio przygotowane próbki inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej i postępowano dalej, jak w przypadku testu saturacyjnego wiązania [³H]CGS21680, przy czym stosowany filtr GF/B był przed filtracją dodatkowo zwilżony poprzez zanurzenie na 45 min w 0,3% w/v roztworze polietylenoiminy (PEI).

5.4.5.8. Testy kompetycyjnego wiązania ligandów receptorów adenozynowych

Analiza kompetycyjnego wiązania ligandów receptorów adenozynowych była prowadzona względem ludzkich i szczurzych podtypów receptorów adenozynowych A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃. Wszystkie testy były wykonywane w całkowitej objętości 400 µl. Mieszanki inkubacyjne przygotowywano dodając kolejno: 190 µl buforu inkubacyjnego, 10 µl roztworu badanego związku w DMSO (ewentualnie 10 µl samego rozpuszczalnika, aby wyznaczyć wiązanie całkowite radioliganda lub roztworu odpowiedniego liganda referencyjnego, w celu wyznaczenia poziomu wiązania niespecyficznego), 100 µl roztworu radioliganda i 100 µl zawiesiny preparatu błon. Roztwór podstawowy radioliganda oraz rozcieńczony preparat białkowy przygotowywano we właściwym dla danego testu buforze inkubacyjnym. Do materiału biologicznego dodawano deaminazy adenozyminy w ilości 2 jednostek enzymu na ml rozcieńczonego preparatu błon, w celu eliminacji endogennej adenozyminy. Po zakończeniu przewidywanego okresu inkubacji, próbki przesączano przez filtry z włókna szklanego przy użyciu 48-pozycyjnego zestawu do filtracji próżniowej i osadzony na filtrach materiał płukano 3-krotnie 3 ml zimnego buforu płuczającego. Następnie filtry umieszczano w naczynkach scyntylicyjnych, dodawano po 2,5 ml płynu scyntylicyjnego i inkubowano przez 6 godzin przed umieszczeniem próbek w liczniku scyntylicyjnym. Oznaczenia wykonywano 3-krotnie, przygotowując próbki w trzech powtórzeniach dla testów z wykorzystaniem tkanek zwierzęcych. Natomiast testy z użyciem preparatów błon rekombinowanych komórek wykonywano 3-krotnie w jednym powtórzeniu, ze względu na duży koszt oznaczenia. Założona procedura eksperymentalna nie wpływała negatywnie na jakość rezultatów. Uzyskiwano wysoką powtarzalność wyników i dobre dopasowanie krzywych wiązania.

W pierwszej kolejności przeprowadzano oznaczenia skriningowe, określając zdolność rozważanych połączeń, zastosowanych w stężeniu 1 µM, do hamowania specyficznego wiązania radioligandów do poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych. W sytuacji, gdy procent hamowania wiązania radioliganda przekraczał założoną dla danego podtypu receptora wartość - wykonywano oznaczenia w szerszym zakresie stężeń badanego związku i w oparciu o analizę Cheng-Prusoffa, wyznaczano dla niego wartość stałej K_i . Wartość progowa procentu hamowania wiązania radioliganda została wyznaczona w oparciu

o wcześniejsze doświadczenia z wykorzystaniem omawianych testów radioreceptorowych. Różnice pomiędzy podtypami receptorów wynikały z faktu, że w poszczególnych testach stosowano zarówno znakowanych agonistów, jak i antagonistów receptorów oraz zmienny był stosunek stężenia radioliganda względem odpowiedniej stałej dysocjacji - K_d .

W Tabeli 5.13 zaprezentowane zostały szczegółowe informacje odnośnie testów wykonanych dla poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych, w tym: rodzaj użytego radioliganda i jego stała dysocjacji względem badanego receptora, a także stężenie końcowe w oznaczeniu. Ponadto wskazano źródło białek receptorowych, warunki oznaczenia wiązania niespecyficznego radioliganda, temperaturę i czas inkubacji, skład buforu inkubacyjnego i buforu płuczącego, a także rodzaj stosowanego filtru oraz kryteria włączenia związku do testów służących wyznaczeniu stałej K_i .

Tabela 5.13 Szczegółowe warunki przeprowadzenia kompetycyjnych testów wiązania ligandów receptorów adenozynowych.

Szczurzy receptor adenozynowy A₁			
radioligand	[³H]CCPA	K_d :	0,2 nM
		stężenie radioliganda:	1 nM
materiał biologiczny:	kora mózgowa szczura, 100 µg	wiązanie niespecyficzne:	CADO, 10 µM
warunki inkubacji:	1,5 h, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 30%		
Ludzki receptor adenozynowy A₁			
radioligand	[³H]CCPA	K_d :	0,61 nM
		stężenie radioliganda:	1 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. CHO-hA₁, 125 µg	wiązanie niespecyficzne:	CADO, 10 µM
warunki inkubacji:	1,5 h, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 20%		

Tabela 5.13, cd. Szczegółowe warunki przeprowadzenia kompetycyjnych testów wiązania ligandów receptorów adenozynowych.

Szczurzy receptor adenozynowy A_{2A}			
radioligand	[³H]MSX-2	<i>K_d</i> :	8 nM
		stężenie radioliganda:	1 nM
materiał biologiczny:	prążkowie mózgu szczura, 100 µg	wiązanie niespecyficzne:	NECA, 50 µM
warunki inkubacji:	0,5 h, temp. pok.	filtracja:	GF/B zwilżony 0,3 % PEI
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 45%		
Ludzki receptor adenozynowy A_{2A}			
radioligand	[³H]MSX-2	<i>K_d</i> :	7,3 nM
		stężenie radioliganda:	1 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. HEK-293-<i>hA</i>_{2A}, 2 µg	wiązanie niespecyficzne:	NECA, 50 µM
warunki inkubacji:	0,5 h, temp. pok.	filtracja:	GF/B zwilżony 0,3 % PEI
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 25%		
Szczurzy receptor adenozynowy A_{2B}			
radioligand	[³H]PSB-603	<i>K_d</i> :	0,45 nM
		stężenie radioliganda:	0.3 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. CHO-<i>rA</i>_{2B}, 40 µg	wiązanie niespecyficzne:	DPCPX, 10 µM
warunki inkubacji:	75 min, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, 0,1% BSA, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 35%		

Tabela 5.13, cd. Szczegółowe warunki przeprowadzenia kompetycyjnych testów wiązania ligandów receptorów adenozynowych.

Ludzki receptor adenozynowy A_{2B}			
radioligand	[³H]PSB-603	<i>K_d</i> :	0,41 nM
		stężenie radioliganda:	0,3 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. CHO-<i>hA</i>_{2B}, 30 μg	wiązanie niespecyficzne:	DPCPX, 10 μM
warunki inkubacji:	75 min, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, 0,1% BSA, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 50%		
Szczurzy receptor adenozynowy A₃			
radioligand	[³H]NECA	<i>K_d</i> :	48 nM
		stężenie radioliganda:	10 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. CHO-<i>rA</i>₃, 50 μg	wiązanie niespecyficzne:	R-PIA, 100 μM
warunki inkubacji:	3 h, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, pH 8,25		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 35%		
Ludzki receptor adenozynowy A₃			
radioligand	[³H]PSB-11	<i>K_d</i> :	4,9 nM
		stężenie radioliganda:	1 nM
materiał biologiczny:	prep. błon kom. CHO-<i>hA</i>₃, 75 μg	wiązanie niespecyficzne:	R-PIA, 100 μM
warunki inkubacji:	45 min, temp. pok.	filtracja:	GF/B
bufor inkubacyjny:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
bufor płuczący:	50 mM TRIS-HCl, pH 7,4		
kryterium włączenia do poszerzonych badań:	% hamowania wiązania radioliganda ≥ 45%		

Osobnym przypadkiem opisanych analiz kompetycyjnych był test homologicznego wiązania antagonisty receptorów adenozynowych A_{2A} - MSX-2. Oznaczenie kompetycyjnego wiązania znakowanego i nieznakowanego analogu MSX-2 do: a) preparatu błon komórek przejściowo transfekowanych konstruktem genetycznym, kodującym białko fuzyjne hA_{2A} AR-ECFP (30 μ g); b) komercyjnego preparatu błon komórek z rekombinowanym receptorem typu dzikiego (2 μ g), przeprowadzono generalnie zgodnie z informacjami podanymi w **Tabeli 5.13**, z tym wyjątkiem, że nie przygotowywano próbek z czystym DMSO i NECA, gdyż zastosowany model dopasowania krzywej nie uwzględniał punktów odpowiadających całkowitemu oraz niespecyficznemu wiązaniu radioliganda. W ramach przeprowadzonych oznaczeń, nieznakowany MSX-2 dodawano do próbek w końcowym stężeniu od 0,1 nM do 1 μ M, natomiast stężenie radioliganda w teście wynosiło 0,69 nM. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach. Analizy otrzymanych wyników dokonano z użyciem oprogramowania GraphPad Prism zgodnie z podanym wcześniej opisem.

5.4.5.9. Testy radioreceptorowe względem receptorów kannabinoidowych

Testy radioreceptorowe w kierunku receptorów kannabinoidowych zostały przeprowadzone z wykorzystaniem związku [3 H]CP55,940, który był stosowany w końcowym stężeniu 0,1 nM. Poziom wiązania niespecyficznego radioliganda był wyznaczany wobec nieznakowanego CP55,940, zastosowanego w stężeniu 10 μ M. Źródłem receptorów były preparaty uzyskane z kory mózgowej szczura (źródło szczurzych receptorów CB_1) lub preparaty błon komórek linii CHO z nadekspresją ludzkich receptorów kannabinoidowych CB_1 lub CB_2 . Stosowano odpowiednio 100 μ g białka/próbkę, dla materiału tkanki mózgowej szczura oraz 50 μ g białka/próbkę, dla materiału uzyskanego z rekombinowanych komórek ssaczy.

W celu przeprowadzenia oznaczenia, w probówkach polipropylenowych umieszczano kolejno: 465 μ l buforu inkubacyjnego (50 mM Tris-HCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,1% BSA, pH 7,4), 15 μ l roztworu badanej substancji lub samego rozpuszczalnika - DMSO (stęż. końc. DMSO - 2,5%), 60 μ l roztworu radioliganda w buforze inkubacyjnym oraz 60 μ l preparatu białkowego, odpowiednio rozcieńczonego buforem inkubacyjnym. Przygotowane w ten sposób próbki inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym okresie, niezwiązany radioligand oddzielano na drodze filtracji przez filtry z włókna szklanego klasy C (zwilżony 0,3% w/v roztworem PEI), analogicznie jak we wcześniej opisanych eksperymentach. Po 3-krotnym przepłukaniu filtrów 3 ml zimnego buforu płuczącego (50 mM Tris, 0,1% BSA, pH 7,4), filtry z zatrzymanymi kompleksami radioligand-receptor suszono (1,5 h, 50°C). Następnie przenoszono je do naczynek scyntylacyjnych, zalewano

plynem scyntylacyjnym i dokonywano pomiarów radioaktywności po 6 godzinach preinkubacji.

Eksperymenty kompetycyjnego wiązania [³H]CP55,940 przeprowadzano w trzech niezależnych próbach, każda w dwóch lub trzech powtórzeniach, odpowiednio dla szczurzego receptora CB₁ lub podtypów ludzkich receptorów. We wstępnych próbach oznaczana była aktywność związków w stężeniu 10 μM. W momencie, gdy we wstępnych oznaczeniach związek hamował wiązanie radioliganda w stopniu większym niż 50%, wykonywano oznaczenia dla siedmiu różnych stężeń w zakresie od 30 nM do 100 μM, w zależności od rozpuszczalności danego połączenia. Względem uzyskanych wyników przeprowadzano analizę zgodnie z równaniem Cheng-Prusoffa, przyjmując, że wartości K_d dla poszczególnych podtypów receptorów kannabinoidowych wynoszą: 0,58 nM ([³H]CP55,940 wzgl. rCB₁), 2,4 nM ([³H]CP55,940 wzgl. hCB₁) i 0,7 nM ([³H]CP55,940 wzgl. hCB₂).

5.4.5.10. Testy radioreceptorowe w kierunku receptorów histaminowych H₄

Oznaczenia z użyciem preparatów błon z komórek ssaczych CHO

Preparaty błon z rekombinowanych komórek CHO wykorzystano zarówno w testach saturacyjnego, jak i kompetycyjnego (w tym homologicznego) wiązania [³H]histaminy. W omawianych oznaczeniach stosowano przede wszystkim materiał biologiczny, pozyskany z linii komórkowej otrzymanej na drodze transdukcji retrowirusowej (w ilości 100 μg białka na próbkę). Wykorzystano również komercyjny preparat błon (PerkinElmer, Waltham, MA, USA; w ilości 2 μg białka na próbkę), jako materiał referencyjny w teście homologicznego wiązania [³H]histaminy. Testy prowadzono w całkowitej objętości 350 μl buforu inkubacyjnego (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,4), na którą składało się: 25 μl roztworu radioliganda, 25 μl roztworu związku w DMSO lub samego rozpuszczalnika oraz 300 μl rozcieńczonego preparatu błon. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 60 minut na wytrząsarce orbitalnej (250 rpm), a następnie oddzielano niezwiązany radioligand na drodze filtracji przez filtr GF/B, zwilżony 0,3% w/v roztworem polietylenoiminy. Osadzony na filtrze materiał płukano 8-krotnie 0,2 ml zimnego buforu 50mM Tris-HCl, pH 7,4.

Test saturacyjnego wiązania [³H]histaminy wykonano w trzech powtórzeniach, stosując stężenie radioliganda w zakresie od 0,5 do 350 nM i wyznaczając poziom wiązania niespecyficznego w obecności 100 μM histaminy. Natomiast testy kompetycyjne wykonywano w ramach dwóch niezależnych eksperymentów, przeprowadzonych każdorazowo w trzech powtórzeniach, w których stosowano radioligand w końcowym

stężeniu 10 nM oraz oznaczane związki w szeregu rozcieńczeń, obejmujących zakres co najmniej trzech jednostek logarytmu dziesiętnego ze stężenia molarnego badanych połączeń.

Oznaczenia z użyciem preparatów błon z komórek owadzych Sf9

Eksperymenty radioreceptorowe z użyciem materiału pochodzącego z rekombinowanych komórek owadzych przeprowadzono podobnie, jak testy wykorzystujące preparaty błon komórek CHO z nadekspresją ludzkich receptorów histaminowych H₄. Wprowadzone modyfikacje protokołu oznaczenia obejmowały: zastosowanie buforu inkubacyjnego o składzie 12,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA i 75 mM Tris-HCl, pH 7,4 oraz przeprowadzenie testów przy całkowitej objętości próbki równej 0,2 ml. Ponadto preparat błon komórkowych stosowano w ilości 35 µg białka na próbkę, a płukanie filtrów GF/B z zatrzymanym materiałem radioaktywnym wykonywano trzykrotnie 0,5 ml buforu inkubacyjnego. Stała K_d dla [³H]histaminy, wykorzystana do obliczeń stałych powinowactwa (K_i) badanych ligandów, została wyznaczona we wcześniejszych eksperymentach i wynosiła 11,66 nM [262].

5.4.6. Testy funkcjonalne

5.4.6.1. Test akumulacji cAMP

Ogólne założenia metody

Większość współczesnych technik pomiarów stężenia cAMP *in vitro* opiera się na współzawodnictwie wiązania endogennego (komórkowego) i egzogenego (dodawanego w trakcie oznaczenia), znakowanego cAMP względem białka (kinazy, przeciwciała) specyficznie wiążącego cAMP [205, 271]. Wariant takiego oznaczenia został wykorzystany również w ramach niniejszej pracy. W zastosowanej metodzie, poziom cAMP został oznaczony techniką radiometryczną. Jej podstawą jest kompetycyjne wiązanie cyklicznego AMP, uwolnionego w wyniku lizy komórek oraz znakowanego trytem analogu - [³H]cAMP, do kinazy białkowej zawartej w rozpuszczalnej frakcji homogenatu kory nadnerczy krowich. Ilość powstających kompleksów białko-[³H]cAMP jest odwrotnie proporcjonalna do ilości nieznakowanego cAMP w próbkach [272]. Przeprowadzone testy funkcjonalne aktywacji receptorów GPCR składały się każdorazowo z dwóch podstawowych etapów: 1) stymulacji komórek zakończonej ich lizą i uwolnieniem cAMP; 2) oznaczenia cAMP w lizatach komórkowych.

Za rozkład cAMP w komórce odpowiadają fosfodiesterazy (PDE, ang.: *phosphodiesterase*), enzymy katalizujące reakcję hydrolizy wiązania 3' estrowego w cząsteczce cAMP,

prowadzącą do powstania adenozylo-5'-monofosforanu. Stwierdzono występowanie różnych izoform PDE, zaangażowanych w rozkład nie tylko cAMP, ale też cGMP. Dodatkowo obserwuje się różną dystrybucję tkankową i subkomórkową izoform fosfodiesteraz oraz różne mechanizmy kontroli ich aktywności, niemniej jednak, najpowszechniejszym czynnikiem stymulującym aktywność PDE jest fosforylacja cząsteczki enzymu przez cAMP-zależne kinazy, co wskazuje na to, że podstawową funkcją fosfodiesteraz jest udział w sprzężeniu zwrotnym ujemnym sygnalizacji związanej z cAMP [205, 273]. Rozkład cAMP przez PDE może być źródłem błędów w oznaczeniach wtórnych przekaźników powiązanych z kaskadą cykazy adenylnowej. Przykładowo, związki o komponentie hamującej fosfodiesterazę mogą dawać fałszywie pozytywne wyniki w kampaniach skринingowych, wymierzonych w poszukiwanie agonistów receptorów oddziałujących z białkami G_s. Aby zapobiec możliwości wystąpienia takich artefaktów w testach funkcjonalnych akumulacji cAMP, stosuje się hamujące rozkład cAMP inhibitory PDE. Przykładem takiego inhibitora, stosowanego w niniejszej pracy, jest związek RO-201724 [274].

W celu zapewnienia odpowiedniego okna pomiarowego w testach oceniających hamujący wpływ białek G_i na aktywność cykazy adenylnowej, konieczne jest wstępne pobudzenie komórek do produkcji cAMP. Efekt ten uzyskuje się stosując forskolinę - związek bezpośrednio aktywujący CA i prowadzący do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP.

Oznaczenie aktywności antagonistów receptorów adenozylo-2A i 2B

Celem oznaczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem najaktywniejszych ligandów ludzkich receptorów adenozylo-2A i 2B była weryfikacja hipotezy, popartej wcześniejszymi wynikami badań dla analogicznych związków, odnośnie antagonistycznego charakteru tych połączeń. Z tego powodu przeprowadzona została uproszczona analiza Gaddum/Schilda. Rejestrowano zmianę przebiegu krzywej dawka-odpowiedź dla agonisty receptorów, w obecności potencjalnego antagonisty, w teście wewnątrzkomórkowej akumulacji cAMP. W tym celu wykonywano równoległe oznaczenia aktywności agonisty receptorów adenozylo-2A - NECA, w dwóch wariantach:

- oznaczenie wpływu samego agonisty na akumulację cAMP w komórkach z nadekspresją właściwego podtypu receptora adenozylo-2A (A_{2A} lub A_{2B}),
- ocena efektu wywołanego przez agonistę w obecności potencjalnego antagonisty, zastosowanego w stężeniu skutkującym minimum 4-krotną zmianą parametru EC_{50} dla porównywanych krzywych dawka-odpowiedź.

W celu przeprowadzenia oznaczenia - 24 godziny przed właściwym eksperymentem, komórki linii CHO ze stabilną ekspresją jednego z dwóch analizowanych podtypów receptora adenozynowego, wysiewano na płytki 24-dołkowe w ilości 200 000 komórek na dołek, w standardowej pożywce hodowlanej. W dniu eksperymentu, usuwano pożywkę z przygotowanych płytek wielodołkowych i płukano komórki przyczepione do podłoża buforem HBSS w ilości 200 μ l/dołek. Następnie pozostawiano komórki w identycznej ilości tego samego buforu przez 2 godziny w inkubatorze hodowlanym o temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie, płytki umieszczano w inkubatorze do płytek mikrotitracyjnych o identycznej temperaturze i dodawano do dołków poszczególnych składników mieszaniny inkubacyjnej w kolejności:

- 25 μ l roztworu RO-201724 o stężeniu 400 μ M (stęż. końcowe - 40 μ M),
- po 10 minutach - 12,5 μ l roztworu potencjalnego antagonisty (stęż. końcowe: KD-357 - 5 μ M, KD-114 - 10 μ M, KD-414 - 2 μ M, KD-423 - 2 μ M) lub 12,5 μ l buforu wykorzystywanego do wykonania rozcieńczeń (10% DMSO, 90% HBSS) - w przypadku płytki kontrolnej (ocena efektu pobudzenia komórek samym NECA),
- po następnych 30 minutach - 12,5 μ l każdego z jedenastu seryjnych rozcieńczeń NECA (w zakresie stężeń agonisty od 0,3 nM do 30 μ M).

Całkowita objętość mieszanin inkubacyjnych wynosiła 250 μ l/dołek, natomiast końcowe stężenie DMSO w próbkach wynosiło 1,4%. Inkubację płytek kontynuowano przez 20 minut, a następnie stymulację komórek finalizowano poprzez usunięcie zawartości poszczególnych dołków i dodanie do nich po 500 μ l gorącego buforu lizującego (4 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 90°C). Po kolejnych 5 minutach, płytki przenoszono na lód i pobierano 50 μ l lizatu komórkowego do próbek propylenowych, w których oznaczano zawartość cAMP, zgodnie z opisaną dalej procedurą.

Oznaczenie aktywności agonistów receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂

W celu potwierdzenia ekspresji funkcjonalnych receptorów kannabinoidowych w liniach komórkowych CHO-*hCB₁R* i CHO-*hCB₂R*, otrzymanych na drodze transdukcji retrowirusowej, wykonywano testy funkcjonalne z użyciem szeregu rozcieńczeń nieselektywnego agonisty receptorów kannabinoidowych - CP55,940. Komórki przygotowywano do testów identycznie, jak w przypadku oznaczeń wykonanych dla antagonistów receptorów adenozynowych. Stymulację komórek na płytkach 24-dołkowych prowadzono również w całkowitej objętości próbki równej 250 μ l/dołek, przy końcowym stężeniu DMSO - 1,4%.

Do 200 μ l buforu HBSS w dołkach z komórkami CHO-*hCB₁R* lub CHO-*hCB₂R* dodawano kolejno:

- 25 μ l roztworu RO-201724 (stęż. końcowe - 40 μ M),
- po 10 minutach inkubacji -12,5 μ l roztworu agonisty *CB₁R* i *CB₂R* - CP55,940, o stężeniu końcowym w zakresie od 30 pM do 100 μ M,
- po kolejnych 3 minutach - forskolinę (stęż. końcowe - 10 μ M), w celu zaktywowania cykazy adenylanowej, umożliwiającego ujawnienie aktywności agonisty receptorów oddziałujących z białkiem *G_i*.

Koniec stymulacji komórek następował po 15 minutach od dodania forskoliny, w wyniku usunięcia zawartości dołków i dodania 500 μ l buforu lizującego (4 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 90°C). Dalsze postępowanie w oznaczeniu było identyczne, jak we wcześniej opisanej metodyce dla receptorów adenozytowych.

Przygotowanie preparatu białkowego wiążącego cAMP

Nadnercza krowie pozyskane zostały jako odpady mięsne podczas uboju przemysłowego jałówek (tj. samic bydła domowego w wieku powyżej 6 miesięcy, przed pierwszym wycieleniem), w obecności uprawnionego lekarza weterynarii. Zamrożone tkanki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykorzystania w eksperymentach. Dzień przed wykonaniem preparatyki nadnerczy, narządy umieszczano w lodówce o temperaturze 4°C celem rozmrożenia. Od rozmrożonych nadnerczy oddzielano tkankę tłuszczową oraz pozostałości tkanki łącznej, a następnie, po rozpreparowaniu, usuwano rdzeń nadnerczy widoczny jako jasna, wyraźnie odróżniająca się tkanka. Wszystkie zabiegi wykonywano w szalce Petriego umieszczonej na lodzie. Oczyszczone kory nadnerczy dzielono na mniejsze fragmenty i umieszczano w zimnym buforze o składzie: 100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,25 M sacharozy, 0,1% w/v 2-merkaptoetanolu, pH 7,4 w proporcji: 50 ml buforu na jeden organ. Następnie materiał homogenizowano za pomocą dyspergatora Ultra-Turrax z zainstalowanym ostrzem 10G, przy prędkości obrotów 16 000 rpm (ustawienie nr 3) przez 60 s. Otrzymany homogenat filtrowano kolejno przez: metalowe sitko o średnicy oczek 0,8 mm, lejek Büchnera o pojemności 100 ml i przez 3 warstwy gazy 17-nitkowej, a następnie wirowano uzyskaną zawiesinę (30 000×g, 4°C, 60 min). Supernatant po wirowaniu zawierał mieszaninę rozpuszczalnych białek (w tym istotne dla wykonywanych oznaczeń kinazy białkowe wiążące cAMP), których stężenie oznaczano metodą Lowry'ego. Uzyskany preparat przechowywano w temperaturze -20°C.

Oznaczenie stężenia cAMP w lizatach komórkowych

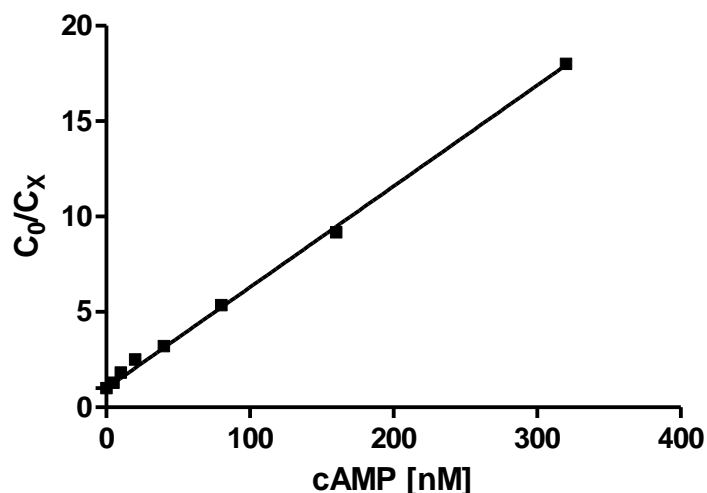
Aby umożliwić ilościową analizę akumulacji cAMP w komórkach, równoległe do właściwego eksperymentu stymulacji komórek, przygotowano kolejne, 2-krotne rozcieńczenia standardowego roztworu cAMP w zakresie stężeń od 320 nM do 5 nM, które wykorzystano do wykreślenia krzywej standardowej dla oznaczenia. Test wykonywano przygotowując mieszaniny inkubacyjne o składzie jak w **Tabeli 5.14**.

Tabela 5.14 Skład mieszanin inkubacyjnych w oznaczeniu stężenia cAMP w lizatach komórkowych.

Lp.	Próba badana	Całkowite wiązanie radioliganda	Standardy cAMP	Próba ślepa
1	Lizat komórkowy 50µl	Bufor lizujący 50µl	Kolejne rozc. cAMP w buforze lizującym 50µl	Bufor lizujący 50µl
2	Roztwór [³ H]cAMP w wodzie ultraczystej (stężenie końcowe radioliganda - 3nM) 30µl			
3	Preparat białka wiążącego cAMP (30 µg/próbkę) rozcieńczony w wodzie ultraczystej 40µl			Woda ultraczysta 40µl

Otrzymane próbki inkubowano na lodzie przez 1 godzinę, a następnie [³H]cAMP związany z białkiem kory nadnerczy, oddzielano od puli niezwiązanego radioliganda na drodze filtracji przez filtr GF/B, przy użyciu 48-kanalowego urządzenia do filtracji próżniowej. Fragmenty filtra odpowiadające poszczególnym kanałom filtracyjnym przenoszono pojedynczo do naczynek scyntylacyjnych, dodawano płynu scyntylacyjnego i po 6 godzinach inkubacji dokonywano pomiaru w liczniku scyntylacyjnym. Na podstawie zmierzonej radioaktywności próbek kontrolnych i badanych, wyznaczano ilość cAMP w poszczególnych dołkach płytek hodowlanych. W pierwszej kolejności, od wszystkich zmierzonych wartości odjęto uśredniony wynik pomiarów prób ślepych. I tak: średni pomiar całkowitego wiązania radioliganda, pomniejszony o uśrednioną wartość dla prób ślepych został określony jako parametr C_0 , natomiast analogiczny parametr dla pozostałych próbek badanych i standardów został określony jako C_x . Obliczone parametry wykorzystywano do wyznaczenia wartości ilorazu C_0/C_x , dla wszystkich rozcieńczeń standardu oraz próbek badanych. Następnie przedstawiano na wykresie zależność ilorazu C_0/C_x względem stężenia cAMP w poszczególnych rozcieńczeniach próbek standardowych. Zgodnie z założeniami, zależność ta

miała charakter liniowy. Po dopasowaniu prostej regresji, uzyskiwano równanie, które pozwalało wyliczyć stężenie cAMP w próbkach badanych oraz całkowitą ilość wtórnego przekaźnika w 500 μl lizatu komórkowego, przy uwzględnieniu, że w ramach prowadzonych oznaczeń pobierano z tej objętości 50 μl . Przykład dyskutowanej prostej kalibracyjnej dla wybranego eksperymentu przedstawia **Rysunek 5.5**.



Rysunek 5.5 Przykładowa prosta kalibracyjna dla oznaczenia stężenia cAMP w próbce metodą radiometryczną.

Ilości cAMP w poszczególnych próbkach badanych, wyznaczone na podstawie prostej regresji, wyrażano jako % maksymalnej produkcji cAMP, występującej w komórkach stymulowanych najwyższym stężeniem NECA (dla receptorów adenozynowych) lub samą forskoliną w stężeniu 10 μM (dla receptorów kannabinoidowych). Znormalizowane pomiary akumulacji cAMP przedstawiano na wykresie w funkcji stężenia badanego liganda. W toku analizy regresji, do punktów na wykresie dopasowywano krzywą sigmoidalną, dla której wyznaczano wartość parametru EC_{50} . W przypadku oznaczania aktywności antagonistów receptorów adenozynowych, w analizie Gadium/Schilda (służącej wyznaczeniu stałej wiązania antagonisty - K_b) używano wzoru:

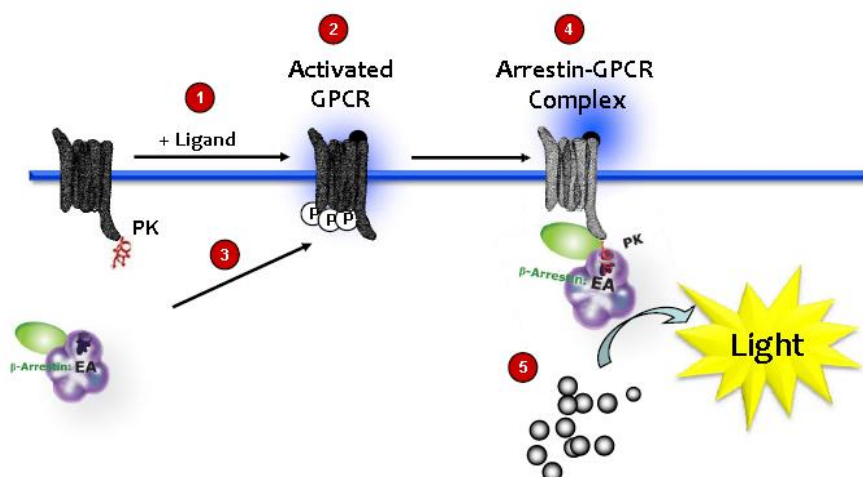
$$K_b = \frac{[ATG]}{DR - 1}, \quad (5.16)$$

gdzie: K_b - stała dysocjacji antagonisty receptora, $[ATG]$ - stężenie antagonisty, dla którego obserwowano zmianę przebiegu krzywej dawka-efekt dla agonisty, wyrażoną parametrem DR (ang.: *dose ratio*), czyli stosunkiem wartości parametru EC_{50} wyznaczonego w obecności antagonisty względem wartości EC_{50} pod nieobecność antagonisty.

5.4.6.2. Test aktywacji szlaku β -arrestynowego

Założenia testu

Test funkcjonalny aktywacji szlaku β -arrestynowego może być wykorzystany do monitorowania pobudzenia receptorów siedmiotransbłonowych poprzez pomiar bezpośredniej interakcji zaktywowanych receptorów z cząsteczkami β -arrestyny. Zestaw odczynników PathHunter β -arrestin Assay (DiscoverX) wykorzystuje do tego celu technologię opartą na procesie komplementacji dwóch fragmentów enzymu - β -galaktozydazy. W modelu tym, przy użyciu technik inżynierii genetycznej, do sekwencji receptora GPCR przyłączona zostaje (w ramach tej samej ramki odczytu) krótka sekwencja kodująca 42-aminokwasowy C-końcowy fragment β -galaktozydazy (PK, nazwa własna: ProInK). Następnie uzyskuje się stabilną ekspresję rekombinowanego receptora w komórkach eukariotycznych dodatkowo kotransfekowanych konstruktem fuzyjnym β -arrestyny i N-końcowego fragmentu β -galaktozydazy (EA, ang.: enzyme acceptor). Dla pełnej aktywności enzymu niezbędne jest połączenie obu fragmentów. Dochodzi do tego w momencie zaktywowania receptora przez związanie agonisty i rekrutacji cząsteczek β -arrestyny do receptora, czyli w sytuacji fizycznego zbliżenia obu fragmentów β -galaktozydazy. Wzrost aktywności enzymu może być mierzony np. poprzez pomiar konwersji substratu β -galaktozydazy na drodze reakcji chemiluminescencyjnej (**Rysunek 5.6**).



Rysunek 5.6 Zasada działania testu aktywacji szlaku β -arrestynowego. 1. Wiązanie liganda do rekombinowanego receptora z przyłączonym C-końcowym fragmentem β -galaktozydazy - PK (ProInK). 2. Zmiana konformacji receptora, przejście w stan aktywny (ang.: *Activated GPCR*) i ekspozycja miejsc fosforylacji dla kinaz receptorów GPCR - fosforylacja białka receptorowego. 3. Rekrutacja rekombinowanej β -arrestyny do receptora. 4. Utworzenie kompleksu receptor- β -arrestyna (ang.: *Arrestin-GPCR Complex*) skutkujące komplementacją fragmentów β -galaktozydazy. 5. Detekcja funkcjonalnej β -galaktozydazy na drodze specyficznej reakcji chemiluminescencyjnej (źródło: Instrukcja dołączona do zestawu odczynników - PathHunter eXpress Orphan GPCR β -arrestin Assays Product Booklet, DiscoverX Corporation, Fremont, CA, USA).

Warunki oznaczenia

Komórki CHO z nadekspresją receptora GPR18 wraz z przyłączonym C-końcowym fragmentem β -galaktozydazy oraz kotransfekowane konstruktem fuzyjnym: β -arrestyna-fragment N-końcowy β -galaktozydazy, hodowano zgodnie z opisanymi wcześniej procedurami. Dzień przed eksperymentem, komórki wysiewano na białą, nieprzeźroczystą płytkę 96-dołkową w ilości 20 000 komórek/dołek w 90 μ l pożywki (Opti-MEM, 2% FBS, 100 U/ml penicyliny, 100 μ g/ml streptomycyny, 800 μ g/ml genetycyny i 300 μ g/ml hygromycyny B) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji, badane związki rozcieńczano za pomocą buforu PBS, zawierającego 10% DMSO oraz 0,1% albuminy wołowej i dodawano do komórek na płytce w objętości 10 μ l. Następnie płytkę inkubowano przez 90 min w temperaturze 37°C. W celu wyznaczenia poziomu podstawowego mierzonego sygnału luminescencyjnego, w eksperymencie uwzględniano próbę ślepą zawierającą sam rozpuszczalnik (PBS, 10% DMSO, 0,1% BSA). Odczynnik do wykrywania aktywności β -galaktozydazy przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta. W probówce polipropylenowej mieszano chemiluminescencyjny substrat galaktozydazy - Galacton-Star (2mM), wzmacniacz sygnału luminescencji - Emerald-II i pożywkę hodowlaną w stosunku objętościowym 1:5:19. Przygotowany roztwór dodawano do wystymulowanych komórek na płytce, w ilości 50 μ l/dołek i prowadzono inkubację przez 60 min w temperaturze pokojowej. Po tym okresie, dokonywano odczytu luminescencji z wykorzystaniem czytnika mikroplatek.

W pierwszej serii eksperymentów oznaczona została aktywność potencjalnych agonistów receptora GPR18 - Δ^9 -THC oraz NAGly. Następnie seria badanych związków - pochodnych imidazotiazolonu, imidazotiazynonu i imidazotiazepinonu była oznaczana w trybie agonisty, tzn. oceniano ich zdolność do wywołania bezpośredniej odpowiedzi związanej z receptorem GPR18 przy stężeniu 10 μ M. Uzyskany sygnał porównywano z odpowiedzią na zastosowanie 10 μ M roztworu Δ^9 -THC, którą traktowano jako 100%. Ostatecznie oceniano zdolność badanych połączeń, zastosowanych w stężeniu 10 μ M, do zahamowania odpowiedzi wywołanej przez Δ^9 -THC o tym samym stężeniu - były to oznaczenia w tzw. trybie antagonisty. Eksperymenty wykonywano trzykrotnie w trzech powtórzeniach.

5.4.7. Bufory i roztwory

Pożywka LB

Do kolby płaskodennej odważono: 10 g peptonu kazeinowego, 5 g ekstraktu z drożdży oraz 10 g NaCl. Następnie dodano 950 ml wody dejonizowanej i podgrzano zawartość kolby do całkowitego rozpuszczenia wszystkich składników. Po częściowym ostudzeniu, ustalono pH pożywki na poziomie 7,5 i uzupełniono wodą do 1000 ml. Uzyskany roztwór poddano sterylizacji w autoklawie.

Pożywka LB z agarem

Stałe podłoże hodowlane LB przygotowywano analogicznie jak pożywkę płynną, z tą różnicą, że odważano dodatkowo 1 g agaru na każde 100 ml pożywki. Po zakończonej sterylizacji, podłoże pozostawiano do częściowego ostudzenia (do temperatury ok. 55°C) i wlewano po 7-8 ml do jałowych szalek Petriego o średnicy 6 cm, wykonanych z tworzywa sztucznego. Podłoże pozostawiano do zastygnięcia w otwartych szalkach w komorze laminarnej z włączoną lampą UV.

Roztwory antybiotyków do hodowli bakteryjnych

Roztwory podstawowe antybiotyków do hodowli bakteryjnych przygotowywano w stężeniu, odpowiednio: ampicylina - 50 mg/ml i kanamycyna - 10 mg/ml. Roztwory podstawowe dodawano do wysterylizowanych pożywek po ich częściowym ostudzeniu, aby zapobiec rozkładowi antybiotyku. Końcowe stężenia antybiotyków w podłożach mikrobiologicznych wynosiły: ampicylina - 100 µg/ml i kanamycyna - 25 µg/ml.

Glukoza, roztwór 1 M

Odważono 18,02 g glukozy, którą następnie rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej. Uzyskany roztwór, ze względu na termolabilność glukozy, sterylizowano na drodze filtracji przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm.

Pożywka SOC

Do kolby płaskodennej odważono: 1 g peptonu kazeinowego, 0,25 g ekstraktu z drożdży oraz 25 mg NaCl. Następnie dodano 0,5 ml roztworu 250 mM KCl oraz 45 ml wody dejonizowanej i sterylizowano w autoklawie. Do ostudzonej, jałowej pożywki odmierzone 250 µl roztworu 2 M MgCl₂ i 1 ml roztworu 1 M glukozy, a następnie uzupełniono jałową wodą do 50 ml.

EDTA, roztwór 0,5 M

W zlewce umieszczono 90 ml wody ultraczystej oraz 18,61 g dwuwodnej soli sodowej EDTA. Zawartość zlewki mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i dodawano 1 M roztwór NaOH, w celu podniesienia wartości pH do 8. W podanych warunkach następowało całkowite rozpuszczenie EDTA. Na koniec otrzymany roztwór uzupełniano wodą do 100 ml. Uzyskany roztwór wykorzystywano do otrzymywania rozcieńczonych buforów zawierających EDTA (np.: bufor TAE; 5 mM EDTA w PBS; 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA; itp.)

Bufor do elektroforezy TAE, 50-krotnie stężony

W celu przygotowania 50-krotnie stężonego roztworu podstawowego - 242 g Tris w postaci wolnej zasady rozpuszczano w 800 ml wody ultraczystej, a następnie dodawano 57,1 ml lodowatego kwasu octowego oraz 100 ml 0,5 M EDTA i uzupełniano wodą do 1000 ml. Roztwór roboczy buforu TAE otrzymywano poprzez 50-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego wodą ultraczystą.

Bufor obciążający dla próbek DNA do elektroforezy w żelu agarozowym

Bufor obciążający (6-krotnie stężony) otrzymywano przez połączenie: 3 ml glicerolu, 25 mg błękitu bromofenolowego oraz wody do biologii molekularnej - do 10 ml.

Penicylina i streptomycyna do hodowli komórkowych

Zawartość fiolek z antybiotykami - Penicillinum crystallisatum TZF, 1 000 000 U (Polfa Tarchomin) oraz Streptomycinum TZF, 1 g (Polfa Tarchomin) rozpuszczono w całkowitej objętości 20 ml wody ultraczystej uzyskując 500-krotnie stężony roztwór podstawowy antybiotyków o stężeniu: 50 000 U/ml penicyliny oraz 50 000 µg/ml streptomycyny, który wyjaławiano na drodze filtracji przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm.

Hipoksantyna, ksantyna i kwas mykofenolowy (10 mg/ml w wodzie).

Odważono 5 mg hipoksantyny, ksantyny lub kwasu mykofenolowego i zawieszono w 4 ml wody ultraczystej. Następnie dodawano kilka kropli 1 M roztworu NaOH i mieszano do całkowitego rozpuszczenia składników. Uzupełniono wodą ultraczystą do 5 ml, wyjaławiono na drodze filtracji i przechowywano w temperaturze 4°C.

Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem (PBS)

Odważono: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g bezwodnego Na₂HPO₄ oraz 0,27 g KH₂PO₄. Składniki umieszczono w zlewce i dodano 950 ml wody ultraczystej. Po rozpuszczeniu

składników ustalono pH na poziomie 7,4 i uzupełniono wodą do 1 l. Gotowy roztwór przeniesiono do zakręcannej butelki szklanej i sterylizowano w autoklawie.

Polietylenoimina (PEI), roztwór 1 mg/ml

Do 25 ml wody ultraczystej w polipropylenowej probówce odważono 30 mg PEI i worteksowano przez 10 minut do całkowitego rozpuszczenia polimeru, a następnie ustalano pH na poziomie 7,4, uzupełniano wodą do 30 ml i filtrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm .

Zrównoważony roztwór soli Hanksa (HBSS, ang.: *Hank's balanced salt solution*)

Roztwór HBSS uzyskano poprzez rozpuszczenie poniższych składników w 1000 ml autoklawowanej wody ultraczystej i ustalenie pH na 7,3:

- 4,77 g HEPES (stęż. końcowe - 20 mM),
- 7,59 g NaCl (stęż. końcowe - 130 mM),
- 0,99 g glukozy (stęż. końcowe - 5,5 mM),
- 0,10 g MgSO₄ (stęż. końcowe - 0,83 mM),
- 0,10 g MgCl₂×6H₂O (stęż. końcowe - 0,5 mM),
- 0,21 g CaCl₂×2H₂O (stęż. końcowe - 1,4 mM),
- 0,35 g NaHCO₃ (stęż. końcowe - 4,17 mM),
- 0,40 g KCl (stęż. końcowe - 5,36 mM),
- 0,05 g KH₂PO₄ (stęż. końcowe - 0,4 mM),
- 0,04 g Na₂HPO₄ (stęż. końcowe - 0,3 mM).

Bufor lizujący do oznaczenia komórkowego poziomu cAMP

W zlewce połączono 8 ml roztworu 0,5 M EDTA (stężenie końcowe 4 mM) oraz 982 ml wody ultraczystej i ustalono pH na 7,3, a następnie dodano 100 μl Tritonu X-100 (stężenie końcowe 0,01%).

Bufor do przygotowania preparatu białkowego wiążącego cAMP z nadnerczy krowich

Do zlewki odważono: 15,76 g Tris-HCl, 14,60 g NaCl i 85,58 g sacharozy, dodano 950 ml wody ultraczystej i (po rozpuszczeniu składników) 20 ml roztworu 0,5 M EDTA oraz 898 μl 2-merkaptoetanolu ($\rho = 1,114 \text{ g/ml}$ w 25°C). Następnie ustalono pH na 7,4 i uzupełniono wodą do 1000 ml.

6. LITERATURA

1. Offermanns, S., Rosenthal, W., *Encyclopedia of molecular pharmacology*. Wyd. II, **2008**, Berlin; Nowy Jork: Springer.
2. Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., *Seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**. 3(9): 639-50.
3. Reiter, E., Lefkowitz, R.J., *GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling*. *Trends Endocrinol Metab*, **2006**. 17(4): 159-65.
4. Lefkowitz, R.J., *Seven transmembrane receptors: something old, something new*. *Acta Physiol (Oxf)*, **2007**. 190(1): 9-19.
5. Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.P., Davenport, A.P., Spedding, M., Harmar, A.J., *International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list*. *Pharmacol Rev*, **2005**. 57(2): 279-88.
6. Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., *How many drug targets are there?* *Nat Rev Drug Discov*, **2006**. 5(12): 993-6.
7. Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., Seuwen, K., *The 7 TM G-protein-coupled receptor target family*. *ChemMedChem*, **2006**. 1(8): 761-82.
8. Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, I., *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. *J Biol Chem*, **1998**. 273(28): 17299-302.
9. Peeters, M.C., van Westen, G.J., Li, Q., Ijzerman, A.P., *Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation*. *Trends Pharmacol Sci*, **2011**. 32(1): 35-42.
10. Rasmussen, S.G.F., Gether, U., *Molecular Mechanisms of GPCR Activation*, W: Seifert, R., Wieland, T. (red.), *G Protein-Coupled Receptors as Drug Targets 2006*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 27-42.
11. Offermanns, S., *G-proteins as transducers in transmembrane signalling*. *Prog Biophys Mol Biol*, **2003**. 83(2): 101-30.
12. Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., Hamm, H.E., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. *Endocr Rev*, **2003**. 24(6): 765-81.
13. Nie, Z., Daaka, Y., *G protein-independent and β arrestin-dependent GPCR signaling*, W: Siehler, S., Milligan, G. (red.), *G Protein-Coupled Receptors 2010*, Cambridge: Cambridge University Press. 217-30.
14. Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., *Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling*. *Biochem J*, **2003**. 375(Pt 3): 503-15.
15. Ralevic, V., Burnstock, G., *Receptors for purines and pyrimidines*. *Pharmacol Rev*, **1998**. 50(3): 413-92.
16. Jacobson, K.A., Gao, Z.G., *Adenosine receptors as therapeutic targets*. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**. 5(3): 247-64.

17. Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., Muller, C.E., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. Pharmacol Rev, **2011**. 63(1): 1-34.
18. Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, **2001**. 53(4): 527-52.
19. Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Wasserman, W., *Structure and function of adenosine receptors and their genes*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **2000**. 362(4-5): 364-74.
20. Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dinsart, C., Van Sande, J., Maenhaut, C., Simons, M.J., Dumont, J.E., Vassart, G., *Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family*. Science, **1989**. 244(4904): 569-72.
21. Libert, F., Schiffmann, S.N., Lefort, A., Parmentier, M., Gerard, C., Dumont, J.E., Vanderhaeghen, J.J., Vassart, G., *The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor*. EMBO J, **1991**. 10(7): 1677-82.
22. Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaeghen, J.J., Dumont, J.E., Vassart, G., Schiffmann, S., *RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity*. Biochem Biophys Res Commun, **1990**. 173(3): 1169-78.
23. Magrane, M., Consortium, U., *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data*. Database, **2011**. 2011: bar009.
24. Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Schofield, P.R., Sutherland, G.R., *Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1*. Genomics, **1995**. 26(2): 423-5.
25. Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Sutherland, G.R., Schofield, P.R., *Localization of the adenosine A2b receptor subtype gene (ADORA2B) to chromosome 17p11.2-p12 by FISH and PCR screening of somatic cell hybrids*. Genomics, **1995**. 25(2): 605-7.
26. Atkinson, M.R., Townsend-Nicholson, A., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Schofield, P.R., *Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene*. Neurosci Res, **1997**. 29(1): 73-9.
27. Chen, J.F., Eltzschig, H.K., Fredholm, B.B., *Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?* Nat Rev Drug Discov, **2013**. 12(4): 265-86.
28. de Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H., Zheng, J., *Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target*. J Med Chem, **2013**. 57(9): 3623-50.
29. Yaar, R., Jones, M.R., Chen, J.F., Ravid, K., *Animal models for the study of adenosine receptor function*. J Cell Physiol, **2005**. 202(1): 9-20.
30. Fredholm, B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*. Cell Death Differ, **2007**. 14(7): 1315-23.

31. Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Muller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E.I., Lluís, C., Goldberg, S.R., Moratalla, R., Franco, R., Ferre, S., *Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids*. *Neuropsychopharmacology*, **2007**. 32(11): 2249-59.
32. Ferre, S., Lluís, C., Justinova, Z., Quiroz, C., Orru, M., Navarro, G., Canela, E.I., Franco, R., Goldberg, S.R., *Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function*. *Br J Pharmacol*, **2010**. 160(3): 443-53.
33. Xu, K., Bastia, E., Schwarzschild, M., *Therapeutic potential of adenosine A(2A) receptor antagonists in Parkinson's disease*. *Pharmacol Ther*, **2005**. 105(3): 267-310.
34. Fredholm, B.B., Chern, Y., Franco, R., Sitkovsky, M., *Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling*. *Prog Neurobiol*, **2007**. 83(5): 263-76.
35. Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Ongini, E., Borea, P.A., *A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells*. *Br J Pharmacol*, **2000**. 129(1): 2-11.
36. Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., Pacher, P., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, **2008**. 7(9): 759-70.
37. Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Liang, B.T., Jacobson, K.A., *Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists*. *Drug Discov Today*, **2012**. 17(7-8): 359-66.
38. Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Synowitz, M., Powell, J.D., Klotz, K.N., Gessi, S., Borea, P.A., *Adenosine receptors and cancer*. *Handb Exp Pharmacol*, **2009**(193): 399-441.
39. Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., Borea, P.A., *Adenosine receptors and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, **2011**. 1808(5): 1400-12.
40. Di Virgilio, F., *Purines, purinergic receptors, and cancer*. *Cancer Res*, **2012**. 72(21): 5441-7.
41. Klotz, K.N., *Adenosine receptors and their ligands*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **2000**. 362(4-5): 382-91.
42. Muller, C.E., Jacobson, K.A., *Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs*. *Biochim Biophys Acta*, **2011**. 1808(5): 1290-308.
43. Yuzlenko, O., Kiec-Kononowicz, K., *Potent adenosine A1 and A2A receptors antagonists: recent developments*. *Curr Med Chem*, **2006**. 13(30): 3609-25.
44. Samsel, M., Dzierzbicka, K., *Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates*. *Pharmacol Rep*, **2011**. 63(3): 601-17.
45. Ghimire, G., Hage, F.G., Heo, J., Iskandrian, A.E., *Regadenoson: a focused update*. *J Nucl Cardiol*, **2013**. 20(2): 284-8.
46. Dunto, R., Deeks, E.D., *Istradefylline: first global approval*. *Drugs*, **2013**. 73(8): 875-82.
47. Hauser, R.A., Olanow, C.W., Kieburtz, K.D., Pourcher, E., Docu-Axelerad, A., Lew, M., Kozyolkin, O., Neale, A., Resburg, C., Meya, U., Kenney, C., Bandak, S., *Tozadenant (SYN115) in patients with Parkinson's disease who have motor fluctuations on levodopa: a phase 2b, double-blind, randomised trial*. *Lancet Neurol*, **2014**. 13(8): 767-76.

48. Mantell, S., Jones, R., Trevethick, M., *Design and application of locally delivered agonists of the adenosine A(2A) receptor*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, **2010**. 3(1): 55-72.
49. Silverman, M.H., Strand, V., Markovits, D., Nahir, M., Reitblat, T., Molad, Y., Rosner, I., Rozenbaum, M., Mader, R., Adawi, M., Caspi, D., Tishler, M., Langevitz, P., Rubinow, A., Friedman, J., Green, L., Tanay, A., Ochaion, A., Cohen, S., Kerns, W.D., Cohn, I., Fishman-Furman, S., Farbstein, M., Yehuda, S.B., Fishman, P., *Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial*. *J Rheumatol*, **2008**. 35(1): 41-8.
50. David, M., Akerman, L., Ziv, M., Kadurina, M., Gospodinov, D., Pavlotsky, F., Yankova, R., Kouzeva, V., Ramon, M., Silverman, M.H., Fishman, P., *Treatment of plaque-type psoriasis with oral CF101: data from an exploratory randomized phase 2 clinical trial*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **2012**. 26(3): 361-7.
51. De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Di Marzo, V., *The endocannabinoid system: a general view and latest additions*. *Br J Pharmacol*, **2004**. 141(5): 765-74.
52. Mouslech, Z., Valla, V., *Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice*. *Neuro Endocrinol Lett*, **2009**. 30(2): 153-79.
53. Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., *The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation*. *Nat Rev Drug Discov*, **2004**. 3(9): 771-84.
54. Adamczyk, P., Miszkiel, J., McCreary, A.C., Filip, M., Papp, M., Przegalinski, E., *The effects of cannabinoid CB1, CB2 and vanilloid TRPV1 receptor antagonists on cocaine addictive behavior in rats*. *Brain Res*, **2012**. 1444: 45-54.
55. Filip, M., Golda, A., Zaniewska, M., McCreary, A.C., Nowak, E., Kolasiewicz, W., Przegalinski, E., *Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine*. *Pharmacol Rep*, **2006**. 58(6): 806-19.
56. Parolaro, D., Rubino, T., *Is cannabinoid transmission involved in rewarding properties of drugs of abuse?* *Br J Pharmacol*, **2002**. 136(8): 1083-4.
57. Wilson, R.I., Nicoll, R.A., *Endocannabinoid signaling in the brain*. *Science*, **2002**. 296(5568): 678-82.
58. Crowe, M.S., Nass, S.R., Gabella, K.M., Kinsey, S.G., *The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation*. *Brain Behav Immun*, **2014**.
59. Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Barna, I., Freund, T.F., *Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice*. *Eur J Neurosci*, **2004**. 19(7): 1906-12.
60. Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Porrino, L.J., *Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress*. *Neuropharmacology*, **2004**. 47(Suppl 1): 345-58.
61. Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., Ross, R.A., *International*

- Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2).* Pharmacol Rev, **2010**. 62(4): 588-631.
62. Mackie, K., Stella, N., *Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players.* AAPS J, **2006**. 8(2): E298-306.
 63. Gaoni, Y., Mechoulam, R., *Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish.* J Am Chem Soc, **1964**. 86(8): 1646-47.
 64. Graham, E.S., Ashton, J.C., Glass, M., *Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot".* Front Biosci (Landmark Ed), **2009**. 14: 944-57.
 65. Perras, C., *Sativex for the management of multiple sclerosis symptoms.* Issues Emerg Health Technol, **2005**(72): 1-4.
 66. Mackie, K., *Cannabinoid receptors as therapeutic targets.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, **2006**. 46: 101-22.
 67. Pertwee, R.G., *Pharmacological actions of cannabinoids.* Handb Exp Pharmacol, **2005**(168): 1-51.
 68. Rempel, V., Volz, N., Hinz, S., Karcz, T., Meliciani, I., Nieger, M., Wenzel, W., Brase, S., Muller, C.E., *7-Alkyl-3-benzylcoumarins: a versatile scaffold for the development of potent and selective cannabinoid receptor agonists and antagonists.* J Med Chem, **2012**. 55(18): 7967-77.
 69. Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.* Nature, **1990**. 346(6284): 561-4.
 70. Ryberg, E., Vu, H.K., Larsson, N., Groblewski, T., Hjorth, S., Elebring, T., Sjogren, S., Greasley, P.J., *Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor.* FEBS Lett, **2005**. 579(1): 259-64.
 71. Shire, D., Carillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P., *An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing.* J Biol Chem, **1995**. 270(8): 3726-31.
 72. Lauckner, J.E., Hille, B., Mackie, K., *The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins.* Proc Natl Acad Sci USA, **2005**. 102(52): 19144-9.
 73. Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature, **1993**. 365(6441): 61-5.
 74. Malfitano, A.M., Basu, S., Maresz, K., Bifulco, M., Dittel, B.N., *What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2).* Semin Immunol, **2014**. 26(5): 369-79.
 75. Griffin, G., Tao, Q., Abood, M.E., *Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor.* J Pharmacol Exp Ther, **2000**. 292(3): 886-94.
 76. Atwood, B.K., Straiker, A., Mackie, K., *CB(2): therapeutic target-in-waiting.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, **2012**. 38(1): 16-20.

77. McHugh, D., Page, J., Dunn, E., Bradshaw, H.B., *Delta(9) -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells*. Br J Pharmacol, **2012**. 165(8): 2414-24.
78. McHugh, D., Hu, S.S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J.M., Bradshaw, H.B., *N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor*. BMC Neurosci, **2010**. 11: 44.
79. Gantz, I., Muraoka, A., Yang, Y.K., Samuelson, L.C., Zimmerman, E.M., Cook, H., Yamada, T., *Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis*. Genomics, **1997**. 42(3): 462-6.
80. Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K., Yasukawa, M., *Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18*. Biochem Biophys Res Commun, **2006**. 347(3): 827-32.
81. Qin, Y., Verdegaal, E.M., Siderius, M., Bebelman, J.P., Smit, M.J., Leurs, R., Willemze, R., Tensen, C.P., Osanto, S., *Quantitative expression profiling of G-protein-coupled receptors (GPCRs) in metastatic melanoma: the constitutively active orphan GPCR GPR18 as novel drug target*. Pigment Cell Melanoma Res, **2011**. 24(1): 207-18.
82. Takenouchi, R., Inoue, K., Kambe, Y., Miyata, A., *N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis via GPR18*. Biochem Biophys Res Commun, **2012**. 418(2): 366-71.
83. Burstein, S.H., McQuain, C.A., Ross, A.H., Salmonsens, R.A., Zurier, R.E., *Resolution of inflammation by N-arachidonoylglycine*. J Cell Biochem, **2011**. 112(11): 3227-33.
84. Henstridge, C.M., *Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55*. Pharmacology, **2012**. 89(3-4): 179-87.
85. Parsons, M.E., Ganellin, C.R., *Histamine and its receptors*. Br J Pharmacol, **2006**. 147(Suppl 1): S127-35.
86. Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Matsumoto, S., *Molecular cloning and characterization of novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes*. J Biol Chem, **2000**. 275(47): 36781-6.
87. Nguyen, T., Shapiro, D.A., George, S.R., Setola, V., Lee, D.K., Cheng, R., Rauser, L., Lee, S.P., Lynch, K.R., Roth, B.L., O'Dowd, B.F., *Discovery of a novel member of the histamine receptor family*. Mol Pharmacol, **2001**. 59(3): 427-33.
88. Liu, C., Ma, X., Jiang, X., Wilson, S.J., Hofstra, C.L., Blevitt, J., Pyati, J., Li, X., Chai, W., Carruthers, N., Lovenberg, T.W., *Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow*. Mol Pharmacol, **2001**. 59(3): 420-6.
89. Morse, K.L., Behan, J., Laz, T.M., West, R.E., Jr., Greenfeder, S.A., Anthes, J.C., Umland, S., Wan, Y., Hipkin, R.W., Gonsiorek, W., Shin, N., Gustafson, E.L., Qiao, X., Wang, S., Hedrick, J.A., Greene, J., Bayne, M., Monsma, F.J., Jr., *Cloning and characterization of a novel human histamine receptor*. J Pharmacol Exp Ther, **2001**. 296(3): 1058-66.

90. Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M., Tanaka, K., *Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**. 279(2): 615-20.
91. Zhu, Y., Michalovich, D., Wu, H., Tan, K.B., Dytko, G.M., Mannan, I.J., Boyce, R., Alston, J., Tierney, L.A., Li, X., Herrity, N.C., Vawter, L., Sarau, H.M., Ames, R.S., Davenport, C.M., Hieble, J.P., Wilson, S., Bergsma, D.J., Fitzgerald, L.R., *Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor*. *Mol Pharmacol*, **2001**. 59(3): 434-41.
92. Leurs, R., Chazot, P.L., Shenton, F.C., Lim, H.D., de Esch, I.J., *Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor*. *Br J Pharmacol*, **2009**. 157(1): 14-23.
93. Lim, H.D., de Graaf, C., Jiang, W., Sadek, P., McGovern, P.M., Istyastono, E.P., Bakker, R.A., de Esch, I.J., Thurmond, R.L., Leurs, R., *Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants*. *Mol Pharmacol*, **2010**. 77(5): 734-43.
94. Hough, L.B., *Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors*. *Mol Pharmacol*, **2001**. 59(3): 415-9.
95. Wise, H., *The roles played by highly truncated splice variants of G protein-coupled receptors*. *J Mol Signal*, **2012**. 7(1): 13.
96. Coge, F., Guenin, S.P., Rique, H., Boutin, J.A., Galizzi, J.P., *Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**. 284(2): 301-9.
97. van Rijn, R.M., van Marle, A., Chazot, P.L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F.C., Lim, H.D., Zuiderveld, O.P., Sansuk, K., Dy, M., Smit, M.J., Tensen, C.P., Bakker, R.A., Leurs, R., *Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor*. *Biochem J*, **2008**. 414(1): 121-31.
98. Lim, H.D., Istyastono, E.P., van de Stolpe, A., Romeo, G., Gobbi, S., Schepers, M., Lahaye, R., Menge, W.M., Zuiderveld, O.P., Jongejan, A., Smits, R.A., Bakker, R.A., Haaksm, E.E., Leurs, R., de Esch, I.J., *Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies*. *Bioorg Med Chem*, **2009**. 17(11): 3987-94.
99. Hofstra, C.L., Desai, P.J., Thurmond, R.L., Fung-Leung, W.P., *Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, **2003**. 305(3): 1212-21.
100. Reher, T.M., Neumann, D., Buschauer, A., Seifert, R., *Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H4-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations*. *Biochem Pharmacol*, **2012**. 84(2): 192-203.
101. Zampeli, E., Tiligada, E., *The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders*. *Br J Pharmacol*, **2009**. 157(1): 24-33.

102. Ling, P., Ngo, K., Nguyen, S., Thurmond, R.L., Edwards, J.P., Karlsson, L., Fung-Leung, W.P., *Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation*. Br J Pharmacol, **2004**. 142(1): 161-71.
103. Engelhardt, H., Smits, R.A., Leurs, R., Haaksma, E., de Esch, I.J., *A new generation of anti-histamines: Histamine H4 receptor antagonists on their way to the clinic*. Curr Opin Drug Discov Devel, **2009**. 12(5): 628-43.
104. de Esch, I.J., Thurmond, R.L., Jongejan, A., Leurs, R., *The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation*. Trends Pharmacol Sci, **2005**. 26(9): 462-9.
105. Zhang, M., Thurmond, R.L., Dunford, P.J., *The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders*. Pharmacol Ther, **2007**. 113(3): 594-606.
106. Strakhova, M.I., Nikkel, A.L., Manelli, A.M., Hsieh, G.C., Esbenshade, T.A., Brioni, J.D., Bitner, R.S., *Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat*. Brain Res, **2009**. 1250: 41-8.
107. Connelly, W.M., Shenton, F.C., Lethbridge, N., Leurs, R., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Lees, G., Chazot, P.L., *The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS*. Br J Pharmacol, **2009**. 157(1): 55-63.
108. Medina, V.A., Rivera, E.S., *Histamine receptors and cancer pharmacology*. Br J Pharmacol, **2010**. 161(4): 755-67.
109. Jablonowski, J.A., Grice, C.A., Chai, W., Dvorak, C.A., Venable, J.D., Kwok, A.K., Ly, K.S., Wei, J., Baker, S.M., Desai, P.J., Jiang, W., Wilson, S.J., Thurmond, R.L., Karlsson, L., Edwards, J.P., Lovenberg, T.W., Carruthers, N.I., *The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists*. J Med Chem, **2003**. 46(19): 3957-60.
110. Smits, R.A., Leurs, R., de Esch, I.J., *Major advances in the development of histamine H4 receptor ligands*. Drug Discov Today, **2009**. 14(15-16): 745-53.
111. Łażewska, D., Więcek, M., Ner, J., Kamińska, K., Kottke, T., Schwed, J.S., Zygmunt, M., Karcz, T., Olejarz, A., Kuder, K., Latacz, G., Grosicki, M., Sapa, J., Karolak-Wojciechowska, J., Stark, H., Kieć-Kononowicz, K., *Aryl-1,3,5-triazine derivatives as histamine H4 receptor ligands*. Eur J Med Chem, **2014**. 83: 534-46.
112. Łażewska, D., Kieć-Kononowicz, K., *Azines as histamine H4 receptor antagonists*. Front Biosci (Schol Ed), **2012**. 4: 967-87.
113. Jablonowski, J.A., Carruthers, N.I., Thurmond, R.L., *The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands*. Mini Rev Med Chem, **2004**. 4(9): 993-1000.
114. Hill, S.J., *G-protein-coupled receptors: past, present and future*. Br J Pharmacol, **2006**. 147(Suppl 1): S27-37.
115. Bockaert, J., Brand, C., Journot, L., *Do recombinant receptor assays provide affinity and potency estimates?* Ann N Y Acad Sci, **1997**. 812: 55-70.
116. Kenakin, T., *The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems*. Pharmacol Rev, **1996**. 48(3): 413-63.

117. Sautel, M., Milligan, G., *Molecular manipulation of G-protein-coupled receptors: a new avenue into drug discovery*. *Curr Med Chem*, **2000**. 7(9): 889-96.
118. Chung, S., Funakoshi, T., Civelli, O., *Orphan GPCR research*. *Br J Pharmacol*, **2008**. 153(Suppl 1): S339-46.
119. Seely, K., Prather, P., *Characterizing the Pharmacology of G Protein-Coupled Receptors in Transfected Cell Lines*, W: Stevens, C.W. (red.), *Methods for the Discovery and Characterization of G Protein-Coupled Receptors*, **2011**, Humana Press. 211-30.
120. Mukherjee, S., Adams, M., Whiteaker, K., Daza, A., Kage, K., Cassar, S., Meyer, M., Yao, B.B., *Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors*. *Eur J Pharmacol*, **2004**. 505(1-3): 1-9.
121. Freshney, R.I., *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. Wyd. V, **2005**, Hoboken, NJ: Wiley-Liss.
122. Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D., *Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin*. *Nature*, **1986**. 321(6065): 75-9.
123. McIlhinney, R.A., *Generation and use of epitope-tagged receptors*. *Methods Mol Biol*, **2004**. 259: 81-98.
124. Shin, N., Coates, E., Murgolo, N.J., Morse, K.L., Bayne, M., Strader, C.D., Monsma, F.J., Jr., *Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H4 receptor*. *Mol Pharmacol*, **2002**. 62(1): 38-47.
125. Ortega-Gutierrez, S., Lopez-Rodriguez, M.L., *CB1 and CB2 cannabinoid receptor binding studies based on modeling and mutagenesis approaches*. *Mini Rev Med Chem*, **2005**. 5(7): 651-8.
126. Kim, J., Wess, J., van Rhee, A.M., Schoneberg, T., Jacobson, K.A., *Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor*. *J Biol Chem*, **1995**. 270(23): 13987-97.
127. McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J., Milligan, G., *Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy*. *J Biol Chem*, **2001**. 276(17): 14092-9.
128. Goddard, A.D., Watts, A., *Contributions of fluorescence techniques to understanding G protein-coupled receptor dimerisation*. *Biophysical Reviews*, **2012**. 4(4): 291-8.
129. Ilien, B., Franchet, C., Bernard, P., Morisset, S., Weill, C.O., Bourguignon, J.J., Hibert, M., Galzi, J.L., *Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties*. *J Neurochem*, **2003**. 85(3): 768-78.

130. Maier-Peuschel, M., Frolich, N., Dees, C., Hommers, L.G., Hoffmann, C., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., *A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation*. J Biol Chem, **2010**. 285(12): 8793-800.
131. Wójcik, T., Bereta, M., Faron-Górecka, A., Dziedzicka-Wasylewska, M., Kieć-Kononowicz, K., *Flow cytometry application for studies on adenosine A2A receptors expression*. Acta Pol Pharm, **2008**. 65(1): 65-70.
132. Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., Milon, A., *Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification*. Cell Mol Life Sci, **2003**. 60(8): 1529-46.
133. Haack, K.K., McCarty, N.A., *Functional consequences of GPCR heterodimerization: GPCRs as allosteric modulators*. Pharmaceuticals, **2011**. 4(3): 50-523.
134. Birdsall, N.J., *Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies*. Trends Pharmacol Sci, **2010**. 31(11): 499-508.
135. Ellis, J., Padiani, J.D., Canals, M., Milasta, S., Milligan, G., *Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function*. J Biol Chem, **2006**. 281(50): 38812-24.
136. Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.B., Fuxe, K., *Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1991**. 88(16): 7238-41.
137. Kenakin, T., *Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry*. Trends Pharmacol Sci, **1997**. 18(12): 456-64.
138. Chen, W.J., Armour, S., Way, J., Chen, G., Watson, C., Irving, P., Cobb, J., Kadwell, S., Beaumont, K., Rimele, T., Kenakin, T., *Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from MCF-7 cells and their relationship to amylin receptors*. Mol Pharmacol, **1997**. 52(6): 1164-75.
139. Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M., Birnbaumer, L., *Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density*. Mol Pharmacol, **1994**. 46(3): 460-9.
140. Tate, C.G., Grishammer, R., *Heterologous expression of G-protein-coupled receptors*. Trends Biotechnol, **1996**. 14(11): 426-30.
141. Laage, R., Langosch, D., *Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins*. Traffic, **2001**. 2(2): 99-104.
142. Stanasila, L., Lim, W.K., Neubig, R.R., Pattus, F., *Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpa fusion proteins in Escherichia coli*. J Neurochem, **2000**. 75(3): 1190-9.
143. Bertin, B., Freissmuth, M., Breyer, R.M., Schutz, W., Strosberg, A.D., Marullo, S., *Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in Escherichia coli. Ligand binding*

- properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits.* J Biol Chem, **1992**. 267(12): 8200-6.
144. Fernandez, J.M., Hoeffler, J.P., *So many possibilities: how to choose a system to achieve your specific goal*, W: Fernandez, J.M., Hoeffler, J.P. (red.), *Gene expression systems: using nature for the art of expression*, **1999**, San Diego: Academic Press. 1-5.
145. Gutierrez, J., Kremer, L., Zaballos, A., Goya, I., Martinez, A.C., Marquez, G., *Analysis of post-translational CCR8 modifications and their influence on receptor activity.* J Biol Chem, **2004**. 279(15): 14726-33.
146. Miggin, S.M., Lawler, O.A., Kinsella, B.T., *Palmitoylation of the human prostacyclin receptor. Functional implications of palmitoylation and isoprenylation.* J Biol Chem, **2003**. 278(9): 6947-58.
147. Couvineau, A., Fabre, C., Gaudin, P., Maoret, J.J., Laburthe, M., *Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor. Evidence that asparagine 58 or 69 is crucial for correct delivery of the receptor to plasma membrane.* Biochemistry, **1996**. 35(6): 1745-52.
148. Pausch, M.H., *G-protein-coupled receptors in Saccharomyces cerevisiae: high-throughput screening assays for drug discovery.* Trends Biotechnol, **1997**. 15(12): 487-94.
149. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., *Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system.* Yeast, **2005**. 22(4): 249-70.
150. Ladds, G., Goddard, A., Davey, J., *Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast.* Trends Biotechnol, **2005**. 23(7): 367-73.
151. Bill, R.M., *Yeast--a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins?* Curr Genet, **2001**. 40(3): 157-71.
152. Price, L.A., Kajkowski, E.M., Hadcock, J.R., Ozenberger, B.A., Pausch, M.H., *Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway.* Mol Cell Biol, **1995**. 15(11): 6188-95.
153. Reilander, H., Weiss, H.M., *Production of G-protein-coupled receptors in yeast.* Curr Opin Biotechnol, **1998**. 9(5): 510-7.
154. Lagane, B., Gaibelet, G., Meilhoc, E., Masson, J.M., Cezanne, L., Lopez, A., *Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, **2000**. 275(43): 33197-200.
155. Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular cloning: a laboratory manual.* Wyd. III, **2001**, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
156. Murphy, C.I., Piwnicka-Worms, H., Grünwald, S., Romanow, W.G., Francis, N., Fan, H.-Y., *Overview of the Baculovirus Expression System*, W: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, **2001**, Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc. 16.9.1-16.9.10.

157. Massotte, D., *G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies*. *Biochim Biophys Acta*, **2003**. 1610(1): 77-89.
158. *Strona internetowa Australijskiego Instytutu Bioinżynierii i Nanotechnologii Uniwersytetu Queensland*. [dostęp: 29.05.2014]; Dostępna w Internecie: <http://web.aibn.uq.edu.au/cssb/Projects/Baculo.html>.
159. Haase, S., Ferrelli, L., Pidre, M.L., Romanowski, V., *Genetic Engineering of Baculoviruses*, W: Romanowski, V. (red.), *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*, **2013**, InTech Open Access. 79-111.
160. Unger, T., Peleg, Y., *Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system*. *Methods Mol Biol*, **2012**. 800: 187-99.
161. *Instrukcja użytkownika zestawu odczynników BaculoGold Baculovirus Expression System*, Becton Dickinson. [dostęp: 29.05.2014]; dostępna w Internecie: https://www.bdj.co.jp/pdf/55-02_03-7900030-23-A1.pdf.
162. Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P., *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. *In Vitro*, **1977**. 13(4): 213-7.
163. Rinken, A., Kameyama, K., Haga, T., Engstrom, L., *Solubilization of muscarinic receptor subtypes from baculovirus infected Sf9 insect cells*. *Biochem Pharmacol*, **1994**. 48(6): 1245-51.
164. Grunewald, S., Reilander, H., Michel, H., *In vivo reconstitution of dopamine D2S receptor-mediated G protein activation in baculovirus-infected insect cells: preferred coupling to Gi1 versus Gi2*. *Biochemistry*, **1996**. 35(48): 15162-73.
165. Guan, X.M., Kobilka, T.S., Kobilka, B.K., *Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide*. *J Biol Chem*, **1992**. 267(31): 21995-8.
166. Burger, K., Gimpl, G., Fahrenholz, F., *Regulation of receptor function by cholesterol*. *Cell Mol Life Sci*, **2000**. 57(11): 1577-92.
167. Bouvier, M., Menard, L., Dennis, M., Marullo, S., *Expression and recovery of functional G-protein-coupled receptors using baculovirus expression systems*. *Curr Opin Biotechnol*, **1998**. 9(5): 522-7.
168. Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L., *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells*. *Nat Biotechnol*, **2005**. 23(5): 567-75.
169. Colosimo, A., Goncz, K.K., Holmes, A.R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R.W., Bennett, M.J., Gruenert, D.C., *Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells*. *Biotechniques*, **2000**. 29(2): 314-8, 20-2, 24.
170. Mortensen, R., Chesnut, J.D., Hoeffler, J.P., Kingston, R.E., *Selection of transfected mammalian cells*. W: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G.,

- Smith, J.A., Struhl, K. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, **1997**, Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc. 9.5.1-9.5.19
171. Makrides, S.C., *Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells*. *Protein Expr Purif*, **1999**. 17(2): 183-202.
172. Hermans, E., *Generation of model cell lines expressing recombinant G-protein-coupled receptors*. *Methods Mol Biol*, **2004**. 259: 137-53.
173. Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M., Wurm, F.M., *Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives*. *Biotechnol Lett*, **2007**. 29(5): 677-84.
174. Jordan, M., Schallhorn, A., Wurm, F.M., *Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation*. *Nucleic Acids Res*, **1996**. 24(4): 596-601.
175. Bertini, R., Sironi, M., Martin-Padura, I., Colotta, F., Rambaldi, S., Bernasconi, S., Ghezzi, P., Haskill, S.J., Liu, D., Mantovani, A., *Inhibitory effect of recombinant intracellular interleukin 1 receptor antagonist on endothelial cell activation*. *Cytokine*, **1992**. 4(1): 44-7.
176. Reed, S.E., Staley, E.M., Mayginnes, J.P., Pintel, D.J., Tullis, G.E., *Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors*. *J Virol Methods*, **2006**. 138(1-2): 85-98.
177. Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., Ludwig, S., *Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent*. *Signal Transduction*, **2006**. 6(3): 179-84.
178. Benjaminsen, R.V., Mattebjerg, M.A., Henriksen, J.R., Moghimi, S.M., Andresen, T.L., *The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH*. *Mol Ther*, **2013**. 21(1): 149-57.
179. Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Moore, M.L., *Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents*. W: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, **2008**, Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc. 9.4.1-9.4.17.
180. Zaremba, M.L., Borowski, J., *Mikrobiologia lekarska: podręcznik dla studentów medycyny*. Wyd. III, **2004**, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
181. Cepko, C., Pear, W., *Overview of the Retrovirus Transduction System*, W: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, **2001**, Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc. 9.9.1-9.9.16.
182. Miller, A.D., Buttimore, C., *Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production*. *Mol Cell Biol*, **1986**. 6(8): 2895-902.
183. Witte, D.G., Yao, B.B., Miller, T.R., Carr, T.L., Cassar, S., Sharma, R., Faghieh, R., Surber, B.W., Esbenshade, T.A., Hancock, A.A., Krueger, K.M., *Detection of multiple H3 receptor affinity states utilizing [3H]A-349821, a novel, selective, non-imidazole histamine H3 receptor inverse agonist radioligand*. *Br J Pharmacol*, **2006**. 148(5): 657-70.

184. Markowitz, D., Goff, S., Bank, A., *Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line*. *Virology*, **1988**. 167(2): 400-6.
185. Emi, N., Friedmann, T., Yee, J.K., *Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus*. *J Virol*, **1991**. 65(3): 1202-7.
186. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J.K., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1993**. 90(17): 8033-7.
187. Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hu, W.-S., Yap, M.G.S., *Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells -- 20 Years and Counting*. *Chemical Engineering Progress*, **2007**. 103(10): 40-47.
188. Kim, J.Y., Kim, Y.G., Lee, G.M., *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2012**. 93(3): 917-30.
189. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, **1977**. 36(1): 59-74.
190. Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A., *Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis*. *BMC Genomics*, **2011**. 12: 14.
191. Thomas, P., Smart, T.G., *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **2005**. 51(3): 187-200.
192. Siehler, S., *Cell-based assays in GPCR drug discovery*. *Biotechnol J*, **2008**. 3(4): 471-83.
193. Greasley, P.J., Jansen, F.P., *G-protein-coupled receptor screening technologies*. *Drug Discov Today Technol*, **2005**. 2(2): 163-70.
194. Zhang, R., Xie, X., *Tools for GPCR drug discovery*. *Acta Pharmacol Sin*, **2012**. 33(3): 372-84.
195. de Jong, L.A., Uges, D.R., Franke, J.P., Bischoff, R., *Receptor-ligand binding assays: technologies and applications*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2005**. 829(1-2): 1-25.
196. Thomsen, W., Frazer, J., Unett, D., *Functional assays for screening GPCR targets*. *Curr Opin Biotechnol*, **2005**. 16(6): 655-65.
197. Auld, D.S., Farmen, M.W., Kahl, S.D., Kriauciunas, A., McKnight, K.L., Montrose, C., Weidner, J.R., *Receptor Binding Assays for HTS and Drug Discovery*, W: Sittampalam, G.S., Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, V., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Riss, T., Trask, O.J., Weidner, J. (red.), *Assay Guidance Manual* [online] **2004**, Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
198. Kenakin, T.P., *Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, **2009**. 8(8): 617-26.

199. Vanderheyden, P.M., Fierens, F.L., De Backer, J., Vauquelin, G., *Reversible and syntopic interaction between angiotensin receptor antagonists on Chinese hamster ovary cells expressing human angiotensin II type 1 receptors*. *Biochem Pharmacol*, **2000**. 59(8): 927-35.
200. Kuder, K., Kieć-Kononowicz, K., *Fluorescent GPCR ligands as new tools in pharmacology*. *Curr Med Chem*, **2008**. 15(21): 2132-43.
201. Berry, J., Price-Jones, M., *Measurement of radioligand binding by scintillation proximity assay*. *Methods Mol Biol*, **2005**. 306: 121-37.
202. Schneider, E., Mayer, M., Ziemek, R., Li, L., Hutzler, C., Bernhardt, G., Buschauer, A., *A simple and powerful flow cytometric method for the simultaneous determination of multiple parameters at G protein-coupled receptor subtypes*. *Chembiochem*, **2006**. 7(9): 1400-9.
203. Kozma, E., Kumar, T.S., Federico, S., Phan, K., Balasubramanian, R., Gao, Z.G., Paoletta, S., Moro, S., Spalluto, G., Jacobson, K.A., *Novel fluorescent antagonist as a molecular probe in A(3) adenosine receptor binding assays using flow cytometry*. *Biochem Pharmacol*, **2012**. 83(11): 1552-61.
204. Hanoune, J., Defer, N., *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2001**. 41: 145-74.
205. Williams, C., *cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest*. *Nat Rev Drug Discov*, **2004**. 3(2): 125-35.
206. Rajagopal, S., Rajagopal, K., Lefkowitz, R.J., *Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Drug Discov*, **2010**. 9(5): 373-86.
207. Cotton, M., Claing, A., *G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration*. *Cell Signal*, **2009**. 21(7): 1045-53.
208. Vines, C.M., Prossnitz, E.R., *Mechanisms of G protein-coupled receptor-mediated degranulation*. *FEMS Microbiol Lett*, **2004**. 236(1): 1-6.
209. Lappano, R., Maggiolini, M., *G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, **2011**. 10(1): 47-60.
210. Fang, Y., Frutos, A.G., Verklereen, R., *Label-free cell-based assays for GPCR screening*. *Comb Chem High Throughput Screen*, **2008**. 11(5): 357-69.
211. Scott, C.W., Peters, M.F., *Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening*. *Drug Discov Today*, **2010**. 15(17-18): 704-16.
212. Yu, N., Atienza, J.M., Bernard, J., Blanc, S., Zhu, J., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y.A., *Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors*. *Anal Chem*, **2006**. 78(1): 35-43.
213. Antony, J., Kellershohn, K., Mohr-Andra, M., Kebig, A., Prilla, S., Muth, M., Heller, E., Disingrini, T., Dallanocce, C., Bertoni, S., Schrobang, J., Trankle, C., Kostenis, E., Christopoulos, A., Holtje, H.D., Barocelli, E., De Amici, M., Holzgrabe, U., Mohr, K., *Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity*. *FASEB J*, **2009**. 23(2): 442-50.

214. Kebig, A., Kostenis, E., Mohr, K., Mohr-Andra, M., *An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators*. J Recept Signal Transduct Res, **2009**. 29(3-4): 140-5.
215. Urban, J.D., Clarke, W.P., von Zastrow, M., Nichols, D.E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J.A., Roth, B.L., Christopoulos, A., Sexton, P.M., Miller, K.J., Spedding, M., Mailman, R.B., *Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology*. J Pharmacol Exp Ther, **2007**. 320(1): 1-13.
216. Simmons, M.A., *Functional selectivity, ligand-directed trafficking, conformation-specific agonism: what's in a name?* Mol Interv, **2005**. 5(3): 154-7.
217. Gao, Z.G., Jacobson, K.A., *Translocation of arrestin induced by human A(3) adenosine receptor ligands in an engineered cell line: comparison with G protein-dependent pathways*. Pharmacol Res, **2008**. 57(4): 303-11.
218. Wu, D.F., Yang, L.Q., Goschke, A., Stumm, R., Brandenburg, L.O., Liang, Y.J., Holtt, V., Koch, T., *Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors*. J Neurochem, **2008**. 104(4): 1132-43.
219. Mukhopadhyay, S., Howlett, A.C., *Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions*. Mol Pharmacol, **2005**. 67(6): 2016-24.
220. Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., *Agonist-biased signaling at the histamine H4 receptor: JNJ7777120 recruits beta-arrestin without activating G proteins*. Mol Pharmacol, **2011**. 79(4): 749-57.
221. Nijmeijer, S., Vischer, H.F., Sirci, F., Schultes, S., Engelhardt, H., de Graaf, C., Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., Leurs, R., *Detailed analysis of biased histamine H(4) receptor signalling by JNJ 7777120 analogues*. Br J Pharmacol, **2013**. 170(1): 78-88.
222. Kukkonen, J.P., Jansson, C.C., Akerman, K.E., *Agonist trafficking of G(i/o)-mediated alpha(2A)-adrenoceptor responses in HEL 92.1.7 cells*. Br J Pharmacol, **2001**. 132(7): 1477-84.
223. Whalen, E.J., Rajagopal, S., Lefkowitz, R.J., *Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists*. Trends Mol Med, **2011**. 17(3): 126-39.
224. Kenakin, T., *The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling*. BMC Pharmacol Toxicol, **2012**. 13: 3.
225. DeWire, S.M., Violin, J.D., *Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology*. Circ Res, **2011**. 109(2): 205-16.
226. Wisler, J.W., DeWire, S.M., Whalen, E.J., Violin, J.D., Drake, M.T., Ahn, S., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J., *A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(42): 16657-62.
227. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, **1962**. 59: 223-39.

228. Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nat Methods, **2005**. 2(12): 905-9.
229. Arun, K.H., Kaul, C.L., Ramarao, P., *Green fluorescent proteins in receptor research: an emerging tool for drug discovery*. J Pharmacol Toxicol Methods, **2005**. 51(1): 1-23.
230. Milligan, G., Feng, G.J., Ward, R.J., Sartania, N., Ramsay, D., McLean, A.J., Carrillo, J.J., *G protein-coupled receptor fusion proteins in drug discovery*. Curr Pharm Des, **2004**. 10(17): 1989-2001.
231. Milligan, G., *Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors*. Eur J Pharm Sci, **2004**. 21(4): 397-405.
232. McGinnis, S., Madden, T.L., *BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools*. Nucleic Acids Res, **2004**. 32(Web Server issue): W20-5.
233. Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., *GenBank*. Nucleic Acids Res, **2013**. 41(Database issue): D36-42.
234. Chen, C.A., Okayama, H., *Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA*. Biotechniques, **1988**. 6(7): 632-8.
235. Jarvis, M.F., Schulz, R., Hutchison, A.J., Do, U.H., Sills, M.A., Williams, M., *[3H]CGS 21680, a selective A2 adenosine receptor agonist directly labels A2 receptors in rat brain*. J Pharmacol Exp Ther, **1989**. 251(3): 888-93.
236. Jarvis, M.F., Williams, M., *Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680*. Eur J Pharmacol, **1989**. 168(2): 243-6.
237. Müller, C.E., Maurinsh, J., Sauer, R., *Binding of [3H]MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(m-methoxystyryl)-1-propargylxanthine) to rat striatal membranes--a new, selective antagonist radioligand for A(2A) adenosine receptors*. Eur J Pharm Sci, **2000**. 10(4): 259-65.
238. Bylund, D.B., Deupree, J.D., Toews, M.L., *Radioligand-binding methods for membrane preparations and intact cells*. Methods Mol Biol, **2004**. 259: 1-28.
239. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., Gelber, C., *The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?* Biotechniques, **2007**. 43(5): 575, 77-8, 81-2.
240. Jacobsen, L., Hughes, P., *Effects of passage number on cell line transfection*. Biochemica, **2007**. 3: 32.
241. Sauer, R., Maurinsh, J., Reith, U., Fulle, F., Klotz, K.N., Müller, C.E., *Water-soluble phosphate prodrugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A(2A)-selective adenosine receptor antagonists*. J Med Chem, **2000**. 43(3): 440-8.
242. Vollmann, K., Qurishi, R., Hockemeyer, J., Müller, C.E., *Synthesis and properties of a new water-soluble prodrug of the adenosine A 2A receptor antagonist MSX-2*. Molecules, **2008**. 13(2): 348-59.

243. Hockemeyer, J., Burbiel, J.C., Müller, C.E., *Multigram-scale syntheses, stability, and photoreactions of A2A adenosine receptor antagonists with 8-styrylxanthine structure: potential drugs for Parkinson's disease*. J Org Chem, **2004**. 69(10): 3308-18.
244. Kieć-Kononowicz, K., Drabczyńska, A., Pękala, E., Michalak, B., Müller, C.E., Schumacher, B., Karolak-Wojciechowska, J., Duddeck, H., Rockitt, S., Wartchow, R., *New developments in A1 and A2 adenosine receptor antagonists*. Pure Appl Chem, **2001**. 73(9): 1411-20.
245. Drabczyńska, A., Schumacher, B., Müller, C.E., Karolak-Wojciechowska, J., Michalak, B., Pękala, E., Kieć-Kononowicz, K., *Impact of the aryl substituent kind and distance from pyrimido[2,1-f]purindiones on the adenosine receptor selectivity and antagonistic properties*. Eur J Med Chem, **2003**. 38(4): 397-402.
246. Drabczyńska, A., Müller, C.E., Schumacher, B., Hinz, S., Karolak-Wojciechowska, J., Michalak, B., Pękala, E., Kieć-Kononowicz, K., *Tricyclic oxazolo[2,3-f]purinediones: potency as adenosine receptor ligands and anticonvulsants*. Bioorg Med Chem, **2004**. 12(18): 4895-908.
247. Drabczyńska, A., Müller, C.E., Lacher, S.K., Schumacher, B., Karolak-Wojciechowska, J., Nasal, A., Kawczak, P., Yuzlenko, O., Pękala, E., Kieć-Kononowicz, K., *Synthesis and biological activity of tricyclic aryloimidazo-, pyrimido-, and diazepinopurinediones*. Bioorg Med Chem, **2006**. 14(21): 7258-81.
248. Drabczyńska, A., Müller, C.E., Schiedel, A., Schumacher, B., Karolak-Wojciechowska, J., Fruziński, A., Zobnina, W., Yuzlenko, O., Kieć-Kononowicz, K., *Phenylethyl-substituted pyrimido[2,1-f]purinediones and related compounds: structure-activity relationships as adenosine A(1) and A(2A) receptor ligands*. Bioorg Med Chem, **2007**. 15(22): 6956-74.
249. Drabczyńska, A., Müller, C.E., Karolak-Wojciechowska, J., Schumacher, B., Schiedel, A., Yuzlenko, O., Kieć-Kononowicz, K., *N9-benzyl-substituted 1,3-dimethyl- and 1,3-dipropyl-pyrimido[2,1-f]purinediones: synthesis and structure-activity relationships at adenosine A1 and A2A receptors*. Bioorg Med Chem, **2007**. 15(14): 5003-17.
250. Drabczyńska, A., Yuzlenko, O., Köse, M., Paskaleva, M., Schiedel, A.C., Karolak-Wojciechowska, J., Handzlik, J., Karcz, T., Kuder, K., Müller, C.E., Kieć-Kononowicz, K., *Synthesis and biological activity of tricyclic cycloalkylimidazo-, pyrimido- and diazepinopurinediones*. Eur J Med Chem, **2011**. 46(9): 3590-607.
251. Drabczyńska, A., Karcz, T., Szymańska, E., Köse, M., Müller, C., Paskaleva, M., Karolak-Wojciechowska, J., Handzlik, J., Yuzlenko, O., Kieć-Kononowicz, K., *Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of tricyclic alkylimidazo-, pyrimido- and diazepinopurinediones*. Purinergic Signal, **2013**: 1-20.
252. Linden, J., *Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions*. Trends Pharmacol Sci, **1994**. 15(8): 298-306.
253. Borrmann, T., Hinz, S., Bertarelli, D.C., Li, W., Florin, N.C., Scheiff, A.B., Müller, C.E., *1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of*

- adenosine A2B receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity.* J Med Chem, **2009**. 52(13): 3994-4006.
254. Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.* Mol Pharmacol, **1988**. 34(5): 605-13.
255. Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., *Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors.* Mol Pharmacol, **1995**. 48(3): 443-50.
256. Southern, C., Cook, J.M., Neetoo-Isseljee, Z., Taylor, D.L., Kettleborough, C.A., Merritt, A., Bassoni, D.L., Raab, W.J., Quinn, E., Wehrman, T.S., Davenport, A.P., Brown, A.J., Green, A., Wigglesworth, M.J., Rees, S., *Screening beta-arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors.* J Biomol Screen, **2013**. 18(5): 599-609.
257. Lu, V.B., Puhl, H.L., Ikeda, S.R., *N-Arachidonyl glycine does not activate G protein-coupled receptor 18 signaling via canonical pathways.* Mol Pharmacol, **2013**. 83(1): 267-82.
258. Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D.G., Caldwell, J.S., Chen, Y.A., *Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay.* J Biol Chem, **2009**. 284(18): 12328-38.
259. Kieć-Kononowicz, K., Karolak-Wojciechowska, J., Müller, C.E., Schumacher, B., Pękala, E., Szymańska, E., *Imidazo-thiazine, -diazinone and -diazepinone derivatives. Synthesis, structure and benzodiazepine receptor binding.* Eur J Med Chem, **2001**. 36: 407-19.
260. Kieć-Kononowicz, K., Karolak-Wojciechowska, J., Michalak, B., Pękala, E., Schumacher, B., Müller, C.E., *Imidazo[2,1-b]thiazepines: synthesis, structure and evaluation of benzodiazepine receptor binding.* Eur J Med Chem, **2004**. 39: 205-18.
261. Sigel, E., Baur, R., Racz, I., Marazzi, J., Smart, T.G., Zimmer, A., Gertsch, J., *The major central endocannabinoid directly acts at GABA(A) receptors.* Proc Natl Acad Sci USA, **2011**. 108: 18150-55.
262. Kottke, T., Sander, K., Weizel, L., Schneider, E.H., Seifert, R., Stark, H., *Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H3/H4 receptor ligands.* Eur J Pharmacol, **2011**. 654(3): 200-8.
263. Karcz, T., Handzlik, J., Łażewska, D., Kottke, T., Seifert, R., Kieć-Kononowicz, K., *Search for histamine H(4) receptor ligands in the group of 4-methylpiperazino amide derivatives.* Inflamm Res, **2010**. 59(2): S243-5.
264. Rempel, V., Fuchs, A., Hinz, S., Karcz, T., Lehr, M., Koetter, U., Müller, C.E., *Magnolia Extract, Magnolol, and Metabolites: Activation of Cannabinoid CB2 Receptors and Blockade of the Related GPR55.* ACS Med Chem Lett, **2013**. 4(1): 41-5.
265. Karcz, T., Kieć-Kononowicz, K., *Development of novel cellular model for affinity studies of histamine H(4) receptor ligands.* Acta Biochim Pol, **2013**. 60(4): 823-7.

266. Rempel, V., Atzler, K., Behrenswerth, A., Karcz, T., Schoeder, C., Hinz, S., Kaleta, M., Thimm, D., Kieć-Kononowicz, K., Müller, C.E., *Bicyclic imidazole-4-one derivatives: a new class of antagonists for the orphan G protein-coupled receptors GPR18 and GPR55*. *Medchemcomm*, **2014**. 5(5): 632-49.
267. Motulsky, H.J., Neubig, R.R., *Analyzing Binding Data*, W: Gerfen, C., Holmes, A., Sibley, D., Skolnick, P., Wray, S. (red.), *Current Protocols in Neuroscience*, **2001**, Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc. 7.5.1-7.5.65.
268. Bylund, D.B., Toews, M.L., *Radioligand binding methods: practical guide and tips*. *Am J Physiol*, **1993**. 265(5 Pt 1): L421-9.
269. Kenakin, T.P., *A pharmacology primer: theory, applications, and methods*. Wyd. III, **2009**, Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press.
270. Cheng, Y., Prusoff, W.H., *Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction*. *Biochem Pharmacol*, **1973**. 22(23): 3099-108.
271. Hill, S.J., Williams, C., May, L.T., *Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies*. *Br J Pharmacol*, **2010**. 161(6): 1266-75.
272. Nordstedt, C., Fredholm, B.B., *A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid*. *Anal Biochem*, **1990**. 189(2): 231-4.
273. Thompson, W.J., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function*. *Pharmacol Ther*, **1991**. 51(1): 13-33.
274. Reeves, M.L., Leigh, B.K., England, P.J., *The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. Implications for the mechanism of action of selective phosphodiesterase inhibitors*. *Biochem J*, **1987**. 241(2): 535-41.

7. ANEKS

7.1. Wykaz skrótów

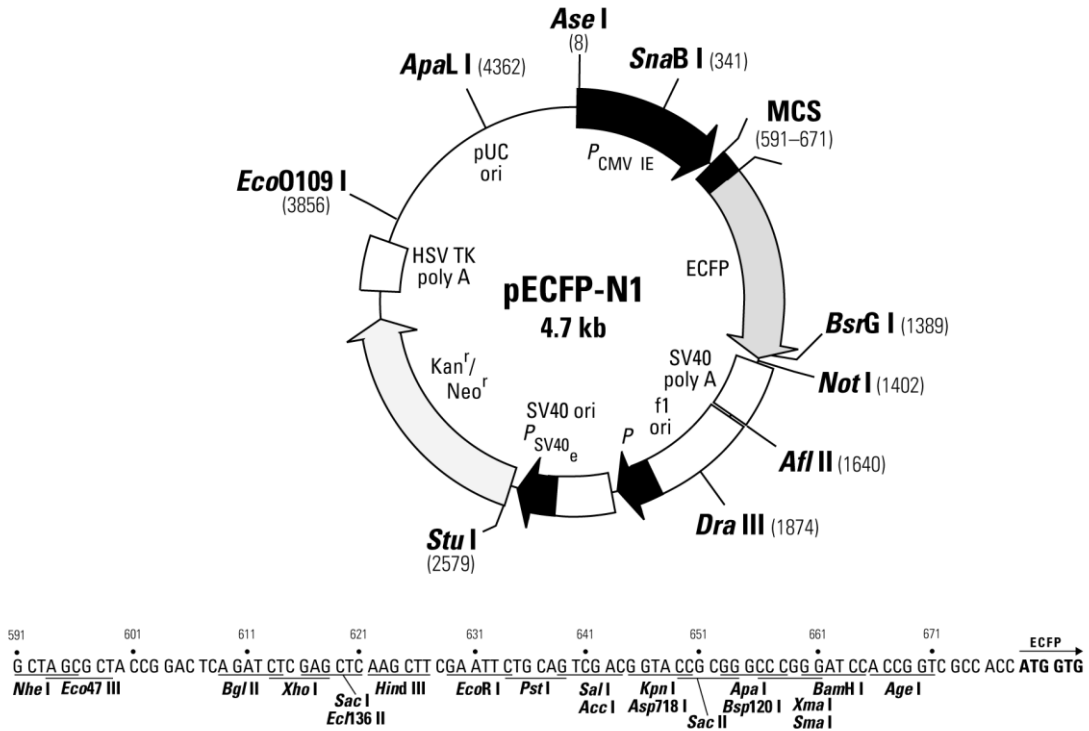
GPCR	receptory oddziałujące z białkami G (ang.: <i>G protein-coupled receptors</i>)
2-AG	2-arachidonyloglicerol
7TM	receptory siedmiotransbłonowe (ang.: <i>seven-transmembrane receptors</i>)
AC	cyklaza adenylanowa (ang.: <i>adenyl cyclase</i>)
AcNPV	wirus poliedrozy jądrowej ćmy <i>Autographa californica</i> (ang.: <i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus</i>)
AEA	<i>N</i> -arachidonyloetanolamina (anandamid)
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
AR	receptory adenozykowe (ang.: <i>adenosine receptors</i>)
AT ₁ R	receptor angiotensynowy typu 1
ATCC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ang.: <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BLAST	narzędzie bioinformatyczne (ang.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BRET	rezonansowy transfer energii bioluminescencji (ang.: <i>bioluminescence resonance energy transfer</i>)
cAMP	cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan
CBR	receptory kannabinoidowe (ang.: <i>cannabinoid receptors</i>)
CHO	unięśmiertelnione komórki jajnika chomika chińskiego (ang.: <i>Chinese hamster ovary cells</i>)
CMV	cytomegalowirus
CREB	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (ang.: <i>cAMP response element-binding protein</i>)
DAG	1,2-diacyloglicerol
DOPE	dioleilo-fosfatydyloetanolamina
DR	receptory dopaminowe (ang.: <i>dopamine receptors</i>)
EBV	wirus Epsteina-Barr (ang.: <i>Epstein-Barr virus</i>)
ECFP	białko wzmacnionej cyjanowej fluorescencji (ang.: <i>enhanced cyan fluorescent protein</i>)
ERK	kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe (ang.: <i>extracellular regulated kinase</i>)
FRET	rezonansowy transfer energii fluorescencji (ang.: <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
FSC	natężenie światła rozproszonego w kierunku biegu promienia lasera (ang.: <i>forward scatter parameter</i>)
G418	genetycyna
GDP	guanozy-5'-difosforan

GFP	białko zielonej fluorescencji (ang.: <i>green fluorescent protein</i>)
GRK	kinazy receptorów oddziałujących z białkami G (ang.: <i>G protein-coupled receptor kinase</i>)
GTP	guanozyno-5'-trifosforan
H ₄ R	receptor histaminowy H ₄
HEK293	linia komórkowa ludzkiej embrionalnej nerki (ang.: <i>human embryonic kidney cells</i>)
IP ₃	1,4,5-trisfosforan inozytolu
IRK	wewnątrzprostowniczy kanał potasowy (ang.: <i>inward rectifier potassium channel</i>)
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami (ang.: <i>mitogen-activated kinases</i>)
MCS	miejsce klonowania, polilinker (ang.: <i>multi-cloning site</i>)
NADA	<i>N</i> -arachidonylo-dopamina
NSB	wiązanie niespecyficzne (ang.: <i>non-specific binding</i>)
ORF	otwarta ramka odczytu (ang.: <i>open reading frame</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	fosfodiesteraza (ang.: <i>phosphodiesterase</i>)
PI-3-K	3-kinaza fosfatydyloinozytoli (ang.: <i>phosphoinositide-3-kinase</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang.: <i>protein kinase C</i>);
PLC	fosfolipaza C (ang.: <i>phospholipase C</i>)
pz	liczba par zasad azotowych
RFU	względne jednostki fluorescencji (ang.: <i>relative fluorescence units</i>)
RhoGEF	czynnik wymiany nukleotydów guaninowych dla GTP-az Rho (ang.: <i>Rho guanine nucleotide exchange factor</i>)
SA	aktywność specyficzna (ang.: <i>specific activity</i>)
SB	wiązanie specyficzne (ang.: <i>specific binding</i>)
SSC	natężenie światła rozproszonego w kierunku prostopadłym do kierunku biegu promienia lasera (ang.: <i>side scatter parameter</i>)
SV40	małpi wirus nr 40 (ang.: <i>Simian virus 40</i>)
TA	radioaktywność całkowitej ilości radioliganda (ang.: <i>total activity</i>)
TB	wiązanie całkowite (ang.: <i>total binding</i>)
VDCC	napięcio-zależny kanał wapniowy (ang.: <i>voltage-dependent calcium channel</i>)
VSV	wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang.: <i>Vesicular stomatitis virus</i>)
WT	komórki typu dzikiego (ang.: <i>wild-type cells</i>)

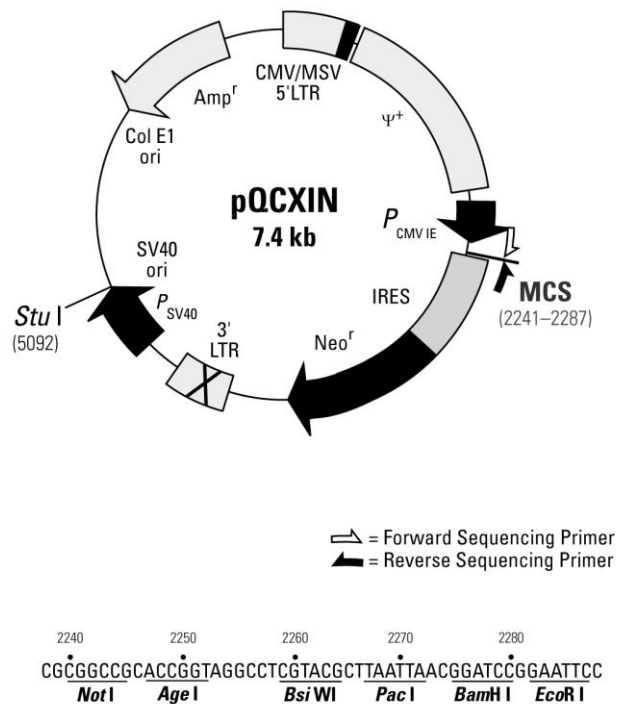
7.2. Załączniki

Załącznik 1. Mapy plazmidów wykorzystanych jako wektory genetyczne w przeprowadzonych eksperymentach biologii molekularnej

pECFP-N1

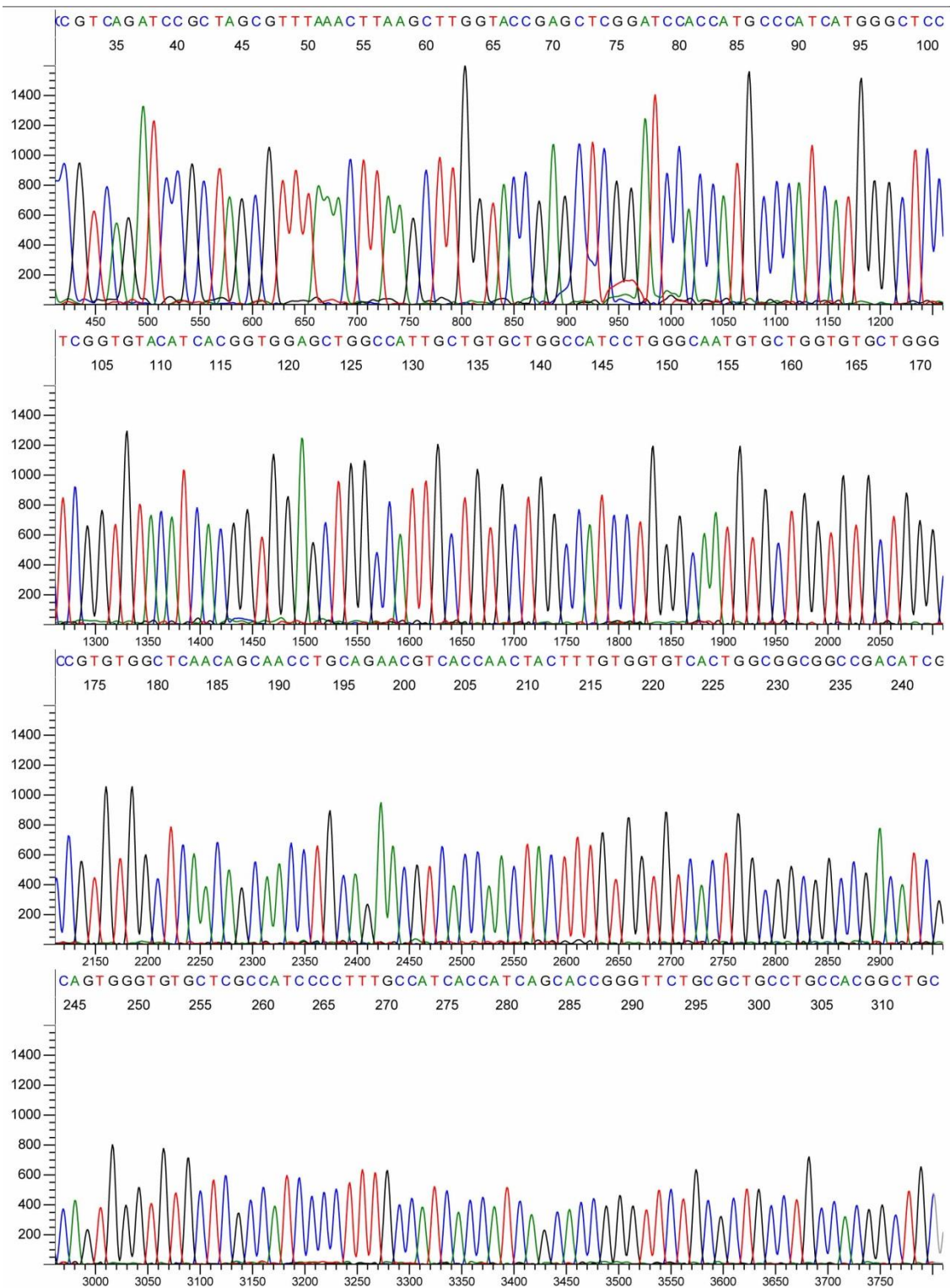


pQCXIN

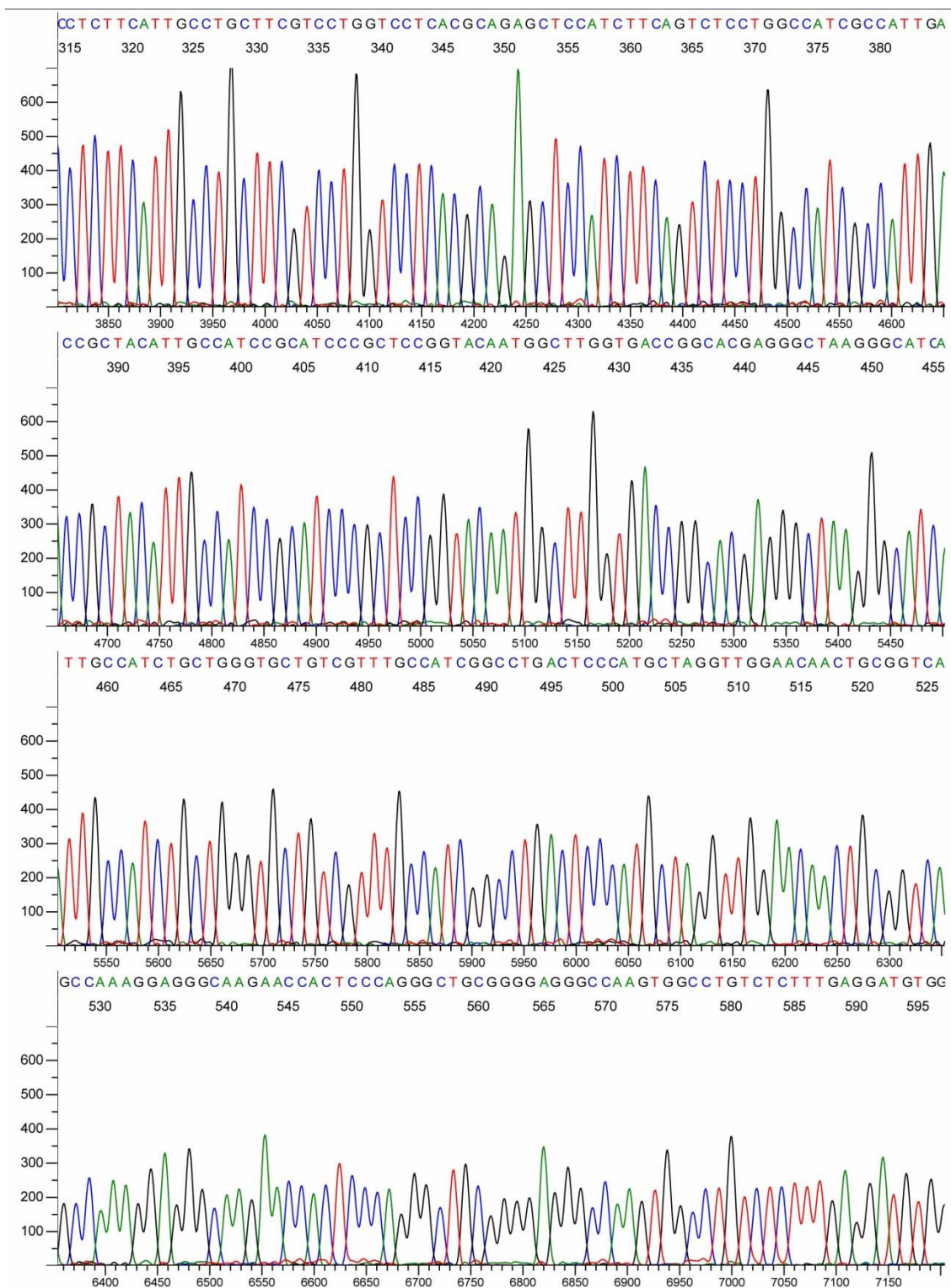


Rysunek 7.1 Mapy plazmidów pECFP-N1 i pQCXIN.

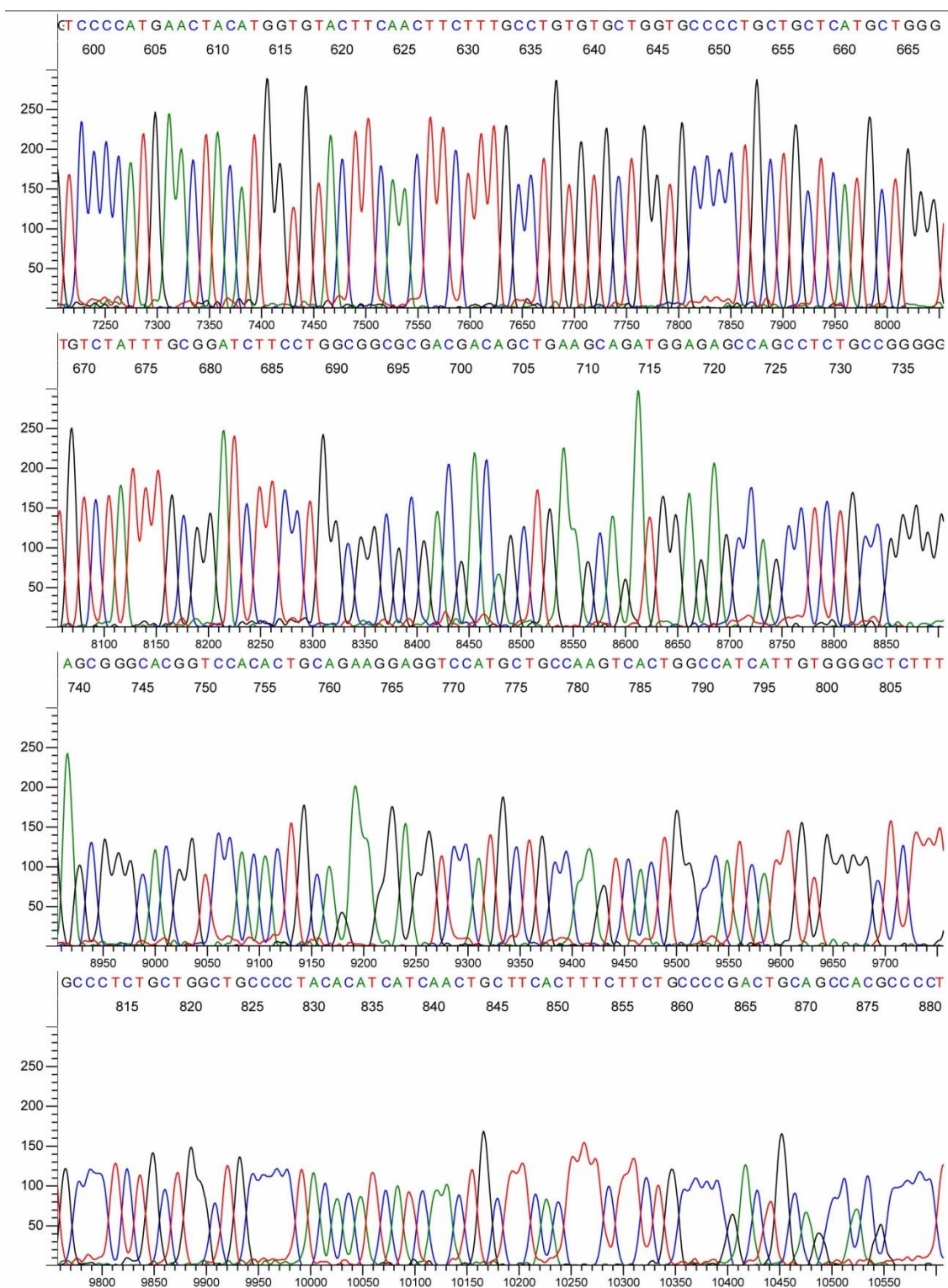
Załącznik 2. Wynik sekwencjonowania nr 1



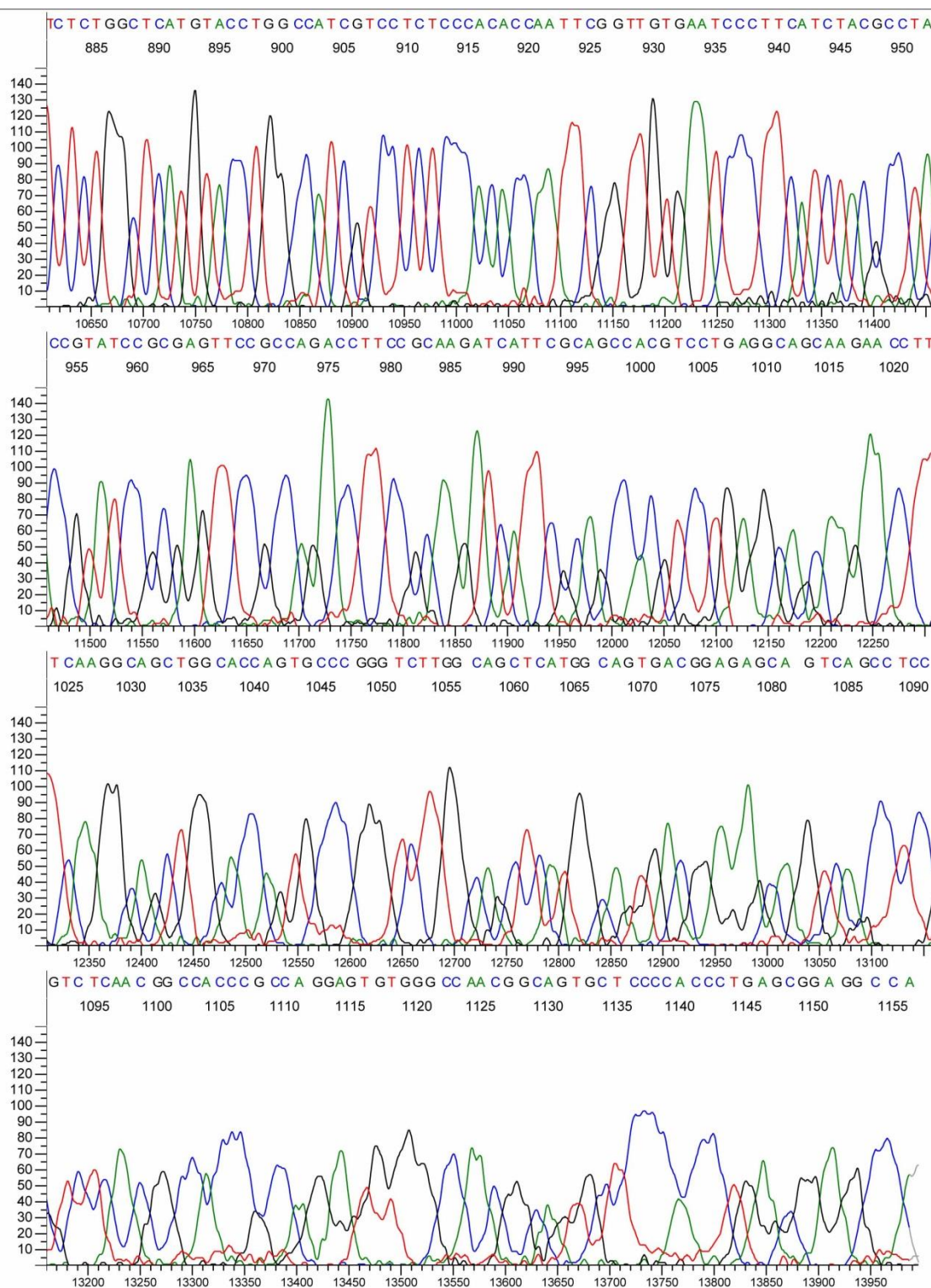
Rysunek 7.2 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 1 - część 1.



Rysunek 7.3 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 1, ciąg dalszy - część 2.

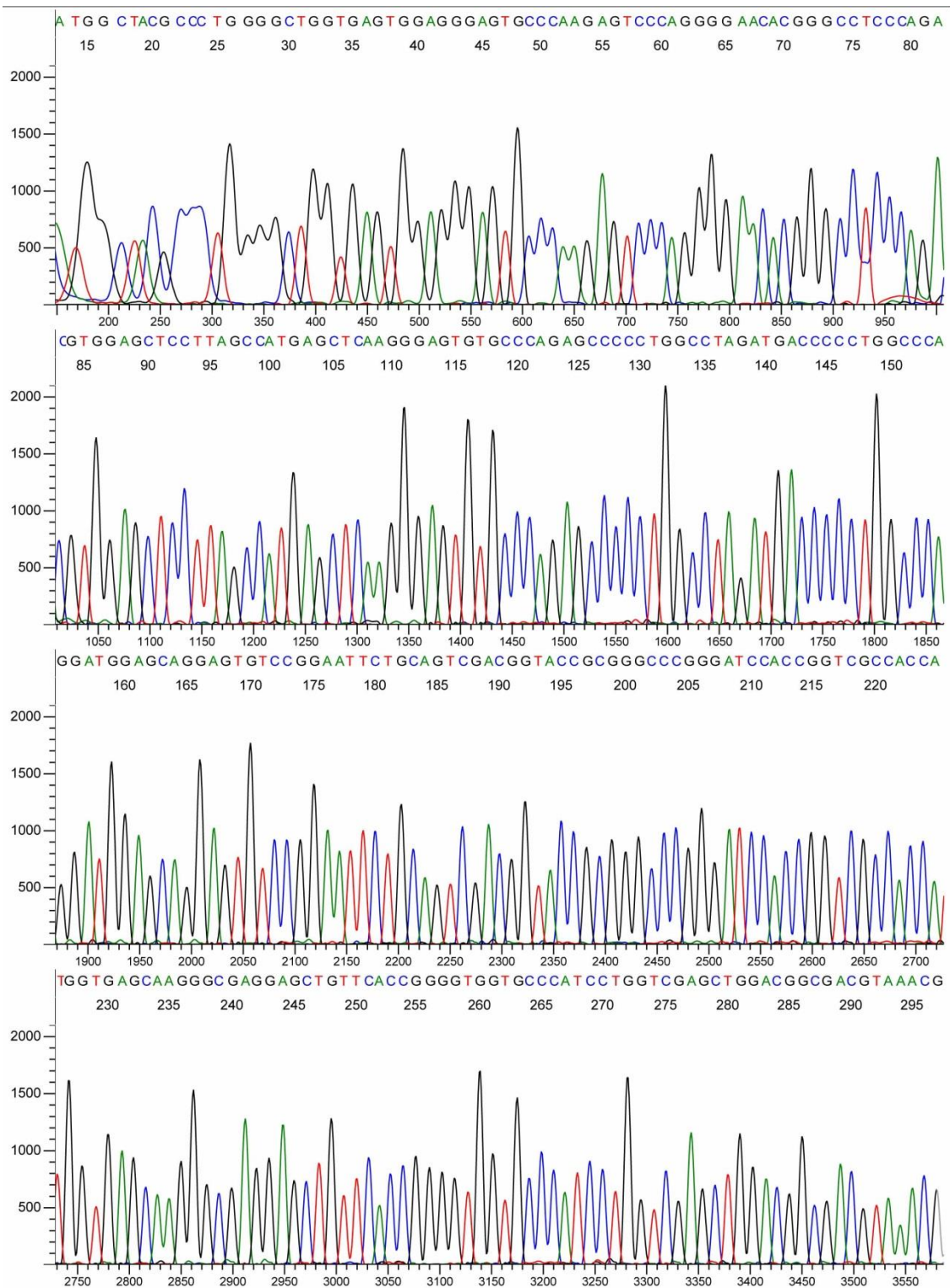


Rysunek 7.4 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 1, ciąg dalszy - część 3.

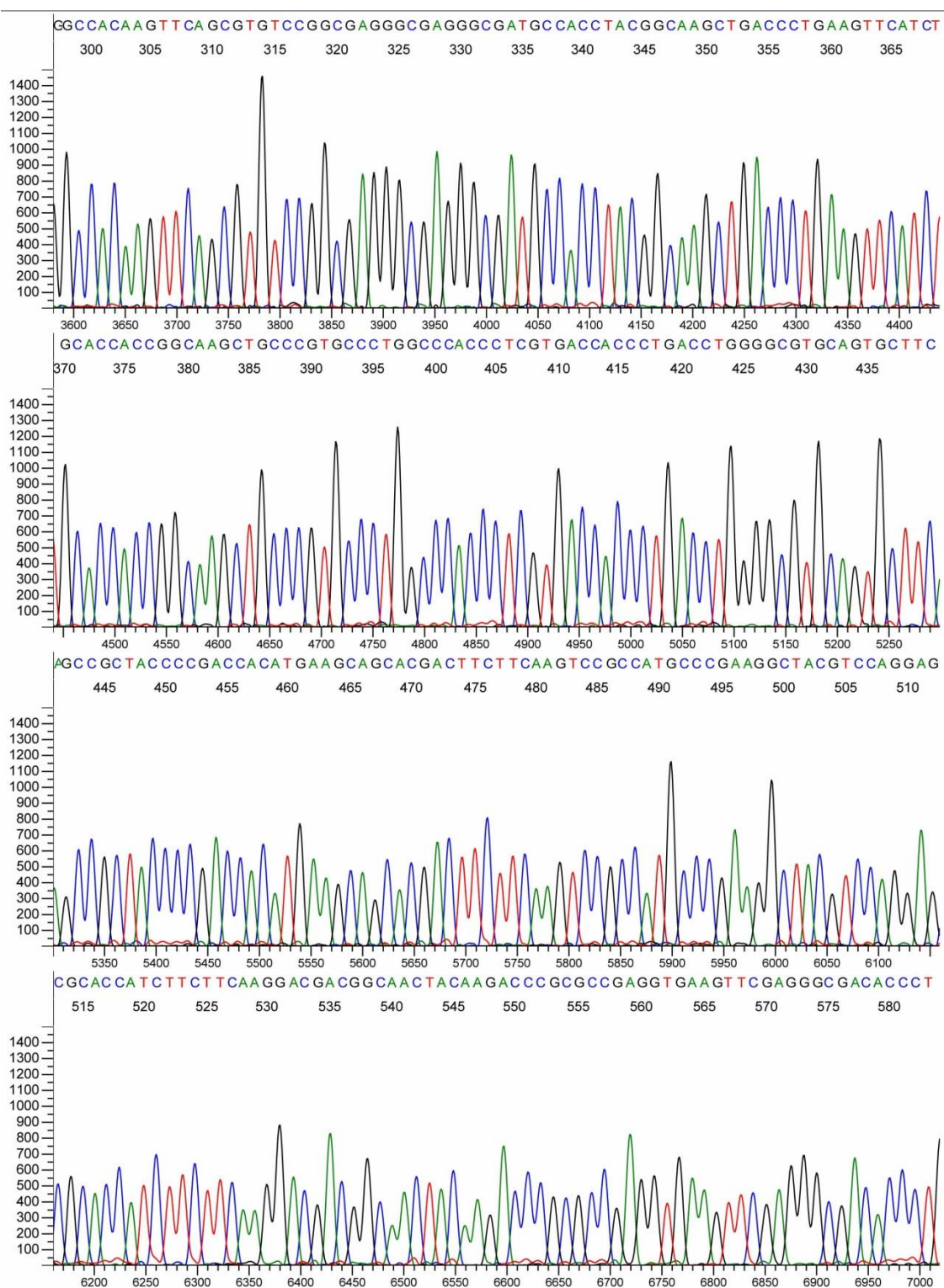


Rysunek 7.5 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 1, ciąg dalszy - część 4.

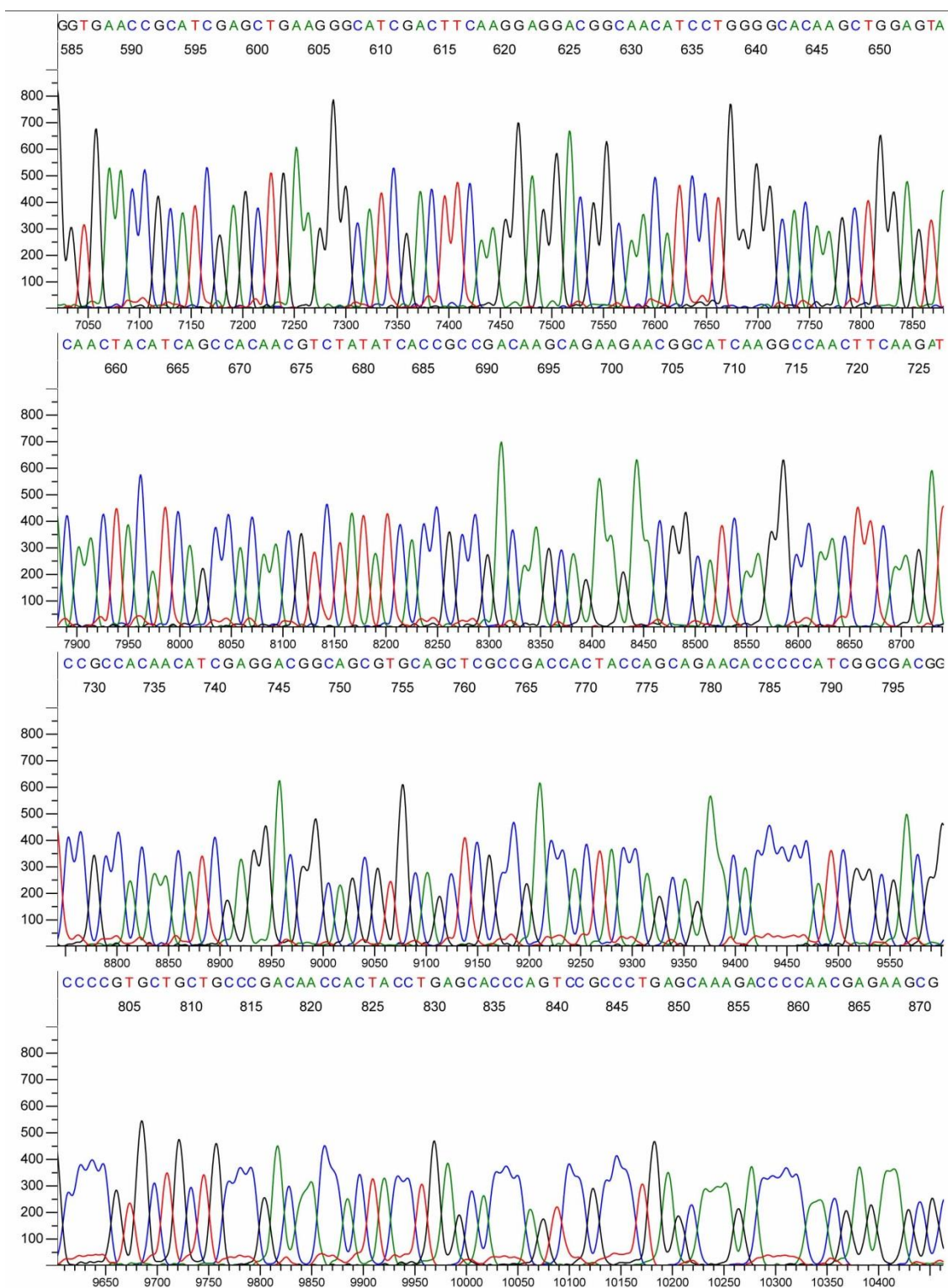
Załącznik 3. Wynik sekwencjonowania nr 2



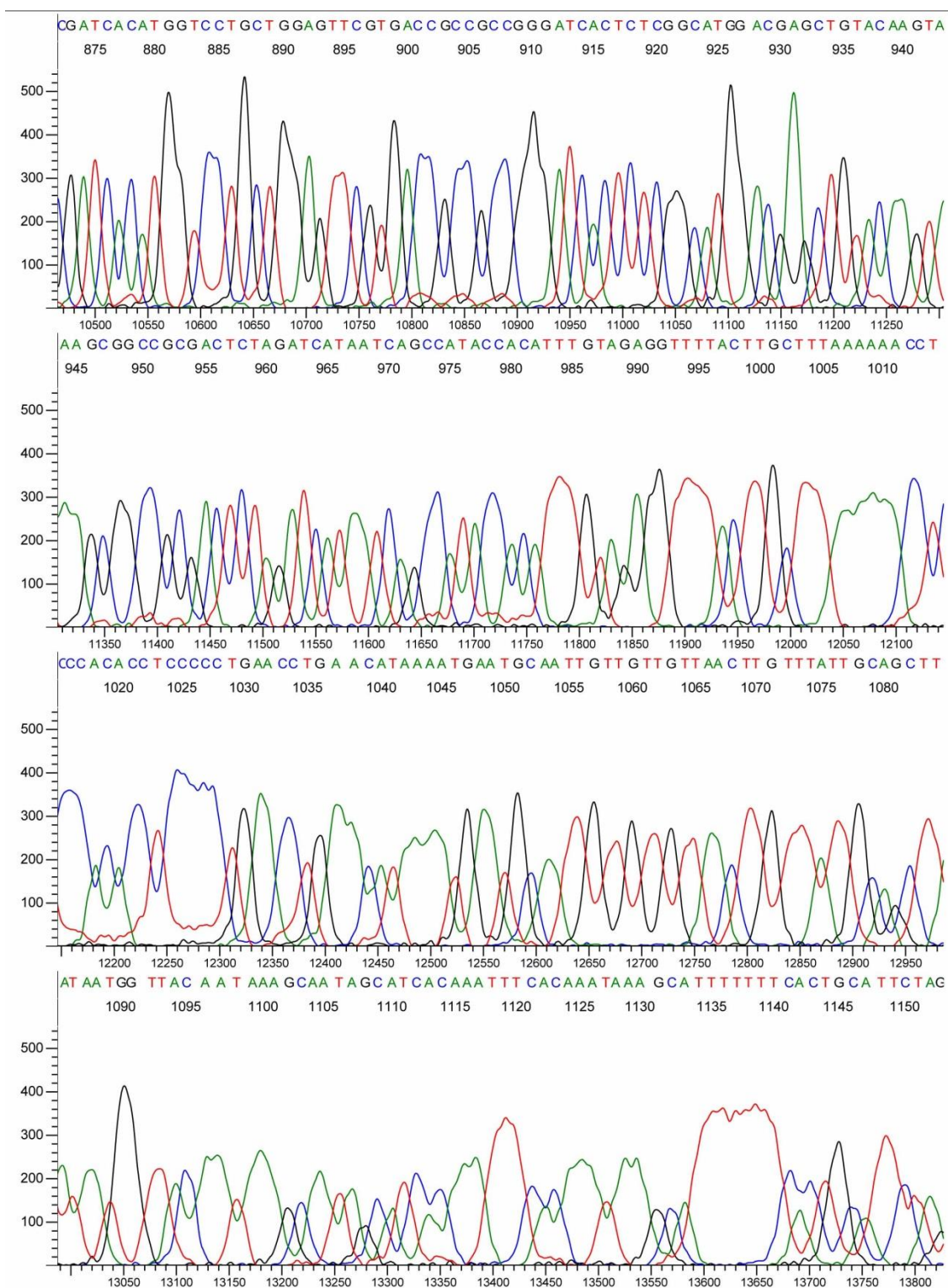
Rysunek 7.6 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 2 - część 1.



Rysunek 7.7 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 2, ciąg dalszy - część 2.

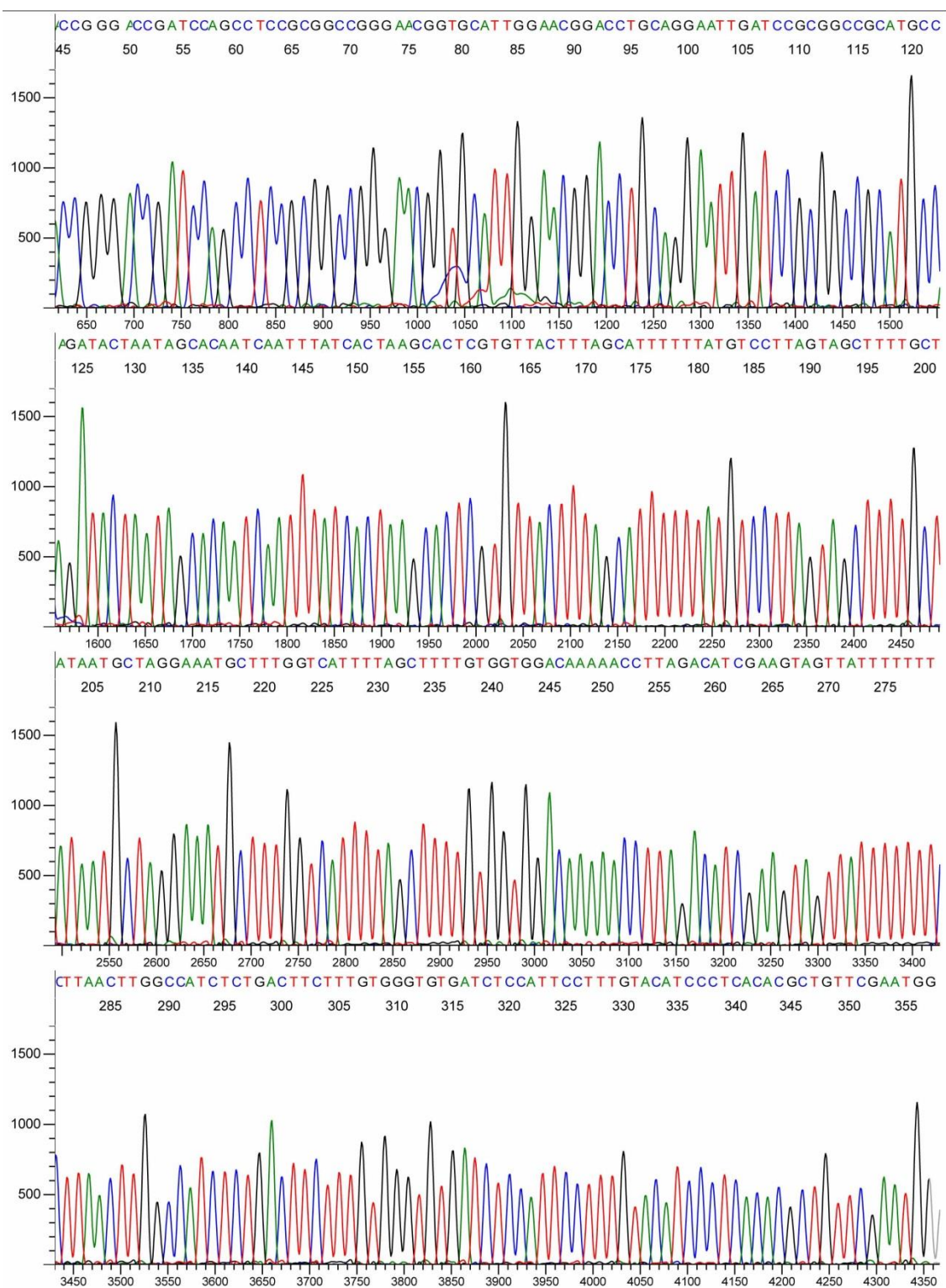


Rysunek 7.8 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 2, ciąg dalszy - część 3.

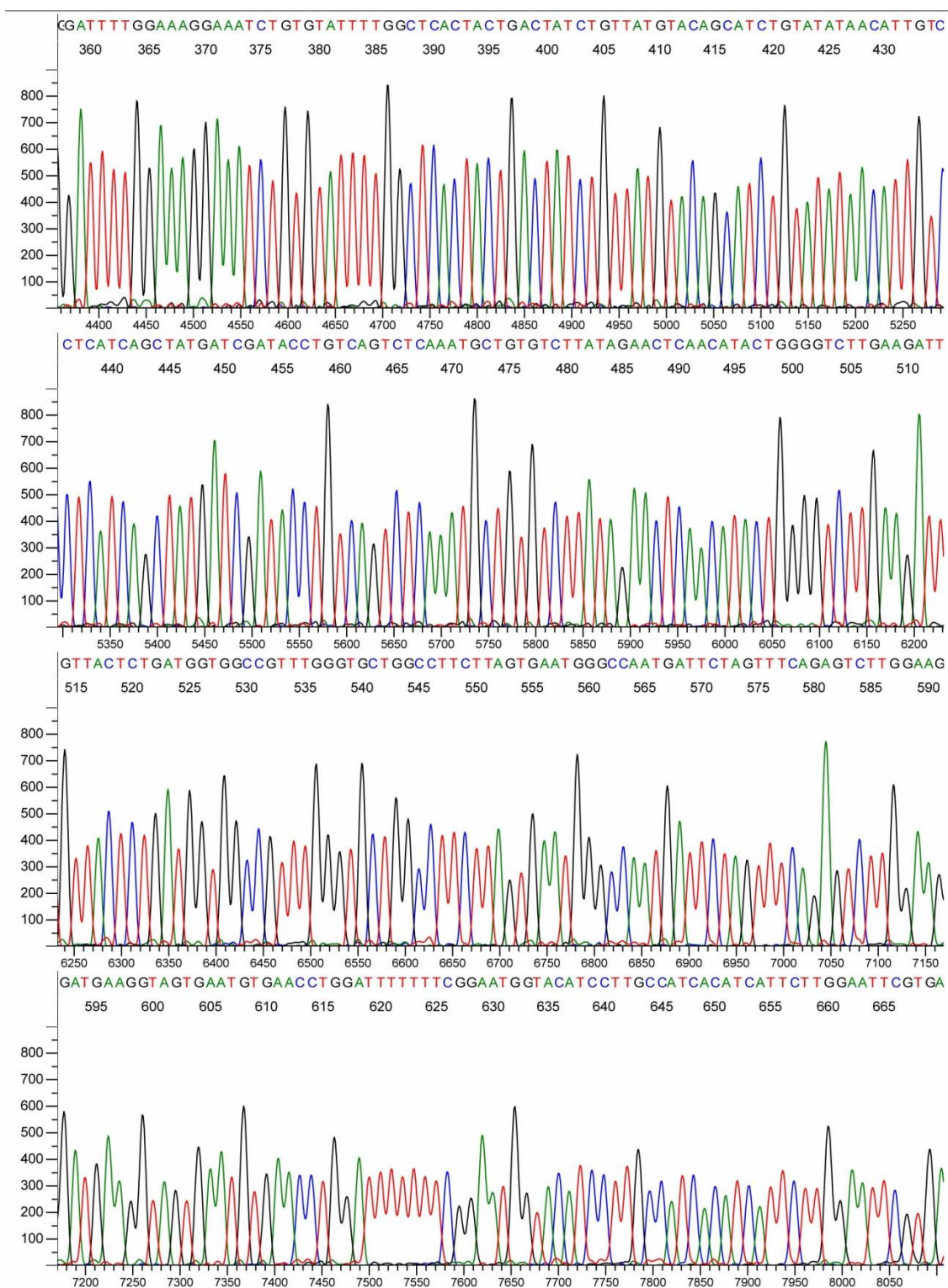


Rysunek 7.9 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 2, ciąg dalszy - część 4.

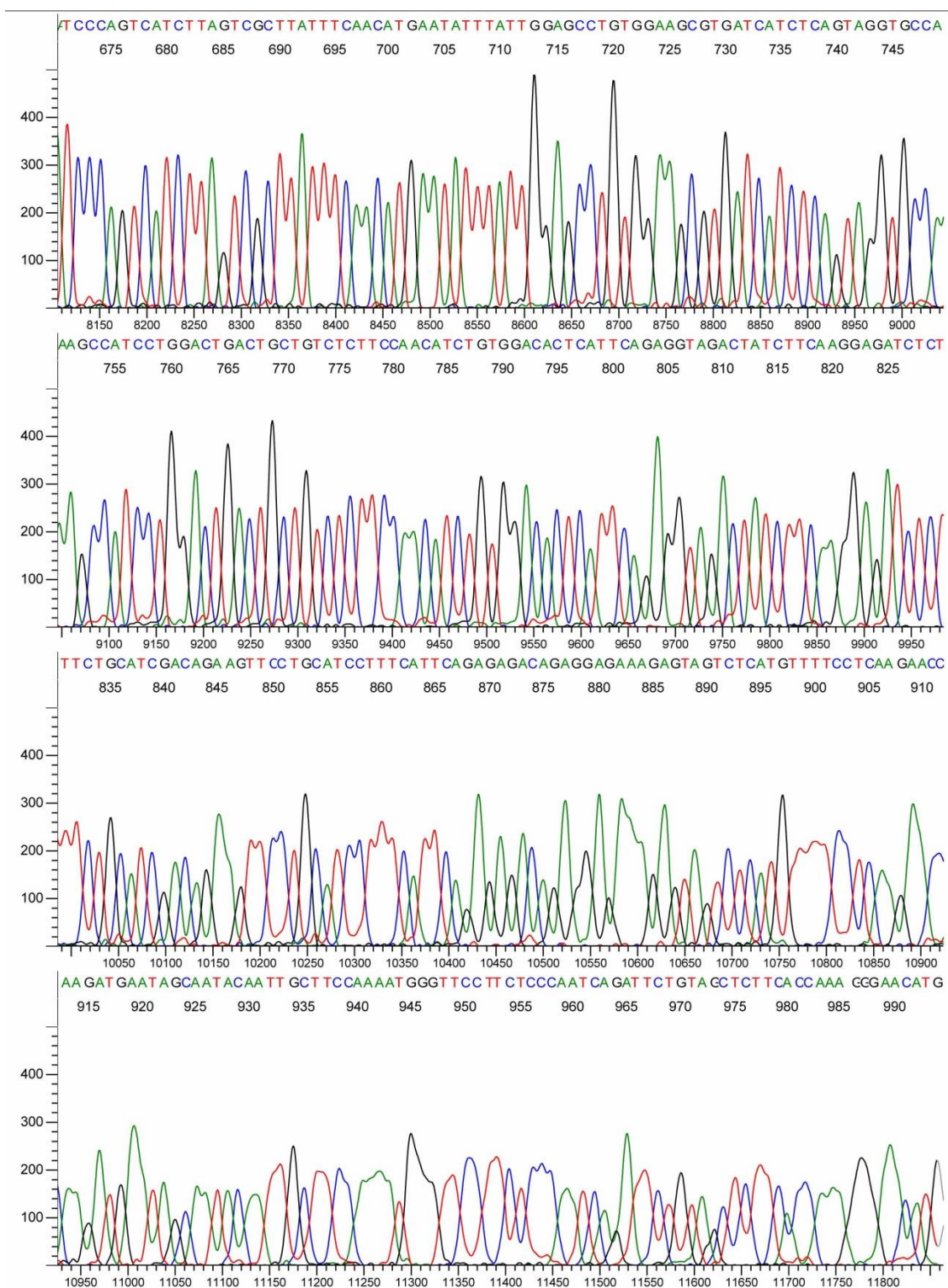
Załącznik 4. Wynik sekwencjonowania nr 3



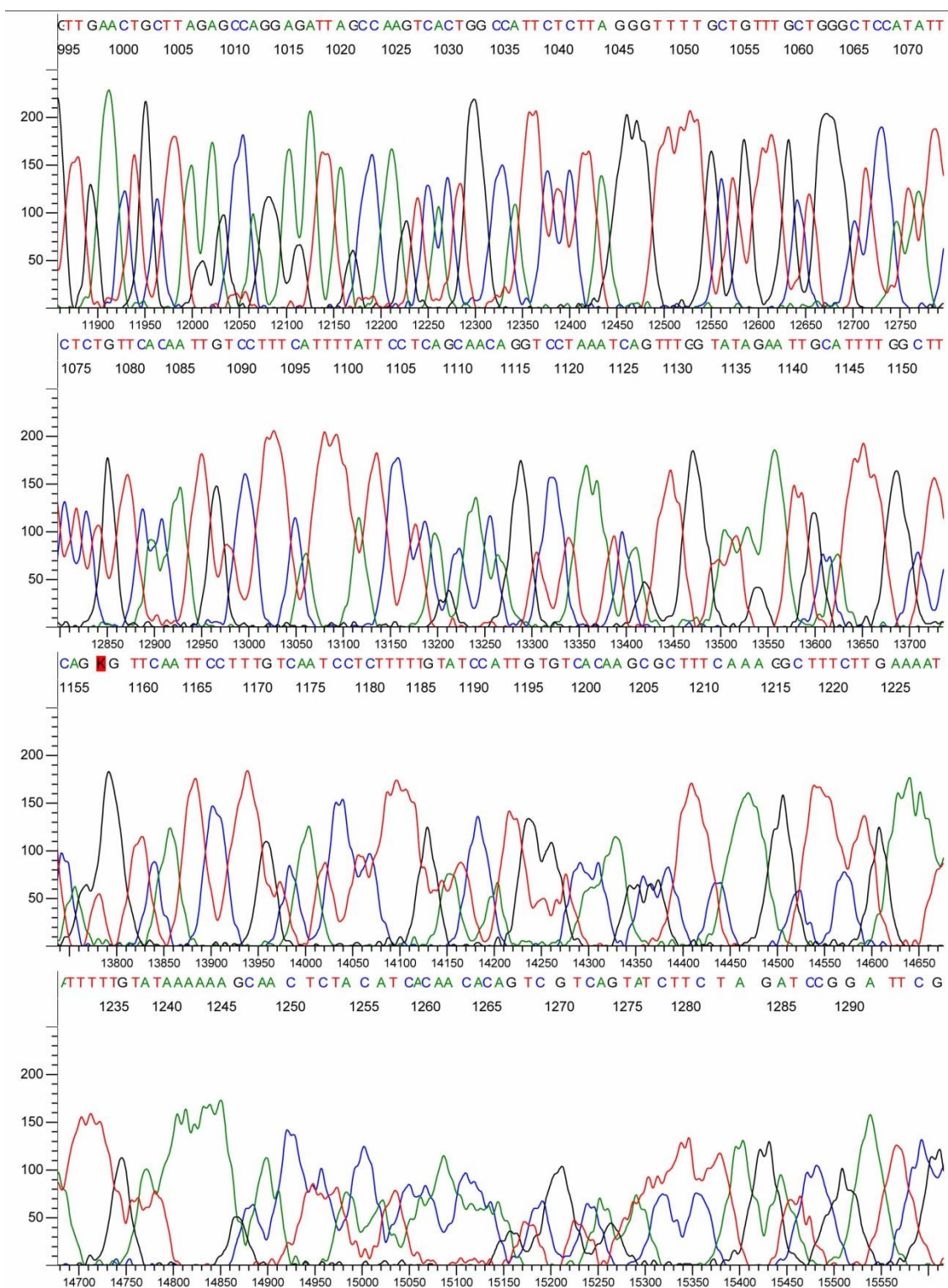
Rysunek 7.10 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 3 - część 1.



Rysunek 7.11 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 3, ciąg dalszy - część 2.

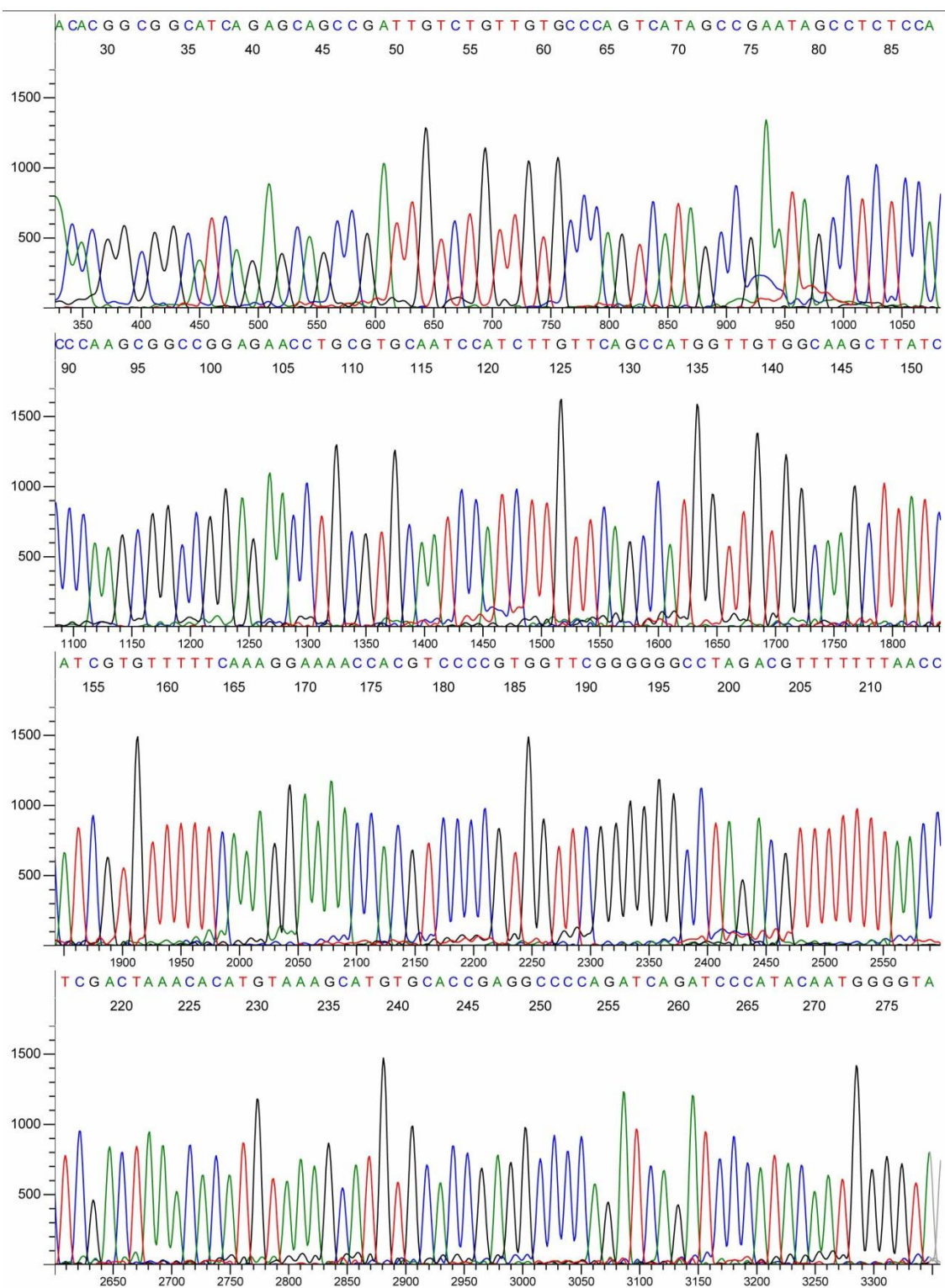


Rysunek 7.12 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 3, ciąg dalszy - część 3.

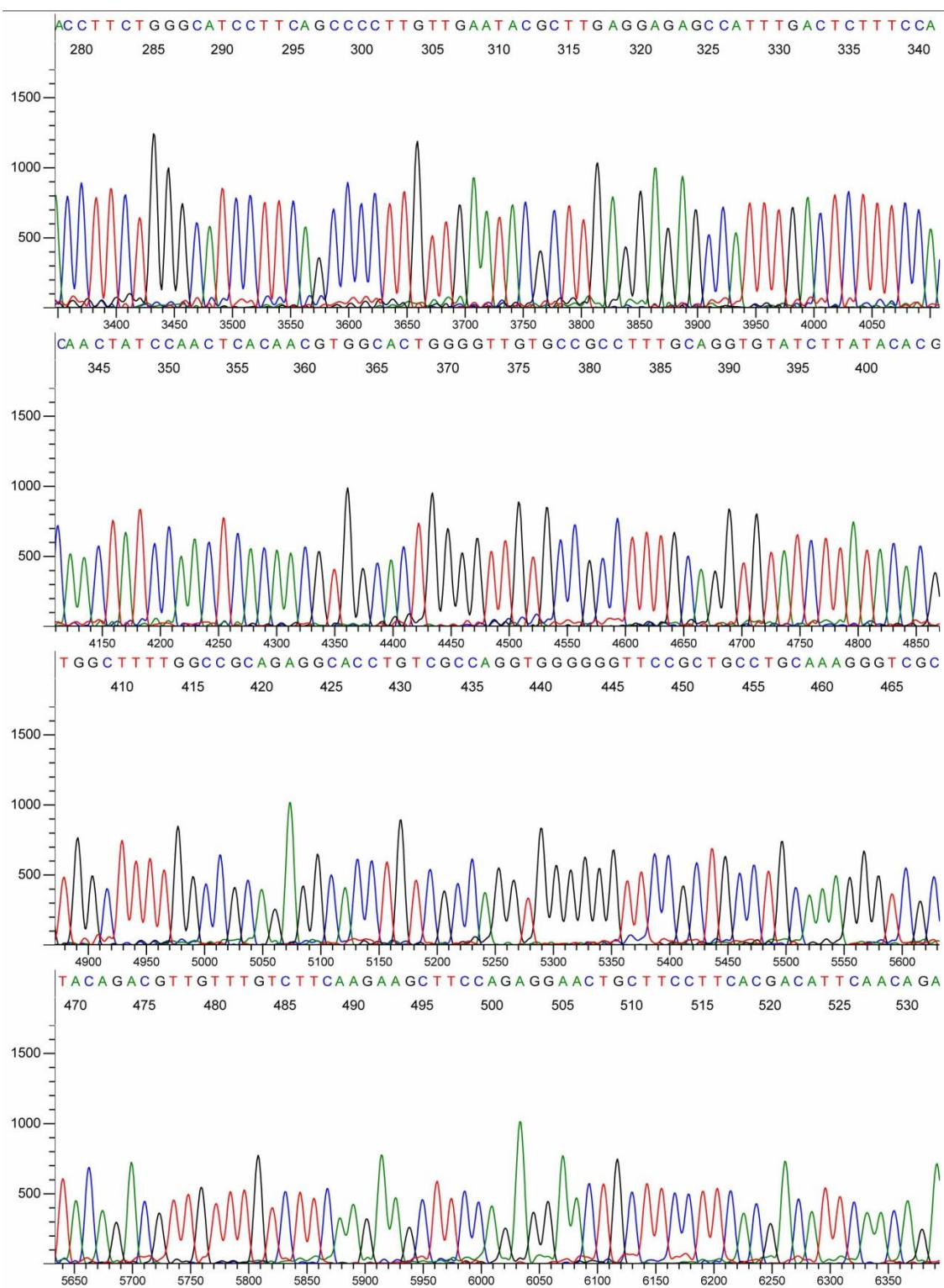


Rysunek 7.13. Fluorogram dla sekwencjonowania nr 3, ciąg dalszy - część 4.

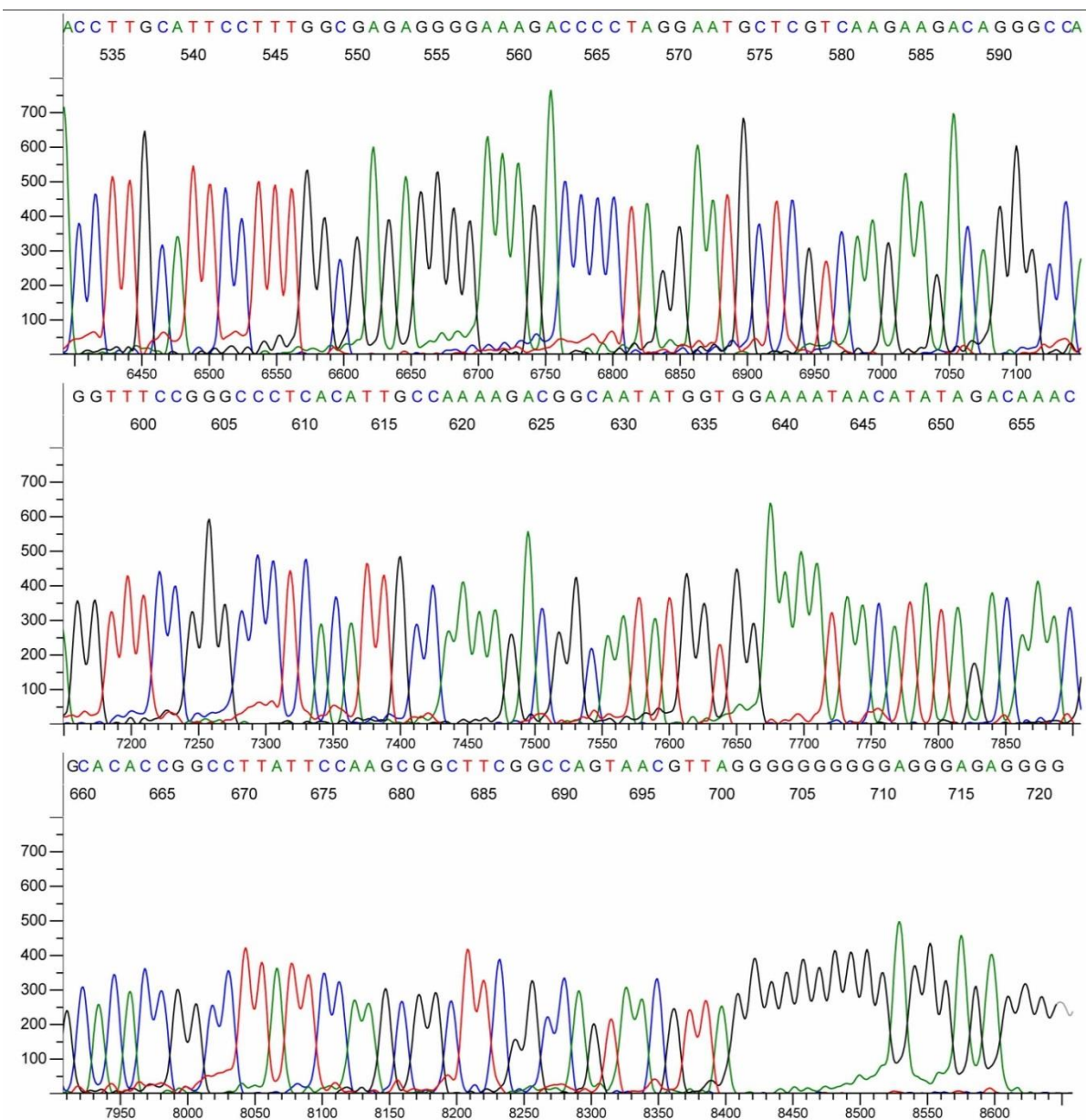
Załącznik 5. Wynik sekwencjonowania nr 4



Rysunek 7.14 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 4 - część 1.



Rysunek 7.15 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 4, ciąg dalszy. - część 2.



Rysunek 7.16 Fluorogram dla sekwencjonowania nr 4, ciąg dalszy - część 3.

Załącznik 6. Wyniki oznaczeń potencjalnych ligandów GPR18 w trybie agonisty za pomocą testu rekrutacji β -arrestyny

Tabela 7.1 Wyniki skringingu potencjalnych ligandów receptora GPR18 w trybie agonisty.

Związek	% odpowiedzi wywołanej THC w stęż. 10 μ M
ChM-53	21 \pm 5
ChM-1	20 \pm 11
ChM-94	19 \pm 3
ChM-4	17 \pm 6
ChM-40	17 \pm 8
ChM-18	15 \pm 12
ChM-90	14 \pm 6
ChM-49	14 \pm 4
B-54	13 \pm 12
ChM-54	12 \pm 7
ChM-52	11 \pm 5
ChM-50	11 \pm 10
ChM-48	11 \pm 20
ChM-44	9 \pm 2
ChM-2	8 \pm 4
ChM-51	7 \pm 5
CB-6	7 \pm 8
ChM-43	7 \pm 7
ChM-13	7 \pm 11
ChM-76	6 \pm 10
ChM-46	5 \pm 8
ChM-12	4 \pm 9
ChM-64	1 \pm 12
CB-1	0 \pm 2
ChM-84	-2 \pm 7
ChM-6	-2 \pm 6
ChM-33	-2 \pm 7
ChM-72	-3 \pm 8
CB-3	-4 \pm 7
ChM-20	-5 \pm 4
CB-2	-5 \pm 6
CB-8	-6 \pm 9
ChM-47	-7 \pm 5
B-56	-7 \pm 4
CB-7	-9 \pm 13
ChM-32	-11 \pm 3
CB-4	-12 \pm 6
ChM-73	-16 \pm 14
CB-9	-19 \pm 11
ChM-3	-20 \pm 13
CB-5	-22 \pm 3

Załącznik 8. Krzywe kompetycyjnego wiązania radioligandów receptorów adenozynowych i kannabinoidowych.

Tabela 7.2 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]CCPA do szczurzego receptora adenozynowego A_1 względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

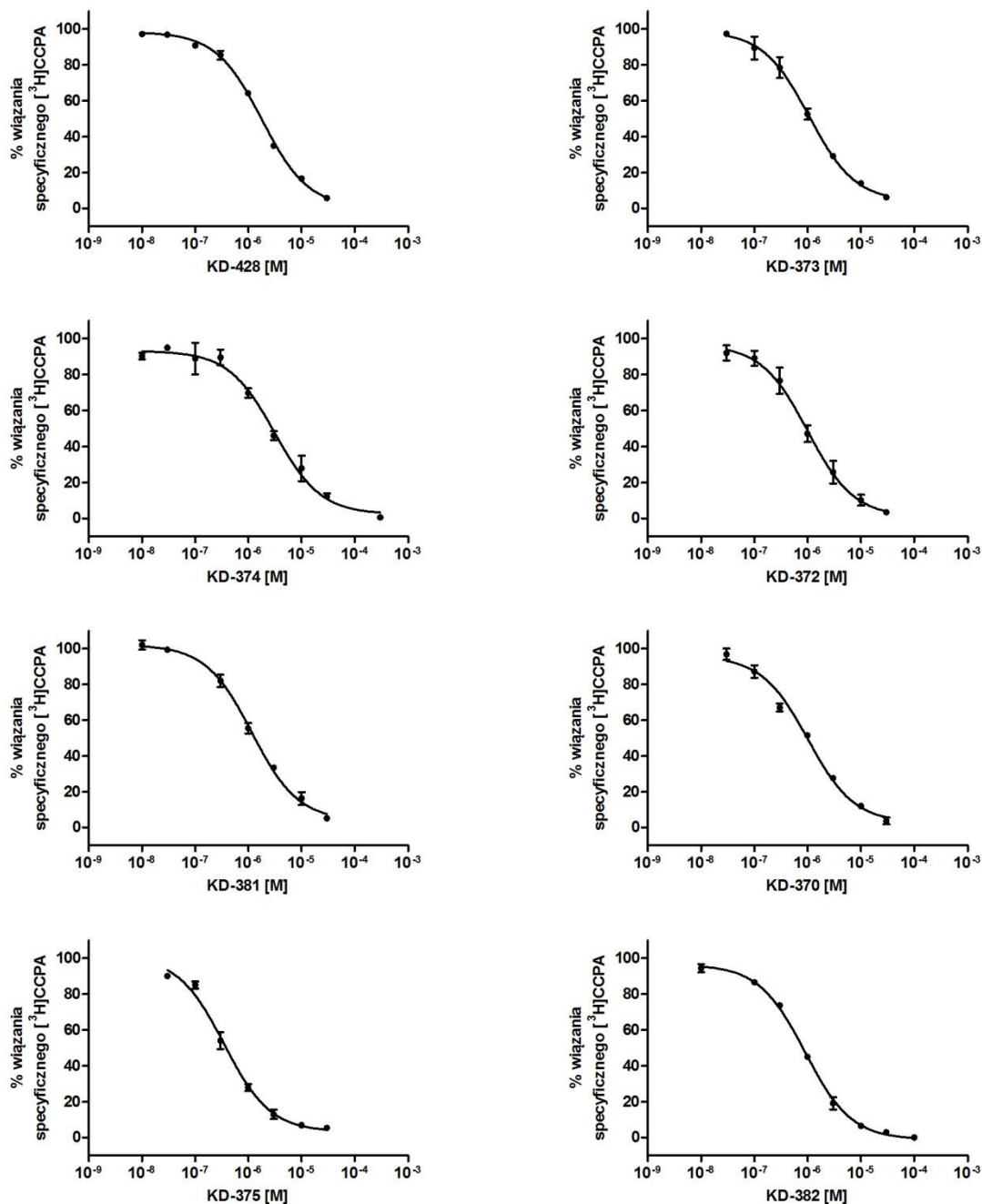


Tabela 7.2, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]CCPA do szczurzego receptora adenozynowego A_1 względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

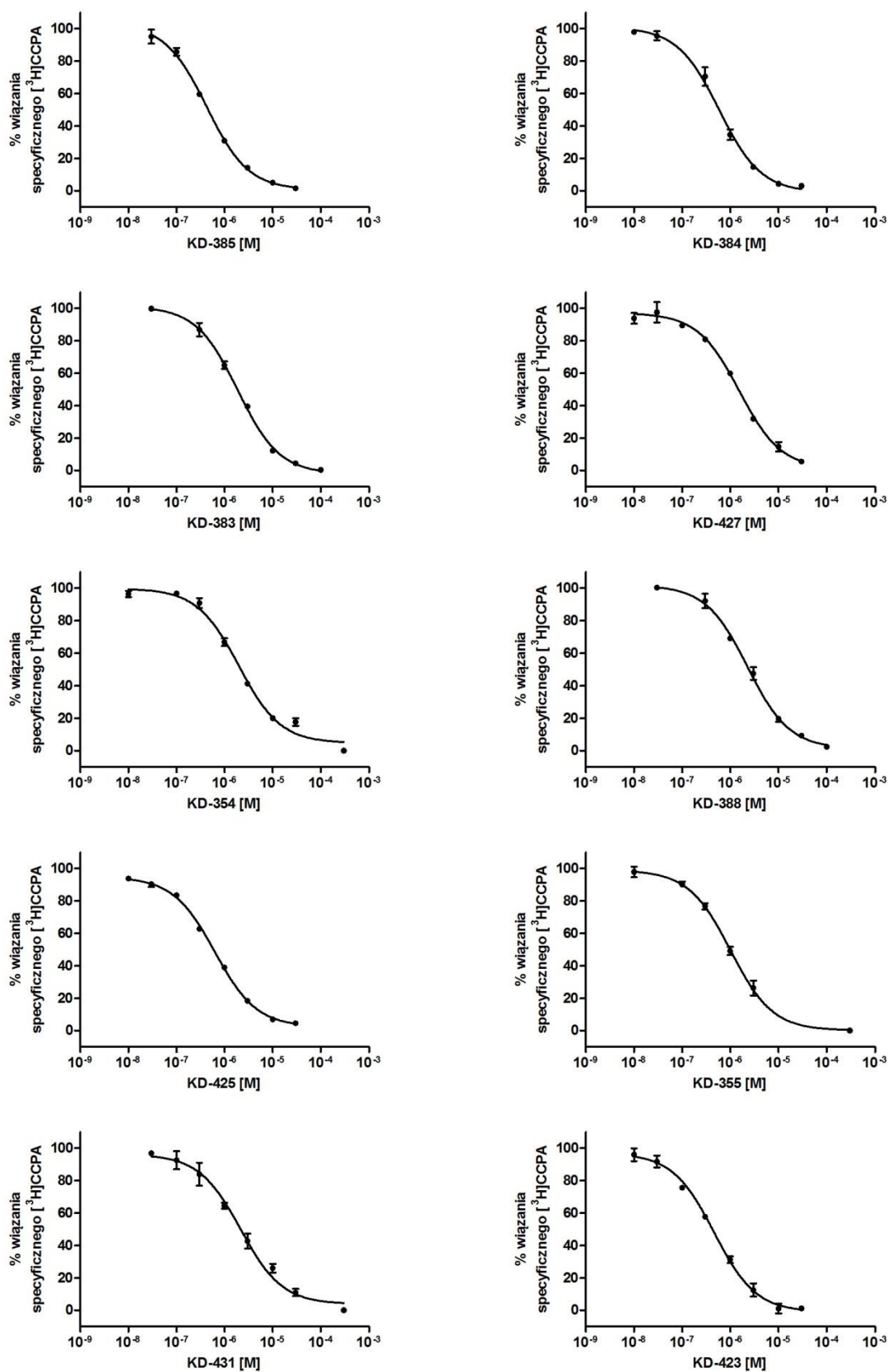


Tabela 7.2, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]CCPA do szczurzego receptora adenozynowego A_1 względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

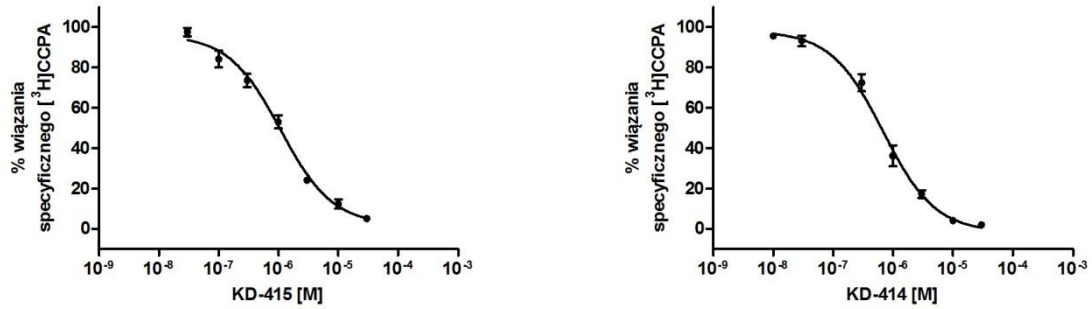


Tabela 7.3 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]MSX-2 do szczurzego receptora adenozynowego A_{2A} względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

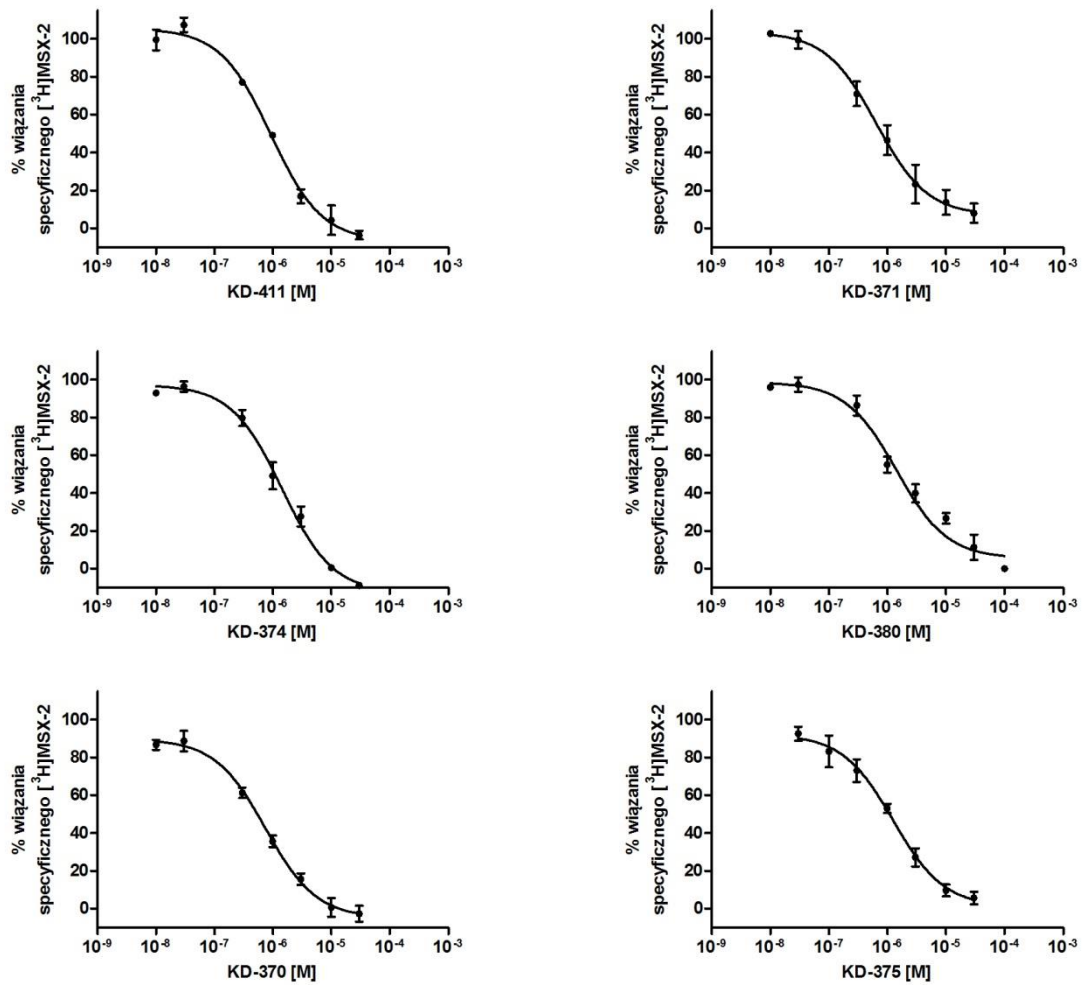


Tabela 7.3, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]MSX-2 do szczurzego receptora adenozynowego $\text{A}_{2\text{A}}$ względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

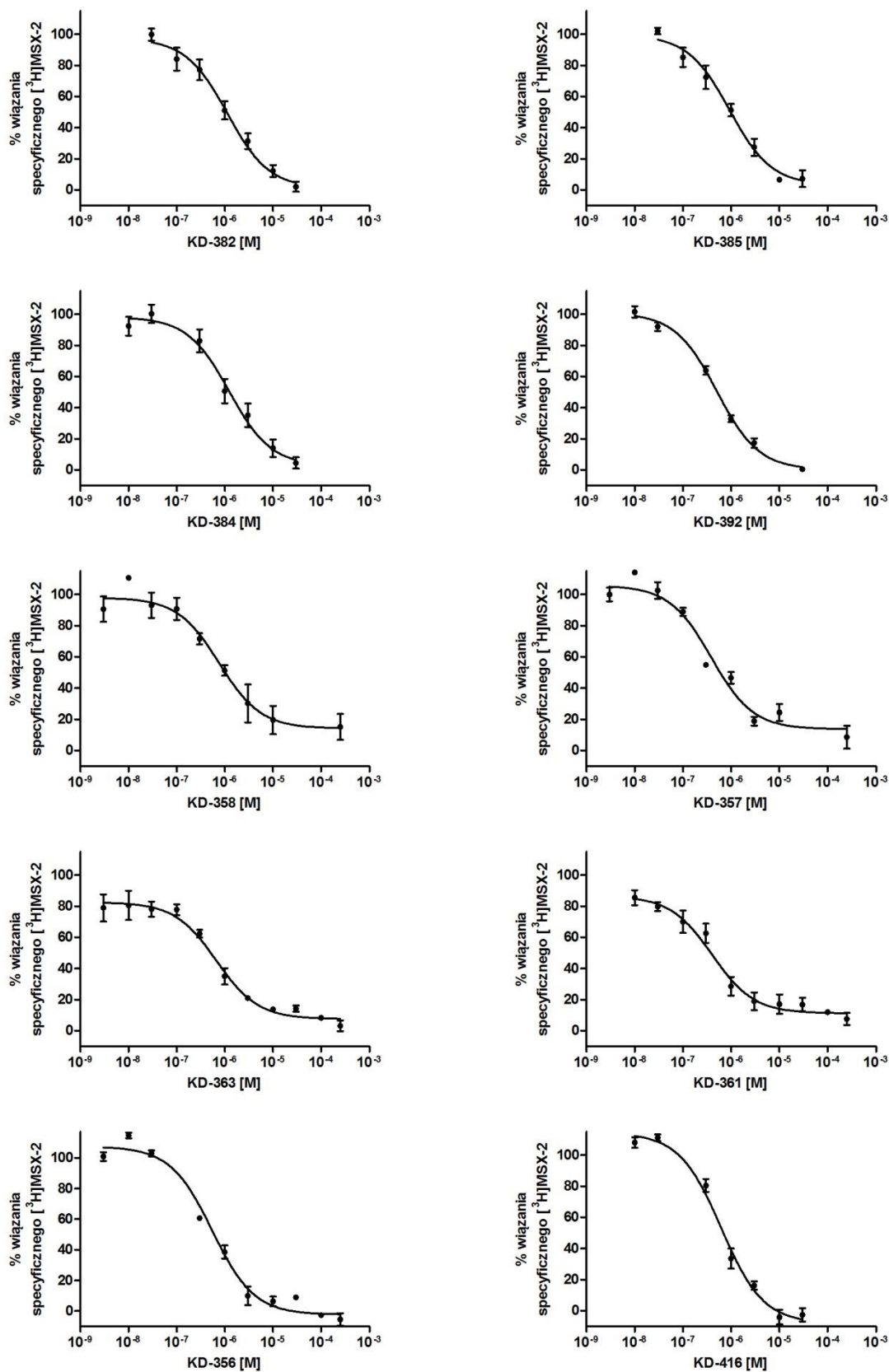


Tabela 7.3, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]MSX-2 do szczyrzego receptora adenozynowego $\text{A}_{2\text{A}}$ względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

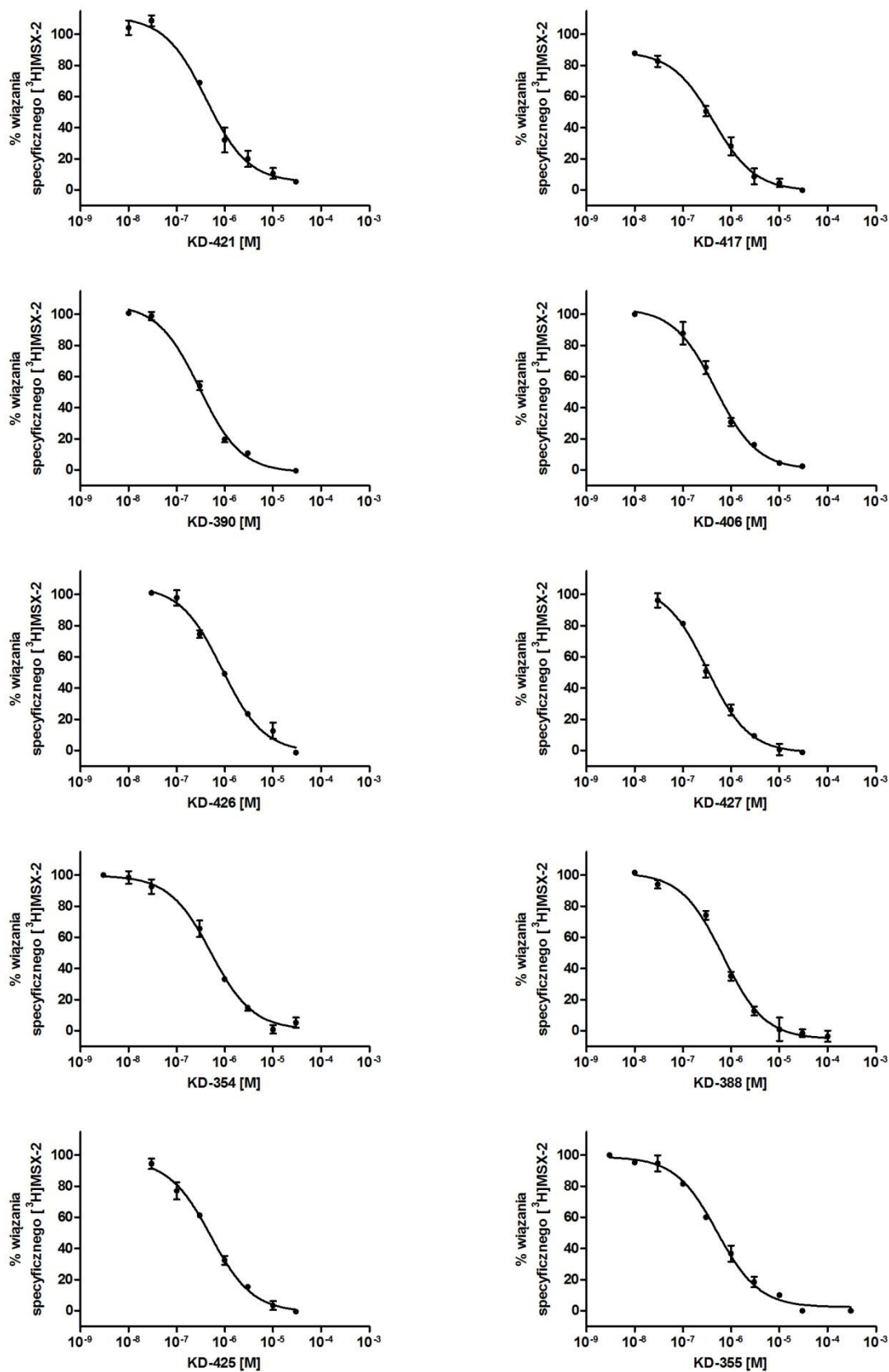


Tabela 7.3, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]MSX-2 do szczurzego receptora adenozynowego A_{2A} względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

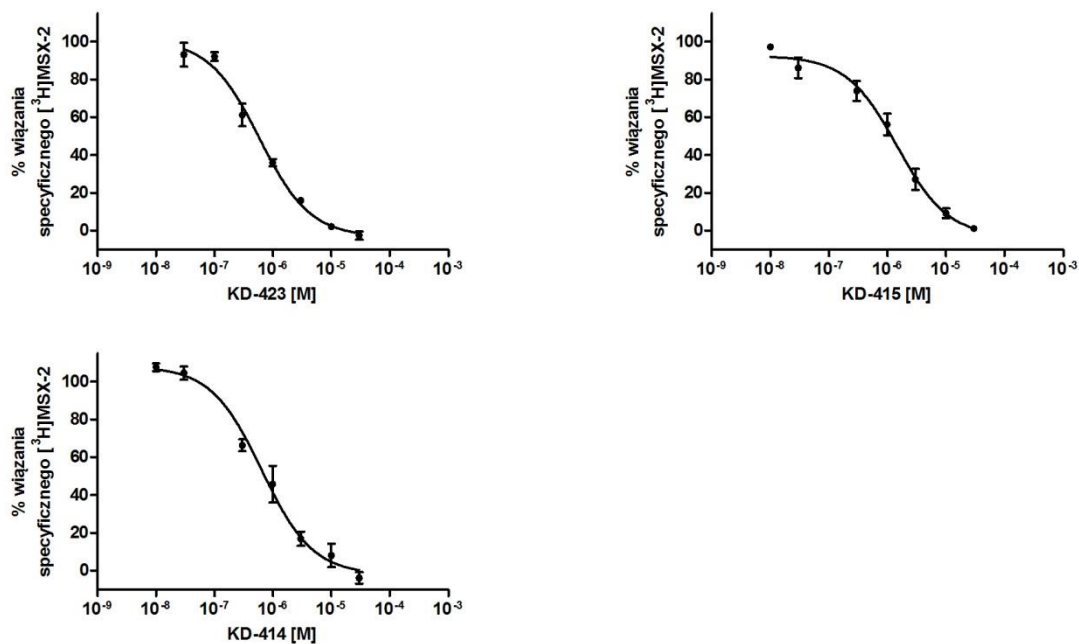


Tabela 7.4 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]PSB-603 do szczurzego receptora adenozynowego A_{2B} względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

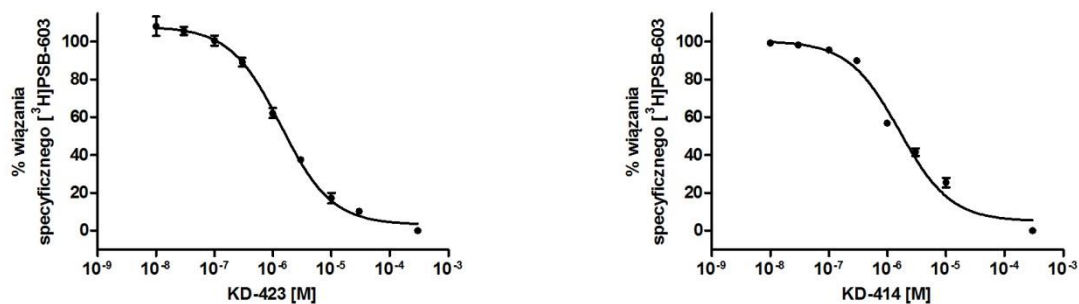


Tabela 7.5 Krzywe kompetycyjnego wiązania [³H]CCPA do ludzkiego receptora adenozynowego A₁ względem pochodnych pirymido[2,1-f]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

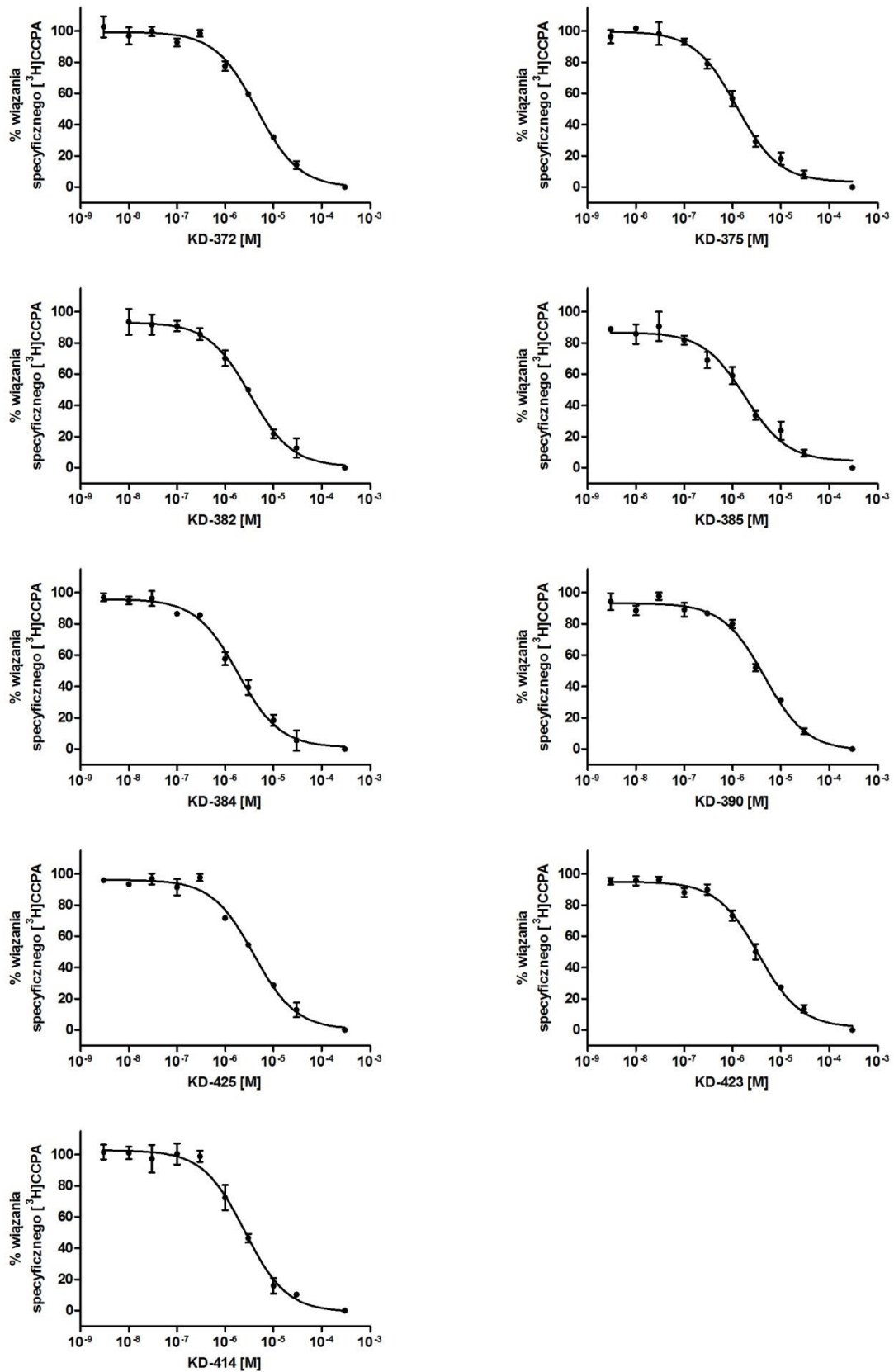


Tabela 7.6 Krzywe kompetycyjnego wiązania [³H]MSX-2 do ludzkiego receptora adenozynowego A_{2A} względem pochodnych pirymido[2,1-f]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

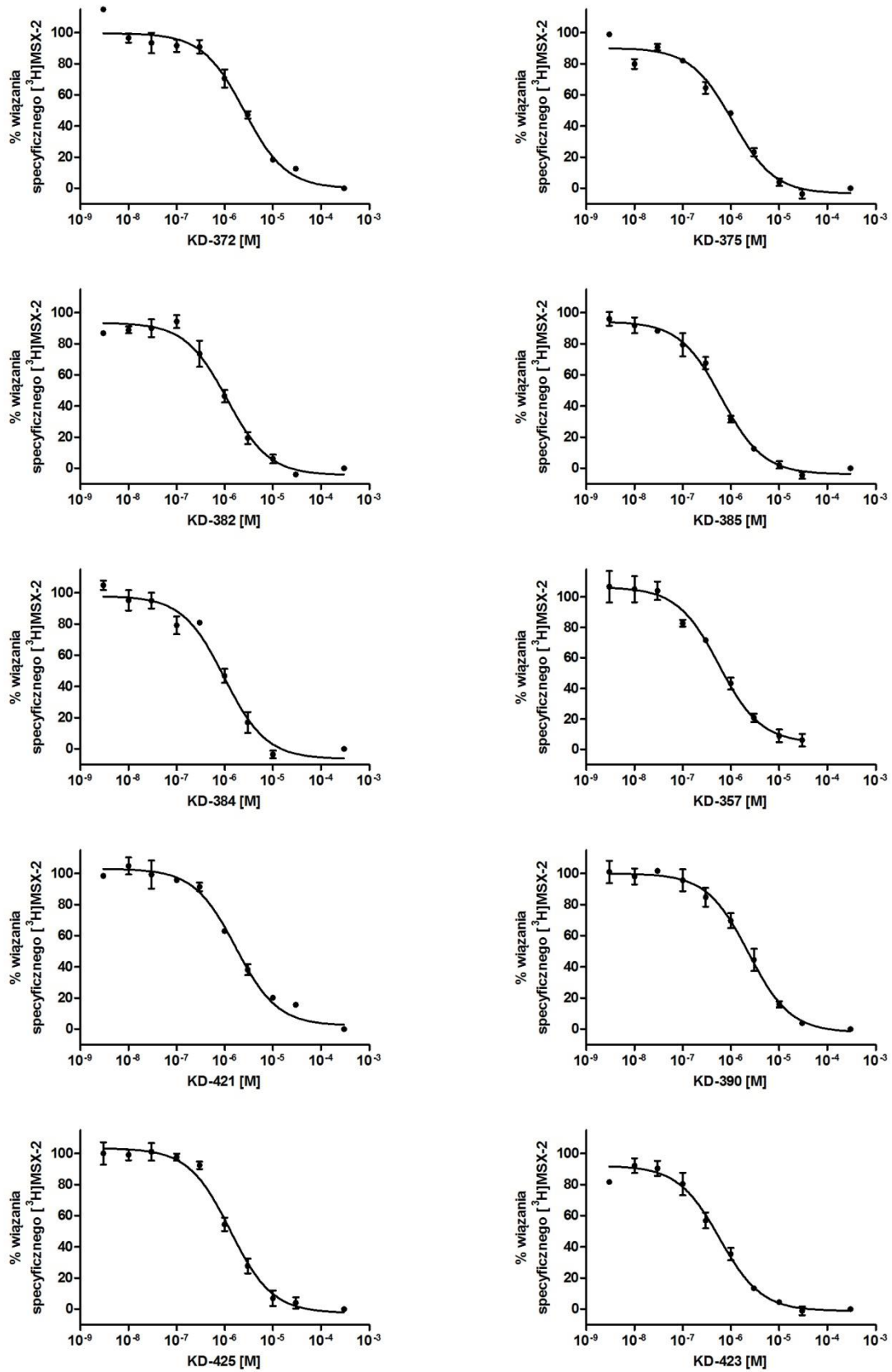


Tabela 7.6, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]MSX-2 do ludzkiego receptora adenozynowego $\text{A}_{2\text{A}}$ względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

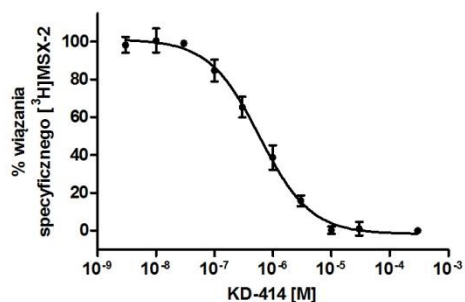


Tabela 7.7 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]PSB-603 do ludzkiego receptora adenozynowego $\text{A}_{2\text{B}}$ względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

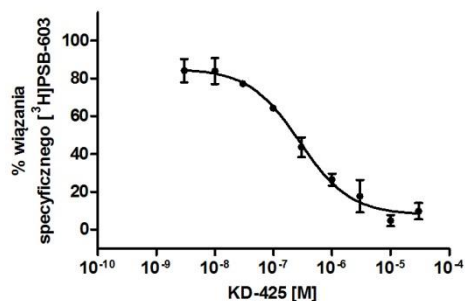
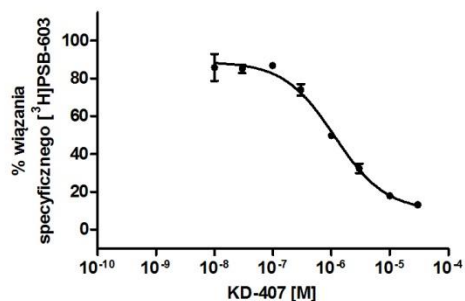
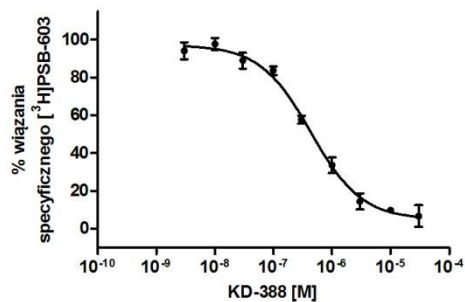
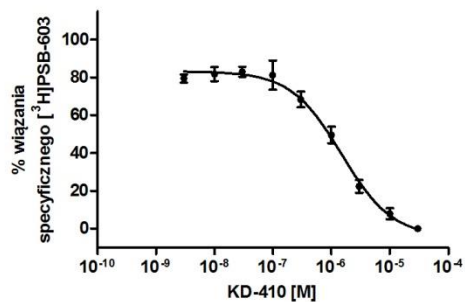
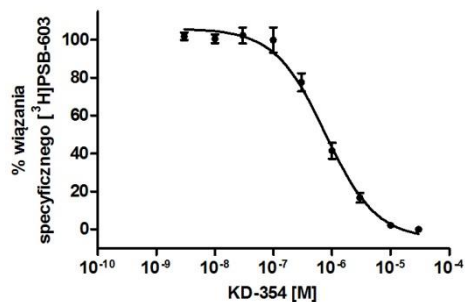
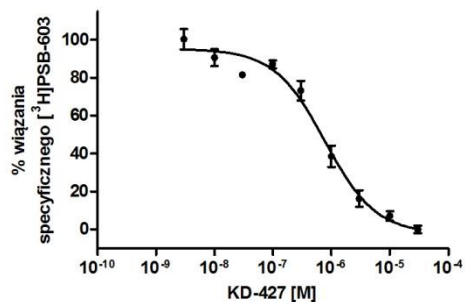


Tabela 7.7, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]PSB-603 do ludzkiego receptora adenozynowego A_{2B} względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

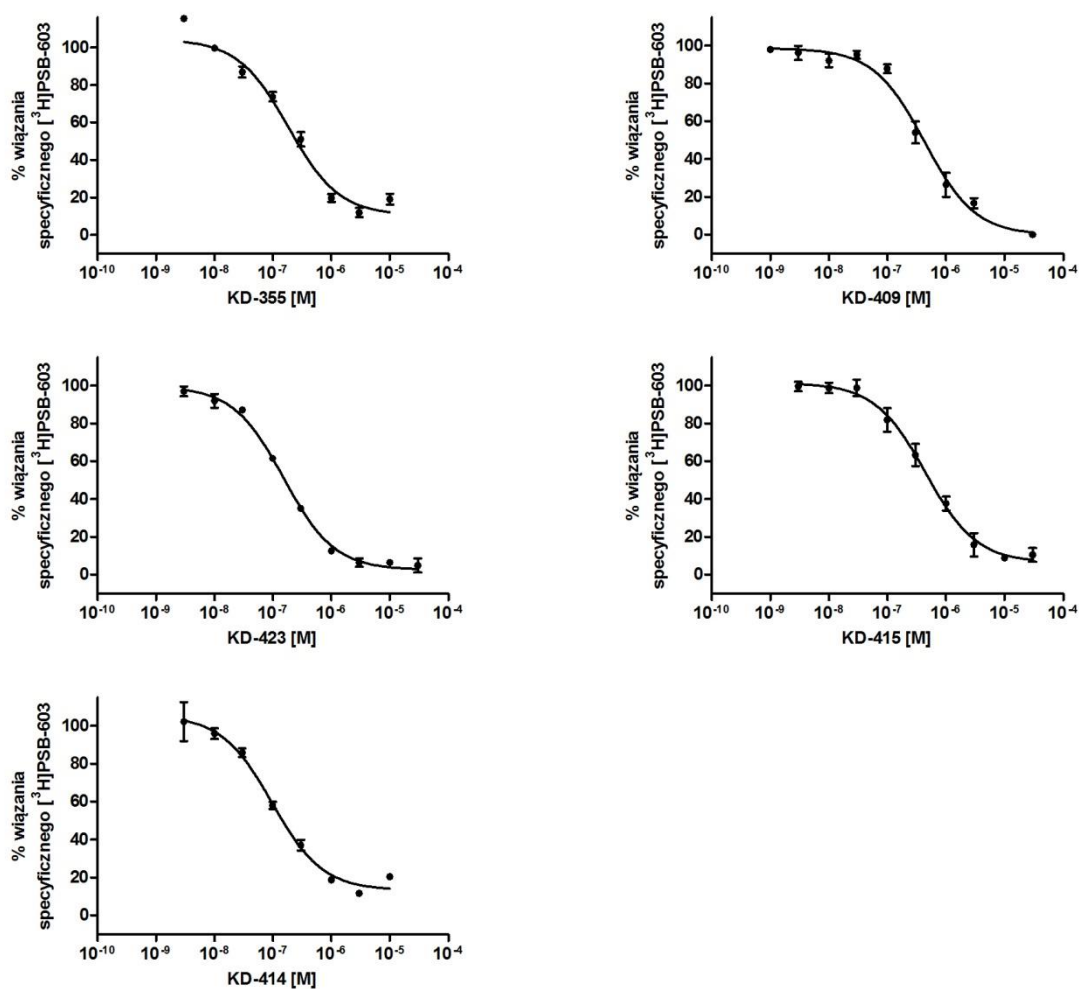


Tabela 7.8 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]PSB-11 do ludzkiego receptora adenozynowego A_3 względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

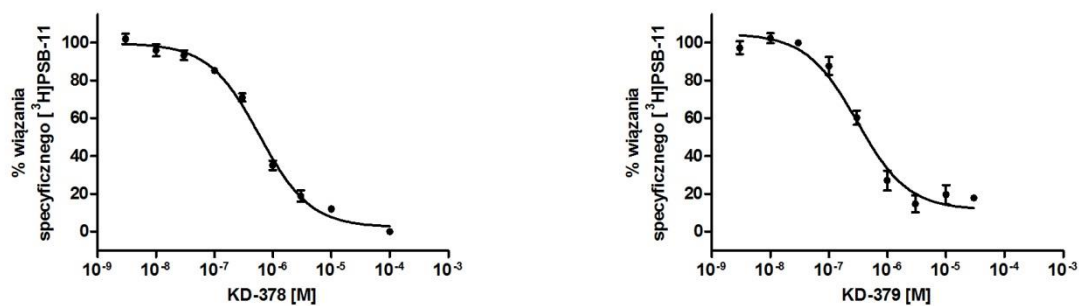


Tabela 7.8, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]PSB-11 do ludzkiego receptora adenozynowego A_3 względem pochodnych pirymido[2,1-*f*]purynodionu. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

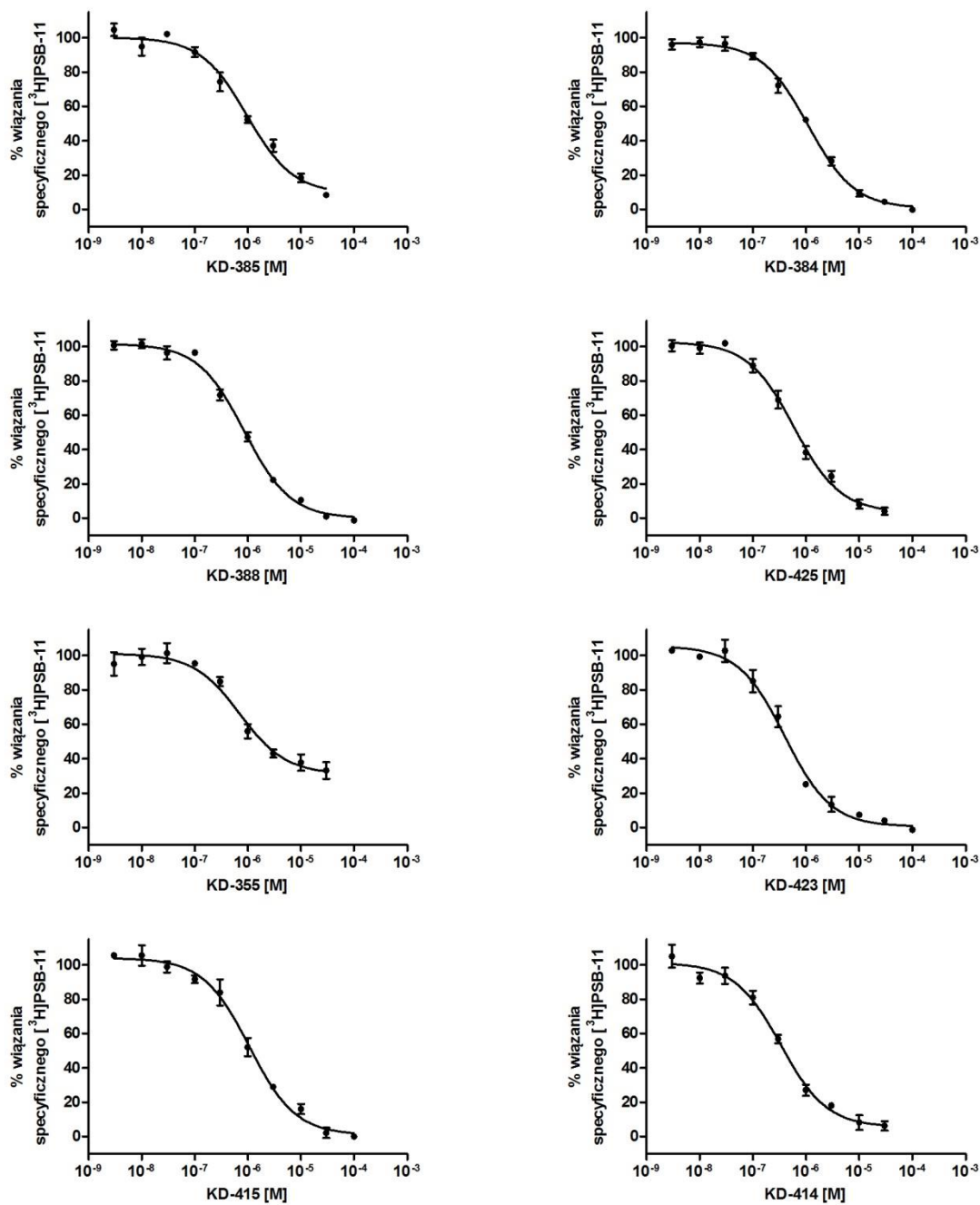


Tabela 7.9 Krzywe kompetycyjnego wiązania [³H]CP55,940 do szczurzego receptora kannabinoidowego CB₁ względem pochodnych imidazo[2,1-*b*]tiazyny oraz imidazo[2,1-*b*]tiazepiny. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

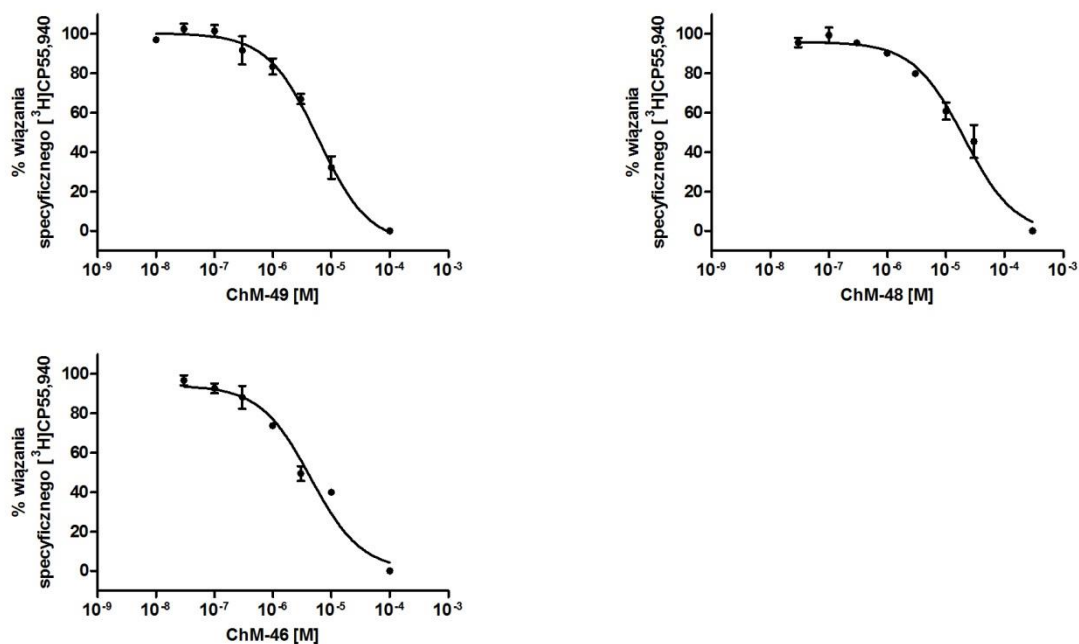


Tabela 7.10 Krzywe kompetycyjnego wiązania [³H]CP55,940 do ludzkiego receptora kannabinoidowego CB₁ względem pochodnych imidazo[2,1-*b*]tiazyny oraz imidazo[2,1-*b*]tiazepiny. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

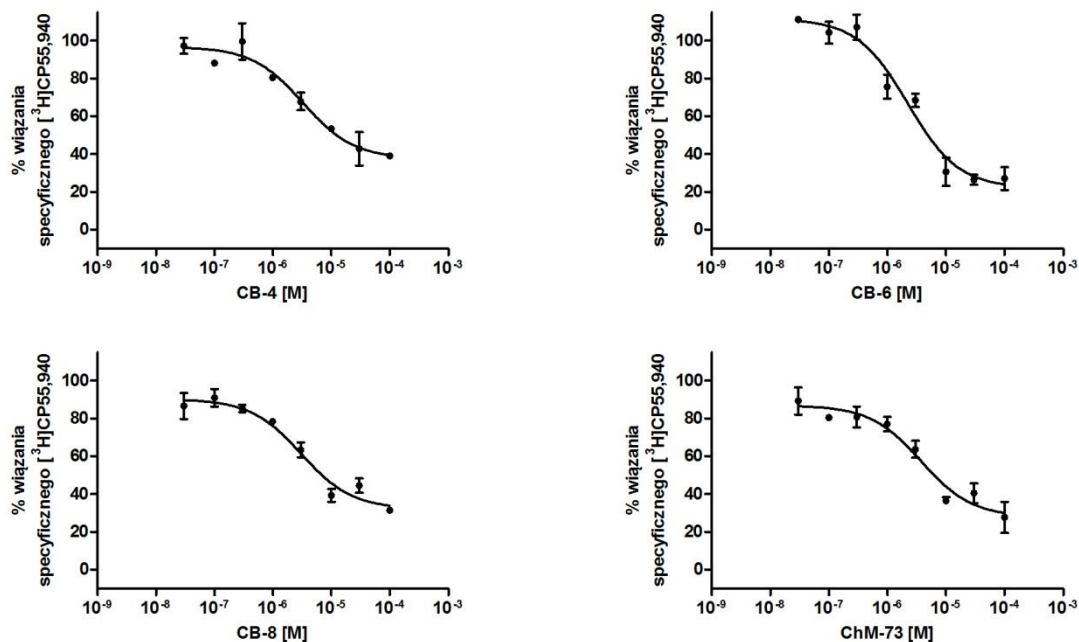


Tabela 7.10, cd. Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]CP55,940 do ludzkiego receptora kannabinoidowego CB₁ względem pochodnych imidazo[2,1-*b*]tiazyny oraz imidazo[2,1-*b*]tiazepiny. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.

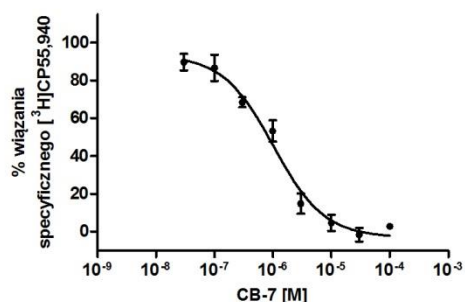
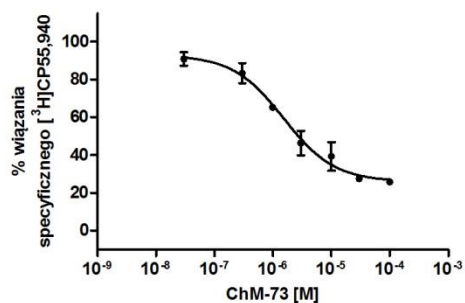
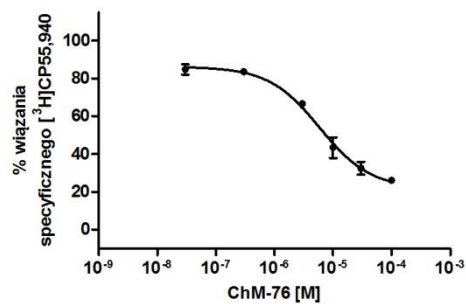
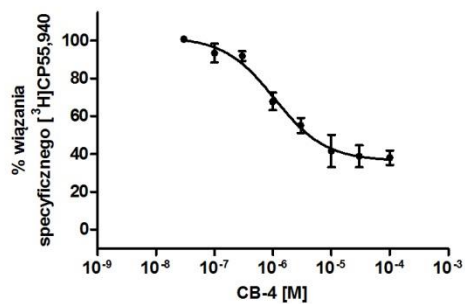
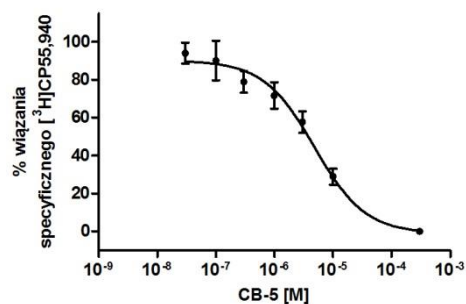
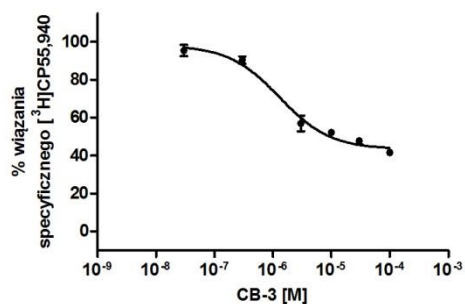


Tabela 7.11 Krzywe kompetycyjnego wiązania [^3H]CP55,940 do ludzkiego receptora kannabinoidowego CB₂ względem pochodnych imidazo[2,1-*b*]tiazyny oraz imidazo[2,1-*b*]tiazepiny. Wykresy przedstawiają uśredniony wynik trzech niezależnych eksperymentów.



8. ŻYCIORYS NAUKOWY AUTORA PRACY

Publikacje i najważniejsze doniesienia zjazdowe tematycznie powiązane z zakresem pracy doktorskiej

Receptory adenozynowe

Publikacje:

1. Drabczyńska A., Karcz T., Szymańska E., Köse M., Müller C.E., Paskaleva M., Karolak-Wojciechowska J., Handzlik J., Yuzlenko O., Kieć-Kononowicz K. Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of tricyclic alkylimidazo-, pyrimido- and diazepinopurinediones. *Purinergic Signal*. **2013**, 9, 395-414. (IF=2,635)

W ramach opisanych w artykule badań, autor prezentowanej pracy doktorskiej dokonał charakteryzacji alkilowych pochodnych trójcyklicznych purynodionów jako ligandów receptorów adenozynowych, za pomocą analogicznych testów farmakologicznych, jak w niniejszej pracy doktorskiej.

2. Drabczyńska A., Yuzlenko O., Köse M., Paskaleva M., Schiedel A.C., Karolak-Wojciechowska J., Handzlik J., Karcz T., Kuder K., Müller C.E., Kieć-Kononowicz K. Synthesis and biological activity of tricyclic cycloalkylimidazo-, pyrimido- and diazepinopurinediones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3590-3607. (IF=3,499)

W ramach cytowanej publikacji, autor pracy doktorskiej wykonał część testów oznaczenia powinowactwa cykloalkilowych pochodnych trójcyklicznych purynodionów względem podtypów receptorów adenozynowych.

Doniesienia zjazdowe:

1. T. Karcz, T. Wójcik, C.E. Müller, K. Kieć-Kononowicz: *Pharmacological characterization of fluorescently tagged human adenosine A_{2A} receptors*. - plakat - V Seminar on Medicinal Chemistry, 2012, Lublin, Polska.
2. T. Karcz, A. Drabczyńska, C.E. Müller, J. Handzlik, K. Kieć Kononowicz: *Phenol derivatives of 1,3-dialkyl-pyrimido[2,1-f] purinediones, investigation of polar substituents influence on physicochemical properties and adenosine A₁ and A_{2A} receptors affinity*. - plakat - VII Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 2011, Katania, Włochy
3. T. Karcz, A. Drabczyńska, S. Hinz, V. Rempel, C.E. Müller, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz: *Modulation of physicochemical properties of phenol derivatives of 1,3-dimethyl-pyrimido[2,1-f]purinediones - adenosine A_{2A} receptor ligands*. - plakat - XXI International Symposium in Medicinal Chemistry, EFMC-ISMIC 2010, Bruksela, Belgia
4. A. Drabczyńska, C.E. Müller, T. Karcz, K. Kieć-Kononowicz: *A comparison of rat and human adenosine A_{2A} receptor affinity of tricyclic purinediones*. - plakat - II Seminar on Medicinal Chemistry, 2009, Lublin, Polska

Receptory kannabinoidowe

Publikacje:

1. Rempel V., Atzler K., Behrenswerth A., Karcz T., Schoeder C., Hinz S., Kaleta M., Thimm D., Kieć-Kononowicz K., Müller C.E. Bicyclic imidazole-4-one derivatives: a new class of antagonists for the G protein-coupled orphan receptors GPR18 and GPR55. *MedChemComm.* **2014**, 5, 632-649. (IF=2,722)

Praca opisuje m.in. badania farmakologiczne dla dwucyklicznych pochodnych imidazolonu w kierunku receptorów CB₁R, CB₂R i GPR18, które autor przeprowadził w toku przygotowania rozprawy doktorskiej, poszerzone o testy funkcjonalne akumulacji cAMP i wiązania [³⁵S]GTPγS z użyciem komórek z nadekspresją receptorów CB₁R i CB₂R, a także testy rekrutacji β-arrestyny w komórkach ze stabilną ekspresją receptora GPR55 oraz metody syntezy badanych połączeń.

2. Rempel V., Fuchs A., Hinz S., Karcz T., Lehr M., Kötter U., Müller C.E. Magnolia extract, magnolol, and metabolites: activation of cannabinoid CB₂ receptors and blockade of the related GPR55. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 41-45. (IF=3,311)

Autor uczestniczył w opracowaniu testów farmakologicznych do badań powinowactwa oraz aktywności wewnętrznej ligandów receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂, a także przeprowadził oznaczenia powinowactwa wybranych pochodnych opisanych w artykule.

3. Rempel V., Volz N., Hinz S., Karcz T., Meliciani I., Nieger M., Wenzel W., Bräse S., Müller C.E. 7-Alkyl-3-benzylcoumarins: a versatile scaffold for the development of potent and selective cannabinoid receptor agonists and antagonists. *J Med. Chem.* **2012**, 55, 7967-77. (IF=5,614)

W powyższej pracy wykonane zostały, zoptymalizowane przez doktoranta, w oparciu o otrzymane linie komórkowe z nadekspresją receptorów kannabinoidowych CB₁ i CB₂, testy wiązania [³H]CP55,940 oraz akumulacji cAMP.

Doniesienia zjazdowe:

T. Karcz, S. Hinz, V. Rempel, K. Kieć-Kononowicz, C.E. Müller: *Retroviral expression of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in CHO cells and the characterization of the obtained cell lines.* - plakat - Workshop of the DFG Research Unit 926 - The Endocannabinoid System: From Physiology to Pathophysiology, 2010, Bonn, Niemcy

Receptor histaminowy H₄

Publikacje:

1. Łażewska D., Więcek M., Ner J., Kamińska K., Kottke T., Schwed JS., Zygmunt M., Karcz T., Olejarz A., Kuder K., Latacz G., Grosicki M., Sapa J., Karolak-Wojciechowska J., Stark H., Kieć-Kononowicz K. Aryl-1,3,5-triazine derivatives as histamine H₄ receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 534-46. (IF=3,499)

Autor przeprowadził oznaczenia aktywności wewnętrznej ligandów receptora H₄R.

2. Karcz T., Kieć-Kononowicz K. Development of novel cellular model for affinity studies of histamine H₄ receptor ligands. *Acta Biochim. Pol.* **2013**, 60, 823-827. (IF=1,185)

Publikacja opisuje otrzymanie linii komórkowej z nadekspresją receptora histaminowego H₄ oraz ocenę jej przydatności do oznaczenia powinowactwa ligandów H₄R.

3. Karcz T., Handzlik J., Łażewska D., Kottke T., Seifert R., Kieć-Kononowicz K. Search for histamine H₄ receptor ligands in the group of 4-methylpiperazino amide derivatives. *Inflamm. Res.* **2010**, 59(S2), 243-245. (IF=1,964)

W ramach badań do cytowanej publikacji, autor pracy doktorskiej wykonał testy oznaczenia aktywności potencjalnych ligandów receptorów histaminowych H₄ z użyciem materiału uzyskanego z rekombinowanych komórek owadzych.

Staże zagraniczne, w ramach których realizowane były badania do pracy doktorskiej

Niemcy, Uniwersytet we Frankfurcie, Katedra Chemii Farmaceutycznej, grupa badawcza Prof. H. Starka, projekt badawczy (1 miesiąc):

2-30.11.2008

Niemcy, Uniwersytet w Bonn, Katedra Chemii Farmaceutycznej, grupa badawcza Prof. C.E. Müller, projekt badawczy (12 miesięcy):

01.06-30.09.2009

01.07-30.09.2010

11.07-31.07.2011

01.01-31.03.2012

01.09.-30.09.2013

9. PODZIĘKOWANIA

Chciałbym serdecznie podziękować **Prof. dr hab. Katarzynie Kieć-Kononowicz** za umożliwienie mi wykonania pracy w kierowanej przez siebie Katedrze, a także za pomoc w rozwoju naukowym, zapewnienie środków na prowadzenie badań oraz wyjazdy zagraniczne, cenne wskazówki merytoryczne, inspirujące dyskusje, ciągłe wsparcie, cierpliwość oraz pokazanie postaw godnych dobrego naukowca i człowieka.

Swoje podziękowania kieruję również pod adresem **Prof. dr Christy Müller**, za ciepłe przyjęcie w Bonn i obdarzenie zaufaniem oraz właściwe ukierunkowanie moich badań, propozycje ciekawych i innowacyjnych eksperymentów, liczne wskazówki, pomoc w rozwiązywaniu problemów naukowych i wsparcie w organizacji wizyt w Bonn.

Wyrażam wdzięczność **Prof. dr Holgerowi Stark** za życzliwość i umożliwienie mi pracy w laboratorium Chemii Farmaceutycznej we Frankfurcie.

Serdecznie dziękuję **Prof. dr hab. Gabrielowi Nowakowi** oraz **Prof. dr hab. Marcie Dziedzickiej-Wasylewskiej** za udostępnienie laboratoriów do oznaczeń radioizotopowych.

Dziękuję również recenzentom pracy: **Prof. dr hab. Małgorzacie Filip** oraz **Prof. dr hab. Krzysztofowi Józwiakowi** za poświęcony czas i krytyczne uwagi.

Władysławowi Gogulskiemu składam serdeczne podziękowania za nieodpłatne udostępnienie materiału badawczego w postaci krowich nadnerczy.

Prezentowana praca nie powstałaby bez wsparcia finansowego **Komitetu Badań Naukowych, Narodowego Centrum Nauki i Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej**. Wspomnianym instytucjom dziękuję za dofinansowanie badań, udzielone w ramach projektów:

1. *Receptory H₃/H₄ histaminowe jako atrakcyjny cel poszukiwań substancji biologicznie aktywnych*, Narodowe Centrum Nauki - projekt *Maestro I*, 2011/02/A/NZ4/00031, 2012-2017, kierownik projektu - prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz.
2. *Poszukiwanie nowych ligandów receptorów adenozynowych o właściwościach lekopodobnych*, Narodowe Centrum Nauki - projekt *Harmonia II*, 2012/M/NZ4/00219, 2012-2015, kierownik projektu - prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz.
3. *Opracowanie modeli komórkowych do badań farmakologii molekularnej receptorów histaminowych H₃ i H₄*, Narodowe Centrum Nauki - projekt *Preludium I*, 2011/01/N/NZ4/01126, 2011-2014, kierownik projektu - mgr Tadeusz Karcz.
4. *Pharmacological studies on cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂) and the related G protein-coupled receptor GPR55* - stypendium Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (DAAD), nr A/09/82092, 1.07-30.09.2010, beneficjent - mgr Tadeusz Karcz.
5. *Nowe kierunki badań nad ligandami receptorów (A₁/A_{2A}/A_{2B}) z wykorzystaniem anelowanych purynodionów* - Komitet Badań Naukowych, projekt badawczy własny, N405 2978 36, 2009-2012, kierownik projektu - prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz.

6. *The search for selective histamine H₃/H₄ receptor ligands with potential therapeutic utility* - współpraca z prof. H. Starkiem z Uniwersytetu we Frankfurcie program nr DWM/75/DAAD/JC/2007, koordynator programu ze strony polskiej prof. K. Kieć-Kononowicz, 2007-2009.

Dziękuję także wszystkim pozostałym osobom, które poprzez stworzenie miłej atmosfery, wymianę doświadczeń i twórcze dyskusje, przyczyniły się do powstania niniejszej pracy:

- **pracownikom i doktorantom Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM**, a w szczególności: **dr Annie Drabczyńskiej, dr hab. Jadwidze Handzlik, Marii Kaleta** za dostarczenie związków do badań farmakologicznych, **dr Ewie Szymańskiej** za wsparcie w trudnych momentach i pomoc w rozwiązywaniu problemów natury chemicznej, **koleżankom i kolegom z Pracowni Biotechnologii Farmaceutycznej** za dzielenie trudów pracy laboratoryjnej,
- **koleżankom i kolegom z Katedry Chemii Farmaceutycznej I Uniwersytetu w Bonn**, w tym wyjątkowo serdecznie: **dr Viktorowi Rempel** za harmonijną i owocną współpracę, **dr Sonji Hinz** za przekazanie cennych uwag metodycznych, **Beate Ponatowski, Christin Vielmuth, Nicole Florin, Amelie Fiene, Stephanowi Jepards** oraz **Wessamowi Alnouri** za życzliwość i wszechstronną pomoc,
- **dr Timowi Kottke** z **Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu we Frankfurcie** za wskazówki odnośnie przeprowadzonych eksperymentów i wspólnie spędzony czas,
- **pracownikom Zintegrowanych Laboratoriów Katedry Farmakobiologii i Katedry Farmakodynamiki UJ CM** za stworzenie wspaniałej atmosfery pracy.

Tadeusz Karcz
Kraków, lipiec 2014.