

Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Allosteryczna modulacja receptorów serotoninowych
5-HT_{1A} i 5-HT₇ przez jony cynku**

mgr Grzegorz Satała

Promotor: prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Kraków, 2017

*Pracę doktorską pragnę zadedykować **Dorotce, Mamie i Tacie**,
osobom, które zawsze mnie wspierają.*

Dziękuję,

*Panu prof. dr hab. **Andrzejowi J. Bojarskiemu**, mojemu promotorowi, kierownikowi Zakładu Chemii Leków IF PAN za poświęcony czas, wsparcie i zaufanie*

oraz

*Pani dr **Beacie Duszyńskiej** za wartościowe uwagi, dyskusje i pomoc w trakcie pisania mojej pracy doktorskiej.*

Pragnę również podziękować:

*Pani **Krystynie Nędzy** za pomoc w badaniach receptorowych *in vitro*,*

*Panu mgr **Tomaszowi Lendzie** za pomoc w hodowli komórkowej,*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chemii Leków Paniom dr **Marii Paluchowskiej**, dr **Annie Stankiewicz**, dr **Sabinie Podlewskiej**, mgr **Agacie Hogendorf**, mgr **Katarzynie Kaczorowskiej**, **Anecie Koziół**, Panom dr **Rafałowi Kurczabowi**, dr **Stefanowi Mordalskiemu**, dr **Ryszardowi Bugno**, dr **Jakubowi Staroniowi**, mgr **Krzysztofowi Ratajowi**, mgr **Dawidowi Warszyciemu**, mgr **Rafałowi Kaflowi**, mgr **Adamowi Hogendorfowi** za wiele cennych rad i słów wsparcia.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	11
STRESZCZENIE	13
ABSTRACT	15
1 PODSTAWY TEORETYCZNE BADAŃ	17
1.1 Allosteria – wprowadzenie	17
1.2 Cechy modulacji allosterycznej	18
1.3 Allosteria w rodzinie receptorów sprzężonych z białkiem G	20
1.4 Teoretyczne modele oddziaływań ligand-receptor	25
1.4.1 Równanie prawa działania mas	25
1.4.2 Model dwóch stanów (TSM)	28
1.4.3 Operacyjny model agonizmu i jego rozszerzenie	30
1.4.4 Allosteryczny model potrójnego kompleksu (TCM)	32
1.4.5 Operacyjny model allosteryzmu	36
1.4.6 Allosteryczny model dwóch stanów (ATSM)	40
1.4.7 Model typu „bell-shape”	42
1.4.8 Modele uwzględniające interakcje białka G z receptorem	43
1.4.8.1 Rozszerzony model potrójnego kompleksu (ETCM)	44
1.4.8.2 Model poczwórnego kompleksu (QCM)	45
1.5 Cynk, występowanie i rola w OUN	47
1.6 Receptory serotoniny, ogólna charakterystyka i rola w OUN	52
1.6.1 Receptory 5-HT _{1A} , związek z depresją i mechanizmem przeciwdepresyjnego działania cynku	54
1.6.2 Receptory 5-HT ₇ , potencjalna rola w terapii zaburzeń OUN	55
2 IDEA I CEL PRACY	59
3 WYNIKI BADAŃ	61
3.1 Analiza ekspresji receptorów 5-HT _{1A} oraz 5-HT _{7B} w linii HEK293	61
3.2 Cytotoksyczne działanie jonów cynku na komórki HEK293	62
3.3 Oddziaływanie jonów cynku z odczytnikami zestawu LANCE Ultra cAMP	63
3.4 Ocena ilościowa wpływu jonów cynku na aktywność receptorów serotoniny 5-HT _{1A}	64
3.4.1 Wpływ wybranych jonów metali na wiązanie specyficznego radioliganda do receptorów 5-HT _{1A}	64
3.4.2 Oznaczenie parametrów wiązania [³ H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT _{1A}	65
3.4.3 Oznaczenie parametrów wiązania [³ H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT _{1A} w obecności jonów cynku	65

3.4.4	Badanie wypierania [³ H]8-OH-DPAT z miejsc wiążących w receptorach 5-HT _{1A} przez jony cynku	67
3.4.5	Wpływ jonów cynku na proces współzawodnictwa o miejsca wiązania w receptorach 5-HT _{1A} pomiędzy [³ H]8-OH-DPAT a serotonina	67
3.4.6	Wpływ jonów cynku na parametry kinetyczne procesu wiązania [³ H]8-OH-DPAT z receptorami 5-HT _{1A}	68
3.4.7	Wpływ cynku na efekty stymulacji receptorów 5-HT _{1A}	70
3.5	Ocena wpływu jonów cynku na aktywność receptorów serotoninowych 5-HT ₇	71
3.5.1	Wpływ wybranych jonów metali na specyficzne wiązanie radioligandów do receptorów serotoninowych 5-HT ₇	71
3.5.2	Oznaczenie parametrów wiązania radioligandów do receptorów 5-HT ₇	72
3.5.3	Oznaczenie parametrów wiązania radioligandów do receptorów 5-HT ₇ w obecności jonów cynku	73
3.5.4	Badanie wypierania radioligandów z miejsc wiążących w receptorach 5-HT ₇ przez jony cynku	76
3.5.6	Wpływ jonów cynku na kinetykę procesu dysocjacji radioliganów z miejsc wiążących receptorów 5-HT ₇	77
3.5.7	Wpływ cynku na aktywność funkcjonalną receptorów 5-HT ₇	79
4	DYSKUSJA WYNIKÓW	81
4.1	Wpływ jonów cynku na receptory 5-HT _{1A}	81
4.2	Wpływ jonów cynku na receptory 5-HT ₇	84
4.3	Podsumowanie wyników	86
5	MATERIAŁY	89
5.1	Hodowla komórkowa	89
5.2	Radioligandy wykorzystane w testach <i>in vitro</i>	90
5.3	Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystane w testach <i>in vitro</i>	91
5.4	Aparatura	92
5.5	Wykaz użytych zasobów internetowych i programów komputerowych	92
6	METODY	95
6.1	Hodowla komórek linii HEK293 z ekspresją receptorów 5-HT _{1A} oraz 5-HT _{7B}	95
6.1.1	Warunki hodowli	95
6.1.2	Pasaże komórek	95
6.1.3	Przygotowanie hodowli komórkowych do badań funkcjonalnych	96
6.1.4	Przygotowanie hodowli komórkowych do badania powinowactwa metodą liganda znakowanego izotopowo	96
6.2	Ocena ekspresji receptorów 5-HT _{1A} i 5-HT _{7B} w komórkach linii HEK293	96
6.2.1	Ocena ekspresji mRNA metodą RT-PCR	97
6.2.2	Ocena ekspresji białka metodą Western Blot	98
6.3	Analiza żywotności komórek	101

6.3.1 Test śmiertelności komórek wykorzystujący dehydrogenazę mleczanową (LDH)	101
6.3.2 Test żywotności komórek z wykorzystaniem soli tetrazolowej (MTT)	102
6.4 Badania <i>in vitro</i> prowadzone z zastosowaniem ligandów znakowanych radiozotopowo	103
6.4.1 Procedura oznaczenia wartości K_D i B_{max} w eksperymentach saturacji	104
6.4.2 Badanie wpływu wybranych jonów metali na wiązanie specyficznego radioliganda	106
6.4.3 Badanie współzawodnictwa o miejsce wiązania pomiędzy ligandem ortosterycznym a specyficznym radioligandem (testy kompetycji)	107
6.4.4 Testy kinetycznych dysocjacji wiązania radioligand-receptor	108
6.4.5 Testy kinetyczne asocjacji radioliganda z receptorem	108
6.5 Badanie wpływu cynku na efekty stymulacji receptorów	108
6.5.1 Testy aktywności wewnętrznej agonisty do receptora 5-HT _{1A}	109
6.5.2 Testy aktywności wewnętrznej ligandów receptorów 5-HT ₇	110
6.6 Analiza danych	110
7 BIBLIOGRAFIA	113
8 ZAŁĄCZNIK: KOPIE PUBLIKACJI	127

WYKAZ SKRÓTÓW

5-HT	5-hydroksytryptamina, serotonina
APS	nadsiarczan amonu (<i>ang. ammonium persulfate</i>)
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (<i>ang. American Type Culture Collection</i>)
BCA	kwas bis-cynchoninowy (<i>ang. bicinchoninic acid</i>)
BSA	albumina surowicy wołowej (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (<i>ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>)
CCPM	skorygowane zliczenia na minutę (<i>ang. corrected counts per minute</i>)
DMEM	pożywka dla komórek (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DTT	ditiotreitol, odczynnik Clelanda
EDTA	kwas wersenowy (<i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FRET	rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji (<i>ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
G418	genetycyna
GPCR	receptory sprzężone z białkami G (<i>ang. G-protein-coupled receptor</i>)
HEK293	ludzkie komórki embrionalne nerki (<i>ang. Human Embryonic Kidney 293</i>)
IUPHAR	Międzynarodowa Unia Podstawowej i Klinicznej Farmakologii (<i>ang. International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (<i>ang. lactate dehydrogenase</i>)
LSD	dietyloamid kwasu lizergowego (<i>ang. lysergic acid diethylamide</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetyltriazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolu (<i>ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
NAM	negatywny modulator allosteryczny (<i>ang. negative allosteric modulator</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy

PAM	pozytywny modulator allosteryczny (<i>ang. positive allosteric modulator</i>)
PBS	bufor fosforanowy (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
SAM	neutralny modulator allosteryczny (<i>ang. silent allosteric modulators</i>)
SDS	siarczan dodecyłu sodu
TBST	sól fizjologiczna buforowana Tris (<i>ang. Tris-buffered saline</i>)
TEMED	tetrametyloetylenodiamina
ZChL	Zakład Chemii Leków

STRESZCZENIE

Allosteria to proces regulacji wielu protein. Mimo, że od kilkunastu lat intensywnie badany w grupie receptorów związanych z białkami G, w rodzinie metabotropowych receptorów serotoninowych (5-HT) wykryty tylko w czterech przypadkach. Jednym z nich jest, odnotowany w testach *in vitro*, hamujący wpływ jonów cynku na powinowactwo selektywnych ligandów: antagonisty ($[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$) i agonisty ($[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$) do receptorów 5-HT_{1A}. Mechanizm tych oddziaływań, został zdefiniowany jako negatywna modulacja allosteryczna w odniesieniu do obu ligandów. Jednak niejednoznaczne wyniki, na których oparto ocenę zmian w aktywności $[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$ -u, mogły rodzić wątpliwości, czy przypisanie tego typu modulacji w stosunku do oddziaływań agonisty z receptorami 5-HT_{1A} jest właściwe. Szczególnie, że w świetle badań prowadzonych w Instytucie Farmakologii PAN, przeciwdepresyjne działanie jonów cynku w behawioralnych modelach depresji, było odwracane po podaniu antagonisty WAY-100635, a to sugerowało odwrotny kierunek wpływu.

Biorąc zatem pod uwagę brak spójności pomiędzy przedstawianymi wynikami, pierwszą część badań pracy doktorskiej, poświęcono wyjaśnieniu mechanizmu bezpośredniego oddziaływania jonów cynku z receptorami 5-HT_{1A} względem obserwowanych zmian w aktywności agonistów. W tym celu przeprowadzono szereg eksperymentów wiązania specyficznego radioliganda ($[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$): saturacji, kompetycji, testów kinetycznych asocjacji i dysocjacji, jak też funkcjonalnych (test komórkowy LANCE) do oceny efektów stymulacji receptorów. We wszystkich doświadczeniach wykorzystywano komórki linii HEK293 ze stabilną ekspresją receptorów 5-HT_{1A}.

Na podstawie otrzymanych wyników, wykazano złożony (zależny od stężenia) mechanizm działania jonów cynku. W stężeniach sub-mikromolarnych (10 μM) obserwowano nasilenie wiązania agonisty do receptorów 5-HT_{1A}, jak też wzrost efektów aktywacji receptora w teście funkcjonalnym. Natomiast użycie jonów cynku w stężeniu 500 μM , obniżały powinowactwo agonisty w eksperymentach wiązania radioliganda. Otrzymane dane były zgodne z agonistycznymi i antagonistycznymi efektami działania cynku obserwowanymi w badaniach *in vivo*.

Celem drugiej części badań, była ocena czy jony cynku, będąc endogennym modulatorem receptorów 5-HT_{1A} (oraz kilku innych typów receptorów GPCR) mogą regulować allosterycznie także receptory typu 5-HT₇. Przesłankami wskazującymi ten kierunek

badan były: wspólna z receptorami 5-HT_{1A}, lokalizacja w limbicznych strukturach mózgu, odpowiedzialnych m.in. za kontrolę nastroju i pamięć, oraz wykrycie regulacji allosterycznej receptora 5-HT₇ przez inną endogenną substancję – oleamid.

Podobnie jak w przypadku receptorów 5-HT_{1A}, wpływ jonów cynku badano w eksperymentach wiązania znakowanych radioligandów oraz funkcjonalnych. Doświadczenia prowadzono z zastosowaniem komórek HEK293 wykazujących nadekspresję receptorów 5-HT₇ oraz wobec trzech różnych radioligandów: agonisty [³H]5-CT oraz antagonistów [³H]SB-269970 i [³H]mesulerginy. W testach funkcjonalnych, dodatkowo określono wpływ jonów cynku w stężeniu 10 μM na aktywność konstytutywną receptorów 5-HT₇. W przeprowadzonych badaniach cynk wykazywał głównie działanie hamujące w stosunku do aktywności badanych ortosterycznych ligandów. Zatem, na podstawie wyników otrzymanych w eksperymentach wiązania specyficznych radioligandów, mechanizm działania cynku w receptorach 5-HT₇ można było zaklasyfikować jako negatywną modulację allosteryczną zarówno wobec agonistów jak i antagonistów. Natomiast w testach funkcjonalnych cynk, badany w stężeniu 10 μM, przejawiał cechy neutralnego antagonisty. Biorąc pod uwagę, że stężenie znajdującego się pozakomórkowo cynku jest niższe od 100 μM, efekty zaobserwowane w badaniach w obecności 10 μM cynku, przyjęto jako reprezentację jego prawdopodobnego mechanizmu działania w warunkach fizjologicznych zarówno wobec receptorów 5-HT_{1A} jak i 5-HT₇.

Co istotne, określone dla cynku typy modulacji allosterycznej były zgodne pod względem profilu funkcjonalnego z agonizmem do receptorów 5-HT_{1A} i antagonizmem do receptorów 5-HT₇, które odpowiadają za aktywność przeciwdepresyjną ligandów w różnych modelach behawioralnych. Zatem, w świetle otrzymanych wyników, można było uznać, iż pozytywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT_{1A} oraz negatywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT₇ mogą odgrywać rolę w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania jonów cynku.

ABSTRACT

The allosteric regulation of G-protein-coupled receptors is a well-known phenomenon, but there are only a few examples of allosteric modulation within the metabotropic serotonergic receptor family. Among them, negative allosteric modulatory properties of Zn ions against selective antagonist ($[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$) and agonist ($[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$) in *in vitro* binding at 5-HT_{1A} receptors were reported. However, the effects observed for $[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$ were particularly complex in the light of the efficacy of zinc in the behavioral models of depression *in vivo*, which was blocked by the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. As allosteric modulation is strongly probe-dependent, the evaluation of the effects of Zn on agonist activity should be of primary importance to its action observed *in vivo*.

Thus, the first part of the research was devoted to mechanistic insight into the nature of direct Zn interactions at 5-HT_{1A} receptors in *in vitro* radioligand experiments and functional assays. In the study, HEK293 cells expressing 5-HT_{1A} receptors were used, which provide a homogeneous system to study the effects attributed to the 5-HT_{1A} subtype. The influence of Zn ions on agonist binding was investigated by saturation, competition and both association and dissociation kinetic studies using $[^3\text{H}]\text{8-OH-DPAT}$ as well as in the functional LANCE test.

The obtained results showed zinc non-competitive interactions toward agonist binding at serotonin 5-HT_{1A} receptors, in which biphasic effects, involving potentiation of both agonist binding and function at sub-micromolar concentrations (10 μM) of zinc ions along with the inhibition of agonist affinity at sub-millimolar zinc concentrations (500 μM) were observed. These data were consistent with both the agonist and antagonist-like effects of zinc observed in *in vivo* studies.

In the second part of the thesis, it was of interest to assess whether direct interactions between zinc and any subtype other than 5-HT_{1A} could be recognized and quantified using radioligand binding experiments and functional assays. Therefore, we focused on 5-HT₇ receptors, which are highly co-expressed with 5-HT_{1A} receptors in the majority of brain structures and, similarly to zinc ions, have been reported to be important for the treatment of depression.

As a result of the research, zinc allosteric inhibition of both agonist and antagonist binding at human recombinant 5-HT₇ receptors stably expressed in HEK293 cells were observed

by radioligand binding studies as well as zinc neutral antagonism was displayed by the concentration of 10 μM in the functional assay.

Given that zinc potentiation of agonist activity at 5-HT_{1A} receptors and its inhibiting properties on 5-HT₇ receptors signaling, were detected at low concentrations of zinc ions, it could be hypothesized that these effects may represent the most likely direction of zinc activity under physiological conditions. Thus, among numerous zinc-regulated proteins, both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor subtypes can be considered as serotonergic targets for zinc modulation in the CNS.

1 PODSTAWY TEORETYCZNE BADAŃ

1.1 Allosteria – wprowadzenie

Termin allosteria pochodzi od złożenia dwóch greckich słów *allos* (inny) i *steros* (solidny, stały), które znaczeniowo przekładają się na określenie „inny przestrzennie” [1]. W piśmiennictwie naukowym pierwsza wzmianka o allosterii pojawia się już w 1961 roku [2], a definicja pojęcia dwa lata później. Zgodnie z nią allosteryczna zmiana w aktywności enzymu następuje w wyniku wiązania liganda do innego miejsca w cząsteczce białka niż punkt uchwytu specyficznego substratu [3].

Zjawisko allosterii, jako proces biologiczny, jest mechanizmem regulacji wielu białek, w tym także receptorowych. W warunkach fizjologicznych oddziaływanie endogennego liganda (agonisty) z receptorem zachodzi w tzw. miejscu ortosterycznym (*gr. orthos* – prosty), a każdą inną lokalizację wiązania liganda przyjęto określać mianem miejsca allosterycznego [4, 5]. Ligandy ortosteryczne i modulatory allosteryczne, ze względu na przestrzenną odrębność miejsca wiązania w białku, bezpośrednio nie konkurują ze sobą, ale cząsteczka allosteryczna przyłączając się do receptora zmienia jego konformację i pośrednio wpływa na aktywność związanego liganda ortosterycznego. Przejawia się to zmianami obserwowanymi w powinowactwie i/lub aktywności wewnętrznej ortosterycznego agonisty, przy czym wywoływane efekty są niezależne od siebie. Kierunek tych zmian wyznacza najbardziej podstawowy podział modulatorów allosterycznych na: pozytywne – PAM-y (*ang. positive allosteric modulators*) zwiększające i negatywne – NAM-y (*ang. negative allosteric modulators*) obniżające aktywność ortosterycznego liganda oraz neutralne – SAM-y (*ang. silent allosteric modulators*), które nie wpływają na aktywność endogennego agonisty, lecz modyfikują działanie innych ligandów allosterycznych [6].

Zgodnie z koncepcją modulacji allosterycznej zatwierdzoną przez Międzynarodową Unię Podstawowej i Klinicznej Farmakologii – IUPHAR (*ang. International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) [5] wymienione typy modulatorów nie wykazują samodzielnego działania, które ujawnia się dopiero w obecności endogennego liganda lub innego związku wiążącego się z receptorem w miejscu ortosterycznym. Tym niemniej w praktyce eksperymentalnej identyfikuje się przykłady związków wykazujących właściwości zarówno modulatorów allosterycznych jak i agonistów. W tym przypadku należy odróżnić działanie allosterycznych agonistów, mających zdolność aktywacji

receptora po związaniu z miejscem allosterycznym, od ago-allosterycznych modulatorów – ligandów o podwójnych cechach agonistów i modulatorów. W eksperymentach funkcjonalnych tego typu związki same działają jak częściowi agoniści, a ich podanie łącznie z endogennym agonistą wywołuje efekt addytywny zwiększając intensywność sygnału (E_{max}) agonisty [7].

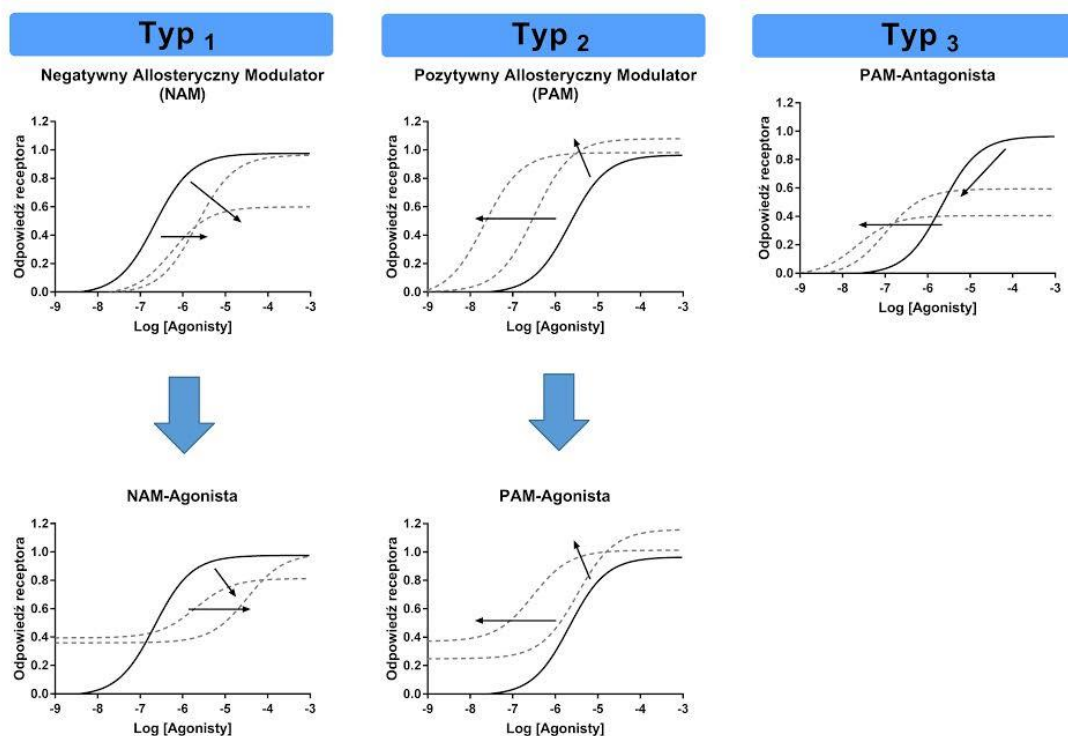
1.2 Cechy modulacji allosterycznej

Wśród własności wymienianych jako specyficzne dla modulatorów allosterycznych na pierwszym miejscu wyszczególnia się selektywność działania. Cecha ta, wynika głównie z większego zróżnicowania strukturalnego miejsc allosterycznych receptorów, które w przeciwieństwie do ortosterycznych kieszeni wiążących, nie zachowały w toku ewolucji trwałej sekwencji aminokwasów dla utrzymania zdolności oddziaływania z endogennymi ligandami. W konsekwencji ligandy allosteryczne powinny wykazywać znacznie wyższą selektywność działania receptorowego, co jest szczególnie istotne dla rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, *ang. G-protein-coupled receptor*), gdzie poszczególne typy i podtypy receptorów wykazują wysoką homologię miejsc ortosterycznych (tzw. konserwowanie ewolucyjne). Mając na uwadze potencjalne własności terapeutyczne licznych receptorów GPCR, brak selektywności działania jest często przyczyną efektów niepożądanych i w tym aspekcie upatruje się przewagi modulacji allosterycznej nad klasycznym mechanizmem oddziaływania leku z ortosterycznym miejscem wiążącym receptora [8].

Zdolność równoczesnego wiązania allosterycznego modulatora i związku ortosterycznego z cząsteczką białka receptorowego powoduje, że interakcja pomiędzy tymi dwoma ligandami zachodzi poprzez zmianę konformacji receptora. Oznacza to, że zamiast konkurencji o miejsce wiążące występuje tzw. kooperatywność, zaznaczająca się jako wzajemny wpływ jednej cząsteczki na wiązanie drugiej. Z tego faktu wynikają specyficzne cechy allosterycznej modulacji: odrębny wpływ modulatora na powinowactwo związku ortosterycznego i na zdolność przekazywania sygnału (aktywność wewnętrzna) receptora, wysycenie efektu (*ang. saturability*) oraz zależność obserwowanego efektu od zastosowanego liganda ortosterycznego (*ang. probe dependance*) [8].

Rozdzielenie efektów allosterycznych w odniesieniu do powinowactwa (*ang. affinity*) i zdolności przekazywania sygnału pod względem siły (*ang. potency*) oraz intensywności

lub też skuteczności (*ang. efficacy*) powoduje, że dany modulator może wpływać tylko na jeden z tych parametrów, a wywołując zmiany zarówno w powinowactwie jak i aktywności wewnętrznej może działać przeciwnie. Zestawione na rysunku 1 kombinacje potencjalnych kierunków oddziaływań modulatora na agonistę (zobrazowane jako zmiany w przebiegu krzywej stężenie-efekt) wyznaczają podział allosterycznych ligandów na trzy typy główne (z których dwa pierwsze mogą występować w dwóch wariantach) [8].



Rysunek 1. Wpływ allosterycznych modulatorów na przebieg krzywych stężenie-odpowiedź. Allosteryczne ligandy mogą zwiększać, nie zmieniać lub zmniejszać powinowactwo i efektywność. Efekty te mogą produkować przesunięcia krzywej w lewo lub prawo, zwiększając lub zmniejszając maksymalną odpowiedź. Dodatkowo allosteryczny modulator może wykazywać bezpośrednie działanie w celu wywołania agonistycznej odpowiedzi w systemie receptorowym [8].

Dla Typu 1 charakteryzującego modulatory NAM, wyróżnia się na dwa rodzaje ligandów: klasyczne NAM-y, obniżające zarówno powinowactwo jak i sygnał wewnątrzkomórkowy agonisty i NAM-agonistów, które obniżając powinowactwo, mają zdolność do bezpośredniej aktywacji receptora. Podobnie dla PAM-ów (Typ 2) wyróżnia się: klasyczne PAM-y podwyższające jednocześnie powinowactwo agonisty i przekazywany sygnał (co na wykresie skutkuje przesunięciem krzywej w lewą stronę) oraz PAM-agonistów, gdzie dodatkowo obserwuje się działanie własne modulatora uruchamiające szlak sygnalizacyjny. Oddzielny profil reprezentuje działanie

PAM-antagonistów (Typ 3) charakteryzujące się wzrostem powinowactwa endogennego agonisty z jednoczesnym osłabieniem siły aktywacji receptora [8].

Drugą, specyficzną dla allosterycznej modulacji, cechą jest tzw. efekt wysycenia (*ang. saturability ceiling effect*), czyli limit stężenia powyżej którego nie obserwuje się dłużej wpływu modulatora na działanie związku ortosterycznego. W przeciwieństwie do ligandów ortosterycznych, konkurujących o to samo miejsce w receptorze (i mających teoretycznie możliwość nieograniczonego zwiększania siły działania wraz ze wzrostem dawki), stężenie liganda allosterycznego, wyższe od wysycającego miejsca allosteryczne, nie wpływa na siłę wiązania związku ortosterycznego z receptorem. Własność ta ma istotne znaczenie dla bezpieczeństwa potencjalnego zastosowania liganda allosterycznego w terapii, ponieważ zmniejsza ryzyko przedawkowania leku, oraz podobnie jak w przypadku selektywności oddziaływań, może minimalizować objawy uboczne [8].

Kolejna cecha charakteryzująca działanie modulatorów allosterycznych to zależność efektu od rodzaju liganda zajmującego miejsce ortosteryczne. Jest ona określana angielskim terminem *probe dependence*, co można tłumaczyć jako zależność od próbnika. Fakt, że modulator allosteryczny modyfikuje konkretną konformację kompleksu białka receptorowego z danym ligandem ortosterycznym powoduje, że siła i kierunek obserwowanych efektów końcowych mogą być odmienne dla różnych ligandów ortosterycznych. Oznacza to, że modulator allosteryczny powodując np. wzrost powinowactwa (lub siły przekazywania sygnału) agonisty do określonego białka receptorowego, może nie wywołać żadnych zmian lub zadziałać przeciwnie w stosunku do innego agonisty badanego w tym samym systemie receptorowym. Zależność od próbnika utrudnia eksperymentalną identyfikację modulatorów allosterycznych, stąd też przyjmuje się praktykę oceny potencjalnej aktywności modulatora wobec endogennego agonisty lub liganda ortosterycznego o zbliżonej strukturze chemicznej [8].

1.3 Allosteria w rodzinie receptorów sprzężonych z białkiem G

Wprawdzie koncepcja modulacji allosterycznej jako mechanizmu działania wielu protein (np. kooperacyjnego wiązania tlenu do hemoglobiny) została odkryta już kilkadziesiąt lat temu, to w grupie receptorów związanych z białkami G oddziaływania allosteryczne zaczęto identyfikować dopiero stosunkowo niedawno [9, 10]. Co ciekawe, najbardziej rozpowszechnionym allosterycznym modulatorem w receptorach GPCR jest samo białko

G [11, 12] ale także wiele innych występujących endogenne substancji wykazuje takie cechy. Do tej grupy zaliczają się np. jony metali (sód, cynk i magnez); lipidy, a wśród nich przede wszystkim cholesterol, endokannabinoidy (anandamid i 2-arachidonoglycerol), pregnenolon, progesteron i oleamid; aminokwasy i peptydy (L-Phe, L-Trp, L-Tyr, glutatione, pepcan-12), jak też przeciwciała występujące zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym [13].

W tabeli 1 zamieszczone zostały przykłady substancji endogennych wykazujących działanie allosteryczne z wyszczególnieniem receptorów GPCR będących ich punktem uchwytu.

Tabela 1. Wykaz endogennych allosterycznych modulatorów GPCR.

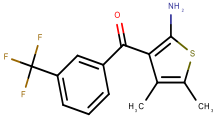

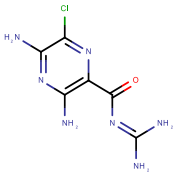
Modulator	Białko receptorowe
Jony:	
Na ⁺	m.in.: μ -OR, δ -OR, A ₁ R, A _{2A} R, A ₃ R, α_{2A} -AR, β_2 -AR, D ₂ R, CB ₁ R, H ₁ R, H ₃ R, B ₂ R
Zn ²⁺	m.in.: μ -OR, D ₁ R, D ₂ R, D ₃ R, MC ₁ R, MC ₂ R, α_1 -AR, β_2 -AR, 5-HT _{1A} R
Mg ²⁺	μ -OR, κ -OR, β_1 -AR
Mn ²⁺	μ -OR, δ -OR, κ -OR, β -AR
Aminokwasy i pochodne:	
l-Phe/l-Trp/l-Tyr	CaSR
l-Leu/l-Ile/l-Phe	GABA _B R
Homocysteina	D ₂ R
Agmatyna	α_{2D} -AR
Peptydy:	
MSHIIH (czynnik hamujący uwalnianie melanotropiny)	D ₂ R
5-HT – modulina	5-HT _{1B/1D} R
Glutation	CaSR
Większe peptydy/białka:	
Pepcan-12	CB ₁ R
Dynorfina-A	M ₂ mAChR
Protamina	M ₂ mAChR
MBP (zasadowe białko mieliny)	M ₂ mAChR
Lipidy:	
Oleamid	5-HT _{2C/2A} R, 5-HT _{1A} R, 5-HT ₇ R
Anandamid	M ₁ mAChR, A ₃ R
2-AG	A ₃ R
Kwas arachidonowy	mAChR
Lipoksyna A4	CB ₁ R
Progesteron (P ₄)	OTR
5 β -Dihydroprogesteron	OTR
Cholesterol	Rodopsyna, β_2 -AR, OTR, A _{2A} R, 5-HT _{1A} R
Pregnenolon	CB ₁ R
Przeciwciała:	

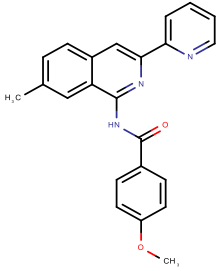
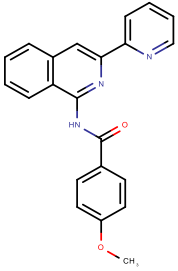
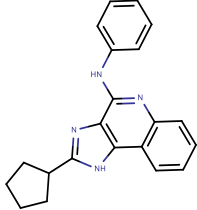
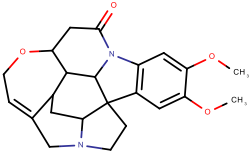
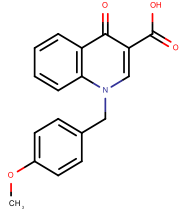
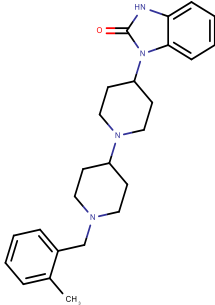
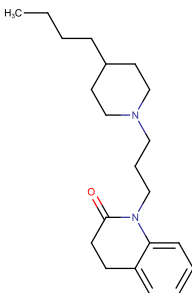
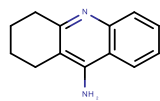
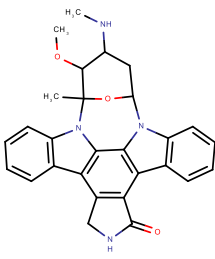
IgG	5-HT ₄ R, α_1 -AR, AT ₁ R, β_1 -AR, β_2 -AR, CaSR, D ₂ R, ET _A R, GABA _B R, M ₁ mAChR, M ₂ mAChR, M ₃ mAChR, mGluR1, mGluR5, TSH-R
-----	---

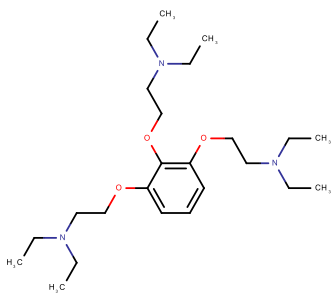
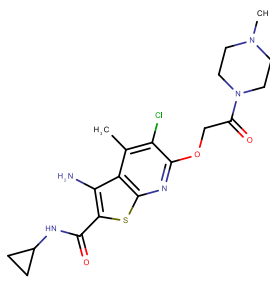
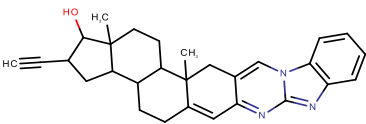
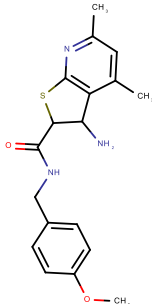
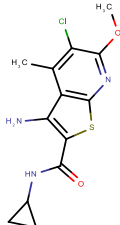
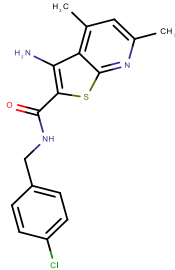
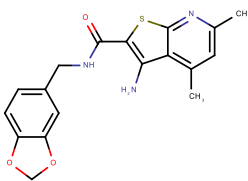
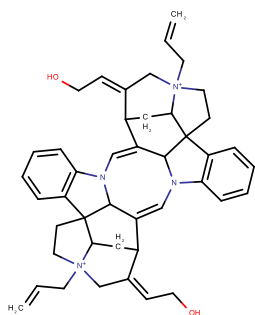
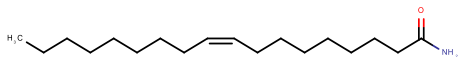
Użyte skróty: A₁R, A_{2A}R, A₃R, receptory adenozynowe typów: A₁, A_{2A} i A₃; AT₁R receptor angiotenzynowy II typu 1; α_1 -AR, α_{2A} -AR, α_{2D} -AR, receptory adrenergiczne α typów: α_1 , α_{2A} i α_{2D} ; β_1 -AR, β_2 -AR, receptory adrenergiczne β typów: β_1 i β_{2A} ; B₂R, receptor bradykininowy typu 2; CaSR, receptor wapnia zewnątrzkomórkowego; CB₁R, receptor kanabinoidowy typu 1; D₁R, D₂R, D₃R, receptory dopaminowe typów: D₁, D₂ i D₃; ET_AR, receptor endoteliny typu A; GABA_BR, metabotropowy receptor dla kwasu γ -aminomasłowego; mGluR1, mGluR5 metabotropowe receptory glutamatergiczne typów 1 i 5; H₁R, H₃R receptory histaminowe typów: H₁ i H₃; M₁ mAChR, M₂ mAChR, M₃ mAChR receptory muskarynowe typów: M₁, M₂ i M₃; MC₁R, MC₂R receptory melanokortynowe MC₁ i MC₂; OTR, receptor oksytocynowy; κ -OR, μ -OR, δ -OR, receptory opioidowe typów: κ , μ i δ -OR; TSH-R, receptor tyreotropowy; 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B/1D}R, 5-HT_{2C/2A}R, 5-HT₄R, 5-HT₇R: receptory serotoninowe typów: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2C/2A}, 5-HT₄R i 5-HT₇.

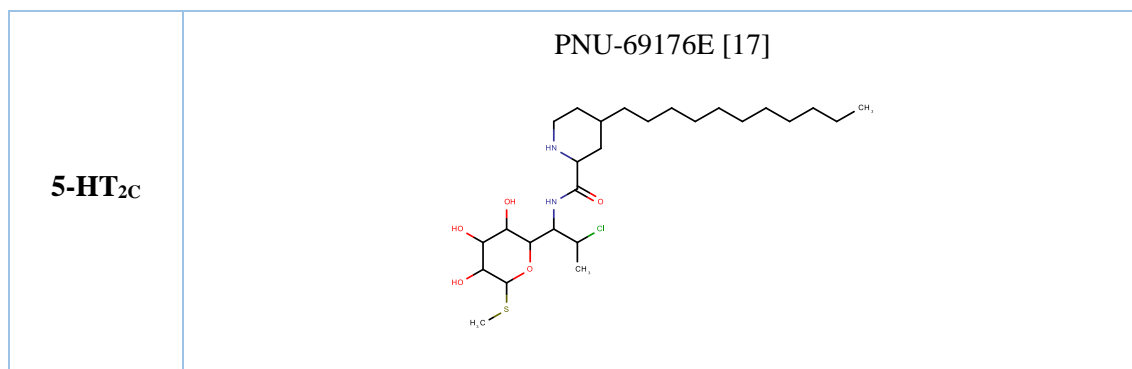
Istnienie dodatkowych (w stosunku do endogennych) miejsc wiążących w cząsteczce receptora ma istotne znaczenie dla możliwości regulacji jego funkcji, stąd też allosteria jest uważana za jeden z kluczowych mechanizmów biochemicznych. W rodzinie GPCR największą liczbę egzogennych modulatorów allosterycznych znaleziono dla receptorów glutamatergicznych należących do klasy C GPCR. Natomiast w najliczniejszej grupie receptorów klasy A GPCR, przykłady allosterycznej regulacji opisano głównie dla receptorów muskarynowych i adenozynowych [7, 14]. W odniesieniu do receptorów serotoninowych, które z wyjątkiem typu 5-HT₃, należą do klasy A GPCR, do tej pory znane są tylko 4 przykłady modulacji allosterycznej i dotyczą one działania oleamidu na receptory 5-HT_{2A} i 5-HT₇ [15, 16], związku PNU-69176E [17] pozytywnie modulującego receptor 5-HT_{2C} oraz allosterycznej inhibicji receptora 5-HT_{1A} wywołanej jonami cynku [18] (Tabela 2).

Tabela 2. Przykłady modulatorów allosterycznych receptorów klasy A GPCR.

Receptory adenozynowe		
A ₁	PD-81723 [19] 	LUF-5484 [20] 
A _{2A}	Amiloryd [21] 	

A₃	<p>VU-5455 [22]</p> 	<p>VU-8504 [23]</p> 	
	<p>DU-124183 [24]</p> 		
Receptory muskarynowe			
M₁	<p>Brucyna [25]</p> 	<p>BQCA [26]</p> 	<p>TBPB [27]</p> 
	<p>77-LH-28-1 [28]</p> 	<p>Takryna [29]</p> 	<p>Staurosporyna [30]</p> 

<p>M₂</p>	<p>Galamina [31]</p> 	<p>LY-2119620 [32]</p> 	
<p>M₃</p>	<p>WIN-62577 [33]</p> 		
<p>M₄</p>	<p>VU-0152100 [34]</p> 	<p>LY-2033298 [35]</p> 	<p>VU-10010 [36]</p> 
	<p>VU-0152099 [37]</p> 	<p>Chlorek alkuronium [33]</p> 	
<p>Receptory serotoninowe</p>			
<p>5-HT_{2A} 5-HT₇</p>	<p>Oleamid [15]</p> 		



1.4 Teoretyczne modele oddziaływań ligand-receptor

Zdefiniowanie mechanizmu farmakologicznego działania związku na poziomie oddziaływań z receptorem, zakłada badanie szerokiego zakresu jego stężeń i ocenę wywieranych efektów bezpośrednio w dedykowanym systemie receptorowym lub na podstawie modyfikacji aktywności innego liganda w tym samym systemie. Otrzymane wyniki są analizowane przy użyciu ilościowych modeli matematycznych dla interakcji lek-receptor. Stopień zgodności danych eksperymentalnych z konkretnym modelem stanowi podstawę do przypisania ligandowi określonego mechanizmu działania oraz wyznaczenia liczbowych parametrów charakteryzujących aktywność biologiczną związku. W niniejszym rozdziale przedstawiono rozwój koncepcji teoretycznych służących do klasyfikacji ligandów i ilościowej oceny ich aktywności [38].

1.4.1 Równanie prawa działania mas

W analizie oddziaływań lek-receptor procesem źródłowym jest prawo działania mas Guldberga i Waagego [39]. Zostało ono zdefiniowane w drugiej połowie XIX w. dla odwracalnych reakcji chemicznych i podaje matematyczną zależność pomiędzy stężeniami substratów i produktów w stanie równowagi: $[A] + [B] \leftrightarrow [A'] + [B']$, a zastosowane w farmakologii w stanie równowagi przyjmuje postać:

$$k_1[A][R] = k_2[AR]$$

Równanie 1

gdzie: $[A]$, $[R]$ i $[AR]$ oznaczają odpowiednio ilości (stężenia molowe) leku A, receptora R i kompleksu lek-receptor AR; symbole k_1 i k_2 odpowiednio stałe szybkości asocjacji leku z receptorem i dysocjacji leku od receptora.

Z prawa działania mas wynika wzór na stałą równowagi procesu:

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[A][R]}{[AR]}$$

Równanie 2

Zakładając, że całkowita ilość receptorów w badanym układzie $[R_T] = [R] + [AR]$:

$$K_D = \frac{[A]([R_T] - [AR])}{[AR]}$$

Równanie 3

W ujęciu oddziaływań farmakologicznych, stała równowagi K_D , zwana także stałą dysocjacji jest miarą powinowactwa (*ang. affinity*) leku do danego receptora i określa stężenie leku konieczne do zajęcia połowy miejsc wiążących receptora.

Po przekształceniu równania 3, można obliczyć ilość kompleksu lek-receptor $[AR]$:

$$[AR] = \frac{[A][R_T]}{[A] + [K_D]}$$

Równanie 4

Powyższe, proste równania są wykorzystywane dla analizy danych eksperymentalnych otrzymanych drogą wiązania znakowanego radioizotopowo liganda do receptora (*ang. radioligand binding assay*) i wyznaczenia wartości parametrów, które ilościowo określają bezpośrednie oddziaływanie liganda z receptorem tj. powinowactwa K_D związku ortosterycznego i maksymalnej ilość receptorów R_T . Warto zwrócić uwagę, że symbol R_T jest tożsamy z oznaczeniem B_{max} definiowanym jako maksymalna liczba miejsc wiążących (*ang. binding sites*) receptora zajętych przez ligand, oraz że równanie 4 jest funkcjonalnie identyczne z równaniem Michaelisa-Menten stosowanym do opisu kinetyki reakcji enzymatycznej [38].

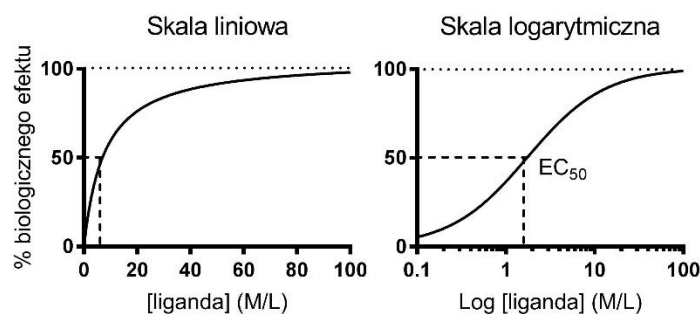
Ponieważ wykrywane w badaniach efekty są mierzone dla poszczególnych stężeń liganda, równanie 4 można przekształcić do postaci:

$$\frac{[AR]}{[B_{max}]} = \frac{[A]}{[A] + [K_D]}$$

Równanie 5

Iloraz $[AR]/[B_{max}]$, określany terminem *fractional occupancy*, definiuje tę część receptorów, do której wiąże się dane stężenie badanego związku i wywołuje mierzony efekt. Angielski termin funkcjonujący w literaturze przedmiotu można tłumaczyć na język polski jako „obsadzenie ułamkowe”, jednak biorąc pod uwagę dominujące piśmiennictwo anglojęzyczne, wprowadzanie polskiego tłumaczenia tylko na potrzeby niniejszej pracy, nie ma racjonalnego uzasadnienia.

Wykresem równania 5 w skali liniowej jest hiperbola, zwana także izotermą wiązania lub krzywą saturacji, natomiast w skali półlogarytmicznej krzywa sigmoidalna (Rysunek 2).



Rysunek 2. Zależność stężenie-odpowiedź w skali liniowej oraz logarytmicznej.

Stopień dopasowania danych doświadczalnych do wykresów teoretycznych równań określa zgodność z modelem wiązania, który wynikając bezpośrednio z prawa działania mas opisuje mechanizm o stechiometrii oddziaływań 1:1, tj. zawsze tylko jednej cząsteczki liganda z jedną cząsteczką receptora. Ponadto, jego zakres stosowalności wyznaczają założenia:

- odwracalności procesu tworzenia kompleksu ligand-receptor,
- jednakowej dostępności wszystkich receptorów dla ligandów,
- występowania tylko dwóch stanów receptorów: wolnego bądź związanego z ligandem,
- zachowania własności liganda i receptora po utworzeniu kompleksu (tj. utworzenie kompleksu nie zmienia własności liganda i receptora) [38].

Model ten, definiując klasyczny mechanizm konkurencji (kompetycji) w oddziaływaniach z receptorem, jest z powodzeniem wykorzystywany do ilościowej oceny poziomu wiązania ligandów ortosterycznych. Parametrami określającymi aktywność badanego związku są wymienione wyżej stała powinowactwa (dysocjacji) K_D i B_{max} oraz w przypadku eksperymentów wypierania radioliganda z miejsc wiążących przez nieznakowany związek, wartość IC_{50} (*ang. inhibition constance*) określająca stężenie liganda wypierające 50% radioliganda z miejsc wiążących. Wartość IC_{50} można przeliczyć na stałą hamowania bezwzględnego K_i przy użyciu równania Cheng-Prusoff'a sformułowanego w 1973 r. [40]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[A]}{K_D}}$$

Równanie 6

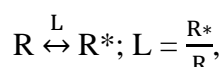
Bezpośrednie zastosowanie modelu powinno być jednak ograniczone tylko do ilościowej oceny poziomu wiązania liganda ortosterycznego, ponieważ zmiany konformacyjne białka receptorowego wywołane przyłączeniem agonisty lub modulatora allosterycznego naruszają ostatnie z wymienionych wyżej założeń [38].

W celu oceny stymulacji farmakologicznej receptora wywołanej przez agonistę, jak też efektów wynikających z równoczesnego wiązania modulatora do miejsca allosterycznego, opracowane zostały nowe modele matematyczne, przy czym w opisie tych procesów proste równanie odwracalnego wiązania ligand-receptor stanowi podstawowy element składowy złożonego układu równań. Wyniki eksperymentów ukierunkowanych na badanie tego typu oddziaływań można analizować według jednego z dwóch głównych modeli, tj. modelu dwóch stanów (*ang. two-state model – TSM*) [41] lub modelu operacyjnego (*ang. operational model*) [42], których równania zostały wyprowadzone najpierw dla opisu efektów aktywacji receptorów, a następnie dostosowane dla oddziaływań allosterycznych.

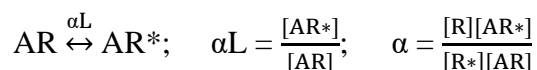
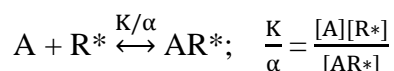
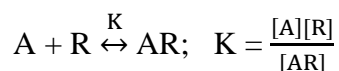
1.4.2 Model dwóch stanów (TSM)

Model dwóch stanów, początkowo opracowany dla kanałów jonowych przez Castillo i Katza w 1957 roku [43], został zmodyfikowany w pracy Monoda (1965) [44], a następnie zastosowany do oddziaływań ligand-receptor [45–47].

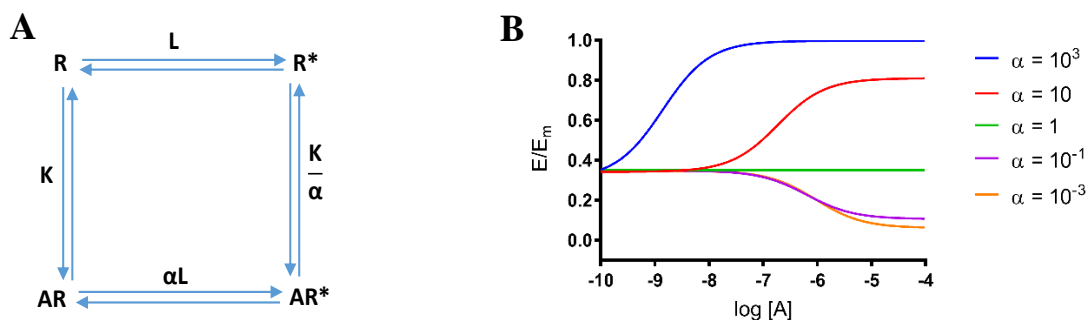
Jest on oparty na założeniu, że receptor w sposób odwracalny zmienia konformację ze stanu nieaktywnego (R) w aktywny (R*):



co powoduje, że podczas oddziaływań z ligandem A tworzą się dwa dodatkowe stany związane: AR i AR*:



W sumie, rozważany układ składa się z czterech stanów: dwóch wolnych R i R* i dwóch związanych z ligandem AR i AR*, których stężenia są określone przez cztery równowagi chemiczne i trzy stałe niezależne: L, K i α (Rysunek 3) [48].



Rysunek 3. Schemat modelu dwóch stanów (A) oraz symulacja zależności efektu od stężenia z różnymi wartościami parametru α (B) [48].

Parametr L określa skłonność wolnego receptora R do przechodzenia w stan aktywny R^* , K jest miara powinowactwa liganda A do nieaktywnego stanu R , α jest miarą wewnętrznej skuteczności (*ang. intrinsic efficacy*) liganda A . Wartość $\alpha > 1$ oznacza wzrost, $\alpha = 0$ brak zmian, a $\alpha < 1$ obniżenie w proporcji receptorów aktywnych [48].

Równanie funkcji f dla frakcji aktywnych receptorów (Równanie 7) określa odpowiedź receptora:

$$f = \frac{[R]_{\text{active}}}{[R]_T} = \frac{KL + \alpha L[A]}{K(1+L) + (1 + \alpha L)[A]} \quad \text{Równanie 7}$$

w którym:

$$[R]_{\text{active}} = [R^*] + [AR^*]$$

$$R_T = [R] + [AR] + [R^*] + [AR^*]$$

Geometrycznymi deskryptorami krzywej są:

Lewa asymptota charakteryzująca odpowiedź podstawową receptora tj.: f dla $[A] = 0$:

$$Basal = \frac{1}{1 + \frac{1}{L}}$$

Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$Top = \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha L}}$$

Punkt środkowy: wartość $[A]$ w połowie maksymalnej wartości funkcji f

$$[A_{50}] = \frac{K(1+L)}{1+\alpha L}$$

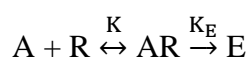
$[A_{50}]$ jest mniejsze, równe i większe od K dla agonistów ($\alpha > 1$), neutralnych antagonistów ($\alpha = 1$) i odwrotnych agonistów ($\alpha < 1$).

Pozorna stała dysocjacji K_{app} odnosząca się do obu (wolnego i związanego) stanów receptora jest określona równaniem 8:

$$K_{app} = \frac{([R] + [R^*])[A]}{[AR] + [AR^*]} = \frac{K(1+L)}{1+\alpha L} \quad \text{Równanie 8}$$

1.4.3 Operacyjny model agonizmu i jego rozszerzenie

Opracowany 1983 roku przez Blacka'a i Leff'ego [42] jako model aktywacji receptora jest prostym, liniowym równaniem składającym się z dwóch kroków: wiązania liganda z receptorem i funkcji przetwarzającej stan związania receptora z agonistą, w odpowiedź biologiczną [48].



Ligand (agonista) A wiąże się do receptora R ze stałą równowagi dysocjacji K, a miarą skuteczności przetwarzania stanu związania receptora z agonistą w odpowiedź, jest K_E , będąca wartością $[AR]$ dla której obserwuje się $\frac{1}{2}$ możliwego efektu maksymalnego E_m . Wykresem zależności pomiędzy stężeniem kompleksu ligand-receptor, a obserwowanym efektem jest hiperbola opisana równaniami 9 i 10:

$$f = \frac{E}{E_m} = \frac{[AR]}{K_E + [AR]} \quad \text{Równanie 9}$$

$$f = \frac{E}{E_m} = \frac{\tau[A]}{K + (1 + \tau)[A]} \quad \text{Równanie 10}$$

W równaniu 9 parametr K_E określa operacyjną skuteczność wyznaczając granicę górnej asymptoty (*ang. top f value*).

Równanie 10 zawiera dwa parametry: K – stałą dysocjacji liganda i τ – operacyjną skuteczność systemu będący ilorazem pomiędzy całkowitą ilością receptorów $[R]_T$, a wewnętrzną skutecznością agonisty K_E :

$$\tau = \frac{[R]_T}{K_E}; [R]_T = [R] + [AR]$$

Geometrycznymi deskryptorami krzywej są:

Lewa asymptota charakteryzująca odpowiedź podstawową receptora tj.: f dla $[A] = 0$:

$$Basal = 0$$

Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$Top = \frac{1}{1 + \frac{1}{\tau}}$$

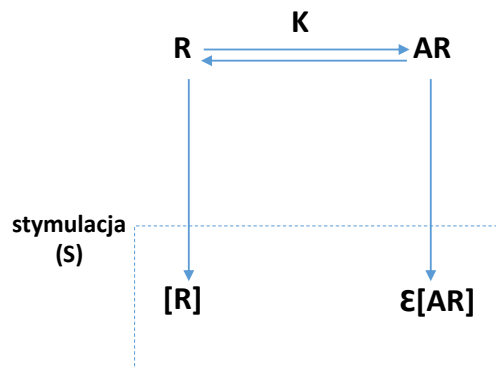
Wraz ze wzrostem τ wzrasta asymptotyczna granica górna (*ang. top values*) dla aktywności agonistów.

Pełny agonista osiąga górne wartości bliskie 1, częściowy agonista znacznie niższe od 1. Punkt środkowy: wartość $[A]$ w połowie maksymalnej wartości funkcji f :

$$[A_{50}] = \frac{K}{1+\tau}$$

$[A_{50}]$ jest niższe niż K i im bardziej skuteczny jest agonista tym większa jest różnica między K , a $[A_{50}]$.

Operacyjny model agonizmu nie przewiduje aktywności spontanicznej receptorów i nie może być wykorzystany do opisu funkcji odwrotnych agonistów. Umożliwia to równanie rozszerzonego modelu agonizmu, zaproponowane przez Slack'a i Hall'a w 2012 roku [49]:



Rysunek 4. Operacyjny model agonizmu zawierający opis konstytutywnej aktywności receptora [48].

W modelu tym przyjęto, że całkowita ilość receptorów $[R]_T = [R] + [AR]$, a aktywność spontaniczna (konstytutywna) jest uwzględniona poprzez zdefiniowanie sygnału receptora:

$$S = [R] + \varepsilon[AR],$$

w którym $[R]$ i $[AR]$ to stężenia wolnego i związanego z ligandem receptora, a ε określa różną zdolność kompleksu ligand-receptor do generowania sygnału w odniesieniu do wolnego receptora.

Zależność pomiędzy sygnałem S i obserwowanym efektem opisuje równanie hiperboli (Równanie 11):

$$f = \frac{E}{E_m} = \frac{S}{K_E + S} \tag{Równanie 11}$$

gdzie K_E podobnie jak w poprzednim modelu oznacza wewnętrzną skuteczność agonisty.

Uwzględnienie konstytutywnej aktywności niezwiązanych z ligandem receptorów poprzez zdefiniowanie parametru $\chi = \frac{[R]_T}{K_E}$ i kolejne przekształcenia prowadzą do równania 12:

$$f = \frac{K\chi + \varepsilon\chi[A]}{K(1 + \chi) + (1 + \varepsilon\chi)[A]} \quad \text{Równanie 12}$$

Równanie 12 zawiera trzy parametry: χ , określające zdolność receptorów do generowania spontanicznej aktywności, K będące stałą równowagi dysocjacji liganda od receptora i ε charakteryzujące sygnał kompleksu ligand-receptor. Dla agonistów $\varepsilon > 1$ charakteryzuje wartości górnej asymptoty wyższe niż dla odpowiedzi spontanicznej; wartość $\varepsilon = 1$ opisuje profil neutralnych antagonistów, dla których górna asymptota jest równa z odpowiedzią podstawową receptora, a $\varepsilon < 1$ wyznacza odwrotnych agonistów gdy górna asymptota leży poniżej wartości odpowiedzi oznaczonych dla wolnego receptora. Ze względu na matematyczną równoznaczność równania 12 z równaniem 7, otrzymany wykres hiperboli będzie identyczny jak dla modelu dwóch stanów (Rysunek 3B), jeśli te same wartości zostaną użyte dla K , χ i ε jak dla parametrów K , L i α (z modelu dwóch stanów).

Geometryczne deskryptory krzywej:

Lewa asymptota charakteryzująca odpowiedź podstawową receptora tj.: f dla $[A] = 0$:

$$Basal = \frac{1}{1 + \frac{1}{\chi}}$$

Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$Top = \frac{1}{1 + \frac{1}{\varepsilon\chi}}$$

Punkt środkowy: wartość $[A]$ w połowie maksymalnej wartości funkcji f :

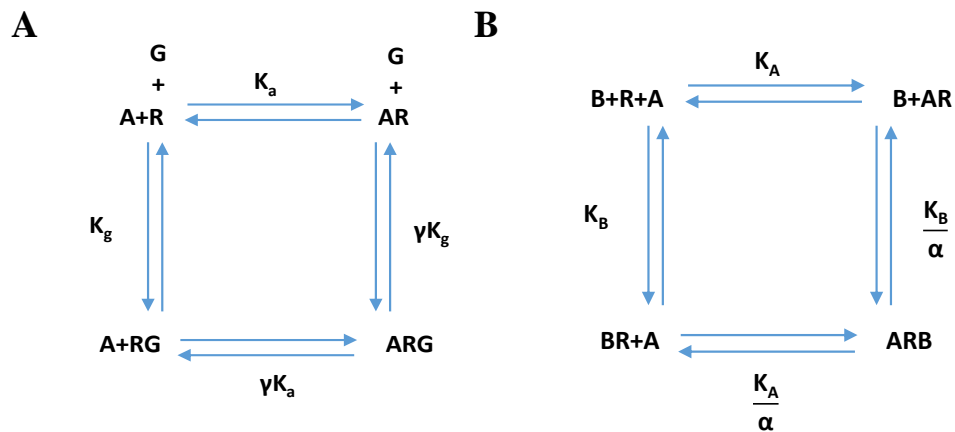
$$[A_{50}] = \frac{K(1+\chi)}{1+\varepsilon\chi}$$

dla agonistów: $[A_{50}] < K$ ($\varepsilon > 1$), dla neutralnych antagonistów: $[A_{50}] = K$ ($\varepsilon = 1$), dla odwrotnych agonistów: $[A_{50}] > K$ ($\varepsilon < 1$) [48].

1.4.4 Allosteryczny model potrójnego kompleksu (TCM)

Odkrycie modulatorów allosterycznych receptorów GPCR i mechanizmów leżących u podstaw ich właściwości farmakologicznych, spowodowało potrzebę rewizji i rozszerzenia istniejących modeli opisujących klasyczne oddziaływania z receptorami.

Prototypem równań dla modulacji allosterycznej był model potrójnego kompleksu (*ang. ternary complex model – TCM*), który został opracowany w 1980 roku przez DeLean'a i wsp. [50], jako rozszerzenie liniowego modelu dwóch stanów, o interakcję białka G z receptorem [51] (Rysunek 5A).



Rysunek 5. Schemat modelu potrójnego kompleksu (TCM) (A) [51] oraz allosterycznego modelu potrójnego kompleksu (ATCM) (B) [1].

W skład systemu wchodzi: receptor (R), agonista (A) i związane z proteiną receptora białko G. Odpowiedź komórkowa receptora następuje po aktywacji białka G w wyniku przyłączenia agonisty do receptora i utworzeniu kompleksu ARG. Parametr γ definiuje różne powinowactwo białka G do receptora, gdy receptor jest związany z ligandem A lub w różne powinowactwo liganda do związanego z białkiem G receptora; K_a to stała asocjacji agonisty do wolnego receptora, K_g jest stałą asocjacji białka G do receptora. Wartość parametru $\gamma > 1$ oznacza pozytywną kooperatywność; $\gamma = 1$ brak oddziaływania a $\gamma < 1$ negatywną kooperatywność [48].

W 1988 roku model TCM został zastosowany do oddziaływań allosterycznych zastępując oddziaływanie białka G, wiązaniem drugiego liganda B w dodatkowej kieszeni receptora [52], stąd w późniejszych pracach przyjęło się określać go jako allosteryczny model potrójnego kompleksu (*ang. allosteric ternary complex model – ATCM*; Rysunek 5B).

ACTM opisuje interakcje dwóch ligandów A i B z jednym receptorem i utworzenie potrójnego kompleksu ARB, który ma odmienne właściwości niż wolny receptor.

Ligand A wiąże się do miejsca ortosterycznego receptora tworząc kompleks AR, ligand B jako allosteryczny modulator, wiąże się do kieszeni allosterycznej i jego kompleks jest oznaczony BR. Stałe K_A i K_B oznaczają stałe równowagi dysocjacji dla wiązania A i B. Każda z dwucząsteczkowych reakcji modelu zachowuje się według schematu

klasycznego prawa działania mas stosowanego do oceny oddziaływań w miejscu ortosterycznym.

Tym niemniej, modulację allosteryczną oprócz stałych K_A i K_B , charakteryzuje dodatkowo współczynnik kooperatywności α [52–54] będący jednostką skalującą, służącą do pomiaru wielkości efektu wywieranego w stanie równowagi przez związek allosteryczny na działanie liganda ortosterycznego [55]. Wartość $\alpha > 1$ świadczy o pozytywnej kooperacji, czyli charakteryzuje działanie PAM; $0 < \alpha < 1$ określa negatywną kooperację dla NAM; $\alpha = 1$ oznacza, że oddziaływanie allosteryczne nie wpływa na aktywność liganda ortosterycznego i jest klasyfikowane jako tzw. neutralna modulacja. Warto wspomnieć, że przypadku klasycznego oddziaływania dwóch ligandów konkurujących w receptorze o miejsce ortosteryczne $\alpha = 0$, stąd też gdy wyznaczone na podstawie eksperymentu wartości tego parametru są zbliżone do 0, bardzo trudno wówczas odróżnić działanie badanego związku od konkurencyjnego antagonizmu [1].

Poniżej zamieszczono równania dla stałych równowagi wynikające z procesów przedstawionych na rysunku 5B.

$$K_A = \frac{[A][R]}{[AR]} \quad K_B = \frac{[R][B]}{[RB]} \quad \frac{K_A}{\alpha} = \frac{[A][RB]}{[ARB]} \quad \frac{K_B}{\alpha} = \frac{[AR][B]}{[ARB]}$$

R_T – całkowita ilość receptorów w badanym układzie: $[R_T] = [R] + [AR] + [RB] + [ARB]$;

ρ_A – parametr charakteryzujący frakcję receptorów związaną z ligandem ortosterycznym

A (*ang. fractional occupancy*) jest zdefiniowany wzorem: $\rho_A = \frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]}$

$$\rho_A = \frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]} = \frac{[AR] + [ARB]}{[R] + [AR] + [RB] + [ARB]}$$

Równanie 13

Kolejne przekształcenia równania 13:

Podstawiając $\frac{1}{[A][R]}$ do prawej strony:

$$\frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]} = \frac{\frac{[AR]}{[A][R]} + \frac{[ARB]}{[A][R]}}{\frac{[R]}{[A][R]} + \frac{[AR]}{[A][R]} + \frac{[RB]}{[A][R]} + \frac{[ARB]}{[A][R]}}$$

Równanie 14

Robiąc podstawienia do równania 14:

$$K_A = \frac{[A][R]}{[AR]}; [ARB] = \frac{\alpha[AR][B]}{K_B}; [R] = \frac{K_B[RB]}{[B]}$$

Otrzymujemy:

$$\frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]} = \frac{\frac{1}{K_A} + \frac{\alpha[B]}{K_B K_A}}{\frac{1}{K_A} + \frac{1}{[A]} + \frac{\alpha[B]}{K_B K_A} + \frac{[B]}{[A]K_B}}$$

$$\frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]} = \frac{\frac{1}{K_A} + \frac{\alpha[B]}{K_A K_B}}{\frac{1}{K_A} + \frac{1}{[A]} + \frac{\alpha[B]}{K_B K_A} + \frac{[B]}{[A]K_B}} \cdot [R_T]$$

$$[AR] + [ARB] = \frac{\left(\frac{1}{K_A} + \frac{\alpha[B]}{K_A K_B}\right) [R_T]}{\frac{1}{[A]} \left(\frac{[A]}{K_A} + 1 + \frac{\alpha[A][B]}{K_B K_A} + \frac{[B]}{K_B}\right)}$$

Podstawienie: $Y = [AR] + [ARB]$

$$\begin{aligned} Y &= \frac{[R_T] \left(\frac{1}{K_A} + \frac{\alpha[B]}{K_A K_B}\right)}{\frac{1}{[A]} \left(\frac{[A]}{K_A} + 1 + \frac{\alpha[B][A]}{K_A K_B} + \frac{[B]}{K_B}\right)} = \frac{[A]R_T \left(\frac{1}{K_A} + \frac{\alpha[B]}{K_A K_B}\right)}{\left(\frac{K_B A}{K_A K_B} + \frac{K_A K_B}{K_A K_B} + \frac{\alpha[B][A]}{K_A K_B} + \frac{K_A [B]}{K_A K_B}\right)} = \\ &= \frac{[A][R_T] \left(\frac{K_B}{K_A K_B} + \frac{\alpha[B]}{K_A K_B}\right)}{\frac{K_B A + K_A K_B + \alpha[B]A + K_A [B]}{K_A K_B}} = \\ &= \frac{[A][R_T](K_B + \alpha[B])}{K_B [A] + K_A K_B + \alpha[B][A] + K_A [B]} = \frac{[A][R_T](K_B + \alpha[B])}{[A](K_B + \alpha[B]) + K_A K_B + K_A [B]} \cdot \frac{1}{K_B + \alpha[B]} \end{aligned}$$

Otrzymujemy:

$$Y = \frac{[A][R_T]}{[A] + \frac{K_A K_B + K_A [B]}{K_B + \alpha[B]}}$$

$$\frac{[AR] + [ARB]}{[R_T]} = \frac{[A]}{[A] + \frac{K_A(K_B + [B])}{K_B + \alpha[B]}}$$

$$\frac{[A]}{[A] + \frac{K_A(K_B + [B])}{K_B + \alpha[B]}} = \frac{[A']}{A' + \frac{K_A(K_B + [B'])}{K_B + \alpha[B'']}}$$

$$[A'] \left([A] + \frac{[A]}{\frac{K_A(K_B + [B])}{K_B + \alpha[B]}} \right) = [A] \left([A'] + \frac{K_A(K_B + [B'])}{K_B + \alpha[B']} \right) \quad /- [A][A'] /: K_A$$

$$\frac{A'(K_B + [B])}{K_B + \alpha[B]} = \frac{[A](K_B + [B'])}{K_B + \alpha[B']} \quad /: [A'][A]$$

$$\frac{(K_B + [B])}{[A](K_B + \alpha[B])} = \frac{(K_B + [B'])}{[A'](K_B + \alpha[B'])}$$

$$\frac{[A](K_B + \alpha[B])}{K_B + [B]} = \frac{[A'](K_B + \alpha[B'])}{K_B + [B']} = d$$

$$\log\left(\frac{A'(K_B + \alpha[B'])}{K_B + [B]}\right) = \log d$$

$$\log([A'](K_B + \alpha[B'])) - \log(K_B + [B']) = \log d$$

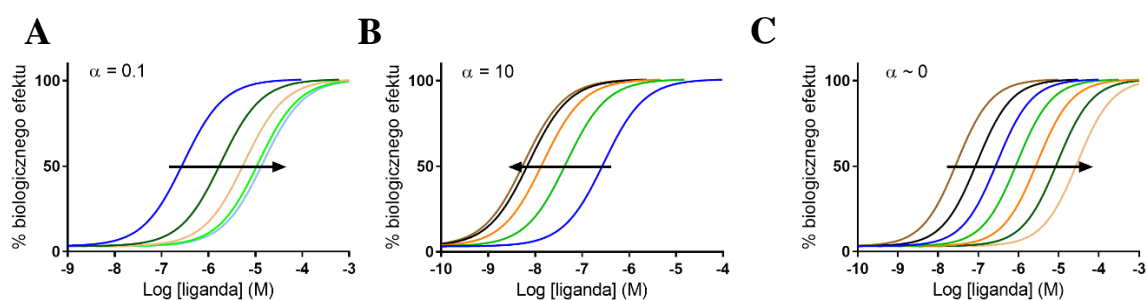
$$\log[A'] + \log(K_B + \alpha[B']) - \log(K_B + [B']) = \log d$$

$$\log(K_B + \alpha[B']) - \log(K_B + [B']) - \log d = -\log[A']$$

Równanie 15

Równanie 15 zostało wykorzystane do oceny zjawiska allosterii w eksperymentach saturacyjnych niniejszej rozprawy doktorskiej. Dla łatwiejszej analizy wyrażenie zostało przepisane do równania 23.

W przypadku pozytywnej kooperatywności pomiędzy oddziaływaniami ligandów A i B w receptorze ($\alpha > 1$), wykres krzywej wiązania ortosterycznego liganda A do receptora w obecności modulatora B będzie przesunięty w lewo w odniesieniu do krzywej wiązania wykreślonej dla samego liganda A. Negatywna kooperatywność pomiędzy A i B ($\alpha < 1$) zaznaczy się przesunięciem wykresu w przeciwnym kierunku.



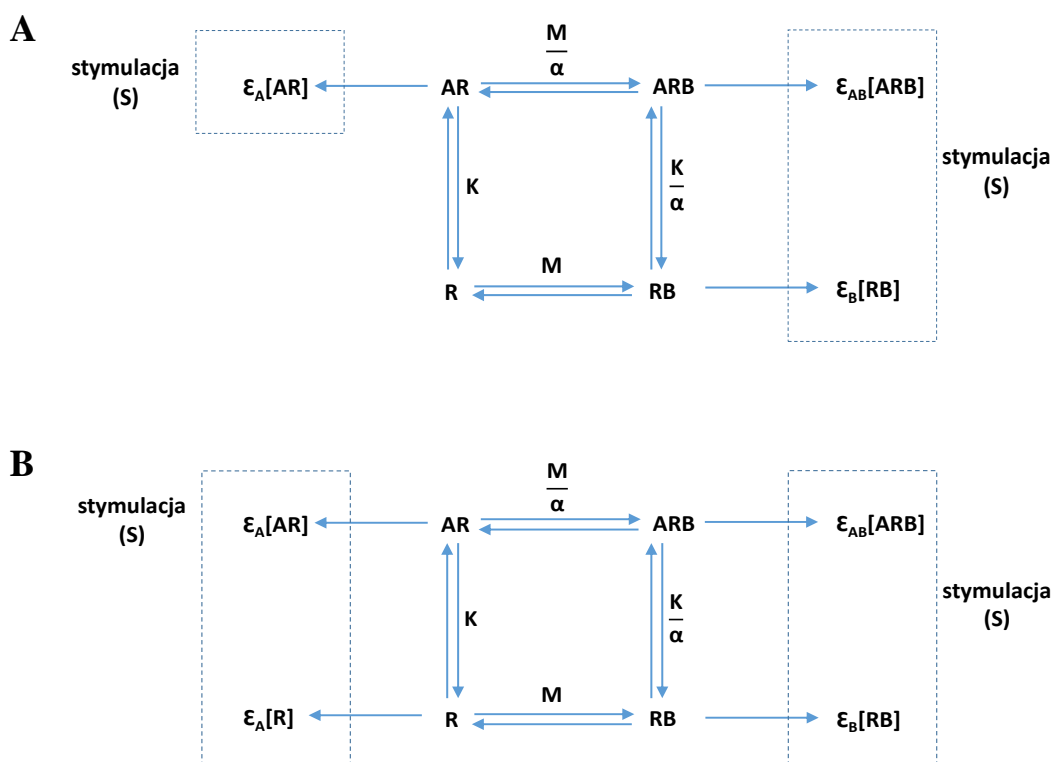
Rysunek 6. Przebieg krzywych stężenie-efekt w modelu ATCM. Pozytywna (A) i negatywna (B) kooperatywność w porównaniu do kompetencyjnego antagonizmu (C).

Przebieg wykresów wiązania liganda ortosterycznego do receptora, otrzymanych w obecności rosnących stężeń liganda typu NAM ($\alpha = 0,1$), PAM ($\alpha = 10$) i kompetencyjnego antagonisty ($\alpha \sim 0$), przedstawiono na rysunku 6. Wykresy A i B ilustrują, charakterystyczny dla modulacji allosterycznej, efekt pułapowy tj. graniczne stężenie modulatora, przy którym nie obserwuje się dalszych zmian w aktywności liganda ortosterycznego [56].

1.4.5 Operacyjny model allosteryzmu

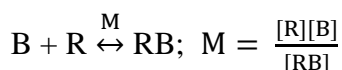
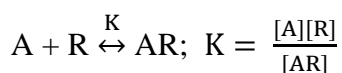
Jak wspomiano w rozdziale 1.2 ligandy allosteryczne oprócz kooperatywności oddziaływania z ligandem ortosterycznym (decydującej o zmianach w powinowactwie)

mogą wpływać na skuteczność wywoływania sygnału komórkowego przez agonistę, jak też same posiadać aktywność wewnętrzną. Wiadomo też, że modulacja powinowactwa występuje niezależnie od modulacji aktywności wewnętrznej związku ortosterycznego i kierunek wywoływanych zmian nie jest ze sobą skorelowany. Uwzględniając tę złożoność i różnorodność potencjalnych efektów, w 2007 roku opracowano operacyjny model allosteryzmu [7]; łączący ze sobą cechy operacyjnego modelu agonizmu Blacka'a i Leff'ego [42] oraz modelu allosterycznego ATCM [48].



Rysunek 7. Podstawowy operacyjny model allosteryzmu (A) oraz uwzględniający aktywność konstytutywną (B) [48].

Jest on opisany czterema równaniami reakcji dwóch ligandów ortosterycznego A i allosterycznego B z receptorem R i zdefiniowany odpowiednio przez cztery stałe równowagi i trzy niezależne parametry: K, M i α .





Receptory są oznaczone jako: niezwiązane z ligandem R, związane z jednym ligandem ortosterycznym AR lub allosterycznym BR lub potrójny kompleks z oboma ligandami ARB. Stałe K i M są miarą powinowactwa odpowiednio agonisty A i modulatora B do receptora, a współczynnik α jest miarą kooperatywności pomiędzy wiązaniem A i B.

Sygnaly cząstkowe od poszczególnych kompleksów są określone przez: $S_{AR} = \varepsilon_A[AR]$; $S_{BR} = \varepsilon_B[RB]$; $S_{ARB} = \varepsilon_{AB}[ARB]$, a sygnał całkowity stanowi ich sumę $S = \varepsilon_A[AR] + \varepsilon_B[RB] + \varepsilon_{AB}[ARB]$.

Równanie hiperboli (16) określa zależność pomiędzy sygnałem całkowitym, a obserwowanym efektem:

$$f = \frac{E}{E_m} = \frac{S}{K_E + S} \quad \text{Równanie 16}$$

E_m oznacza efekt maksymalny, K_E to stała określająca skuteczność przekształcania procesu wiązania receptora z ligandem w sygnał.

$$f = \frac{K\tau_B[B] + \tau_A(M + \alpha\beta[B])[A]}{K(M + (1 + \tau_B)[B]) + (M(1 + \tau_A) + \alpha(1 + \tau_A\beta)[B])[A]} \quad \text{Równanie 17}$$

parametry τ określają operacyjną skuteczność układu; indeksy dolne opisują odpowiednie kompleksy ligand-receptor:

$$\tau_A = \frac{\varepsilon_A[R]_T}{K_E}; \quad \tau_B = \frac{\varepsilon_B[R]_T}{K_E}; \quad \tau_{AB} = \frac{\varepsilon_{AB}[R]_T}{K_E} = \frac{\beta\varepsilon_A[R]_T}{K_E} = \beta\tau_A$$

$$[R]_T = [R] + [AR] + [RB] + [ARB]$$

Geometryczne deskryptory krzywych:

Lewa asymptota dla odpowiedzi podstawowej przy $[A] = 0$ i $[B] = 0$

$$\text{Basal} = 0$$

Lewa asymptota gdy $[A] = 0$

$$\text{Bottom} = \frac{\tau_B[B]}{M + (1 + \tau_B)[B]}$$

Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$\text{Top} = \frac{\tau_A(M + \alpha\beta[B])}{M(1 + \tau_A) + \alpha(1 + \tau_A\beta)[B]}$$

Punkt środkowy: wartość $[A]$ dla połowy maksymalnego efektu:

$$[A_{50}] = \frac{K(M+(1+\tau_B)[B])}{M(1+\tau_A)=\alpha(1+\tau_A\beta)[B]}$$

Równanie operacyjnego modelu allosteryzmu (Równanie 17) opisujące zależność efektu od stężenia, zawiera stałe dysocjacji K i M dla agonisty i modulatora; współczynniki kooperatywności α oraz β odnoszący się do zdolności modulatora B do zmiany skuteczności wywoływania sygnału przez A ($\epsilon_{AB} = \epsilon_B\beta$).

Modyfikacją operacyjnego modelu allosteryzmu jest uwzględnienie aktywności konstytutywnej receptora przez wprowadzenie do równania 17 parametru uwzględniającego sygnał pochodzący od wolnych receptorów R (Rysunek 7B).

Całkowity sygnał jest wówczas zdefiniowany jako $S = [R] + \epsilon_A[AR] + \epsilon_B[RB] + \epsilon_{AB}[ARB]$, a obserwowany efekt $\frac{E}{E_m} = \frac{S}{K_E + S}$

Równanie 18 opisujące ten model przyjmuje postać:

$$f = \frac{E}{E_m} = \frac{K\chi(M + \epsilon_B[B]) + \epsilon_B\alpha\delta[B][A]}{K(M(1+\chi) + (1+\epsilon_B\chi)[B]) + (M(1 + \epsilon_A\chi) + \alpha(1 + \epsilon_A\epsilon_B\delta\chi)[B])[A]} \quad \text{Równanie 18}$$

$[A]$ i $[B]$ oznaczają odpowiednio stężenia agonisty i modulatora, K jest stałą dysocjacji agonisty, M – stałą dysocjacji modulatora, χ charakteryzuje konstytutywną aktywność receptora i $\chi = \frac{[R]_T}{K_E}$; ϵ_A – wewnętrzną aktywność agonisty A , ϵ_B – wewnętrzną aktywność modulatora B , α to współczynnik kooperatywności pomiędzy wiązaniem ligandów A i B z receptorem, δ współczynnik kooperatywności aktywacji receptora przez A w obecności B .

Całkowita ilość receptorów $[R]_T = [R] + [AR] + [RB] + [ARB]$.

Geometryczne deskryptory krzywych:

Lewa asymptota dla odpowiedzi podstawowej przy $[A] = 0$ i $[B] = 0$

$$Basal = \frac{1}{1 + \frac{1}{\chi}}$$

Lewa asymptota gdy $[A] = 0$

$$Bottom = \frac{\chi(M + \epsilon_B[B])}{M + (1 + \chi) + [B](1 + \epsilon_B\chi)}$$

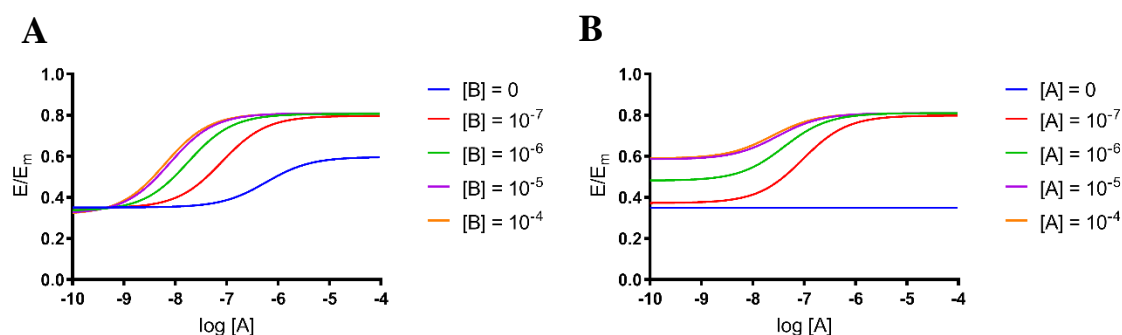
Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$Top = \frac{\chi \varepsilon_A (M + \varepsilon_B \alpha \delta [B])}{M(1 + \varepsilon_A \chi) + \alpha(1 + \varepsilon_A \varepsilon_B \delta \chi)[B]}$$

Punkt środkowy: wartość [A] dla połowy maksymalnego efektu:

$$[A_{50}] = \frac{K(\chi(M + \varepsilon_B [B]) + M + [B])}{\chi \varepsilon_A (M + \varepsilon_B \delta \alpha [B]) + M + \alpha [B]}$$

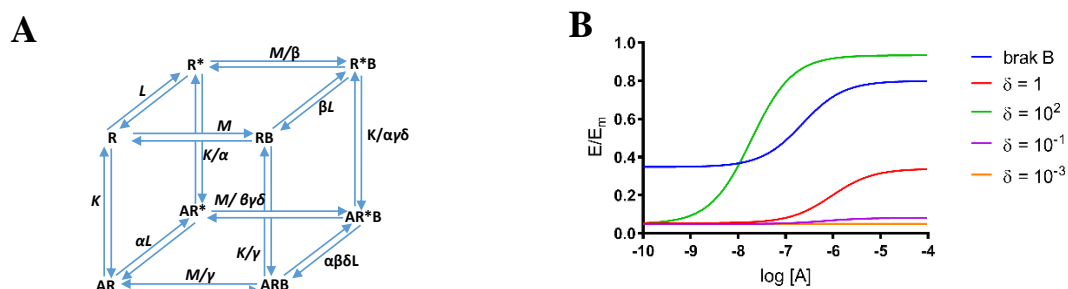
Przebieg krzywych stężenie-efekt, na podstawie równania 18 dla: a) agonisty A w obecności rosnących stężeń modulatora B i b) modulatora B w obecności rosnących stężeń agonisty A przedstawiono na rysunku 8 [48].



Rysunek 8. (A) Krzywe typu stężenie-efekt dla agonisty w obecności i nieobecności wzrastających stężeń allosterycznego modulatora B. (B) Krzywe typu stężenie-efekt dla modulatora w obecności i nieobecności wzrastających stężeń agonisty A wobec tych samych farmakologicznych parametrów jak dla przypadku (A) [48].

1.4.6 Allosteryczny model dwóch stanów (ATSM)

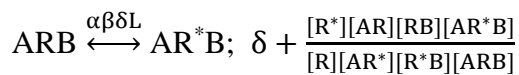
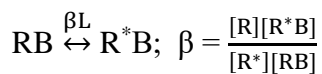
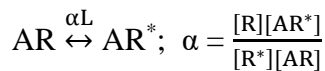
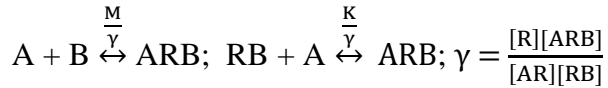
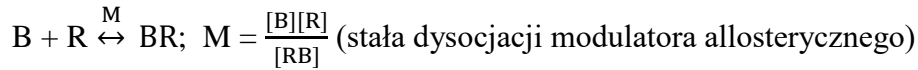
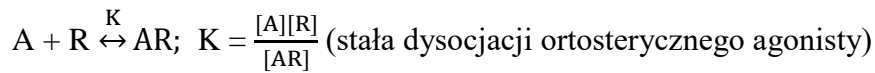
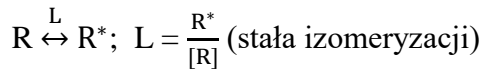
Równoległym podejściem do matematycznego opisu oddziaływań allosterycznych jest zastosowanie allosterycznego modelu dwóch stanów (*ang. allosteric two-state model – ATSM*) (Rysunek 9) [57], opracowanego jako rozwinięcie modelu TSM [48].



Rysunek 9. Allosteryczny model dwóch stanów (ATSM) (A). Symulacja krzywych stężenie-efekt dla modelu ATSM (B) [48].

Oprócz kooperacyjnego wiązania modulatora do miejsca allosterycznego receptora, model ten daje także możliwość oceny własności agonistycznych modulatora jak też przewiduje konstytutywną aktywność receptora.

Stałe równowagi modelu L, K, M są zdefiniowane następująco:



Równanie funkcji f dla frakcji aktywnych receptorów (równanie 19) przyjmuje postać:

$$f = \frac{[R]_{\text{Active}}}{[R]_{\text{T}}} = \frac{KL(M + \beta[B]) + \alpha L(M + \beta\gamma\delta[B])[A]}{K(M(1+L) + (1 + \beta L)[B]) + (M(1 + \alpha L) + \gamma(1 + \alpha\beta\delta L)[B])[A]}$$

Równanie 19

w którym: $[R]_{\text{Active}} = [R^*] + [AR^*] + [R^*B] + [AR^*B]$,

$$[R]_{\text{T}} = [R] + [AR] + [RB] + [ARB] + [R^*] + [AR^*] + [R^*B] + [AR^*B]$$

W powyższych równaniach: γ – współczynnik kooperatywności wiązania pomiędzy A i B (kooperatywność: $\gamma = 1$ neutralna, $\gamma > 1$ pozytywna, $\gamma < 1$ negatywna); α – wewnętrzna aktywność A; β – wewnętrzna aktywność B; δ – współczynnik kooperatywności aktywacji receptora przez A i B (kooperatywność: $\delta = 1$ neutralna, $\delta > 1$ pozytywna, $\delta < 1$ negatywna).

Geometryczne deskryptory krzywych:

Lewa asymptota dla odpowiedzi podstawowej przy $[A] = 0$ i $[B] = 0$

$$Basal = \frac{1}{1 + \frac{1}{L}}$$

Lewa asymptota gdy $[A] = 0$

$$Bottom = \frac{L(M + \beta[B])}{M + (1 + L) + (1 + \beta L)[B]}$$

Prawa asymptota: wartość funkcji f gdy $[A] \rightarrow \infty$:

$$Top = \frac{L\alpha(M + \beta\gamma\delta[B])}{M(1 + \alpha L) + \gamma(1 + \alpha\beta\delta L)[B]}$$

Warto zauważyć, że jeśli $\gamma = 0$ to $[ARB] = [AR*B] = 0$ i $Top = \frac{1}{1 + \frac{1}{L\alpha}}$, co oznacza sytuację ekstremalnie negatywnej kooperatywności, w której ligandy wzajemnie wykluczają swoje wiązanie z receptorem.

Punkt środkowy: wartość $[A]$ dla połowy maksymalnego efektu:

$$[A_{50}] = \frac{K(M + \beta[B]) + M + [B]}{L\alpha(M + \beta\gamma\delta[B]) + M + \gamma[B]}$$

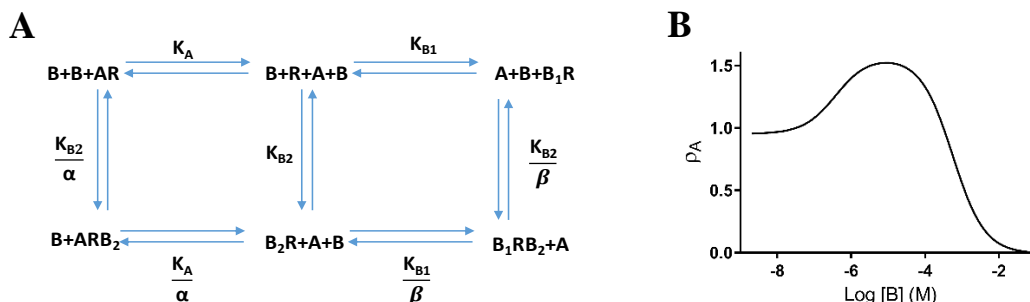
Własności agonistyczne modulatora B są, jak już wspomniano, określone przez parametr β ; w sytuacji gdy B jest „czystym” modulatorem allosterycznym $\beta = 1$ (*bottom = basal*); jeśli B jest agonistą $\beta > 1$ (*bottom > basal*) natomiast gdy $\beta < 1$ (*bottom < basal*) to B ujawnia właściwości odwrotnego agonisty. Rysunek 9B ilustruje zachowanie modelu dla modulatora B wykazującego negatywną aktywność wewnętrzną $\beta < 1$, gdy kooperatywność aktywacji δ pomiędzy A i B jest: neutralna ($\delta = 1$), pozytywna ($\delta > 1$) lub negatywna ($\delta < 1$), natomiast kooperatywność wiązania γ pomiędzy A i B jest neutralna ($\gamma = 1$).

W porównaniu do krzywej referencyjnej dla samego agonisty ($[B] = 0$), wykresy krzywych otrzymanych w obecności B charakteryzują się położeniem dolnej krawędzi krzywej (*bottom* – lewa asymptota) poniżej odpowiedzi podstawowej receptora ($\beta < 1$) i dodatkowo dla: $\delta = 1$ przesunięciem w dół całej krzywej (obniżenie górnej krawędzi); dla $\delta = 10^2$ przesunięciem zarówno w lewo, jak i w górę (ligand A charakteryzuje się wówczas wyższą siłą działania i skutecznością); gdy $\delta = 10^{-1}$, następuje prawie całkowita blokada efektu receptorowego; dla bardzo niskich wartości δ (na przykład $\delta = 10^{-3}$) górna krawędź krzywej (prawa asymptota) spada poniżej dolnej krawędzi (lewej asymptoty), a więc efekt spowodowany obecnością zarówno A, jak i B, jest niższy niż wtedy, gdy z receptorem oddziałuje tylko B [48].

1.4.7 Model typu „bell-shape”

Wśród teoretycznych modeli opisujących oddziaływania allosteryczne ligand-receptor na uwagę zasługuje także równanie wyprowadzone dla sytuacji, w której modulator może wiązać się zarówno z ortosterycznym jak i allosterycznym miejscem w receptorze [58, 59]. Tego typu przypadek, został nazwany modelem „bell-shape”, od obserwowanego podczas analizy wyników eksperymentalnych, charakterystycznego przebiegu krzywej zależności stężenie-efekt. Na rysunku 10 przedstawiono schemat modelu (A) oraz

przykładowy wykres (B) wskazujący na wzrost (wyrażna „górką”) i hamowanie wiązania ortosterycznego radioliganda przez odpowiednio niskie i wysokie stężenia modulatora [56].



Rysunek 10. Schemat równań (A) oraz wykres (B) modelu typu „bell-shape” [1].

W powyższym modelu: [A] to stężenie ortosterycznego radioliganda A; [B] to stężenie liganda B, który wiąże się zarówno do miejsca ortosterycznego receptora oznaczonego indeksem dolnym 1, jak i allosterycznego oznaczonego indeksem 2; K_A jest stałą dysocjacji ortosterycznego radioliganda, K_{B1} i K_{B2} oznaczają stałe równowagi dysocjacji dla odpowiednich miejsc wiązania liganda B; współczynnik α mierzy kooperatywność między wiązaniem do receptora ligandów A i B; współczynnik β określa kooperatywność oddziaływania liganda B w dwóch miejscach receptora.

Fracja receptorów związanych z ligandem ortosterycznym A (*ang. fractional occupancy*) w stanie równowagi jest zdefiniowana wzorem (równanie 20):

$$\rho_A = \frac{\frac{[A]}{K_A} \left(1 + \frac{\alpha[B]}{K_{B2}}\right)}{\frac{[A]}{K_A} \left(1 + \frac{\alpha[B]}{K_{B2}}\right) + \left[1 + \frac{[B]}{K_{B1}} + \frac{[B]}{K_{B2}} \left(1 + \frac{\beta[B]}{K_{B1}}\right)\right]} \quad \text{Równanie 20}$$

Model typu „bell-shape” znajduje zastosowanie do charakterystyki związków wykazujących mieszany ortosteryczno/allosteryczny mechanizm działania [1] i równanie 20 zostało użyte do ilościowej oceny aktywności jonów cynku wobec receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A}, co jest przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej. Tym niemniej trzeba zaznaczyć, że w literaturze przedmiotu nieczęsto spotyka się analizę wyników eksperymentalnych opartą na tym modelu.

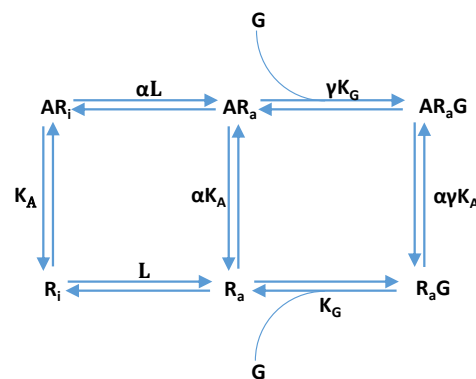
1.4.8 Modele uwzględniające interakcje białka G z receptorem

Receptory GPCR, których funkcja związana jest z przyłączeniem białka G, stanowią grupę endogennie allosterycznych protein. Stąd też modele mechanizmów działania GPCR powinny oprócz interakcji z ligandami orto- i allosterycznymi uwzględniać także

wiązanie z białkiem G. Najprostszym modelem ujmującym ten proces jest omówiony już wyżej ATCM oraz jego rozszerzenie (*ang. extended ternary complex model – ETCM*) [60], w którym dodatkowo przewidziano aktywność konstytutywną receptora. W odpowiedzi na różnorodność efektów wywoływanych przez modulatory GPCR, dalszy rozwój doprowadził do opracowania allosterycznego modelu poczwórnego kompleksu (*ang. quaternary complex model – QCM of receptor allosterysm*) [1].

1.4.8.1 Rozszerzony model potrójnego kompleksu (ETCM)

Rozszerzony model potrójnego kompleksu (Rysunek 11), dający możliwość oznaczenia aktywności odwrotnych agonistów, został opublikowany w 1989 roku przez Costę i Herza [60, 61].



Rysunek 11. Schemat rozszerzonego potrójnego kompleksu [62].

Według tego modelu receptor może istnieć zarówno w stanie aktywnym (R_a) jak i nieaktywnym (R_i) a ligand (A) może oddziaływać z obiema formami. Z kolei białko G wiąże się tylko do stanów aktywnych receptora tj. do wolnego i związanego z ligandem. Parametry: K_A , K_G , są zdefiniowane tak jak w modelu TCM; stała $L = [R_a] / [R_i]$ opisuje skłonność receptora do spontanicznego przechodzenia w stan aktywny; stała α definiuje różnicę pomiędzy aktywnością agonisty (A) do receptora w stanie aktywnym R_a w odniesieniu do powinowactwa do receptora nieaktywnego R_i , np. $\alpha = 5$ oznacza, że ligand A ma 5-krotnie wyższe powinowactwo do R_a niż do R_i ; stała β definiuje różne powinowactwo receptora w stanie aktywnym do białka G; stała γ definiuje powinowactwo receptora związanego z ligandem do białka G w stosunku do powinowactwa receptora niezwiązanego z ligandem, np. $\gamma = 20$ oznacza, że kompleks ligand-receptor ma 20-krotnie wyższe powinowactwo do białka G niż wolny receptor.

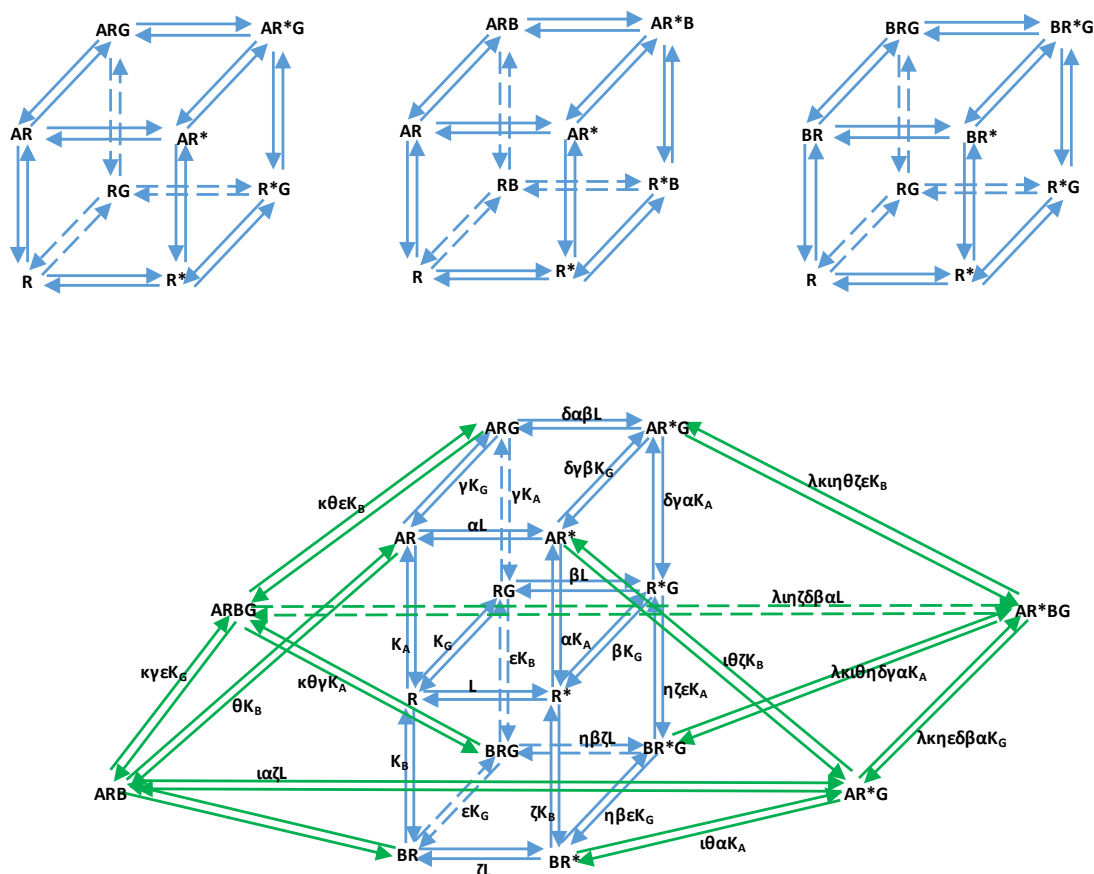
Frakcja receptorów zdolnych produkować odpowiedź biologiczną (tj. kompleksy: AR_aG i R_aG) jest oznaczona jako $\rho = \frac{[AR_aG] + [R_aG]}{R_T}$ i może być wyliczona z równania 21:

$$\rho = \frac{L[G]K_G(1 + \frac{\alpha\gamma[A]}{K_A})}{\frac{[A]}{K_A[1 + \alpha L(1 + \frac{\gamma[G]}{K_G})]} + L(1 + \frac{[G]}{K_G}) + 1}$$

W tym równaniu K_A oznacza stałą równowagi dysocjacji ligand-receptor, a K_G stałą równowagi dysocjacji receptor-białko G [8].

1.4.8.2 Model poczwórnego kompleksu (QCM)

Model poczwórnego kompleksu (ang. *quaternary complex model* – QCM) (Rysunek 12) zakłada tworzenie kompleksów przez ligand ortosteryczny, modulator allosteryczny i białko G z receptorem, który występuje zarówno w konformacji aktywnej (AR*BG) jak i nieaktywnej (ARBG) [1].



Rysunek 12. Schemat modelu QCM [1].

Skomplikowany schemat reakcji jest zdeterminowany aż przez 15 różnych parametrów (definicje podane w tabeli 3) i szczegółowy opis zachowania modelu wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Dla porządku przedstawiono poniżej końcowe równanie dla

frakcji receptorów związanych z ligandem ortosterycznym A (*ang. fractional occupancy*) w obecności modulatora B (Równanie 22) [1]:

$$\rho_A = \frac{\frac{[A]}{K_A} \left(1 + \alpha L + \frac{\theta[B]}{K_B} (1 + \iota \alpha \zeta) + \frac{\gamma[G]}{K_G} (1 + \delta \alpha \beta L + \frac{\kappa \varepsilon \theta [B]}{K_B} (1 + \lambda \eta \delta \beta \alpha \zeta L) \right)}{1 + L + \frac{[B]}{K_B} (1 + \zeta L) + \frac{[G]}{K_G} \left(1 + \beta L + \frac{\varepsilon [B]}{K_B} (1 + \eta \beta \zeta L) \right) + \frac{[A]}{K_A} \left(1 + \alpha L + \frac{\theta [B]}{K_B} (1 + \alpha \zeta L) + \frac{\gamma [G]}{K_G} (1 + \delta \alpha \beta L + \frac{\kappa \varepsilon \theta [B]}{K_B} (1 + \lambda \eta \delta \beta \alpha \zeta L) \right)}$$

Równanie 22

Tabela 3. Opis parametrów dla równania 22.

Parametr	Definicja parametrów przedstawionych na schemacie
L	Stała izomeracji receptora
K _A	Równowagowa stała asocjacji dla ortosterycznego liganda [A]
K _B	Równowagowa stała asocjacji dla allosterycznego modulatora [B]
K _G	Równowagowa stała asocjacji dla białka G [G]
A	Współczynnik kooperatywności [A] dla niezwiązanego receptora
B	Współczynnik kooperatywności [G] dla niezwiązanego receptora
Γ	Kooperatywność między wiązaniem [A] i [G]
Δ	Kooperatywność między aktywacją [A] i [G]
E	Kooperatywność między wiązaniem [B] i [G]
Z	Współczynnik kooperatywności [B] dla niezwiązanego receptora
H	Kooperatywność między aktywacją [B] i [G]
Θ	Kooperatywność między wiązaniem [A] i [B]
ι	Kooperatywność między aktywacją [A] i [B]
κ	Kooperatywność między wiązaniem [A], [B] i [G]
λ	Kooperatywność między aktywacją [A], [B] i [G]

Mimo, wyczerpującego opisu reakcji zachodzących podczas oddziaływania dwóch cząsteczek ligandów (ortosterycznego i allosterycznego) w receptorze GPCR, niezwykle złożony schemat równań modelu QCM nie jest możliwy do praktycznego zastosowania podczas analizy danych eksperymentalnych.

Różnorodność efektów modulacji allosterycznej jest powodem trudności w eksperymentalnej identyfikacji ligandów allosterycznych jak również wyzwaniem dla ilościowego ujęcia obserwowanych zmian. Zjawiska allosteryczne można wykryć stosując testy *in vitro* wiązania znakowanego liganda (radioliganda) oraz testy funkcjonalne na żywych tkankach lub na liniach komórkowych. Ponieważ efekty modulacji allosterycznej są subtelne i mogą charakteryzować się odmiennymi kierunkami kooperatywności, dlatego oprócz stosowania różnych metod eksperymentalnych istotny jest wybór odpowiedniego modelu do analizy wyników [1].

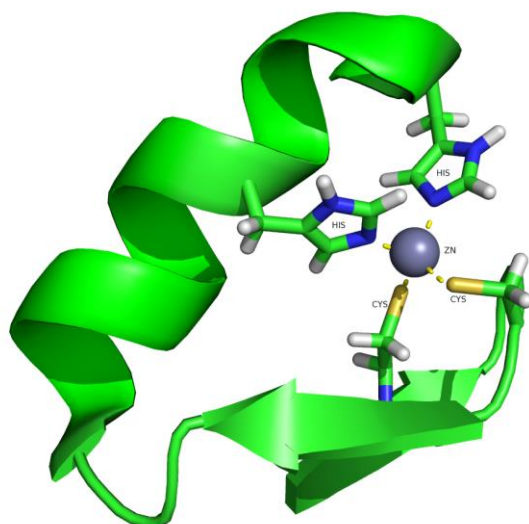
1.5 Cynk, występowanie i rola w OUN

Wśród endogennych substancji organizmu ludzkiego, w których działaniu ujawniają się cechy modulacji allosterycznej, jony cynku zajmują ważne miejsce. Szacuje się, że około 10% wszystkich białek zawiera cynk, co oznacza, że w sposób bezpośredni lub pośredni bierze on udział w różnorodnych procesach komórkowych. Pełnione przez cynk funkcje, w najbardziej ogólny sposób można podzielić na katalityczne, strukturalne oraz regulacyjne [63, 64]. Cynk jest metalem niezbędnym dla aktywności wszystkich klas enzymów i zasadniczym składnikiem około ponad 300 białek enzymatycznych. Jest także istotnym elementem protein zaliczanych do czynników transkrypcyjnych, kontrolujących ekspresję genów. Oprócz roli elementu strukturalnego, cynk uwalniany wewnątrzkomórkowo lub w otoczeniu zewnątrzkomórkowym, uczestniczy w przekazywaniu sygnału. Wewnątrz komórki, jony cynku wpływają na szlaki sygnalizacyjne, które kontrolują proliferację, różnicowanie i apoptozę, a działając jako mediator międzykomórkowy mają szczególne znaczenie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), gdzie pełnią funkcję jednego z neuroprzekazników [63–66].

Biorąc pod uwagę szerokie działanie cynku, nic dziwnego, że jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmu. Zaburzenia mechanizmów regulujących komórkową homeostazę cynku, zaliczane są do czynników leżących u podłoża wielu chorób: immunologicznych, nowotworowych, zwyrodnieniowych czy nieprawidłowości pojawiających się w czasie wzrostu i rozwoju organizmu (jak np. zahamowanie wzrostu i dojrzewania płciowego). Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się wpływowi cynku na choroby OUN, gdyż jego nieprawidłowy metabolizm może być jedną z przyczyn zaburzeń psychicznych, neurosensorycznych i procesów zwyrodnieniowych [65–69]. Złożony mechanizm działania cynku, obejmujący zarówno jego potencjalny wpływ neurotoksyczny jak i neuroprotekcyny pozostaje jednak w dużej mierze niewyjaśniony [68, 69].

Badania nad biologiczną rolą cynku rozpoczęły się w 2. połowie XIX w., kiedy Jules Raulin odkrył jego istotne znaczenie dla rozwoju grzyba *Aspergillus Niger*. Endogenna obecność tego pierwiastka w ludzkich tkankach, wskazująca na zaangażowanie w procesy fizjologiczne, została wykryta w latach 20. ubiegłego wieku. Wyniki badań biochemicznych opublikowanych w 1939 roku, pozwoliły na określenie stechiometrycznej ilości jonów cynku w erytrocytach oraz ich udziału w aktywności enzymatycznej. Rozwój metod analitycznych związanych z izolacją białek i pomiarem

zawartości metali w materiale biologicznym umożliwił odkrycie kolejnych protein zawierających cynk, wśród wszystkich klasach enzymów (oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, izomerazy, ligazy, itp.) [63]. Dużym postępowaniem w badaniach, była identyfikacja małych domen białkowych zawierających aminokwasy, których łańcuchy boczne umożliwiały tworzenie koordynacyjnego wiązania jonów metalu. Domeny te, po raz pierwszy zostały zaobserwowane w 1985 r. jako motyw w genie TFIIIA (*ang. transcription factor IIIA*), kodującym czynnik transkrypcyjny żaby szponiastej (*Xenopus laevis*). Charakterystyczną cechą ich struktury jest występowanie w określonej kolejności cystein i histydyn (ich reszty aminokwasowe mają zdolność kompleksowania kationów cynku) rozdzielonych aminokwasami niekompleksującymi. Taka sekwencja powoduje, że domeny stabilizowane jonami cynku, przyjmują określony trójwymiarowy kształt, od którego pochodzi nazwa: „palce cynkowe” [63, 70, 71]. Wchodzą one w skład białek wiążących DNA i biorą udział w związaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko. Ze względu na konfigurację reszt cysteiny i histydyny, w rodzinie palców cynkowych wyróżnia się dziesięć klas, z których najczęściej występujący motyw zawierający dwie cysteiny i dwie histydyny (C_2H_2), wiąże jon cynku (Zn^{2+}) tetraedrycznym wiązaniem koordynacyjnym. Inne, często spotykane sekwencje aminokwasów obejmują: cztery cysteiny (C_4), trzy cysteiny i jedną histydynę (C_3H) jak też asparaginian i trzy histydyny (DH_3) [70, 71]. Szacuje się, że w ludzkim genomie znajduje się ponad 900 genów kodujących czynniki z motywem palców cynkowych [70, 71].



Rysunek 13. Trójwymiarowa struktura pojedynczego palca cynkowego (PDB ID: 1ZNF). Obraz wygenerowany przy użyciu programu The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

Występują one w wielu czynnikach transkrypcyjnych, jak np.: hormonów tarczycy, kwasu retinowego czy jądrowych receptorów hormonów sterydowych. Do struktur białkowych zdolnych do wiązania cynku zaliczane są także motyw potrójnej szczeliny (*ang. Treble Cleft Motif*), wstażki cynkowej, oraz niskocząsteczkowe metalotioneiny zawierające liczne reszty cysteiny (~ 20) [70, 71]. Ostanie z wymienionych białek, dzięki możliwości przyłączenia wielu jonów metalu jednocześnie, odgrywają rolę w detoksykacji organizmu i uczestniczą w reakcji obronnej związanej ze stresem oksydacyjnym. Metalotioneiny biorą również udział w transporcie cynku, odpowiadając za utrzymanie względnie stałego stężenia cynku, zarówno wewnątrz komórek, jak i w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych.

Przepływ jonów regulowany jest także przez dwie inne rodziny białek: błonowe transportery ZnT (*ang. Zinc Transporters*) i proteiny transporterów regulowanych cynkiem i żelazem Zip (*ang. Zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like proteins*). Ich działanie jest przeciwstawne – transportery ZnT powodują obniżenie puli cynku w cytozolu, przemieszczając go poza komórkę i do organeli wewnątrzkomórkowych, natomiast białka Zip zwiększają zawartość cynku w cytoplazmie komórki, transportując go z zewnątrz [69, 72].

Oprócz połączeń z białkami, cynk występuje w organizmie w postaci wolnych, dwuwartościowych jonów. Zmiany w stężeniu cynku w przestrzeniach wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych są, jak już wspomniano, związane z jego funkcją sygnalizacyjną. Dopiero stosunkowo niedawno zajęto się wyjaśnieniem mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tej sygnalizacji oraz rolę jaką odgrywają w różnorodnych procesach fizjologicznych i patologicznych [65, 66, 73].

Pierwsze wyniki badań, prowadzonych w tym kierunku, charakteryzowały komórki trzustki [74]. Cynk wraz z proenzymami trawiennymi jest obecny w pęcherzykach wydzielniczych trzustki, a jego funkcja sygnalizacyjna polega na przekazywaniu sygnałów o obecności insuliny, wydzielaniu glukagonu oraz trzustkowych egzoenzymów. Niedobór jak i nadmiar cynku w organizmie powoduje obniżenie ilości enzymów trawiennych. Obecnie wiadomo, że poza trzustką, komórki wydzielające cynk znajdują się także w innych organach, m.in.: w gruczole ślinowym, w nabłonku gruczołu krokowego, w jelicie [75, 76]. Zaliczają się do nich także komórki tuczne, trzy typy granulocytów, komórki przysadki mózgowej i neurony OUN [76–78]. W ostatnich latach, główne zainteresowanie neurobiologów cynkiem, skupia się na jego funkcji sygnałowej w OUN [65, 77, 78].

Większość cynku w mózgu jest ściśle związana z enzymami i innymi białkami (np. czynniki transkrypcyjne i metalotioneiny), a około 10% występuje w postaci wolnych jonów, które znajdują się w pęcherzykach presynaptycznych określonego rodzaju neuronów. Neurony te uwalniają również glutaminian, stąd też do ich opisu stosuje się często nazwę „neurony gluzinergiczne” [79, 80]. Występują one w strukturach kory mózgowej oraz układu limbicznego, odpowiedzialnych za odbieranie i przetwarzanie wrażeń zmysłowych (węch, smak, słuch, widzenie, odczuwanie bólu), zarządzanie emocjami oraz uczenie się i pamięć [79, 80].

Podstawową funkcją wolnego cynku znajdującego się w pęcherzykach synaptycznych, wydaje się być modulacja wielu receptorów postsynaptycznych. Po pobudzeniu neuronu cynk razem z neuroprzekaźnikiem uwalniany jest do szczeliny synaptycznej, gdzie wiąże się ze specyficznymi miejscami na neuronach postsynaptycznych. Wpływając na aktywność receptorów glutamatergicznych, receptorów GABA i wielu innych zlokalizowanych postsynaptycznie białek receptorowych, moduluje ogólną pobudliwość mózgu (Tabela 4) [66]. Tak wielowątkowe działanie wskazuje na złożony mechanizm działania cynku i udział w patogenezie różnych procesów OUN [66, 67, 77].

Brak cynku zaburza syntezę DNA, RNA i białek, co podczas rozwoju mózgu przyczynia się do powstawania wad układu nerwowego. Niewystarczający poziom u dzieci wiąże się z obniżoną zdolnością uczenia się, apatią i opóźnieniem umysłowym. Zakłócenie homeostazy cynku w mózgu może prowadzić do rozwoju zaburzeń nastroju, takich jak depresja i lęki oraz do neurodegeneracji i otępienia obserwowanych w chorobie Alzheimera [67, 77, 81]. Ostatnio wskazuje się także na zależność procesów neurogenezy postnatalnej od cynku, co ma znaczenie dla funkcji hipokampa, w tym uczenia się i pamięci oraz kontrolowania emocji i nastroju [82–86].

Tabela 4. Białka receptorowe oddziałujące z cynkiem w ośrodkowym układzie nerwowym.

Specyficzne białko	Główny efekt cynku	Literatura
Receptory glutaminianu		
AMPA	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[87]
NMDA	Toniczne zmniejszenie liczby receptorów	[88, 89]
Metabotropowe	Zmniejszenie liczby receptorów	[90]
Inne receptory		
GABA _A	Przeważnie zmniejszenie liczby receptorów	[91, 92]
GABA _B	Naśladowczy, Zmniejszenie liczby receptorów	[93]
Glicyny	Zwiększenie liczby receptorów	[94]

Sigma 2	Naśladowczy	[95, 96]
Acetylocholino	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[97]
Adenozyne	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[98]
Serotoniny	Zmniejszenie liczby receptorów	[99]
Dopaminy	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[100, 101]
Katecholaminy	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[102]
Melanokortyny	Zwiększenie liczby receptorów	[103]
Receptor cynku	Mobilizuje wewnątrzkomórkowy Ca^{2+}	[104]
Receptor pobudzany protonem	Synergizm cynk- proton	[105]
Opioidowe	Zmniejszenie liczby receptorów	[106]
Kanały		
Ca^{2+}	Blokowanie, hamowanie	[107]
K^{+}	Zwiększenie i zmniejszenie liczby receptorów	[108]
Na^{+}	Rozbieżne wyniki	[109, 110]
Cl^{-}	Stymuluje	[111]
Ca^{2+} - amyloid	Blokowanie	[112]
Transportery		
Glutaminianu	Zmniejszanie wychwytu	[113, 114]
Dopaminy	Zmniejszanie wychwytu	[115, 116]

Użyte skróty: AMPA, kwas α -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-izoksazolo-propionowy; $GABA_A/GABA_B$, kwas γ -aminomasłowy typu A/B; NMDA, kwas N-metylo-D-asparaginowy.

Oprócz wymienionych w tabeli 4 proponowanych punktów uchwytu cynku w OUN, istotną rolę odgrywa, należące do podrodziny greliny, białko GPR39 [117]. Cynk swoiście aktywuje receptor GPR39 i jest uznawany za jego endogenne agoniste. Wysoka ekspresja tego receptora, (oprócz układu pokarmowego) została odkryta w OUN, a głównie w korze frontalnej, hipokampie i w ciele migdałowatym, tj. strukturach mózgowych związanych z emocjami. Badania przeprowadzone na myszach i szczurach pokazały, że brak cynku powoduje znaczne obniżenie gęstości GPR39 w OUN; podobną zmianę zaobserwowano także u samobójców [118]. Co więcej, wyraźne zachowania depresyjne i lękowe przejawiają myszy pozbawione GPR39 [119], wskazując na rolę tego receptora w depresji. W dalszych badaniach zwrócono także uwagę na powiązania pomiędzy aktywacją przez cynk receptora GPR39, a sygnalizacją glutamatergiczną i monoaminergiczną [120], których zaburzenia przyczyniają się do rozwoju objawów choroby.

Z drugiej strony, o przeciwdepresyjnych własnościach cynku świadczą wyniki badań przedklinicznych prowadzonych z zastosowaniem modeli zwierzęcych: wymuszonego

plywania i zawieszenia za ogon u myszy i szczurów, usunięcia opuszek węchowych i modelach łagodnego oraz chronicznego stresu u szczurów [121–124].

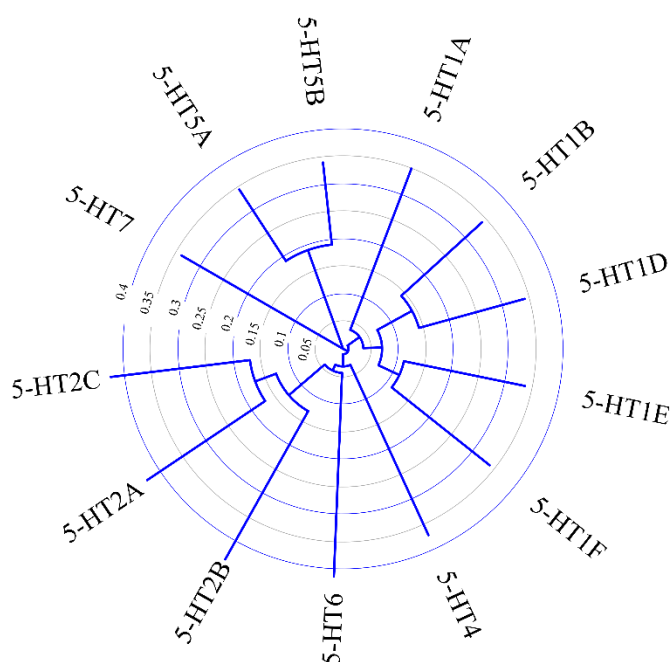
Podsumowując, przeciwdepresyjne własności cynku zostały dobrze udokumentowane w licznych publikacjach, jednak mechanizmy leżące u podstaw tego działania, w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnione. Oprócz bezpośredniej interakcji z receptorem GPR39, który jest ostatnio sugerowany jako nowy cel w terapii depresji, wskazuje się także na rolę układu serotoninowego [125–127]. Badania modulacji funkcji receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przeprowadzone w toku niniejszej pracy doktorskiej wpisują się w tę tematykę.

1.6 Receptory serotoninowe, ogólna charakterystyka i rola w OUN

Serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) jest aminą biogenną, która pełni funkcję hormonu tkankowego i chemicznego neuroprzekaźnika w OUN [128]. Po raz pierwszy wykryta w jelitach w 1937 roku została początkowo nazwana enteraminą. Z surowicy krwi wyizolowano ją w 1948 roku jako substancję zwięzającą naczynia krwionośne. Rok później określono jej strukturę chemiczną, a na początku lat 50. XX. wieku zidentyfikowano w mózgu ssaków jak też ustalono tożsamość z enteraminą [128]. Wtedy także pojawiły się pierwsze sugestie, że serotonina jest chemicznym przekaźnikiem sygnałów pomiędzy neuronami. Pogląd ten został w pełni zaakceptowany dopiero w połowie lat siedemdziesiątych, kiedy zaliczono ją do podstawowych neuroprzekaźników OUN. Serotonina powstaje z tryptofanu w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, w komórkach ścian przewodu pokarmowego i w komórkach tucznych. Nie mając jednak zdolności przenikania bariery krew-mózg, tworzy względnie niezależne od siebie układy: obwodowy i ośrodkowy [128].

Układ, w którym serotonina jest przekaźnikiem neuronalnym należy do najstarszych ewolucyjnie systemów neurotransmisyjnych. Receptory serotoninowe wykształciły się w organizmach eukariotycznych około 700 – 800 milionów lat temu, a ich zróżnicowanie na poszczególne typy nastąpiło znacznie wcześniej niż w układach: adrenergicznym dopaminergicznym czy cholinergicznym [129]. Obowiązująca klasyfikacja rodziny receptorów serotoninowych na 7 typów głównych (5-HT₁–5-HT₇) i 14 podtypów, została przeprowadzona w oparciu o trzy główne kryteria: (1) pierwotną sekwencję aminokwasową, (2) rodzaj uruchamianej ścieżki sygnałowej i (3) profil farmakologiczny. Z wyjątkiem receptora 5-HT₃ (który jest kanałem jonowym) wszystkie pozostałe typy

należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G-protein-coupled receptors – GPCR*) (Rysunek 14) [130, 131].



Rysunek 14. Drzewo filogenetyczne receptorów serotoninowych (wszystkie z wyjątkiem szczerzego 5-HT_{5B} pochodzą od człowieka) wykonane za pomocą aplikacji Tree Of Life v3.4.3 [132].

W ciągu 70 lat badań nad układem serotonergicznym ustalono, że serotonina w organizmie reguluje wiele funkcji fizjologicznych takich jak: krążenie krwi, pracę serca [133], sen [134, 135], stany emocjonalne [135, 136], pamięć [137], ból [138], zachowania seksualne [139] i pobieranie pokarmu [140]. Poszerzona została także wiedza o roli receptorów 5-HT w powstawaniu różnych procesów patologicznych OUN: depresji [135, 141], schizofrenii [142] lęku [135], migreny [139], zaburzeń: łaknienia [140, 143], snu [135, 144, 145], funkcji poznawczych, uczenia się i konsolidacji pamięci [146]. Wyniki prowadzonych prac wniosły ponadto znaczny wkład w opracowanie leków o działaniu przeciwdepresyjnym (inhibitory wychwytu serotoniny – fluoksetyna, paroksetyna, sertralina), przeciwlękowym (buspiron, tandospiron), przeciwmigrenowym (sumatryptan), jak też przeciwpsychotycznym (tzw. atypowe antypsychotyki – ziprasidon i risperidon) [147].

Złożoność neurotransmisji serotoninowej, (zróżnicowanie receptorów 5-HT i wzajemne powiązania między poszczególnymi typami i podtypami receptorów 5-HT oraz białkami receptorowymi innych systemów neuroprzebieżnikowych), funkcjonującej w szeroko rozproszonej, docierającej do prawie każdej struktury mózgu sieci neuronalnej,

powoduje, że na poziomie molekularnym fizjologiczne i patologiczne mechanizmy pozostają jednak w dużej mierze niewyjaśnione.

W niniejszej rozprawie doktorskiej badano wpływ jonów cynku na receptory serotoninowe 5-HT_{1A} i 5-HT₇, między którymi istnieją podobieństwa i powiązania funkcjonalne, przejawiające się w szczególności współwystępowaniem w strukturach mózgu, zaangażowanych w kontrolę nastroju, funkcji poznawczych i pamięć, oraz współdziałaniem w efektach terapeutycznych leków psychotropowych [148–150].

1.6.1 Receptory 5-HT_{1A}, związek z depresją i mechanizmem przeciwdepresyjnego działania cynku

Wśród receptorów rodziny 5-HT, najlepiej przebadany pod kątem biologicznych podstaw zaburzeń neuropsychiatrycznych jest typ 5-HT_{1A}. Receptor ten będąc związany z białkiem G_i hamuje aktywność cykazy adenylanowej i zmniejsza stężenie cAMP w komórce [151].

Zaburzenia jego funkcji są związane z takimi chorobami jak depresja, stany lękowe, choroba Parkinsona, schizofrenia czy choroba Alzheimera [152, 153]. W OUN występują dwie populacje receptorów 5-HT_{1A}: presynaptyczne autoreceptory znajdujące się głównie w jadrach szwu pnia mózgu, oraz postsynaptyczne heteroreceptory, najliczniejsze w korze mózgowej i strukturach układu limbicznego (hipokamp, przegroda boczna, ciało migdałowate). Poza neuronami, receptory 5-HT_{1A} rozmieszczone są również na astrocytach i innych komórkach glejowych [154].

Aktywacja postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A} w obszarach korowo-limbicznych prowadzi do zwiększenia, przekaźnictwa serotonergicznego, korzystnego dla działania leków przeciwdepresyjnych. Przeciwnie efekty wywołuje pobudzenie autoreceptorów, bowiem hamowanie sekrecji endogennej serotoniny do przestrzeni synaptycznej osłabia aktywność neurotransmisji serotoninowej [155].

Rola receptora 5-HT_{1A} w zaburzeniach depresyjnych została udowodniona w licznych badaniach. Wskazuje na to przede wszystkim mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych, które pośrednio (jak np. selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny – SSRI) lub bezpośrednio (wortiooksetyna, wilazodon) wpływają na aktywność receptorów 5-HT_{1A} [155–158]. W efekcie przyjmowania leków przeciwdepresyjnych następuje wzrost aktywności receptorów postsynaptycznych oraz spadek presynaptycznych [159, 160]. Obserwacje te potwierdzają badania *post mortem*, struktury hipokampa mózgu, pobranego od zmarłych ze zdiagnozowaną depresją,

w których wykryto zmniejszoną gęstość receptorów 5-HT_{1A} [159]. Podobne wyniki otrzymano dla pacjentów z czynną ostrą postacią choroby, za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej PET (*ang. positron emission tomography*) [160, 161]. Z kolei w mózgach samobójców z objawami depresji, stwierdzono zwiększoną ilość autoreceptorów 5-HT_{1A} w obszarze jąder szwu pnia mózgu. Dodatkowych dowodów na rolę receptorów 5-HT_{1A} w zaburzeniach nastroju dostarczają wyniki eksperymentów na zwierzętach transgenicznym wskazujące, że zachowanie myszy pozbawionych genu odpowiedzialnego za ekspresję receptora 5-HT_{1A} charakteryzuje podwyższony poziom lęku i brak odpowiedzi na podanie leków z grupy SSRI [162].

Należy także wspomnieć, o zaangażowaniu neurotransmisji serotonergicznej oraz receptora 5-HT_{1A} w przeciwdepresyjne działanie cynku. Wskazują na to wyniki wielu badań prowadzonych w Instytucie Farmakologii PAN, a w szczególności:

- zwiększenie gęstości receptorów 5-HT_{1A} w hipokampie szczurów po chronicznych (14 dni) podaniach cynku [127];
- blokada przeciwdepresyjnego efektu cynku w teście wymuszonego pływania (*ang. forced swimming test*) FST po podaniu selektywnego antagonisty receptora 5-HT_{1A} – związku WAY-100635 [123];
- nasilenie działania leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI w teście FST w wyniku wspólnych podań z cynkiem, które jest blokowane przez związek hamujący syntezę serotoniny – p-chlorofenyloalaninę [127, 163].

Rezultaty zacytowanych prac sugerują, że cynk może wpływać na transmisję serotonergiczną poprzez modulowanie funkcji receptora 5-HT_{1A}. Przemawia za tym także, mechanizm allosterycznej regulacji receptora 5-HT_{1A} zaobserwowany w testach *in vitro* (część wyników przedstawiono w niniejszej dysertacji), na podstawie których przeprowadzono ocenę bezpośredniego wpływ jonów cynku na aktywność receptorów 5-HT_{1A} [18, 164].

1.6.2 Receptory 5-HT₇, potencjalna rola w terapii zaburzeń OUN

Receptor 5-HT₇ jest ostatnim typem, który zaklasyfikowano do rodziny receptorów serotoninowych. Został odkryty przez kilka niezależnych zespołów naukowych, które w 1993 roku niemal jednocześnie opublikowały wyniki swoich prac [165–167]. Na poziomie molekularnym receptor 5-HT₇ jest związany z białkiem G_s, którego stymulacja prowadzi do aktywowania cyklazy adenylowej katalizującej powstawanie cyklicznego

AMP (cAMP). Wykazano także, że aktywacja receptora może dodatkowo uruchamiać szlak sygnalizacyjny białka G12 [168].

Receptor 5-HT₇ został wykryty w organizmie człowieka, świni oraz gryzoni: myszy, szczurów i świnek morskich [169]. W OUN występuje głównie w obrębie wzgórza, podwzgórza, hipokampa oraz pnia mózgu, a na obwodzie w naczyniach krwionośnych i jelitach [169, 170]. Lokalizacja w wymienionych regionach mózgu odzwierciedla jego rolę w kontrolowaniu różnorodnych funkcji, w tym głównie: rytmów okołodobowych, termoregulacji, nocycypcji, stanów emocjonalnych, związanych z pamięcią, nauką i plastycznością mózgu [169, 171–174]. Konsekwentnie, udział nieprawidłowej sygnalizacji za pośrednictwem receptora 5-HT₇ jest sugerowany w licznych procesach neuropatologicznych, wśród których na najczęściej wymieniane są: schizofrenia, lęk, depresja i zaburzenia funkcji poznawczych. W świetle opublikowanych wyników, istnieje wyraźny związek między regulacją receptora 5-HT₇, a terapeutyczną skutecznością leków przeciw-psychotycznych II generacji oraz przeciwdepresyjnych [172, 175], w których mechanizmie zaznacza się silne działanie antagonistyczne do tego receptora. Farmakologiczna, selektywna blokada receptora wpływa także na normalizację przesunięcia fazy rytmu aktywności lokomotorycznej myszy (wywołanego światłem lub podaniem agonisty receptora 5-HT_{1A}) [176], co ma istotne znaczenie w kontekście występującej w depresji desynchronizacji rytmu dobowego.

Licznych dowodów na zaangażowanie receptora 5-HT₇ w patomechanizm depresji dostarczają ponadto badania prowadzone na zwierzętach z wyłączonym genem 5-HT₇ [145, 177]. W testach behawioralnych służących do przewidywania aktywności przeciwdepresyjnej tj. : zawieszenia za ogon i FST, myszy genetycznie zmodyfikowane zachowywały się tak jak po podaniu leków przeciwdepresyjnych, natomiast po podaniu antagonistów receptora 5-HT₇ zmiany w reakcji zwierząt obserwowano w zależności od fazy rytmu dobowego [145, 177].

W odniesieniu do zaburzeń przebiegających z dysfunkcją poznawczą występujących m.in.: w zaburzeniach spektrum autyzmu, zespole łamliwego chromosomu X i chorobie Alzheimera, interesujące wyniki uzyskano w badaniach wpływu regulacji receptora 5-HT₇ na mechanizm plastyczności synaptycznej. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że konsekwencją stymulacji receptora jest zmiana morfologii neuronów poprzez wydłużenie neurytów oraz wzrost liczby kolców i synaps dendrytycznych, co skutkuje wzmocnieniem pobudzenia synaptycznego [168, 178]. Specyficzność opisanych zmian została zweryfikowana w eksperymentach z użyciem

selektywnego antagonisty oraz myszy pozbawionych receptora 5-HT₇ [179]. Co więcej, opisywane badania wskazują, że receptor 5-HT₇ przyczynia się nie tylko do kształtowania obwodów neuronowych podczas wczesnego życia, ale także do przebudowy połączeń neuronalnych w dojrzałym mózgu. Zatem obserwacje te mają znaczenie dla zrozumienia i leczenia zaburzeń psychiatrycznych zarówno pochodzenia neurozwojowego (np. spektrum zaburzeń autyzmu) jak i innych charakteryzujących się występowaniem niedoborów poznawczych (schizofrenia i depresja) [179].

Odrębnym zagadnieniem, o którym jednak warto na koniec wspomnieć w kontekście tematu pracy doktorskiej, jest możliwość regulacji allosterycznej receptora 5-HT₇. Jak do tej pory, z wyjątkiem cynku, którego wpływ na aktywność receptora przedstawiono w niniejszej dysertacji, tylko działanie oleamidu zostało opisane jako allosteryczna modulacja receptora 5-HT₇ [15, 180]. Oleamid należy do grupy endogennych, amidowych lipidów występujących w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym u ssaków [181, 182] i jak wynika z opublikowanych badań, oprócz receptora 5-HT₇, moduluje allosterycznie także dwa inne podtypy 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A/2C} [16, 183]. W odniesieniu do receptorów 5-HT₇ wykazano, że oleamid aktywuje neurony 5-HT₇ we wzgórzu i podwzgórzu myszy [180], natomiast badany w testach *in vitro* wywołuje spadek powinowactwa [³H]5-HT do receptora 5-HT₇, nie zmieniając maksymalnego poziomu wiązania [15]. Wyniki te dowiodły, że receptor 5-HT₇ podlega regulacji allosterycznej i stanowiły przesłanki dla podjęcia badań w ramach mojej pracy doktorskiej.

2 IDEA I CEL PRACY

Tematyka badań przedstawionych w pracy doktorskiej jest związana z mechanizmami allosterycznej modulacji, uznawanej obecnie za uniwersalny proces regulacji białek należących do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR).

Ich celem była charakterystyka oddziaływań jonów cynku z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A} i 5-HT₇ pod względem ilościowej oceny obserwowanych zmian w aktywności receptorów zachodzących drogą modulacji allosterycznej.

Przesłankami do podjęcia tej tematyki były nieliczne przykłady interakcji tego typu zidentyfikowane w grupie metabotropowych receptorów serotoninowych. Obejmują one: działanie oleamidu na receptory 5-HT_{2A} i 5-HT₇ [15, 16], potęgujący aktywność receptora 5-HT_{2C} wpływ związku PNU-69176E [17] oraz modulację receptora 5-HT_{1A} przez jony cynku [18]. Ostatni z wymienionych przykładów, dotyczący allosterycznego hamowania przez jony cynku, aktywności selektywnych ligandów (antagonisty WAY-100638 i agonisty 8-OH-DPAT) do receptorów 5-HT_{1A}, stanowił punkt wyjścia badań podjętych w pracy doktorskiej. Otrzymane przez hiszpańskich badaczy wyniki [18] mimo, że wskazywały na bezpośredni wpływ modulujący jonów na receptory 5-HT_{1A}, były jednak częściowo sprzeczne z agonistyczno/antagonistycznym profilem działania cynku ujawnionym w testach charakteryzujących funkcjonalną aktywność receptorów 5-HT_{1A} *in vivo*, które wykonano w Instytucie Farmakologii PAN [164]. Zatem w celu wyjaśnienia tych nieścisłości, w ramach pracy doktorskiej zaplanowano znacznie szerszy (w stosunku do przedstawionych w omawianej pracy) zakres badań nad wpływem jonów cynku na aktywność agonistów do receptorów 5-HT_{1A}.

Biorąc pod uwagę wspólną lokalizację receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ w strukturach mózgu, oraz wspomniany wyżej fakt, że obecność allosterycznych miejsc wiążących dla endogennego oleamidu została wykazana w receptorach 5-HT₇, uznano za celowe sprawdzenie mechanizmu działania jonów cynku również w stosunku do tego typu receptorów.

W wyniku realizacji zaplanowanych badań, wyczerpująco scharakteryzowano sposoby oddziaływania jonów cynku z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇, i wskazano bezspornie na istnienie allosterycznych miejsc wiążących cynk w obu typach receptorów.

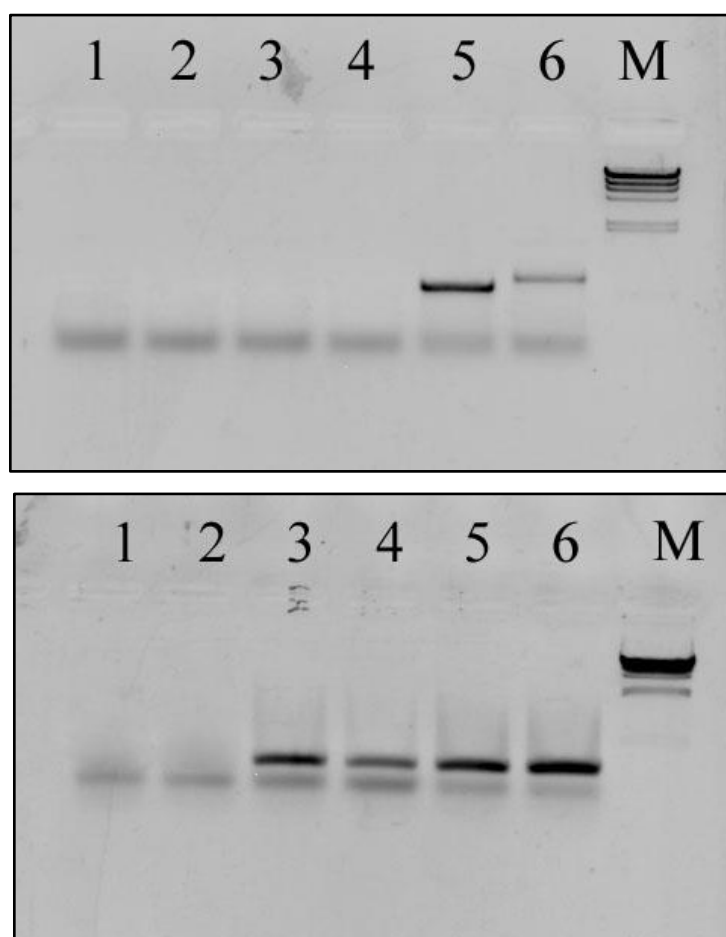
Uzyskana nowa wiedza przyczyni się do szerszego rozumienia zarówno roli cynku w ośrodkowym układzie nerwowym jak i mechanizmów modulacji allosterycznej w badanej grupie receptorów.

3 WYNIKI BADAŃ

3.1 Analiza ekspresji receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B} w linii HEK293

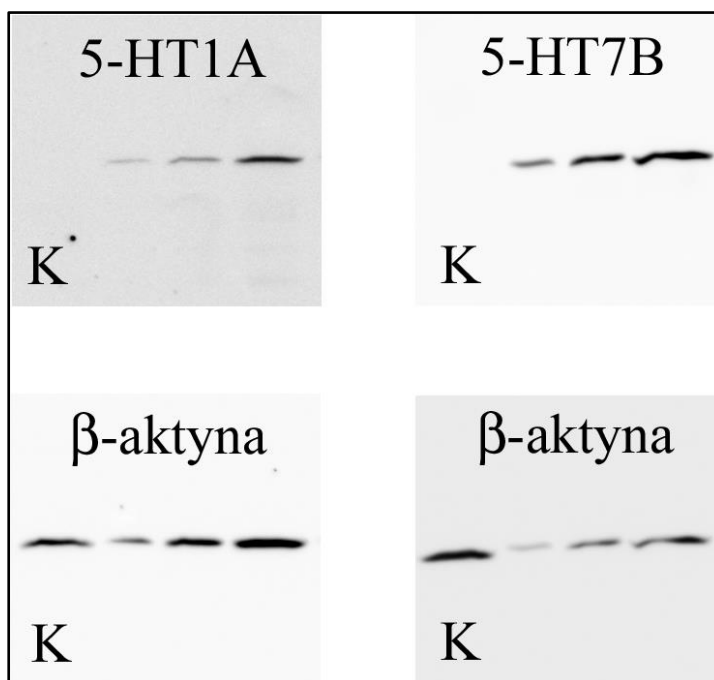
Eksperymenty *in vitro*, których wyniki zostały opisane i przedyskutowane w niniejszej rozprawie, wykonano przy użyciu linii embrionalnych komórek ludzkiej nerki HEK293 (*ang. Human Embryonic Kidney*) wykazujących stabilną nad-ekspresję białka ludzkich receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B}. Obie linie otrzymano w ZChL IF PAN.

Analiza produktów reakcji RT-PCR potwierdziła obecność mRNA ludzkich receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B} w komórkach macierzystej linii HEK293. Nie stwierdzono ekspresji mRNA wyżej wymienionych receptorów w komórkach nietransfekowanych.



Rysunek 15. Panel górny – przykładowa analiza ekspresji receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B} metodą RT-PCR w badanych liniach komórkowych HEK293. Ścieżki nieparzyste – rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z wykorzystaniem starterów dla 5-HT_{7B}; ścieżki parzyste – rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z wykorzystaniem starterów dla 5-HT_{1A}. Ścieżki 1 i 2 – bez matrycy cDNA (kontrola specyficzności starterów), 3 i 4 – cDNA uzyskane z nietransfekowanej linii HEK293 (kontrola negatywna), 5 i 6 – matryce cDNA uzyskane z transfekowanych linii. Panel dolny – przykładowa analiza ekspresji czynnika elongacyjnego EF-2 – reakcje kontrolne. Układ próbek w ścieżkach identyczny jak w panelu górnym. M – marker λ DNA.

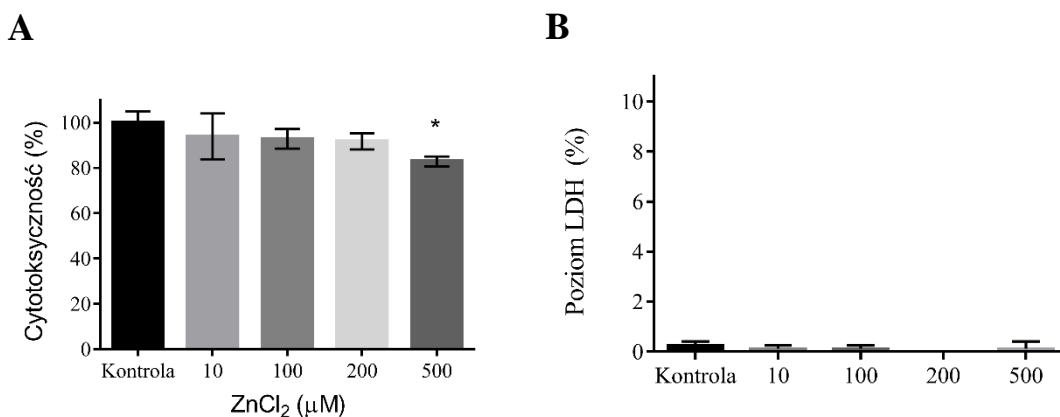
Ekspresję receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B} na poziomie białka, potwierdzono metodą Western Blot. W transfekowanych liniach komórkowych, w wyniku reakcji ze specyficznym przeciwciałem, stwierdzono obecność prążków na wysokości około 50 kDa. Nie zaobserwowano ekspresji tych białek receptorowych w nietransfekowanej linii HEK293.



Rysunek 16. Przykładowa analiza ekspresji receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B} metodą Western Blot w liniach HEK293. K – nietransfekowane komórki HEK293 (40 μg białka na ścieżkę) stanowiące kontrolę negatywną. Dla transfekowanych linii komórkowych nakładano trzy różne ilości białka na ścieżkę: 10, 20 i 40 μg.

3.2 Cytotoksyczne działanie jonów cynku na komórki HEK293

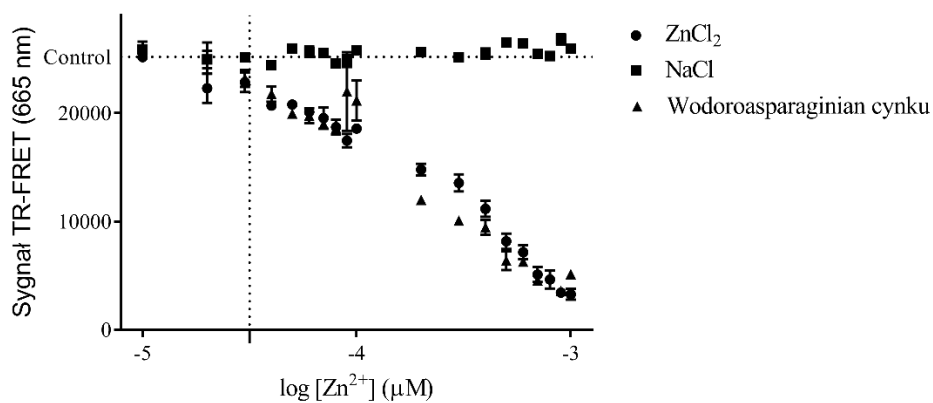
Ze względu na toksyczne działanie cynku wykrywane w wielu systemach komórkowych [184, 185], jego wpływ na żywotność i integralność błon komórek linii HEK293 zbadano w testach śmiertelności komórek wykorzystujących dehydrogenazę mleczanową (LDH) oraz żywotności komórek z wykorzystaniem soli tetrazolowej (MTT) (Rysunek 17). Stwierdzono, że jony cynku do stężenia 200 μM, nie miały wpływu na liczbę żywych komórek.



Rysunek 17. Cytotoksyczność cynku w komórkach HEK293 oceniano (A) za pomocą testu MTT oraz (B) uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Komórki traktowano stężeniami cynku w zakresie od 10 do 500 μM. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD (n = 3); *p < 0,05.

3.3 Oddziaływanie jonów cynku z odczynnikami zestawu LANCE Ultra cAMP

Ze względu na właściwości kompleksujące cynku, sprawdzono potencjalne oddziaływanie jonów Zn²⁺ ze związkami wchodzącymi w skład zestawu do wykrywania cAMP – LANCE Ultra cAMP (PerkinElmer), zastosowanego w testach funkcjonalnych (Rysunek 18).



Rysunek 18. Wpływ jonów cynku (w postaci dwóch soli) w roztworze roboczym PerkinElmer LANCE Ultra na znacznik Eu-cAMP i ULight anti-cAMP. Chlorek sodu zastosowano jako kontrolę testu.

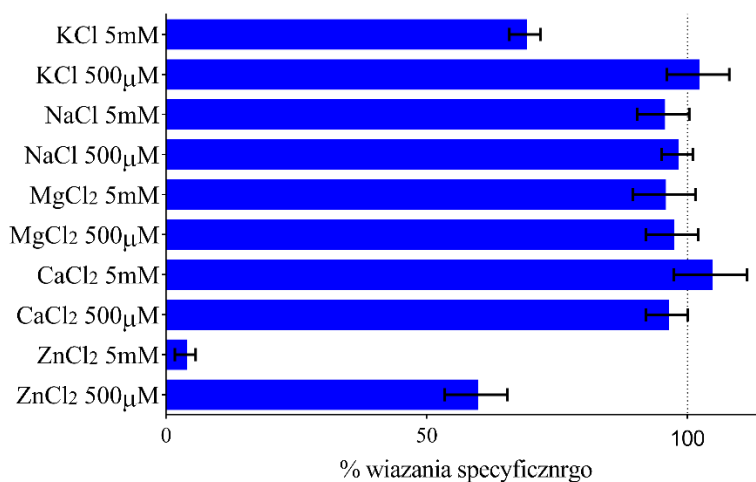
Zgodnie z notą aplikacyjną producenta, kationy metali ciężkich mogą tłumić fluorescencję [186]. W wyniku przeprowadzonego testu zaobserwowano, że jony Zn²⁺ w stężeniu większym niż 30 μM, negatywnie wpływają na sygnał fluorescencji i efekt ten występuje dla obu badanych soli cynku. Dlatego aby uniknąć zafałszowania

wyników, w eksperymentach funkcjonalnych, aktywność cykazy adenylowej badano tylko stężenia do 10 μM Zn^{2+} .

3.4 Ocena ilościowa wpływu jonów cynku na aktywność receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}

3.4.1 Wpływ wybranych jonów metali na wiązanie specyficznego radioliganda do receptorów 5-HT_{1A}

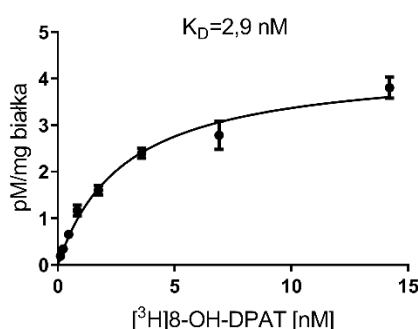
W pierwszym etapie badań sprawdzono czy jony cynku oddziałują na receptory serotoninowe 5-HT_{1A} w komórkach linii HEK293 oraz czy oddziaływanie jest specyficzne dla tych jonów. W tym celu określono poziom wiązania radioliganda [³H]8-OH-DPAT (który jest selektywnym, pełnym agonistą) do receptora 5-HT_{1A} w obecności dwóch stężeń (5 mM i 500 μM) wybranych, dwu i jednowartościowych jonów metali. Wyniki przedstawione na rysunku 19 pokazują, że w przypadku stężenia 5 mM, oprócz jonów cynku (powodujących 95% hamowania wiązania [³H]8-OH-DPAT) statystycznie znamiennej wpływ wywierały także jony potasu (ok. 30%); a dla stężenia 500 μM , największe hamowanie wiązania (o ok. 40%) było obserwowane tylko dla cynku, natomiast dla pozostałych jonów nie wykryto statystycznie istotnych różnic w stosunku do poziomu zarejestrowanego w próbkach kontroli (bez dodatku jonów metali).



Rysunek 19. Porównanie wpływu wybranych jonów metali na wiązanie specyficznego radioliganda [³H]8-OH-DPAT z receptorami 5-HT_{1A}, wyrażonego jako % wiązania specyficznego.

3.4.2 Oznaczenie parametrów wiązania [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}

W następnej kolejności, metodą analizy saturacyjnej, wyznaczono parametry wiązania radioliganda [³H]8-OH-DPAT do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} we frakcji błonowej komórek HEK293. Aby określić ilość tworzonego kompleksu użyto 8 stężeń radioliganda w zakresie 0,1 – 12,8 nM. Wyznaczona doświadczalnie wartość stałej dysocjacji $K_D = 2,9 \pm 0,1$ nM mieści się przedziale danych literaturowych (1 – 4,5 nM) [187], a gęstość receptorów B_{max} rzędu 4,5 pM/mg świadczy o nadekspresji białka receptorowego. Obie wartości przyjęto jako kontrolne w eksperymentach przeprowadzonych w obecności jonów cynku. Poniżej przedstawiono przykładową krzywą z trzech wykonanych niezależnych eksperymentów (Rysunek 20).

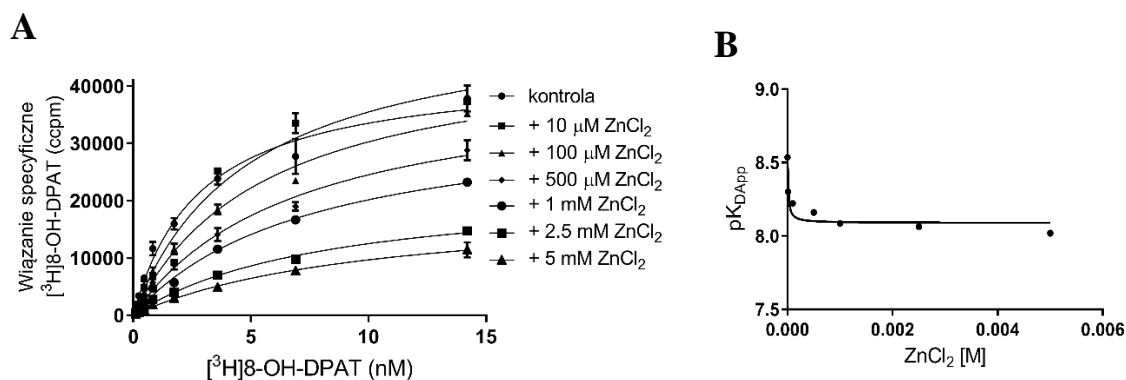


Rysunek 20. Krzywa saturacyjna receptora 5-HT_{1A} dla [³H]8-OH-DPAT.

3.4.3 Oznaczenie parametrów wiązania [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} w obecności jonów cynku

W serii eksperymentów saturacji badano wpływ sześciu rosnących stężeń jonów cynku (w zakresie od 10 μ M do 5 mM) na wiązanie radioliganda [³H]8-OH-DPAT. Krzywe saturacyjne dla wszystkich stężeń Zn^{2+} przedstawiono na rysunku 21A, a obliczone wartości K_D i B_{max} zamieszczono w tabeli 5. Porównanie otrzymanych wyników z wartością stałej dysocjacji wyznaczoną w doświadczeniu kontrolnym wskazuje, że wraz ze zwiększaniem zawartości cynku w poszczególnych eksperymentach, wartości wyznaczanych stałych K_D dla [³H]8-OH-DPAT rosły znacząco, co oznacza osłabienie powinowactwa radioliganda do receptora 5-HT_{1A} pod wpływem jonów cynku. W odniesieniu do oznaczeń poziomu gęstości receptorów, zaobserwowano nietypowe zmiany wartości B_{max} w zależności od stężenia jonów. Mianowicie, obecność 10 μ M cynku powodowała wzrost specyficznego wiązania o około 28% ($5,8 \pm 0,7$ pM/mg białka) w stosunku do wyznaczonego dla kontroli ($4,5 \pm 0,3$ pM/mg białka); w stężeniach 0,5 i 1 mM cynku następował powrót do wartości wyjściowych (odpowiednio: $4,7 \pm 0,7$

i $4,0 \pm 0,6$ pM/mg), natomiast dwa najwyższe z zastosowanych stężeń cynku (2,5 i 5 mM) znacząco obniżały wiązanie specyficzne [3 H]8-OH-DPAT do wartości $B_{\max} = 3,1 \pm 1,0$ i $2,5 \pm 0,8$ pM/mg białka.



Rysunek 21. Wpływ wzrastających stężeń cynku na wiązanie radioliganda [3 H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}. (A) Krzywe saturacyjne otrzymane dla 6 stężeń ZnCl₂. Próbkę kontrolną stanowiło wiązanie radioliganda do receptorów bez dodatku jonów Zn²⁺; (B) Regresja nieliniowa krzywych saturacyjnych na podstawie równania 23.

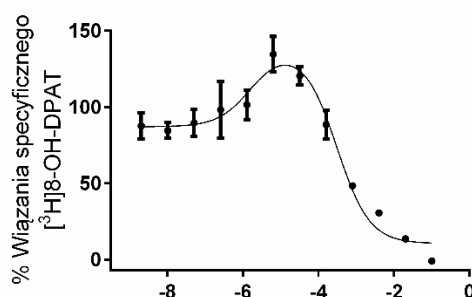
Otrzymane wyniki analizowano metodą regresji nieliniowej zgodnie z równaniem 23. Wyznaczono przesunięcia krzywych saturacyjnych względem siebie poprzez obliczenie współczynnika kooperatywności α , a charakterystyczny dla mechanizmu modulacji allosterycznej [56] rozkład zmian wartości stałych dysocjacji K_D w zależności od stężenia cynku przedstawiono na rysunku 21B. Otrzymana wartość współczynnika kooperatywności $\alpha = 0,37$ świadczy o zachodzeniu zjawiska negatywnej kooperatywności, tj. o osłabieniu wiązania ortosterycznego radioliganda do receptorów 5-HT_{1A}.

Tabela 5. Wartości K_D oraz B_{\max} dla krzywych saturacji wiązania agonisty [3 H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}. Dane stanowią wartości średnie z trzech oznaczeń \pm standardowe odchylenie. Istotność statystyczna różnic między średnimi została obliczona testem t-Studenta. Wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$ oznaczono *.

Zn ²⁺ [μ M]	K_D [nM]	B_{\max} [pM/ mg białka]
0	$2,9 \pm 0,10$	$4,5 \pm 0,3$
10	$5,0 \pm 0,09$	$5,8 \pm 0,7^*$
100	$6,0 \pm 0,42$	$6,2 \pm 2,0$
500	$6,9 \pm 0,02$	$4,7 \pm 0,7$
1000	$8,2 \pm 0,90$	$4,0 \pm 0,6$
2500	$8,6 \pm 0,65$	$3,1 \pm 1,2^*$
5000	$9,6 \pm 0,64$	$2,5 \pm 0,8^*$

3.4.4 Badanie wypierania [³H]8-OH-DPAT z miejsc wiążących w receptorach 5-HT_{1A} przez jony cynku

Ze względu na specyficzny rozkład zmian wartości B_{max} obserwowany w eksperymentach saturacji, w kolejnym kroku badano oddziaływania jonów Zn^{2+} z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A} wobec pojedynczego stężenia [³H]8-OH-DPAT ($\sim K_D = 2,5$ nM) dla serii 12 stężeń $ZnCl_2$. W przebiegu, wykreślonej na podstawie otrzymanych wyników, krzywej typu „bell-shape” (Rysunek 22), uwidoczniony został wzrost wiązania specyficznego radioliganda (odnotowany także w eksperymentach saturacji), które osiągnęło maximum przy stężeniu 10 μM jonów cynku. Natomiast powyżej 100 μM następowało wyraźne hamowanie wiązania [³H]8-OH-DPAT. Stosując odpowiedni model matematyczny (Równanie 20) do analizy wyników wyznaczono parametry powinowactwa jonów cynku do ortosterycznych $K_{B1} = 46,3$ μM i allosterycznych $K_{B2} = 5,44$, miejsc wiążących receptora 5-HT_{1A} oraz współczynnik kooperatywności $\alpha = 5,43$. Wskazały one na wyższe powinowactwo cynku do miejsc allosterycznych oraz na pozytywną modulację receptorów 5-HT_{1A}.



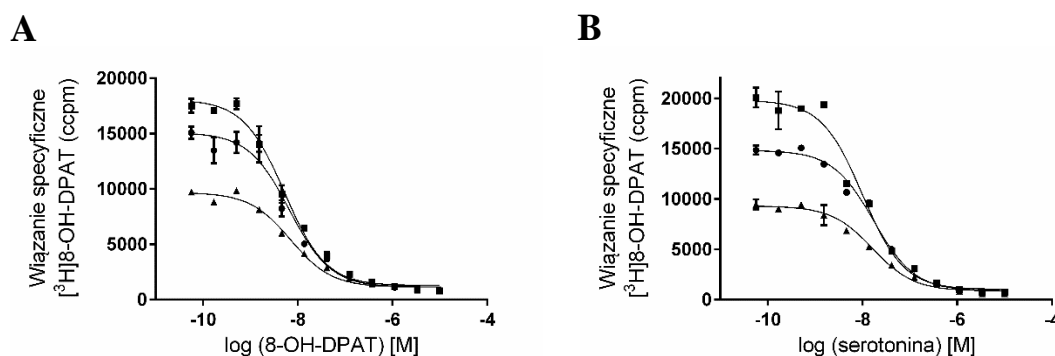
Rysunek 22. Wykres zależności specyficznego wiązania [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} od stężenia jonów cynku. Krzywa typu „bell-shape” dla 12 stężeń $ZnCl_2$ wystymulowana za pomocą równania 20.

3.4.5 Wpływ jonów cynku na proces współzawodnictwa o miejsca wiązania w receptorach 5-HT_{1A} pomiędzy [³H]8-OH-DPAT a serotoniną

Charakterystyczny przebieg krzywej „bell-shape” wskazywał na możliwość regulacji aktywności receptora 5-HT_{1A} przez jony cynku w zależności od stężenia tj.: niższe stężenia powinny wywoływać efekty pozytywnej modulacji, a wyższe powodować hamowanie wiązania agonisty.

Biorąc pod uwagę działanie cynku w organizmie, uznano za zasadne sprawdzenie wpływu jonów cynku w odniesieniu do serotoniny, która jest endogennym ortosterycznym agonistą w układzie receptorów 5-HT. Dodatkowo, efekty dwóch stężeń

cyнку (10 i 500 μM) zbadano także w odniesieniu do wiązania nieznakowanego radioizotopowo 8-OH-DPAT, (Rysunek 23A) i serotoniny (Rysunek 23B).



Rysunek 23. Przykładowe wykresy otrzymane w eksperymentach konkurencji dla agonistów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} w obecności dwóch stężeń jonów cynku 10 μM (■) i 500 μM (▲) w porównaniu do kontroli nie zawierającej cynku (●).

Dodanie cynku w stężeniu 10 μM spowodowało niewielkie, lecz statystycznie istotne zwiększenie powinowactwa serotoniny do receptora 5-HT_{1A} ($K_i = 5,4 \pm 0,2$ nM vs $8,7 \pm 0,65$ dla kontroli) i mniej znaczącą zmianę, zaobserwowaną dla 8-OH-DPAT ($K_i = 2,6 \pm 0,10$ vs $3,2 \pm 0,12$); przy wyższych stężeniach Zn²⁺ powinowactwo 5-HT i 8-OH-DPAT pozostało niezmiennic (Tabela 6).

Tabela 6. Wartości powinowactwa ligandów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} o agonistycznej aktywności wewnętrznej. Wartości uśrednione z trzech eksperymentów z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczna różnic między średnimi została obliczona testem F. Wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$ oznaczono *.

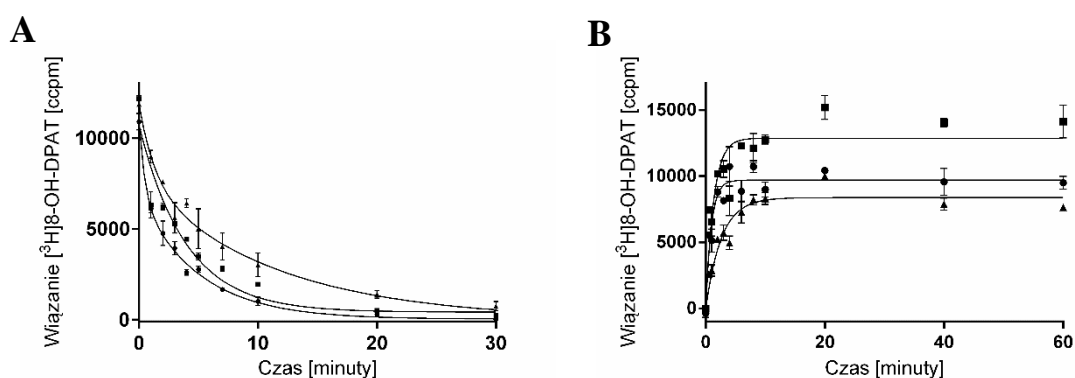
Ligand	Zn ²⁺ [μM]		
	0	10	500
	K _i [nM]		
(R)-(+)-8-Hydroxy-DPAT	$3,2 \pm 0,12$	$2,6 \pm 0,10$ *	$3,3 \pm 0,30$
Serotonina	$8,7 \pm 0,65$	$5,4 \pm 0,20$ *	$8,1 \pm 0,64$

3.4.6 Wpływ jonów cynku na parametry kinetyczne procesu wiązania [³H]8-OH-DPAT z receptorami 5-HT_{1A}

Dynamika odwracalnego procesu tworzenia kompleksu ligand-receptor zmienia się wraz z wprowadzeniem do dwucząsteczkowej reakcji trzeciego składnika. Wówczas wpływ allosterycznego modulatora typu PAM zaznacza się poprzez zwiększenie szybkości asocjacji i/lub zmniejszenie dysocjacji, a odwrotne efekty wywołuje typ NAM. Natomiast, jeśli do układu zostanie włączony ligand konkurujący o miejsce ortosteryczne w receptorze, to zwiększając czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi reakcji

tworzenia kompleksu, spowolni asocjację, ale nie powinien zmieniać szybkości dysocjacji [1]. Z tego powodu w klasyfikacji mechanizmu badanego procesu istotne znaczenie mają wyniki otrzymane w testach dysocjacji.

Ze względu na złożone, zależne od stężenia, efekty modulacji receptora 5-HT_{1A} przez jony cynku, eksperymenty kinetyczne, które przeprowadzono w toku dalszych badań obejmowały wyznaczenie wartości stałych szybkości dysocjacji jak też asocjacji [³H]8-OH-DPAT z miejsc wiążących w receptorach 5-HT_{1A} w obecności dwóch stężeń cynku (Tabela 7). Wykresy przedstawiono na rysunku 24.



Rysunek 24. Wpływ cynku na szybkość przebiegu reakcji (A) dysocjacji i (B) asocjacji [³H]8-OH-DPAT w obecności dwóch stężeń jonów 10 µM (■) i 500 µM (▲) w porównaniu do kontroli nie zawierającej cynku (●).

W wyniku przeprowadzenia testów kinetycznych dysocjacji zaobserwowano, że w obecności jonów cynku w stężeniu 10 µM, dwufazowy proces dysocjacji radioliganda [³H]8-OH-DPAT ($k_{\text{offfast}} = 2,33 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$ i $k_{\text{offslow}} = 0,21 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$) zmienił przebieg na jednofazowy, a wyznaczona w tym eksperymencie stała $k_{\text{offobs}} = 0,25 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ była zbliżona do wartości k_{offslow} otrzymanej bez obecności jonów cynku dla [³H]8-OH-DPAT. Z kolei, obie fazy procesu zostały zachowane przy wysokim stężeniu (500 µM Zn²⁺), ulegając jednak wydłużeniu bez zmian w proporcji ($k_{\text{offobsfast}} = 0,57 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ i $k_{\text{offobs slow}} = 0,06 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$). Sumarycznie, rezultaty uzyskane dla obu stężeń cynku wskazały na zmniejszenie szybkości dysocjacji radioliganda, co świadczy o zmianie wynikającej z wpływu jonów cynku na konformację receptora i jest zgodne z wcześniej opisywanymi wynikami sugerującymi mechanizm allosterycznej modulacji receptora 5-HT_{1A}.

Na podstawie przeprowadzonych testów asocjacji (Tabela 7), wykazano, że [³H]8-OH-DPAT wiąże się do receptorów 5-HT_{1A} ze stałą szybkości (k_{ob}) równą $3,4 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$. W obecności jonów Zn²⁺ o stężeniu 10 µM zaobserwowano niewielki,

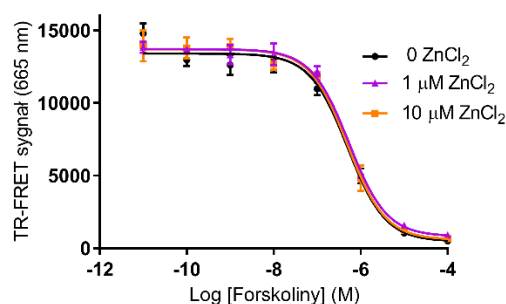
lecz znamiennej statystycznie, wzrost wartości $k_{ob} = 6,4 \pm 0,8 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$ a przy wyższym stężeniu (500 μM), nie odnotowano istotnych zmian.

Tabela 7. Wartości stałych dysocjacji i asocjacji dla wiązania [^3H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}. Wartości uśrednione z trzech eksperymentów z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczna różnic między średnimi została obliczona testem t-Studenta. Wyniki znamienne oznaczono przy poziomie istotności *p < 0,07 lub ** p < 0,05. Symbolem ^a oznaczono kinetykę jednofazową.

	$k_{ob} [\text{min}^{-1}]$	$k_{offfast} [\text{min}^{-1}]$	$k_{offslow} [\text{min}^{-1}]$
kontrola	$3,4 \pm 0,4 \times 10^8$	$2,33 \pm 0,31$	$0,21 \pm 0,02$
+ 10 $\mu\text{M Zn}^{2+}$	$6,4 \pm 0,8 \times 10^8 *$		$0,25 \pm 0,04^a$
+ 500 $\mu\text{M Zn}^{2+}$	$3,6 \pm 0,3 \times 10^8$	$0,57 \pm 0,07 **$	$0,06 \pm 0,02 **$

3.4.7 Wpływ cynku na efekty stymulacji receptorów 5-HT_{1A}

Receptor 5-HT_{1A} sprzężony jest z białkiem G_i, którego pobudzenie obniża komórkowy poziom cAMP i w badaniu działania agonisty wymagana jest wcześniejsza stymulacja komórek forskoliną. Aby jednak uniknąć błędnej interpretacji wyników, związanych z efektami poza-receptorowego oddziaływania jonów cynku (w stosowanej rekombinowanej linii komórkowej HEK293), wykonano eksperyment wyprzedzający, w którym sprawdzono wpływ 1 μM i 10 $\mu\text{M Zn}^{2+}$ na działanie samej forskoliny (Rysunek 25). Ze względu na (Tabela 8.) brak efektów przyjęto, że potencjalne zmiany obserwowane w testach funkcjonalnych będą związane ze specyficznym oddziaływaniem cynku z receptorami 5-HT_{1A} w linii HEK293.

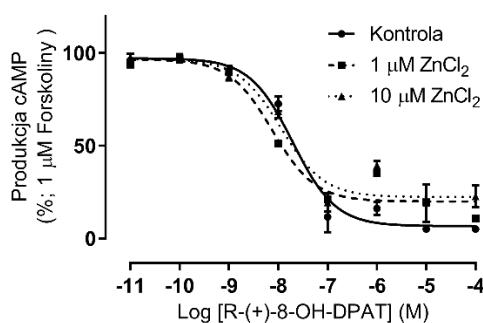


Rysunek 25. Wpływ jonów cynku na stymulowane forskoliną komórki linii HEK293 z ekspresją receptorów 5-HT_{1A}.

Tabela 8. Wpływ jonów cynku na stymulacje receptorów 5-HT_{1A} przez forskolinę.

ZnCl ₂ [μM]	Forskolina EC ₅₀ [nM]
0	501 ± 63
1	538 ± 45
10	496 ± 47

W wyniku kolejno przeprowadzonych testów funkcjonalnych wykazano, że pełny agonista receptora 5-HT_{1A} R-(+)-8-OH-DPAT, hamuje produkcję cAMP na poziomie EC₅₀ = 32 nM (E_{max} = 100%), natomiast jony cynku w stężeniu 1 μM oraz 10 μM powodują równoległe przesunięcie w lewą stronę, krzywej otrzymanej dla tego agonisty (Rysunek 26, Tabela 9) i zmieniają wartości EC₅₀ odpowiednio na 16 nM i 19 nM i jednocześnie nie wpływają na wartość E_{max}.



Rysunek 26. Krzywe zależności stężenie-efekt dla R-(+)-OH-DPAT wobec receptorów 5-HT_{1A} (HEK293) w obecności [1 μM (■); 10 μM (▲)] i nieobecności (●) jonów cynku.

Tabela 9. Wpływ jonów cynku na wartość EC₅₀ agonisty w badaniach funkcjonalnych. *p < 0.05.

Związek	EC ₅₀ [nM]		
	Kontrola	+ 1 μM ZnCl ₂	+ 10 μM ZnCl ₂
R-(+)-8-OH-DPAT	32 ± 6*	16 ± 8*	19 ± 8*

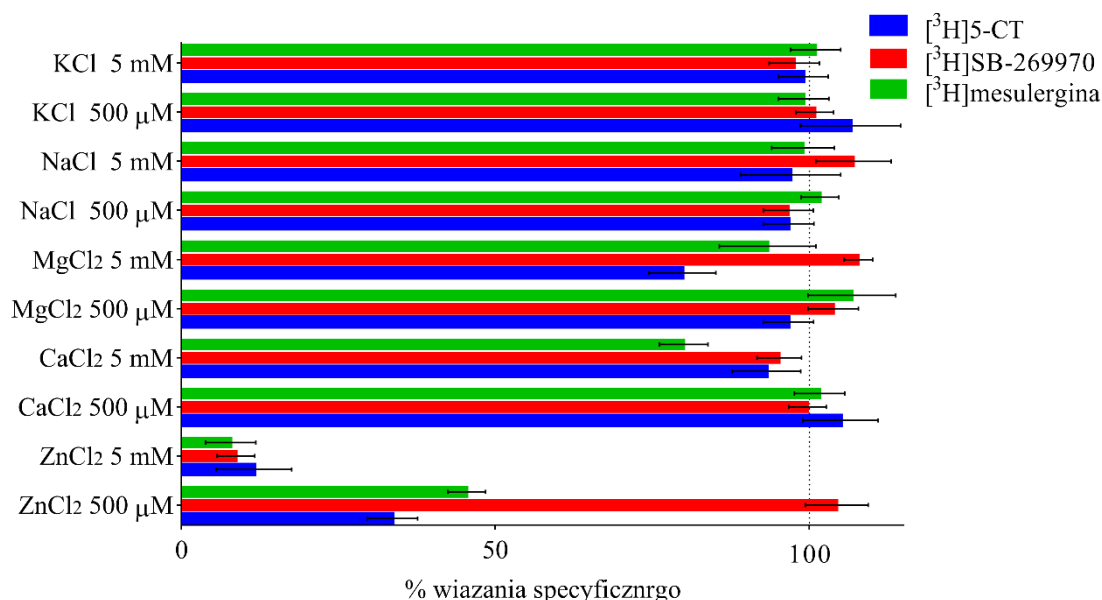
3.5 Ocena wpływu jonów cynku na aktywność receptorów serotoninowych 5-HT₇

Wpływ jonów cynku na receptory 5-HT₇ oceniano za pomocą badań wiązania radioliganda i testów funkcjonalnych z zastosowaniem rekombinowanych komórek HEK293 z nadekspresją receptora 5-HT₇. Eksperymenty saturacji, kompetycji oraz kinetyki wykonano przy użyciu trzech różnych znakowanych izotopowo ligandów: agonisty [³H]5-CT oraz dwóch antagonistów, selektywnego [³H]SB-269970 i nie selektywnej [³H]mesulerginy.

3.5.1 Wpływ wybranych jonów metali na specyficzne wiązanie radioligandów do receptorów serotoninowych 5-HT₇

Podobnie jak w przypadku receptora 5-HT_{1A}, na wstępie prowadzonych badań sprawdzono specyficzność oddziaływania jonów cynku z receptorami serotoninowymi

5-HT₇ wyznaczając poziom wiązania badanych radioligandów w obecności dwóch stężeń (500 μM oraz 5 mM) jedno i dwuwartościowych jonów metali: Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ i Zn²⁺ (Rysunek 27). Jednowartościowe jony (Na⁺ i K⁺) w obu stężeniach oraz jony Ca²⁺ i Mg²⁺ w stężeniu 500 μM nie powodowały żadnych zmian w wiązaniu badanych radioligandów. Cynk w stężeniu 500 μM, nie miał wpływu na poziom wiązania [³H]SB-269970, ale obniżył wiązanie [³H]5-CT i [³H]mesulerginy odpowiednio o 67% i 55% (Rysunek 27). Znaczące statystycznie zmiany w wiązaniu wszystkich radioligandów z receptorem 5-HT₇ zaobserwowano dla jonów dwuwartościowych w stężeniu 500 μM, przy czym o ile dla jonów Mg²⁺ i Ca²⁺ sygnał zmniejszył się tylko o 10 do 20% w stosunku do poziomu kontrolnego, to Zn²⁺ spowodował zmiany sięgające do 90%. W związku z powyższym założono, że potencjalne efekty obserwowane w toku kolejnych badań powinny wynikać ze specyficznego wpływu jonów cynku na receptory 5-HT₇.



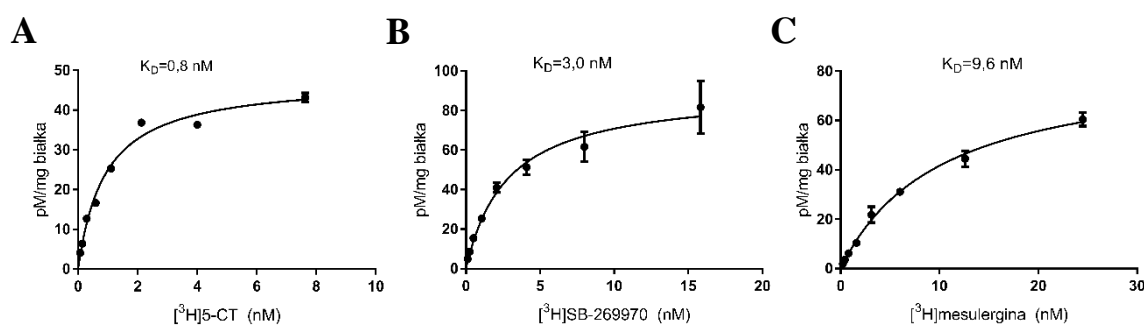
Rysunek 27. Porównanie wpływu (wyrażonego jako % wartości kontrolnej) wybranych jonów metali na wiązanie radioligandów z receptorami 5-HT₇.

3.5.2 Oznaczenie parametrów wiązania radioligandów do receptorów 5-HT₇

W doświadczeniach saturacji przeprowadzonych bez jonów cynku (eksperyment kontrolny), wiązanie każdego z radioligandów z receptorami 5-HT₇ charakteryzował współczynnik Hilla ~ 1, co wskazywało na oddziaływanie z jednorodną populacją miejsc wiążących. Tym niemniej oznaczony poziom wiązania specyficznego B_{max} dla agonisty [³H]5-CT (50,0 pmol/mg białka) był o ok 40 % niższy od zmierzonego dla antagonistów [³H]SB-269970 (81,1 pmol/mg białka) i [³H]mesulerginy (91,2 pmol/mg białka).

Podobne wyniki przedstawiono w publikacji Alberta i wsp. [188], którzy wykazując, że agonista [³H]5-CT znakuje 60% receptorów 5-HT₇ w porównaniu z antagonistą [³H]mesulerginą, postulowali jednak obecność dwóch stanów powinowactwa w receptorach 5-HT₇ linii komórkowej HEK293. Z kolei, autorzy innych prac poświęconych oddziaływaniu ligandów z receptorami 5-HT₇, otrzymali zbliżone wartości B_{max} dla agonisty [³H]5-CT i selektywnego antagonisty [³H]SB-269970 [189], a także dla [³H]mesulerginy i [³H]5-CT [190].

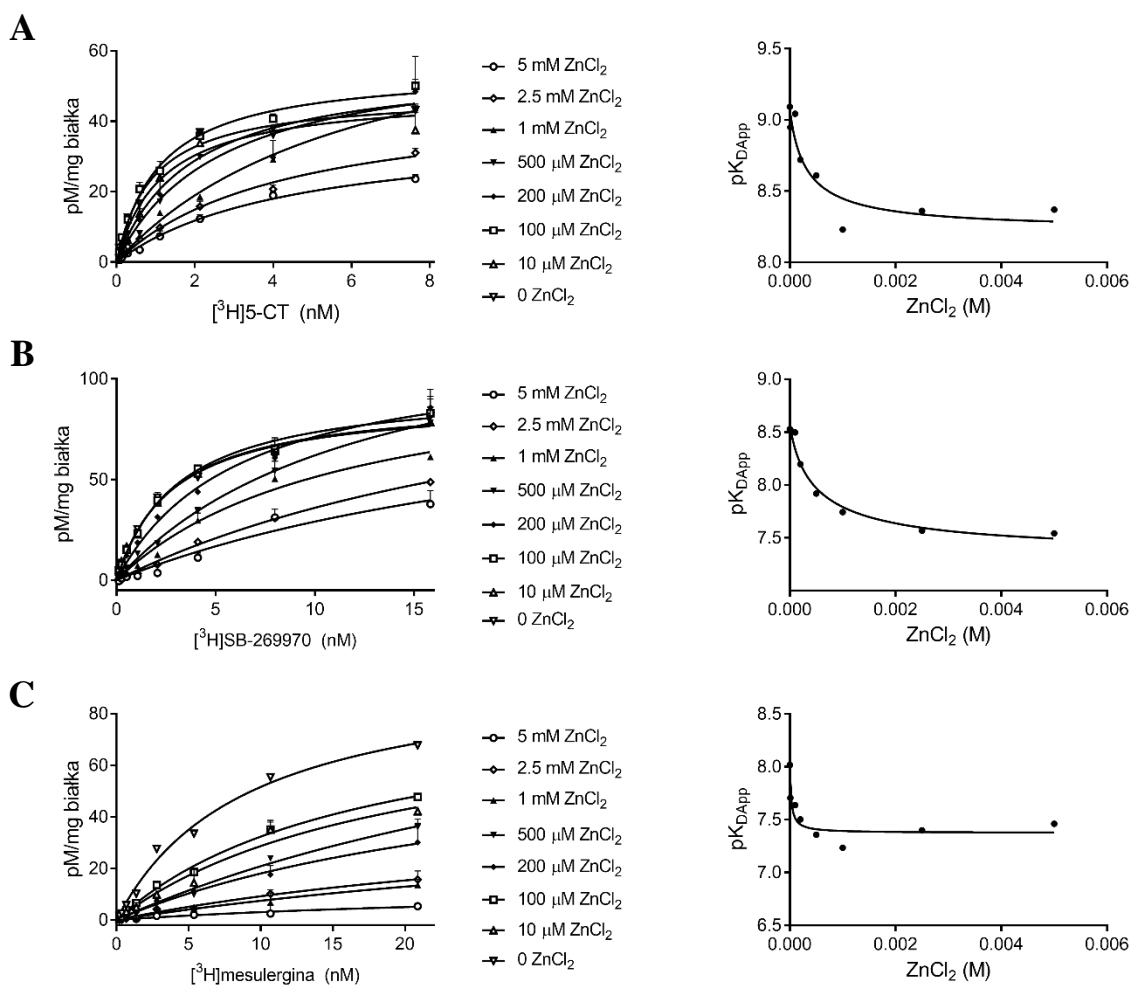
W niniejszych badaniach, analiza statystyczna (GraphPad Prism 7.0) danych z eksperymentów saturacyjnych prowadzonych w nieobecności jonów cynku, nie ujawniła jednak preferencji do przyjmowania przez receptory 5-HT₇ konformacji związanej z możliwością jednoczesnego wyznaczenia dwóch wartości: wysokiego i niskiego powinowactwa. W każdym razie, obliczone wartości stałych powinowactwa dla [³H]5-CT K_D = 0,8 nM, [³H]SB-269970 K_D = 3,0 nM oraz [³H]mesulerginy K_D = 9,6 nM na podstawie przeprowadzonych przez mnie testów (Rysunek 28), były niewiele wyższe od tych, które podano w wyżej wymienionych publikacjach (odpowiednio: 0,4; 1,4 i 6,2 nM) [188–190].



Rysunek 28. Krzywe saturacji dla receptorów 5-HT₇ dla agonisty [³H]5-CT (A) oraz dwóch antagonistów [³H]SB-269970 (B) i [³H]mesulerginy (C).

3.5.3 Oznaczenie parametrów wiązania radioligandów do receptorów 5-HT₇ w obecności jonów cynku

Wyniki eksperymentów saturacji badających wpływ rosnących stężeń jonów Zn²⁺ (10 μM – 5 mM) na oddziaływanie trzech radioligandów z receptorami 5-HT₇, zostały przedstawione odpowiednio na rysunku 29 oraz w tabeli 10.



Rysunek 29. Wpływ cynku na parametry wiązania (K_D i B_{max}) [3H]5-CT (A), [3H]SB-269970 (B) oraz [3H]mesulerginy (C), wyznaczonych w eksperymentach saturacji.

Cynk spowodował wzrost wartości K_D każdego z trzech radioligandów, przy czym zakres wykrytych efektów hamujących był zróżnicowany. W przypadku [3H]5-CT i [3H]mesulerginy, statystycznie istotne różnice w wartościach K_D zaobserwowano dla wszystkich stężeń Zn^{2+} (10 μM – 5 mM), a wartości graniczne (efekt pułapowy) osiągnięto przy stężeniu 1 mM cynku [7]. Dla [3H]SB-269970, widoczne zmiany w K_D wykryto przy stężeniu 200 μM Zn^{2+} , a efekt pułapowy odnotowano przy dwóch najwyższych stężeniach Zn^{2+} (Tabela 10). W odniesieniu do liczby miejsc wiążących, zmiany wartości B_{max} były również obserwowane dla każdego z radioligandów i wykazywały podobną tendencję. Poziom wiązania specyficznego stopniowo wzrastał do osiągnięcia maximum przy stężeniach cynku w zakresie 500 μM – 1 mM, a następnie obniżał się, osiągając w przypadku [3H]5-CT i [3H]mesulerginy znacznie niższe wartości, niż oznaczone jako kontrolne, a w przypadku [3H]SB-269970 wracał do wartości początkowych. Należy jednak zauważyć, że wzrost liczby miejsc wiążących

zaobserwowany szczególnie dla [³H]5-CT oraz [³H]SB-269970 został wyznaczony na podstawie ekstrapolacji do bardzo wysokich stężeń radioligandów (ze względów praktycznych nie używanych w niniejszych eksperymentach) i w związku z tym może być zawyżony. Przemawia za tym także fakt, że wyższym od kontroli wartościom B_{max} nie towarzyszył wzrost powinowactwa, jak to ma miejsce w przypadku pozytywnej allosterycznej modulacji, lecz odwrotnie, stałe wiązania K_D były również wyższe tj. powinowactwo omawianych radioligandów ulegało osłabieniu. Wydaje się natomiast, że spadek B_{max} poniżej wartości kontroli, odnotowany dla [³H]5-CT i [³H]mesulerginy wynikał prawdopodobnie z allosterycznej modulacji prowadzącej do zmiany konformacji receptora 5-HT₇, która utrudniała dopasowanie radioligandów do ortosterycznej kieszeni wiążącej. W tym wypadku można uznać te zmiany za specyficzne dla jonów cynku, ponieważ inne, testowane wcześniej kationy w stężeniu 5 mM, nie wykazywały tak silnego hamowania wiązania radioligandów, a więc wzrost siły jonowej nie odgrywał istotnej roli w niespecyficznym wiązaniu związków. Warto w tym miejscu wspomnieć, że obniżenie wartości B_{max} przy mikromolarnych stężeniach cynku obserwowano jako efekt allosterycznej modulacji innych GPCR, a więc podczas wiązania [³H]WAY-100635 oraz [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} (świadczą o tym również nasze badania) [164], jak też w oddziaływaniach antagonistów z receptorami dopaminowymi D₁ i D₂ [101], oraz w hamowaniu receptorów α_2 -adrenergicznych [102].

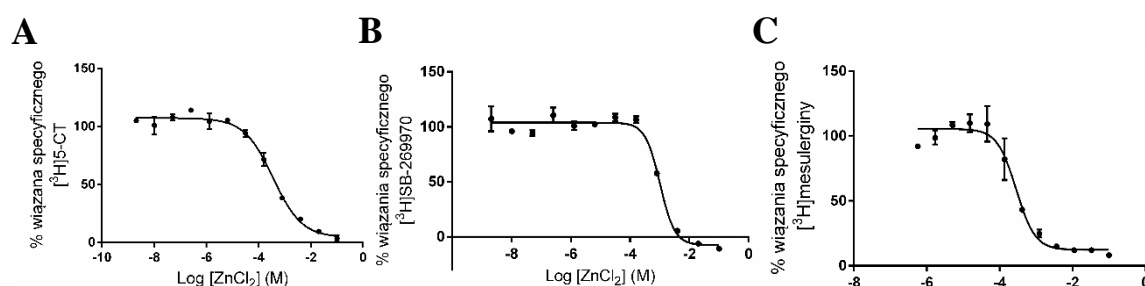
Mechanizm, za pomocą którego cynk hamował wiązanie radioligandów w testach saturacyjnych analizowano metodą regresji nieliniowej w oparciu o równanie 23. Otrzymane wartości współczynników kooperatywności $\alpha = 0,15$ dla [³H]5-CT, $\alpha = 0,06$ [³H]SB-269970 i $\alpha = 0,25$ dla [³H]mesulerginy, świadczą o tym, że podczas oddziaływania badanych związków z receptorem 5-HT₇ cynk działa jako negatywny allosteryczny modulator. Należy jednak zauważyć, że w wyniku badania wpływu cynku na wiązanie antagonisty [³H]SB-269970 otrzymano bardzo niską, zbliżoną do zera, wartość współczynnika α , co oznacza mechanizm oddziaływania trudny do odróżnienia od konkurencji o miejsce ortosteryczne w receptorze [7, 56].

Tabela 10. Wartości stałych powinowactwa K_D [nM] i gęstości receptorów B_{max} [pM/mg białka] wyznaczone dla trzech radioligandów wobec szeregu stężeń $ZnCl_2$. Wartości uśrednione z odchyleniem standardowym. * $p < 0,05$.

Zn^{2+} [μM]	$[^3H]5-CT$		$[^3H]SB-269970$		$[^3H]mesulergina$	
	K_D [nM]	B_{max} [pM/mg]	K_D [nM]	B_{max} [pM/mg]	K_D [nM]	B_{max} [pM/mg]
0	$0,8 \pm 0,1$	$50,0 \pm 7,3$	$3,0 \pm 0,2$	$81,1 \pm 13,5$	$9,6 \pm 0,8$	$91,2 \pm 10,0$
10	$1,1^* \pm 0,1$	$52,5 \pm 9,0$	$3,1 \pm 0,4$	$78,8 \pm 14,7$	$19,7^* \pm 0,1$	$76,4 \pm 12,1$
100	$1,1^* \pm 0,1$	$55,1 \pm 3,5$	$3,6 \pm 0,6$	$89,2 \pm 10,2$	$21,7^* \pm 1,6$	$72,2 \pm 9,4$
200	$1,9^* \pm 0,1$	$57,7 \pm 4,4$	$6,4^* \pm 0,3$	$93,7 \pm 15,0$	$31,4^* \pm 1,5$	$116,7 \pm 24,8$
500	$2,5^* \pm 0,2$	$60,6 \pm 10,2$	$12,1^* \pm 0,6$	$124,3^* \pm 10,9$	$43,8^* \pm 2,2$	$105,6 \pm 13,9$
1000	$5,9^* \pm 0,3$	$71,7^* \pm 7,2$	$18,1^* \pm 0,3$	$110,1^* \pm 7,1$	$58,3^* \pm 4,9$	$51,0^* \pm 3,9$
2500	$4,4^* \pm 0,2$	$43,0 \pm 10,2$	$27,2^* \pm 1,4$	$107,4^* \pm 8,7$	$39,9^* \pm 0,5$	$39,0^* \pm 10,2$
5000	$4,3^* \pm 0,3$	$38,5^* \pm 2,5$	$28,7^* \pm 3,0$	$83,5 \pm 16,2$	$34,6^* \pm 1,8$	$12,1^* \pm 2,6$

3.5.4 Badanie wypierania radioligandów z miejsc wiążących w receptorach 5-HT₇ przez jony cynku

W ramach przeprowadzonych eksperymentów wyznaczono przebieg krzywych wypierania trzech badanych radioligandów (w stężeniu $\leq K_D$) z ich miejsc wiążących w receptorach 5-HT₇ przez serię 12 stężeń cynku (Rysunek 30). Obliczone na tej podstawie wartości stałych hamowania IC_{50} dla wiązania [³H]5-CT i [³H]mesulerginy charakteryzowały się zbliżonymi mikromolarnymi wartościami (odpowiednio $IC_{50} = 346$ i $241 \mu M$), natomiast w przypadku [³H]SB-269970 otrzymana wartość $IC_{50} = 1170 \mu M$ oznaczała znacznie słabsze oddziaływanie.



Rysunek 30. Krzywe wypierania radioligandów: (A) [³H]5-CT, (B) [³H]SB-269970 oraz (C) [³H]mesulerginy z miejsc wiążących w receptorach 5-HT₇ przez cynk.

3.5.5 Wpływ jonów cynku na konkurencyjne wypieranie specyficznych radioligandów z receptorów 5-HT₇

W kolejnym etapie sprawdzono wpływ dwóch stężeń jonów cynku (10 i 500 μM) na proces konkurencyjnego wypierania badanych radioligandów ([³H]5-CT, [³H]SB-269970 i [³H]mesulerginy w stężeniach $\leq K_D$) z miejsc wiążących w receptorach 5-HT₇ przez

ortosteryczne ligandy: 5-CT, SB-269970 i klozapinę (nieselektywny antagonist 5-HT₇). Otrzymane wartości powinowactwa (K_i) zestawiono w tabeli 11.

W homologicznych testach kompetycji, wszystkie otrzymane krzywe wypierania radioliganda [³H]5-CT przez 5-CT (zarówno w oznaczeniach kontrolnych, jak i w obecności jonów cynku), były zgodne z modelem charakteryzującym wiązanie do jednego miejsca wiążącego. Obniżenie wiązania [³H]5-CT (wzrost wartości K_i) do receptorów 5-HT₇, było widoczne przy obu stężeniach cynku, co potwierdzało wyniki eksperymentów saturacji. Dodanie jonów wpływało również na heterologiczne wypieranie [³H]5-CT przez antagonistów klozapinę i SB-269970 z miejsc wiążących receptorów 5-HT₇. Obserwowane efekty były jednak słabsze niż wykryte dla 5-CT, ponieważ zmiany w wiązaniu obu antagonistów, (tj. 1,4-krotny wzrost wartości K_i dla klozapiny i 1,7-krotny dla SB-269970) zostały wykryte tylko dla stężenia 500 μM cynku. Podobnie, w eksperymentach kompetycji z udziałem [³H]SB-269970, powinowactwo zarówno agonisty 5-CT jak i antagonisty klozapiny obniżyło się (odpowiednio 6,9 i 3,9-krotnie) wyłącznie w obecności wyższego stężenia cynku.

W przypadku wiązania [³H]mesulerginy oba stężenia Zn²⁺ hamowały aktywność 5-CT, ale statystycznie istotne zmiany stwierdzono tylko w obecności 500 μM Zn²⁺, jak również tylko przy wyższych stężeniach jonów obserwowano osłabienie konkurencyjnego hamowania oddziaływań klozapiny z receptorami 5-HT₇.

Dla każdej krzywej kompetycji heterologicznego wiązania ligand/radioligand, najlepsze dopasowanie uzyskano stosując model jednego miejsca wiążącego.

Tabela 11. Wpływ jonów cynku w stężeniach 10 μM i 500 μM na powinowactwo 5-CT, SB-269970 i klozapiny wyznaczone w eksperymentach kompetycji z [³H]5-CT (0,8 nM), [³H]SB-269970 (2,5 nM) oraz [³H]mesulerginą (10 nM). * p < 0,05.

Zn ²⁺ [μM]	[³ H]5-CT			[³ H]SB-269970			[³ H]mesulergina		
	5-CT	klozapina	SB-269970	5-CT	klozapina	SB-269970	5-CT	klozapina	SB-269970
0	0,76 ± 0,13	36,00 ± 1,41	2,82 ± 0,06	0,85 ± 0,21	23,55 ± 4,95	N.D.	0,79 ± 0,61	35,45 ± 6,36	N.D.
10	1,36* ± 0,08	32,50 ± 2,12	2,40 ± 0,06	1,05 ± 0,07	25,31 ± 12,73	N.D.	1,31 ± 0,64	43,18 ± 8,49	N.D.
500	3,76* ± 0,43	51,41* ± 7,18	4,86* ± 0,93	5,92* ± 0,07	92,56* ± 12,02	N.D.	13,21* ± 4,58	126,38* ± 32,14	N.D.

3.5.6 Wpływ jonów cynku na kinetykę procesu dysocjacji radioliganów z miejsc wiążących receptorów 5-HT₇

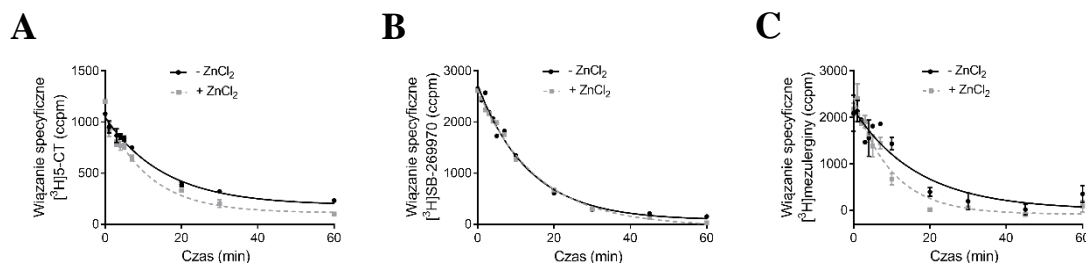
Potwierdzeniem mechanizmu allosterii jest wykrycie zmian w kinetyce dysocjacji ortosterycznego liganda [7, 56], a w przypadku negatywnej modulacji (szczególnie gdy

$\alpha \rightarrow 0$) wyraźniejsze efekty kinetyczne uwidoczniają się z reguły dopiero przy wyższych stężeniach modulatora [191]. Biorąc pod uwagę ten fakt oraz wyniki wcześniej przeprowadzonych eksperymentów, wpływ cynku na kinetykę procesu dysocjacji [^3H]5-CT, [^3H]SB-269970 oraz [^3H]mesulerginy z miejsc wiążących receptorów 5-HT₇ wykonano przy stężeniu 500 μM jonów (Tabela 12, Rysunek 31).

Tabela 12. Stałe szybkości dysocjacji [^3H]5-CT, [^3H]SB-269970 oraz [^3H]mesulerginy z kompleksu z receptorem 5-HT₇, w nieobecności i w obecności 500 μM jonów cynku. * $p < 0,05$.

Zn ²⁺ [μM]	Stała szybkości dysocjacji	[^3H]5-CT	[^3H]SB-269970	[^3H]mesulergina
0	k_{off} [min^{-1}]	$0,070 \pm 0,008$	$0,075 \pm 0,008$	$0,059 \pm 0,035$
500	k_{offobs} [min^{-1}]	$0,092^* \pm 0,005$	$0,068 \pm 0,003$	$0,100^* \pm 0,007$

Wyniki wszystkich wykonanych testów wskazały na jednofazowy przebieg procesów dysocjacji badanych radioligandów, zarówno bez dodatku jonów cynku jak i w ich obecności. Zmiany po włączeniu do eksperymentów cynku, zostały wykryte w oddziaływaniach [^3H]5-CT i [^3H]mesulerginy, dla których zaobserwowano znamienne statystycznie zwiększenie wartości stałych szybkości dysocjacji k_{offobs} (Tabela 12, Rysunek 31). W przypadku [^3H]SB-269970 obecność jonów cynku nie miała znaczącego wpływu na kinetykę badanego procesu (Tabela 12, Rysunek 31).

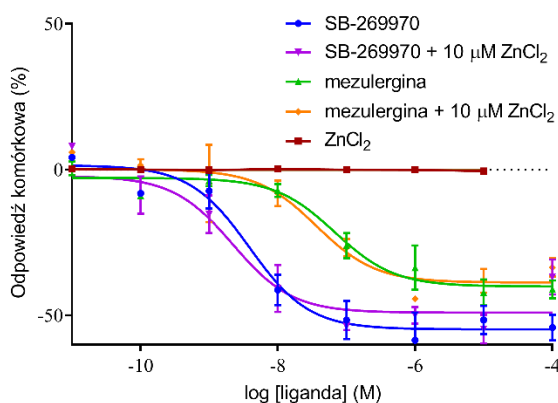


Rysunek 31. Wpływ cynku na proces dysocjacji (A) [^3H]5-CT, (B) [^3H]SB-269970 oraz (C) [^3H]mesulerginy z miejsc wiążących receptorów 5-HT₇ w komórkach linii HEK293.

Opisane zmiany są spójne z wcześniej odnotowanymi wynikami eksperymentów saturacji i kompetycji, ponieważ skrócenie czasu dysocjacji cechuje zazwyczaj negatywną modulację allosteryczną i ten kierunek działania był szczególnie widoczny dla [^3H]5-CT i [^3H]mesulerginy. Z kolei brak wpływu na stałą k_{offobs} antagonisty [^3H]SB-269970 pozostawał w zgodzie z wyznaczoną dla tego radioliganda niską wartością współczynnika kooperatywności α , która charakteryzuje wówczas oddziaływania trudne do odróżnienia od kompetycji.

3.5.7 Wpływ cynku na aktywność funkcjonalną receptorów 5-HT₇

Wysoki poziom cAMP, wykryty bez uprzedniej stymulacji receptorów 5-HT₇, świadczył o aktywności konstytutywnej w stosowanej rekombinowanej linii komórkowej HEK293. Umożliwiło to charakterystykę odwrotnego agonizmu ligandów SB-269970 oraz mesulerginy (Rysunek 32), których dokładny profil farmakologiczny został opisany przez innych autorów [192, 193]. Ponieważ w naszych testach funkcjonalnych, partie komórek HEK293 używane w kolejnych doświadczeniach wykazywały pewne różnice w podstawowym poziomie cAMP (35 – 50%), dlatego efekty wpływu SB-269970, mesulerginy oraz cynku na aktywność konstytutywną receptora 5-HT₇ nie zostały wyznaczone ilościowo lecz tylko przedstawione graficznie na rysunku 32.



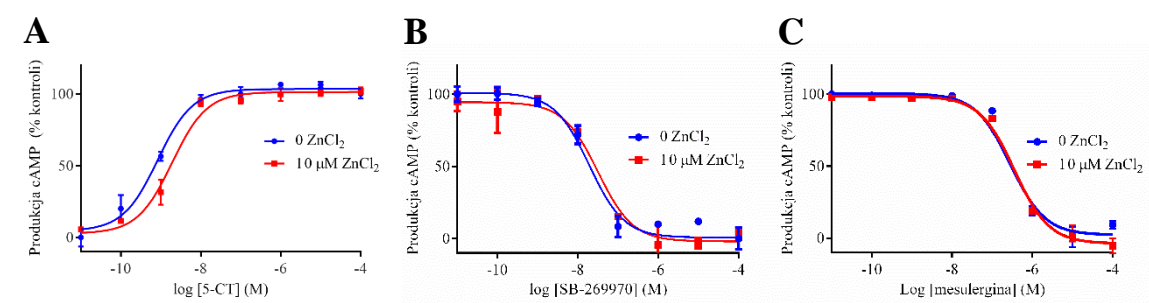
Rysunek 32. Porównanie wpływu SB-269970, mesulerginy i cynku na aktywność konstytutywną receptorów 5-HT₇.

W przeprowadzonym eksperymencie, SB-269970 zachowywał się jak pełny odwrotny agonista, a mesulergina wykazywała cechy częściowego odwrotnego agonizmu, co było zgodne z wynikami przedstawionymi w zacytowanych pracach. Z kolei cynk nie zmieniał poziomu aktywności konstytutywnej, ani też nie wpływał w istotny sposób na blokadę spontanicznej aktywności receptorów 5-HT₇ przez badane ligandy ortosteryczne.

W kolejnym etapie badań funkcjonalnych, określono profil farmakologiczny badanych ligandów ortosterycznych, wyznaczając ilościowe parametry aktywności agonistycznej 5-CT oraz antagonizmu SB-269970 i mesulerginy. Zgodnie z charakterystyką pełnego agonisty, 5-CT stymulował wytwarzanie cAMP ze skutecznością $E_{max} = 100\%$, a oznaczona wartość $EC_{50} = 0,84$ nM korespondowała z jego powinowactwem ($K_i = 0,8$ nM) otrzymanym w badaniach radioizotopowych. SB-26670 i mesulergina, wykazywały cechy silnych antagonistów receptorów 5-HT₇, hamując indukowaną poprzez 10 μM 5-CT akumulację cAMP. W tym wypadku, obliczone wartości stałych $K_b = 1,75$ nM dla

SB-26670 i 31 nM, dla mesulerginy mieściły się w zakresie opublikowanych danych [193, 194].

Następnie zbadano wpływ cynku na efekty odpowiedzi funkcjonalnej receptorów 5-HT₇ na działanie ligandów ortosterycznych. Jak wcześniej zaznaczono, ze względu na interakcję cynku z odczynnikiem LANCE, testy funkcjonalne przeprowadzono tylko dla 10 μM cynku. Wykazano, że obecność cynku w tym stężeniu, powoduje równoległe przesunięcie w prawą stronę krzywej stężenie-efekt, wyznaczonej dla 5-CT i nie wpływa na zmianę E_{max}, co w rezultacie zwiększa 3,2-krotnie wartości EC₅₀ agonisty (Rysunek 33, Tabela 13).



Rysunek 33. Wykresy krzywych zależności stężenie-efekt (A) agonisty 5-CT oraz antagonistów (B) SB-269970 i (C) mesulerginy, wyznaczonych bez cynku (•) i w obecności stężenia 10 μM jonów cynku (■) w receptorach 5-HT₇.

Tabela 13. Wpływ cynku na właściwości funkcjonalne 5-CT (EC₅₀) oraz SB-269970 i mesulerginy (K_b) wobec receptorów 5-HT₇. * p < 0,05.

Agonista	0 μM ZnCl ₂	10 μM ZnCl ₂
	EC ₅₀ [nM]	
5-CT	0,84 ± 0,21	2,67* ± 0,32
Antagonista	K _b [nM]	
SB-269970	1,75 ± 0,07	2,90* ± 0,06
Mesulergina	31,05 ± 7,51	37,15 ± 6,86

Dodatkowo, badając wpływ cynku w stężeniu 10 μM na skuteczność blokady efektów aktywacji receptorów 5-HT₇, zaobserwowano niewielki (ale statystycznie znamienne), wzrost wartości K_b dla SB-269970 i brak zmian parametrów funkcjonalnego antagonizmu dla mesulerginy (Rysunek 33, Tabela 13).

Otrzymane wyniki potwierdziły, zidentyfikowane uprzednio w eksperymentach wiązania radioligandów, hamujące działanie cynku na aktywność badanych związków ortosterycznych w stosunku do receptorów serotynowych typu 5-HT₇.

4 DYSKUSJA WYNIKÓW

Modulacja allosteryczna jest obecnie powszechnie uznanym mechanizmem regulacji wielu protein. W rodzinie receptorów GPCR, dla których allosteria to integralny proces wynikający z funkcji białka G, najwięcej prac poświęcono metabotropowym receptorom glutaminianu z klasy C GPCR [195, 196]. Natomiast w najliczniejszej (bo obejmującej 80% wszystkich GPCR) klasie A, główne badania koncentrowały się na receptorach muskarynowych i adenylinowych [7, 197–200] i jak do tej pory przedstawiono tylko pojedyncze przykłady modulacji allosterycznej receptorów serotoninowych GPCR. Obejmują one oddziaływanie endogennych substancji: oleamidu z receptorami 5-HT_{2A} i 5-HT₇ [15, 16], oraz cholesterolu z receptorami 5-HT_{1A} [201], a także egzogenego związku PNU-69176E wykazującego pozytywną modulację receptorów 5-HT_{2C} [17]. W 2009 roku ukazała się ponadto publikacja charakteryzująca allosteryczne efekty jonów cynku na aktywność receptorów 5-HT_{1A} [18]. W odniesieniu do badań nad rolą cynku w wielu procesach w OUN, a szczególnie w depresji, prowadzonych w Instytucie Farmakologii PAN [68, 123, 124], przedstawione przez autorów tej publikacji wyniki, stanowiły punkt wyjścia dla prac zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

4.1 Wpływ jonów cynku na receptory 5-HT_{1A}

We wspomnianej publikacji Barondo i Sales [18] na podstawie eksperymentów *in vitro*, opisali negatywną allosteryczną modulację jonów cynku zarówno w stosunku do wiązania antagonisty (³H]WAY-100635) jak i agonisty (³H]8-OH-DPAT) z receptorami 5-HT_{1A} w homogenatach kory mózgu szczura. Jednakże wnioski dotyczące wpływu cynku na oddziaływanie [³H]8-OH-DPAT, zostały oparte tylko na wynikach eksperymentów saturacji (wykazujących wzrost wartości stałej dysocjacji K_D i złożone zmiany w poziomie B_{max}), które, jak zaznaczyli autorzy, były niejednoznaczne i z tego powodu trudne do interpretacji. Ze względu na charakteryzującą oddziaływania allosteryczne zależność obserwowanego efektu od zastosowanego liganda ortosterycznego (*ang. probe dependance*), ocena aktywności modulatora wobec wiązania agonisty ma pierwszorzędne znaczenie dla potencjalnego działania *in vivo*. Stąd też w celu określenia nie budzącego wątpliwości mechanizmu wpływu cynku na wiązanie agonisty [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}, zakres testów *in vitro* do pracy

doktorskiej został znacznie rozszerzony, a otrzymane wyniki w pełni potwierdziły słuszność podjętych badań.

W istocie, zgodnie z wynikami przedstawionymi przez Barondo i Salesa [18], przeprowadzone eksperymenty saturacji wskazały na negatywną allosteryczną modulację wiązania [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A}. Tym niemniej, kolejne badania ujawniły, że przyjęcie tego modelu oddziaływania nie pozwalało opisać wszystkich złożonych efektów obserwowanych dla jonów cynku.

Po pierwsze, charakterystyczny przebieg wykresu wypierania [³H]8-OH-DPAT z miejsc wiążących receptorów 5-HT_{1A}, wskazywał początkowo na wzrost specyficznego wiązania radioliganda przy niskich stężeniach cynku (10 μM), a następnie na hamowanie wiązania zachodzące przy wyższych stężeniach (> 100 μM) jonów (Rysunek 22). Taki kształt krzywych wypierania radioliganda (określony jako typ „*bell-shape*”) obserwowano również dla kilku allosterycznych modulatorów receptorów adenylinowych A₁ [1, 58, 202]. Otrzymane w tych badaniach wyniki interpretowano jako dowód podwójnego, zależnego od stężenia mechanizmu działania, wg którego niskie stężenia związków rozpoznawały kieszeń allosteryczną, ale w wyższych wiązały się także w ortosterycznym miejscu receptora, łącząc dwa modele działania: allosterycznej pozytywnej modulacji i konkurencyjnego hamowania [1, 58, 202].

Kolejnym potwierdzeniem złożonych oddziaływań cynku, były wyniki testów kompetycji, w których odnotowany w obecności 10 μM Zn²⁺ wzrost wiązania endogennego agonisty (serotoniny) do receptorów 5-HT_{1A}, nie był obserwowany w stężeniu 500 μM Zn²⁺. Podobnie, kinetyczne eksperymenty asocjacji [³H]8-OH-DPAT, wykazały wzrost wartości stałej szybkości k_{ob} radioliganda tylko przy niskim (10 μM) stężeniu jonów Zn²⁺, (Rysunek 24, Tabela 7). Natomiast, w testach kinetycznych dysocjacji, chociaż obydwa stężenia Zn²⁺ powodowały zwolnienie procesu dysocjacji radioliganda (co jest zazwyczaj związane z pozytywną modulacją allosteryczną), to jednak efekt ten był znacznie silniej zaznaczony w stężeniu 10 μM cynku, przy którym zanikła szybka faza dysocjacji (Rysunek 24, Tabela 7). Dodatkowe potwierdzenie wzmacniającej aktywności agonistycznej, do receptora 5-HT_{1A}, działania niskiego stężenia jonów cynku, dostarczyły wyniki eksperymentów funkcjonalnych, w których wykazano około dwukrotne obniżenie wartości EC₅₀ dla R-(+)-8-OH-DPAT będącego pełnym agonistą receptora 5-HT_{1A}.

Podsumowując, wszystkie rezultaty przeprowadzonych eksperymentów potwierdziły, że wcześniejsze (postulowane w pracy Barondo Sales [18]) założenie modelu negatywnej

kooperatywności dla opisu efektów wpływu Zn^{2+} na oddziaływanie zarówno antagonisty jak i agonisty z receptorami 5-HT_{1A}, jest niewystarczające. Pomimo faktu, iż cynk w testach saturacji wykazuje aktywność typu NAM w stosunku do wiązania [³H]8-OH-DPAT, o czym świadczy wartość współczynnika kooperatywności $\alpha = 0,37$, to w testach kompetycji, kinetycznych i funkcjonalnych, niskie stężenia cynku (10 μ M) ujawniają cechy dodatniej modulacji allosterycznej wobec agonisty do receptorów 5-HT_{1A}.

Warto zauważyć, że w przypadku wspomnianych powyżej ligandów receptorów adenozynowych A₁ odnotowano, że związki te działając w niskim stężeniu, z jednej strony charakteryzowała pozytywna kooperatywność w odniesieniu do interakcji agonistów z receptorami, ale w obecności antagonistów te same modulatory, wykazały tylko właściwości hamujące [58, 202]. Podobne wnioski można wysunąć, zestawiając obecnie uzyskane dane dla efektów wpływu cynku na aktywność agonisty [³H]8-OH-DPAT, z negatywną modulacją allosteryczną wiązania antagonisty [³H]WAY-100635 do receptorów 5-HT_{1A}, opisaną w pracy Barrondo i Salesa [18].

Należy także wspomnieć, że złożony mechanizm działania cynku został wykryty również dla innych białek receptorowych. W badaniach elektrofizjologicznych receptora 5-HT₃, niskie stężenie Zn^{2+} (0,3 – 10 μ M) wzmacniało, a wysokie stężenie Zn^{2+} (30 – 200 μ M) obniżało odpowiedź komórek wywoływaną przez 5-HT [203]. Zależne od stężenia allosteryczne działanie cynku wykryto także wobec jonotropowych receptorów glicyny [204]. Podobne efekty wykazano również dla receptorów β_2 -adrenergicznych, w których obecność 5 μ M Zn^{2+} wzmacniała powinowactwo agonisty, podczas gdy 500 μ M Zn^{2+} hamowało wiązanie antagonisty [102].

W końcu, co niemniej istotne, przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyniki odnoszące się do receptorów 5-HT_{1A}, wykazały znakomitą zbieżność z podwójnym agonistyczno/antagonistycznym profilem działania cynku wykrytym w testach behawioralnych *in vivo*, które zostały równolegle przeprowadzone w Instytucie Farmakologii PAN i opublikowane łącznie z otrzymanymi przez mnie rezultatami w pracy:

Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, Rafalo A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, Tanaka KF, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, Szewczyk B. *Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT_{1A} Receptors: In Vitro and In Vivo Studies*. Mol Neurobiol. 2016, 53 (10):6869-6881.

4.2 Wpływ jonów cynku na receptory 5-HT₇

W szeregu badań wiązania radioligandów i testów funkcjonalnych wykazano, że oprócz modulacji receptorów 5-HT_{1A}, cynk wpływał także na regulację receptorów typu 5-HT₇. W eksperymentach saturacji przeprowadzonych w obecności rosnących stężeń cynku, zaobserwowano zmiany w powinowactwie wszystkich badanych radioligandów tj.: agonisty [³H]5-CT oraz antagonistów [³H]SB-269970 i [³H]mesulerginy, przy czym wielkości obserwowanych efektów były różne, co wyrażały ilościowo wartości wyznaczonych współczynników kooperatywności α . W przypadku wiązania [³H]5-CT i [³H]mesulerginy obliczone wartości α (odpowiednio 0,15 i 0,25) świadczyły o mechanizmie negatywnej allosterii, a wyznaczony dla [³H]SB-269970 bardzo niski współczynnik kooperatywności $\alpha = 0,06$ sugerował możliwość konkurencyjnego antagonizmu [7, 56]. Powyższe wnioski potwierdzono w eksperymentach kinetycznych, w których w obecności 500 μ M cynku odnotowano, znamienne dla modulacji typu NAM [56], wzrost wartości stałych szybkości dysocjacji dla [³H]5-CT i [³H]mesulerginy. Podobnie, w przypadku [³H]SB-269970 zaobserwowany brak wpływu na szybkość dysocjacji, tak samo jak wcześniej wyznaczony w eksperymentach saturacji współczynnik $\alpha \rightarrow 0$, wskazywał na kompetencyjny antagonizm. Różnice wykryte w efektach działania cynku wobec poszczególnych radioligandów receptorów 5-HT₇, odzwierciedlały charakterystyczną dla allosterii zależność od próbnika. Analogiczne przykłady modulatorów, które cechuje różny stopień kooperatywności można znaleźć w licznych publikacjach. W grupie najczęściej badanych receptorów muskarynowych, prototypowy allosteryczny modulator, alkuronium, powodował dziesięciokrotną zmianę w powinowactwie acetylocholiny do receptorów muskarynowych M₂, ale tylko 1,7-krotną zmianę w powinowactwie do innego agonisty – arekoliny [7]. Z drugiej strony, w odniesieniu do antagonistów [³H]metylo-QNB i [³H]atropiny, alkuronium obniżał wiązanie pierwszego a zwiększał wiązanie drugiego radioliganda [205].

W toku przeprowadzonych w pracy doktorskiej badań, różnice w efektach działania cynku wobec ortosterycznych radioligandów receptorów 5-HT₇, wykryto również w wyznaczonych (w eksperymentach kompetycji), wartościach IC₅₀. Wskazały one na 3–4-krotnie silniejsze hamowanie wiązania [³H]5-CT i [³H]mesulerginy niż [³H]SB-269970. Co więcej, w przypadku eksperymentów kompetycji krzyżowej z wykorzystaniem nieznakowanych ligandów ortosterycznych: 5-CT, SB-269970 oraz

klozapiny, obecność 500 μM jonów cynku spowodowała umiarkowane, ale statystycznie istotne, obniżenie ich powinowactwa.

Dodatkowo został również zbadany wpływ Zn^{2+} na wewnątrzkomórkową sygnalizację receptora 5-HT₇, za pomocą testu funkcjonalnego LANCE. Według przedstawianych w literaturze wyników, cynk wpływając na aktywność wewnętrzną wielu GPCR, może zachowywać się zarówno jak agonista, allosteryczny modulator lub odwrotny agonista [102, 103, 206–210]. Testy funkcjonalne przeprowadzone w naszej linii komórkowej, (która charakteryzuje się wysokim poziomem konstytutywnej aktywności), dowiodły, że cynk w stężeniu 10 μM zachowywał się jak neutralny antagonist. Nie zmieniał poziomu spontanicznej aktywności receptora i blokował indukowaną przez 5-CT, produkcję cAMP. Ponadto badane stężenie cynku, nie miało żadnego wpływu na siłę hamowania spontanicznej aktywności receptorów 5-HT₇ przez odwrotnych agonistów SB-269970 i mesulerginę, jednakże obecność 10 μM jonów osłabiała funkcjonalne efekty selektywnego antagonisty receptora 5-HT₇, tj. związku SB-269970, poprzez blokadę jego zdolności do hamowania odpowiedzi wywołanej przez agonistę.

Omówione wyżej wyniki odnoszące się do receptorów serotoninowych typu 5-HT₇ zostały opublikowane w pracy:

Satała G, Duszyńska B, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ. *Allosteric Inhibition of Serotonin 5-HT₇ Receptors by Zinc Ions*. Mol Neurobiol. 2017, 28. doi:10.1007/s12035-017-05360.

Podsumowując, uzyskane rezultaty wykazały, że w odniesieniu do receptorów 5-HT₇ cynk jest negatywnym allosterycznym modulatorem wobec badanych ortosterycznych ligandów o aktywności agonistycznej i antagonistycznej, a zastosowany w testach funkcjonalnych w stężeniu 10 μM , przejawia cechy neutralnego antagonisty.

Biorąc pod uwagę, że stężenie identyfikowanego pozakomórkowo Zn^{2+} jest niższe od 100 μM [211], efekty zaobserwowane w naszych badaniach w obecności 10 μM cynku, mogą reprezentować jego prawdopodobny mechanizm działania w warunkach fizjologicznych zarówno wobec receptorów 5-HT_{1A} jak i 5-HT₇. Pomimo, że oba receptory różnią się pod względem kierunku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, to wzrost stymulacji receptora 5-HT_{1A} sprzężonego z białkiem G_{i/o} [212–214], oraz obniżenie efektów aktywacji receptora 5-HT₇ (sprzężonego z białkiem G_s [168]), powinny prowadzić do zmniejszenia produkcji cAMP, a co za tym idzie mieć taki sam wpływ na pobudliwość neuronów w OUN.

Ponadto, ponieważ receptory 5-HT_{1A} i 5-HT₇ współwystępują w strukturach mózgu odpowiedzialnych m.in. za kontrolę nastroju, a ich funkcjonalne powiązania sugerowano w zaburzeniach depresyjnych [150, 215], regulacja ich aktywności za pośrednictwem jonów cynku może być potencjalnym mechanizmem utrzymywania homeostazy w układzie serotoninowym. Co więcej, określone dla cynku, wobec receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ typy modulacji allosterycznej są zgodne pod względem profilu funkcjonalnego z agonizmem do receptorów 5-HT_{1A} i antagonizmem do receptorów 5-HT₇, które odpowiadają za własności przeciwdepresyjne ligandów, i są identyfikowane w różnych modelach behawioralnych [216–221]. Zatem, w świetle otrzymanych wyników, można uznać, iż pozytywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT_{1A} oraz negatywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT₇ odgrywają rolę w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania jonów cynku.

4.3 Podsumowanie wyników

Efekty zaobserwowane dla jonów cynku w stosunku do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ w badaniach *in vitro* przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej obejmują:

- 1) pozytywną allosteryczną modulację w receptorach 5-HT_{1A} wykrytą w niskich (10 μM) stężeniach cynku wobec agonistów (5-HT i 8-OH-DPAT) w eksperymentach wiązania radioliganda i w testach funkcjonalnych,
- 2) obniżenie powinowactwa agonistów do receptorów 5-HT_{1A} przez wysokie (500 μM), a więc нефизjologiczne stężenia cynku w testach wiązania radioliganda,
- 3) negatywną allosteryczną modulację w receptorach 5-HT₇ wykrytą w niskich i wysokich stężeniach cynku dla agonisty (5-CT) oraz tylko w wysokich (500 μM) stężeniach dla antagonistów w testach wiązania radioliganda,
- 4) hamowanie odpowiedzi funkcjonalnej receptorów 5-HT₇ przez niskie (10 μM) stężenie cynku o cechach neutralnego antagonizmu.

Otrzymane wyniki wskazują, że regulacja aktywności receptorów serotoninowych przez cynk może uczestniczyć w procesie utrzymywania homeostazy, co jest związane z plejotropowym działaniem cynku w OUN, które obejmuje m.in. modulację allosteryczną białek receptorowych w różnych układach neurotransmisyjnych.

Ponadto, zidentyfikowany dla receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ mechanizm allosterycznej modulacji, może również częściowo wyjaśniać skuteczność suplementacji cynku, w leczeniu depresji.

5 MATERIAŁY

5.1 Hodowla komórkowa

Wszystkie płyny i odczynniki do hodowli komórek (DMEM, surowica, PBS, trypsyna, G418) zostały zakupione w firmie Lonza. W tabeli 14 do 18 wyszczególniono odczynniki zastosowane do oceny skuteczności transfekcji.

Tabela 14. Odczynniki użyte do izolacji RNA.

Nazwa	Producent
2-Propoanol	POCH
Chloroform	POCH
TRIzol	Invitrogen

Tabela 15. Odczynniki wykorzystane do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT).

Nazwa	Producent
Inhibitor RNAz	Applied Biosystem
Startery Oligo-dT	Fermentas
Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji (Omniscript Reverse Transcription Kit)	Quiagen

Tabela 16. Reagenty użyte do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Nazwa	Producent
Mieszanka reakcyjna (Taq PCR Master Mix) zawierająca roztwór Taq polimerazy wraz z nukleotydami dNTP	Qiagen
Sekwencje oligonukleotydów	Genomed

Tabela 17. Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym.

Nazwa	Producent
Agaroza	Sigma-Aldrich
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
Bufor obciążający do próbek (6x Orange Loading Dye Solution)	Fermentas
EDTA	Sigma-Aldrich
Kwas Borowy	Sigma-Aldrich
Marker λ DNA	Fermentas
Trizma	Sigma-Aldrich

Tabela 18. Produkty użyte w metodzie Western Blot.

Nazwa	Producent
Akrylamid/Bisakrylamid 40%	Sigma-Aldrich

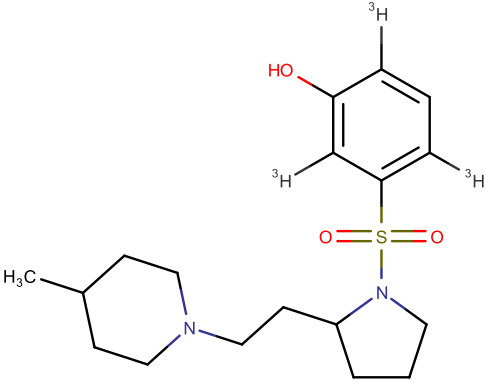
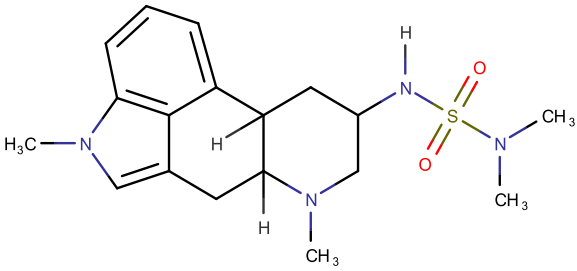
Albumina	Sigma-Aldrich
APS	Sigma-Aldrich
BCA zestaw	Thermo Scientific
BM Chemiluminescence Western Blotting kit	Roche
DTT	Sigma Aldrich
Glicyna	Sigma-Aldrich
Inhibitory proteaz	Sigma-Aldrich
Metanol	POCH
Przeciwciała skierowane przeciwko receptorom 5-HT _{1A} , 5-HT _{7B} oraz β-aktynie	Sigma-Aldrich
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
SDS	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Trizma	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

5.2 Radioligandy wykorzystane w testach *in vitro*

Wszystkie znakowane trytem radioligandy, które użyto w eksperymentach *in vitro* zostały zakupione w firmie PerkinElmer. [³H]8-OH-DPAT stosowano w badaniach wpływu jonów cynku na aktywność receptorów 5-HT_{1A}, natomiast [³H]5-CT, [³H]SB-269970 i [³H]mesulerginę wobec receptorów 5-HT₇ (Tabela 19).

Tabela 19. Wykaz użytych radioligandów.

Radioligand	Struktura chemiczna	Aktywność specyficzna
[³ H]8-OH-DPAT		139,7 Ci / mmol
[³ H]5-CT		75,2 Ci/mmol

[³ H]SB-269970		34,5 Ci/mmol
[³ H]mesulergina	 <p data-bbox="517 965 1150 1032">UWAGA: Brak danych o lokalizacji podstawień [³H] na stronie producenta.</p>	84,7 Ci/mmol

5.3 Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystane w testach *in vitro*

Tabela 20. Lista odczynników.

Nazwa	Producent
5-CT	Sigma-Aldrich
8-OH-DPAT	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Klozapina	Sigma-Aldrich
Kwas askorbiniowy	Sigma-Aldrich
Mesulergina	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	POCH
Pargilina	Sigma-Aldrich
Płyn scyntylacyjny Ultima Gold	PerkinElmer
SB-269970	Sigma-Aldrich
Serotonina	Sigma-Aldrich
Trizma® (pH 7,7)	Sigma-Aldrich
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich

Tabela 21. Lista materiałów zużywalnych.

Nazwa	Producent
Clear Seal 3730	Thermo Scientific
Mikropłytki 96-dółkowe	PerkinElmer
Nieprzewodzące końcówki RoboRack do automatycznej stacji pipetującej Janus	PerkinElmer
Pojemniczki do MultiProbe II HT EX Tip (25 ml oraz 60 ml)	PerkinElmer
Probówki szklane 5 ml (12 i 75 mm)	Lab-Szkło
Tape Multiscreen® Harvester Clear	Millipore

5.4 Aparatura

Tabela 22. Wykaz aparatury użytej w badaniach.

Nazwa	Producent
Aparat do elektroforezy białek Mini protean II	BioRad
Aparat do elektroforezy DNA	Invitrogen
Automatyczna stacja pipetująca JANUS Automated Workstation – Expanded Platform	PerkinElmer
Czytnik M1000 Pro	Tecan
Homogenizator pojemnościowy Ultra-Turrax T8	IKA
Inkubator CO ₂ Galaxy 170R HeraSafe KS12	New Brunswick Scientific
Komora z przepływem laminarnym	Thermo Scientific
Licznik fluorescencyjny Infinity M1000	Tecan
Licznik scyntylacyjny MicroBeta TriLux	PerkinElmer
Maszyna filtrująca UNIFILTER HARVESTER	PerkinElmer
Mikropłytkowy zgrzewacz ALPS™ 50 V	Thermo Scientific
Odwrócony mikroskop optyczny z kontrastem faz – DMIL LED	Leica
Spektrofotometr Multiscan Spectrum	Thermo Labsystem
Stacja do usuwania nadsączy znad hodowli	Gilson
System detekcji luminescencji – Fuji LAS-4000	Fuji
Termocykler T3000	Biometra
Transiluminator UV do wizualizacji żeli Fuji-LAS 1000	Fuji
Vortex mikser GVLab	Gilson
Waga analityczna LE 26P-OCE	Sartorius
Waga analityczna PG203	Mettler Toledo
Wirówka laboratoryjna z chłodzeniem 3-16PK	Sigma-Aldrich
Zestaw pipet laboratoryjnych	Eppendorf

5.5 Wykaz użytych zasobów internetowych i programów komputerowych

Tabela 23. Bazy danych.

Nazwa bazy	Opis	Właściciel	Link
------------	------	------------	------

PDSP	Baza danych gromadząca wyniki eksperymentalnych badań powinowactwa związków do receptorów	Strona jest finansowana przez Program Badań Leków Psychoaktywnych NIMH oraz przez dary od Heffter Research Institute. [222]	https://kiddbdev.med.unc.edu/databases/pdsp.php
RCSB PDB	Baza danych gromadząca struktury krystalograficzne białek	WorldWide PDB www.wwpdb.org [223]	www.rcsb.org
UniProtKB	Baza danych zawierająca informacje o sekwencji i funkcji białek	2002- 2017 UniProt Consortium [224]	http://www.uniprot.org/

Tabela 24. Oprogramowanie.

Nazwa oprogramowania	Opis	Wersja	Autor/ Producent
GraphPad Prism	Program do analizy wyników uzyskanych w doświadczeniach bindingowych.	7.0	GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com
MicroBeta Workstaton	Oprogramowanie do licznika scyntylacyjnego MicroBeta TriLux.	4.0	PerkinElmer
Microsoft Office	Pakiet zawierający edytor tekstu oraz arkusz kalkulacyjny.	2010	Microsoft Corporation
Multiskan Spectrum Software	Oprogramowanie do spektrofotometru Multiskan Spectrum	1.1	Thermo Labsystem
The PyMOL Molecular Graphics System	Program do wizualizacji cząsteczek.	1.8	Schrödinger, LLC
WinPREP	Oprogramowanie do robota pipetującego JANUS Automated Workstation – Expanded Platform	4.1	PerkinElmer
Image Gauge	Program do analizy obrazu żeli agarozowych i membran z analiz Western Blot	4.0	FujiFilm Corporation
Primer3-BLAST	Oprogramowanie do projektowania starterów do reakcji PCR	3.0	NCBI

6 METODY

6.1 Hodowla komórek linii HEK293 z ekspresją receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B}

6.1.1 Warunki hodowli

Wykorzystane w badaniach komórki charakteryzujące się ekspresją receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{7B} są rutynowo używane w Zakładzie Chemii Leków IF PAN w eksperymentach wyznaczania powinowactwa do receptorów metodą wiązania radioliganda i w testach funkcjonalnych efektów stymulacji receptorów. Otrzymano je poprzez transfekcję komórek HEK293 (ATCC) plazmidami pcDNA 3.1 kodującymi cDNA dla w/w białek (cDNA.org) i późniejszą selekcję komórek wykazujących ekspresję genu oporności na neomycynę przy użyciu antybiotyku genetycyny (G418). Hodowle linii komórkowych prowadzono w naczyniach o powierzchni 75cm², w standardowych warunkach (37°C, wilgotna atmosfera zawierająca 5% CO₂) w pożywce DMEM (*ang. Dulbecco's modified Eagle's medium*) z wysoką zawartością glukozy, wzbogaconej w 10% płodową surowicę wołową oraz antybiotyk selekcyjny G418 o stężeniu 500 µg/ml, który pomijano w przypadku hodowli komórek nietransfekowanych.

6.1.2 Pasaże komórek

Po osiągnięciu przez komórki około 90% konfluencji, usuwano pożywkę z hodowli po czym przepłukiwano ją ogrzanym do temperatury pokojowej roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, 154 mM NaCl, 5,6 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄). Po usunięciu PBS-u, do naczyń dodawano 2 ml mieszanki 0,25% trypsyny i 0,02% kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i inkubowano je około 2 minuty. W tym czasie enzym hydrolizuje białka umożliwiające interakcję komórek między sobą, jak i z podłożem hodowlanym. Natomiast EDTA chelatuje jony Ca²⁺, które są niezbędne w adhezji komórek z wykorzystaniem kadheryn. W rezultacie tej inkubacji, komórki odrywają się od podłoża i ilość połączeń komórka-komórka drastycznie spada. Po zablokowaniu i rozcieńczeniu trypsyny poprzez dodanie 10 ml pełnego medium i przepipetowaniu całości, mieszaninę przenoszono do probówek typu falcon i wirowano przez 5 minut z prędkością 180 x g. Nadsącz dekantowano, a pozostały osad komórkowy

zawieszano w świeżej pożywce. 1/10 tej zawiesiny przenoszono do nowego naczynia, w którym kontynuowano hodowlę komórek.

6.1.3 Przygotowanie hodowli komórkowych do badań funkcjonalnych

Po osiągnięciu przez komórki około 90% konfluencji, usuwano pożywkę z nad hodowli po czym komórki inkubowano przez 2 godziny w pożywce DMEM, bez dodatku surowicy. Po tym czasie, ponownie usuwano medium hodowlane, a komórki po przepłukaniu roztworem PBS, zawieszano w 0,02% roztworze EDTA w PBS. Po wirowaniu przez 5 minut z prędkością 180 x g, nadsącz dekantowano, a komórki zawieszano w 1 ml buforu HBSS.

6.1.4 Przygotowanie hodowli komórkowych do badania powinowactwa metodą liganda znakowanego izotopowo

W celu przygotowania membran przeznaczonych do badania powinowactwa *in vitro* metodą liganda znakowanego izotopowo, komórki wysiewano na butelkach o powierzchni 150 cm² i hodowano do momentu osiągnięcia 90% konfluencji. Następnie przemywano je buforem PBS po czym zawieszano w PBS z dodatkiem 0,1 mM EDTA i 1 mM ditiotreitolu (DTT). Zawiesinę wirowano z prędkością 200 x g przez 5 minut, po czym nadsącz dekantowano, a osady komórkowe zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu etapu homogenizacji.

Zamrożone osady komórek HEK293 ze stabilną ekspresją receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇, homogenizowano przez 15 s (Ultra Turrax tissue) w buforze Tris-HCl (50 mM pH 7,7) z dodatkiem 0,1 mM EDTA, a następnie dwukrotnie wirowano przez 20 min w 4°C (35 000 x g). Pomiędzy wirowaniami osady inkubowano przez 15 min w 37°C. Odwirowany materiał zawieszano w suplementowanym buforze Tris-HCl. Próbkę o zawartości 1 ml zamrażano i przechowywano w -80°C do momentu użycia w eksperymencie. Stężenie białka w próbkach określono metodą Bradforda (opis w punkcie 6.2.2).

6.2 Ocena ekspresji receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B} w komórkach linii HEK293

Przed przystąpieniem do badań *in vitro* posiadane linie komórkowe, poddano walidacji pod kątem oceny skuteczności ekspresji receptorów na poziomie mRNA i białka.

6.2.1 Ocena ekspresji mRNA metodą RT-PCR

Izolacja RNA

Komórki wysiano na szalki hodowlane o powierzchni średnicy 3,5 cm w ilości 3×10^5 , a następnie hodowano w warunkach selekcyjnych do uzyskania około 90% konfluencji. Po przepłukaniu komórek buforem PBS, zawieszano je w 300 μ l odczynnika do izolacji RNA (Trizol). Po pięciominutowej inkubacji, do lizatów komórkowych dodano 60 μ l chloroformu, po czym całość wytrząsano i wirowano przez 15 minut z prędkością 12 000 x g. Następnie górną, wodną fazę, przenoszono do nowych probówek i wytrącano RNA poprzez dodanie izopropanolu w stosunku objętościowym 1:1 i dziesięciominutową inkubację. Mieszaninę wirowano przez 10 minut z prędkością 12 000 x g, a nadsącz odrzucono. Powstały w ten sposób bezbarwny osad RNA płukano w 75% etanolu poprzez wirowanie przez 5 minut z prędkością 7500 x g. Po ponownym odrzuceniu nadsączu, RNA znajdujące się w peletce wysuszone, a następnie zawieszono w wodzie wolnej od RNA. Po rozpuszczeniu osadu, zmierzono absorbancję próbki przy $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm. Korzystając z faktu, że absorbancja RNA o stężeniu 40 mg/ml wynosi 1, obliczono stężenie wyizolowanych próbek RNA. Stosunek A260 nm/A280 nm wynoszący około 1,7 świadczył o wystarczającej czystości otrzymanego RNA.

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Reakcję syntezy cDNA na matrycy RNA przeprowadzono z wykorzystaniem starterów oligo dT. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 1 μ g RNA wyizolowanego z hodowli otrzymanych klonów komórek, 0,5 μ l oligo dT, 1 μ l dNTP, 2 μ l 10 x stężonego buforu RT oraz 1 μ l odwrotnej transkryptazy. Całość dopełniano wodą do objętości 20 μ l. Reakcję prowadzono przez 1 godzinę w 37°C po czym zdegradowano pozostałe RNA i inaktywowano enzym poprzez inkubację próbek w 72°C przez 5 minut.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję powielania fragmentów cDNA receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B} prowadzono w obecności specyficznych starterów przy użyciu zestawu Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen). Jako matrycę użyto 20 ng otrzymanego uprzednio cDNA, a w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło ponadto 1 μ l 10 x stężonego buforu reakcyjnego, 1 μ l polimerazy Taq oraz 5 μ M każdego ze starterów. Całość dopełniono wodą do objętości 10 μ l i umieszczano w termocyklerze. Warunki reakcji przedstawiono w tabeli 25. A powstałe w jej wyniku produkty rozdzielono na 1,2% żelu agarozowym. Jako kontrolę przeprowadzono reakcję PCR wykrywającą cDNA dla czynnika transkrypcyjnego EF-2.

Tabela 25. Sekwencje starterów oraz warunki reakcji PCR amplifikującej cDNA receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B} oraz dla czynnika elongacyjnego EF-2.

Gen	Startery	Warunki reakcji	Produkt
5-HT_{1A}	Forward 5'- TCTCTATGGGCGCATATTCC-3' Reverse 5'- CCCGACTCTCCATTCCACT-3'	95°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s – 30 cykli	138 pz
5-HT_{7B}	Forward 5'- TCAGCCAGGACTTTGGCTAT-3' Reverse 5'- TGTGTTTGGCAGCACTCTTC-3'	95°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s – 30 cykli	123 pz
EF-2	Forward 5'- GACATCACCAAGGGTCAG-3' Reverse 5'- GCGGTCAGCACAATGGCATA- 3'	95°C 30s, 60°C 50s, 72°C 30s – 35 cykli	218 pz

Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym

1,5 g agarozy podgrzano w 100 ml buforu TBE (89 mM Tris/kwas borowy pH 8,3; 2 mM EDTA) do całkowitego jej rozpuszczenia, a po ostudzeniu dodano bromek etydyny, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,1%. Przygotowany w ten sposób roztwór wylewano do specjalnej formy i zostawiano do zastygnięcia. Następnie, żel umieszczano w komorze wypełnionej buforem TBE, po czym nakładano do studzienek standard DNA oraz produkty reakcji PCR wymieszane z buforem obciążającym (10 mM Tris pH 7,6; 0,15% Orange G; 0,03% Cyjanol ksylenu; 60% glicerol; 60 mM EDTA) w stosunku 1:6. Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 90 V. Czas rozdziału uzależniony był od wielkości analizowanych fragmentów DNA. Do wizualizacji prążków wykorzystano system FujiLas-4000.

6.2.2 Ocena ekspresji białka metodą Western Blot

Izolacja białek z linii komórkowych

Komórki przeznaczone do pomiarów ilości białka, po osiągnięciu około 90% konfluencji przemyto dwukrotnie PBS-em, a następnie zawieszano w buforze lizującym zawierającym 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% deoksycholenu sodu, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0 oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Lizaty komórkowe wirowano przy 10 000 x g w 4°C przez 15 minut po czym nadsącze przenoszono do świeżych probówek i poddawano dalszej analizie.

Pomiar stężenia białka metodą kolorymetryczną

Oznaczenie stężenia białka wykonano metodą kolorymetryczną Bradforda. W eksperymencie wykorzystano zestaw Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Podczas oddziaływania białka z barwnikiem Coomassie następuje natychmiastowe przesunięcie maksimum absorpcji z 465 nm do 595nm, co wiąże się z jednoczesną zmianą koloru z brązowego na niebieski. W oznaczeniach wykorzystano protokół podany przez producenta. Po zmieszaniu 150 µl odczynnika ze 150 µl badanej próbki całość krótko wytrząsano, po czym inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej i zmierzono absorbancję przy długości fali 595nm na spektrofotometrze płytkowym Multiscan Spectrum. Stężenie białka obliczono w odniesieniu do absorbancji otrzymanych dla krzywej standardowej albuminy wołowej (BSA) (Tabela 26).

Tabela 26. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej (BSA). Wyjściowe stężenie roztworu albuminy wynosiło 2 mg/ml.

Próbka	Schemat rozcieńczeń dla zakresu 1-25 µg/ml		
	Woda	BSA	Końcowe stężenie BSA
A	2370 µl	30 µl stoku	25 µg/ml
B	4950 µl	50 µl stoku	20 µg/ml
C	3970 µl	30 µl stoku	15 µg/ml
D	2500 µl	2500 µl roztworu B	10 µg/ml
E	2000 µl	2000 µl roztworu D	5 µg/ml
F	1500 µl	1500 µl roztworu E	2,5 µg/ml
G	5000 µl		0 µg/ml
Próbka	Schemat rozcieńczeń dla zakresu 100-2000 µg/ml		
	Woda	BSA	Końcowe stężenie BSA
A	0 µl	300 µl stoku	2000 µg/ml
B	125 µl	375 µl stoku	1500 µg/ml
C	325 µl	325 µl stoku	1000 µg/ml
D	175 µl	175 µl roztworu B	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl roztworu C	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl roztworu E	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl roztworu F	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl roztworu G	25 µg/ml
I	400 µl	0 µl	0 µg/ml

Przygotowywanie żeli poliakrylamidowych

Do rozdzielania i detekcji białek receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{7B} o masie około 50 kDa stosowano 10% żel rozdzielający oraz 4% żel zagęszczający, których skład przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Skład żeli zastosowanych w eksperymentach.

Składnik	10% żel rozdzielający	4% żel zagęszczający
Woda	4,845 ml	3,17 ml
Tris-HCl	2,5 ml 1,5M, pH 8,8	1,25 ml 0,5M, pH 6,8
10% SDS	100 μ l	50 μ l
40% akrylamid	2,5 ml	0,5 ml
10% APS	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Przygotowanie próbek do rozdziału elektroforetycznego

Białko wyizolowane z hodowli komórkowych (10, 20 i 40 μ g w przypadku transfekowanych linii komórkowych lub 40 μ g w przypadku natywnej linii HEK293) mieszano w stosunku 1:6 z buforem obciążającym (0,1 M Tris-HCL, 4% SDS, 0,01% glicerol, 0,001% błękit bromofenolowy, pH 6.8) oraz 1:20 z 2M ditiotreiolem. Próbkę dopełniano do 20 μ l buforem lizującym. Białko zawarte w próbkach denaturowano przez 5 minut w 95°C, a następnie krótko wirowano i nakładano do studzienek żelu poliakrylamidowego.

Rozdział elektroforetyczny

Spolimeryzowane żele mocowano w kasecie, a następnie umieszczano w komorze wypełnionej buforem elektrodowym zawierającym 250 mM Tris, 192 mM glicynę oraz 0,1% SDS, pH 8,6. Uprzednio przygotowane próbki białek wprowadzono do studzienek w żelu zagęszczającym. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100 V, aż do osiągnięcia przez próbki poziomu żelu rozdzielającego, po czym rozdzielanie kontynuowano przy napięciu 160 V do momentu, w którym barwnik osiągnął koniec tego polimeru.

Transfer białek na membranę nitrocelulozową

Transfer rozdzielonych elektroforetycznie białek z żelu na membranę nitrocelulozową przeprowadzono w buforze zawierającym 250 mM Tris, 192 mM glicynę, pH 8,6 oraz 5% metanol. Aby zapobiec przegrzewaniu się żelu, procedurę prowadzono w lodzie przy stałym napięciu 100 V przez 1 godzinę.

Immunodetekcja

Membranę nitrocelulozową przepłukano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej trisem (TBST, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,5) po czym blokowano wytrząsając w 3% roztworze albuminy w TBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membrany inkubowano przez noc w 4°C w 1% roztworze albuminy w TBST zawierającym przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko

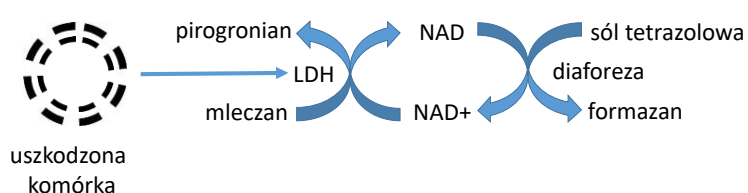
5-HT_{1A} lub 5-HT_{7B}, rozcieńczone 1:1000. Inkubację membran w 1% roztworze albuminy w TBST zawierającym przeciwciała drugorzędowe w rozcieńczeniu 1:10 000, sprzężone z peroksydazą chrzanową, prowadzono przez 1 godzinę z wytrząsaniem, w temperaturze pokojowej. Po każdym z etapów inkubacji z przeciwciałami, membrany płukano trzykrotnie w roztworze TBST przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Prążki białkowe wizualizowano poprzez inkubację z substratem dla peroksydazy chrzanowej przez 1 minutę a następnie przeprowadzono detekcję luminescencji w urządzeniu Fuji Film LAS-4000. Jako kontrolę procedury, wykorzystano reakcję z przeciwciałami wykrywającymi β -aktynę. W tym celu, po immunodetekcji białek receptorowych, membrany płukano w roztworze TBST przez 10 minut, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez kolejne 30 minut w roztworze Restore Western Blot Stripping Buffer. Dzięki temu, związane przeciwciała oddysocjowywały i następowało wygaszenie sygnału chemiluminescencyjnego. Po kilku kolejnych płukaniach membran w TBST, blokowano je ponownie w 3% roztworze albuminy w TBST w 4°C przez noc. Następnie, membrany inkubowano przez 2 godziny w 1% roztworze albuminy w TBST zawierającym przeciwciała pierwszorzędowe, skierowane przeciwko β -aktynie, rozcieńczone 1:10 000. Inkubację membran w 1% roztworze albuminy w TBST, zawierającym przeciwciała drugorzędowe w rozcieńczeniu 1:25 000 prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Płukania pomiędzy inkubacjami, jak i wizualizację reakcji przeprowadzono tak, jak opisano powyżej.

6.3 Analiza żywotności komórek

6.3.1 Test śmiertelności komórek wykorzystujący dehydrogenazę mleczanową (LDH)

W celu oceny potencjalnego wpływu ZnCl₂ na śmiertelność komórek, zastosowana została metoda kolorymetryczna. Uszkodzenie integralności błony komórkowej (śmierć komórki) powoduje uwolnienie LDH do otoczenia. Ilość zewnątrzkomórkowego LDH można określić wykorzystując sprzężony układ reakcji enzymatycznych, w których LDH katalizuje konwersję mleczanu do pirogronianu przez redukcję NAD⁺ do NADH. Następnie diaforaza wykorzystuje NADH do redukcji soli tetrazolowej do czerwonego formazanu, którego absorbancja może być mierzona przy długości fali 490 nm. Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta (Thermo Scientific™ Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, Waltham, Massachusetts, USA). W skrócie, komórki rozsiano na płaskodennej płytce 96-dołkowej, poziom LDH

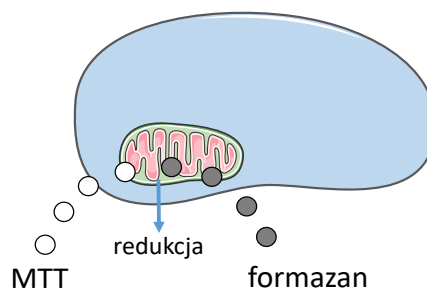
uwalniany z uszkodzonych komórek do pożywki hodowlanej zmierzono po upływie 30 minut po ekspozycji na różne stężenia $ZnCl_2$ w płytkach 96-dołkowych (Rysunek 34). Wolne od komórek nadsące hodowli zebrano z każdej studzienki i inkubowano z odczynnikami w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Intensywność koloru czerwonego utworzonego w tym teście, była mierzona przy pomocy spektrofotometru (Multiscan, Thermo Fisher Scientific). Dane normalizowano do aktywności LDH uwolnionego z komórek traktowanych buforem lizującym (100%) i wyrażono jako procent całkowitego sygnału \pm SEM z trzech oddzielnych doświadczeń.



Rysunek 34. Schemat działania testu LDH.

6.3.2 Test żywotności komórek z wykorzystaniem soli tetrazolowej (MTT)

Redukcja soli tetrazolowej jest powszechnie akceptowaną metodą do badania proliferacji komórek. Żółty MTT jest redukowany przez dehydrogenazy metabolicznie aktywnych komórek, tworząc NADH i NADPH. Ilość powstającego w wyniku reakcji purpurowego, wewnątrzkomórkowego formazanu mierzy się przy użyciu spektrofotometru (Rysunek 35). W celu przeprowadzenia testu, komórki rozsiano na płaskodennej płytce 96-dołkowej. Aby ocenić żywotność komórek po 30 minutowej ekspozycji na różne stężenia $ZnCl_2$, zastosowano zestaw Vybrant MTT Celi Proliferation Assay zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher Scientific). Pokróćce, MTT dodano do każdego dołka płytki, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,15 mg/ml i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Powstały w wyniku reakcji barwnik solubilizowano w DMSO i mierzono jego absorbancję w spektrofotometrze przy długości fali 570 nm (Multiscan Thermo Fisher Scientific). Dane znormalizowano do absorbancji komórek kontrolnych (100%) i wyrażono jako procent kontroli \pm SEM ustanowionych z trzech oddzielnych doświadczeń.



Rysunek 35. Schemat działania testu MTT.

6.4 Badania *in vitro* prowadzone z zastosowaniem ligandów znakowanych radiozotopowo

Do oceny własności allosterycznych cynku, zastosowano metody wiązania specyficznego radioliganda prowadzone w stanie równowagi wiązania kompleksu ligand-receptor tj. eksperymenty saturacji, i kompetycji, oraz eksperymenty kinetyczne określające szybkość asocjacji i dysocjacji radioliganda z kompleksu z receptorem .

Zmiany w wyznaczanych parametrach, tj. wartości: K_D (stała powinowactwa ortosterycznego związku do danego receptora), B_{max} (maksymalna ilość receptorów), K_i (stała powinowactwa nieznakowanego liganda ortosterycznego wyznaczona w eksperymencie kompetycji), oraz k_{ob} (stała asocjacji) i k_{off} (stała dysocjacji) posłużyły do oceny allosterycznej modulacji receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przez jony cynku. Szczegółowe protokoły eksperymentów opierają się na opublikowanych metodach opracowanych w Zakładzie Chemii Leków dla badań oddziaływań ligandów w miejscu ortosterycznym [225, 226]. Poniżej przedstawiono skład buforów stosowanych w eksperymentach (Tabela 28).

Tabela 28. Skład buforów stosowanych w badaniach *in vitro*.

Receptor	Skład buforu
5-HT _{1A}	50 mM Tris-HCl (pH 7,7), 0,1% kwas askorbinowy, 10 μM MgCl ₂ , 10 μM pargilina
5-HT ₇	50 mM Tris-HCl (pH 7,7), 4 mM MgCl ₂ , 10 μM pargilina, 0,1% kwas askorbinowy

6.4.1 Procedura oznaczenia wartości K_D i B_{max} w eksperymentach saturacji

W badaniach zastosowano radioligandy znakowane trytem: [3H]8-OH-DPAT dla receptorów 5-HT_{1A} oraz [3H]5-CT, [3H]SB-269970 i [3H]mesulerginę dla receptorów 5-HT₇.

Do wyznaczenia krzywej wiązania do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przygotowano 8 stężeń odpowiednich radioligandów w suplementowanym buforze Tris-HCl (pH 7,7):

- [3H]8-OH-DPAT w zakresie 0,1 – 14 nM
- [3H]5-CT w zakresie 0,1 – 7 nM
- [3H]SB-269970 w zakresie 0,1 – 16 nM
- [3H]mesulergina w zakresie 0,1 – 21 nM

Pomiary prowadzono w 96-dółkowych płytkach plastikowych o pojemności 0,2 ml. Oznaczenia wykonano w tryplikacie, dla każdego radioliganda wykonano pomiar wiązania niespecyficznego (NS) oraz pomiar wiązania całkowitego (TOTAL). Wszystkie czynności pipetowania wykonano przy użyciu stacji pipetującej JANUS Automated Workstation – Expanded Platform (PerkinElmer) (Rysunek 36). Wyniki doświadczeń analizowano przy użyciu programu GraphPad Prism 7.0.



Rysunek 36. Automatyczna stacja pipetująca JANUS Automated Workstation – Expanded Platform (PerkinElmer).

Aby wyznaczyć stałą dysocjacji K_D oraz gęstość receptorów B_{max} oznaczono specyficzne wiązanie radioliganda do konkretnego typu receptorów serotoninowych. Ponieważ

w zawieszynie błon komórkowych mogą znajdować się inne struktury zdolne do oddziaływania z radioligandem ważne jest określenie poziomu wiązania niespecyficznego (NS). W tym celu do każdego zastosowanego stężenia radioliganda określono wiązanie niespecyficzne zarówno do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ poprzez dodanie 10 μM serotoniny. Całkowite wiązanie (TOTAL) określane jest jako ilość związanego radioliganda bez obecności konkurencyjnego związku. Poziom wiązania specyficznego dla badanego receptora określa różnica pomiędzy wartościami TOTAL i NS.

W celu zmierzenia rzeczywistego stężenia radioliganda w poszczególnych doświadczeniach 25 μl każdego radioliganda odpipetowano do dołków płytki, a następnie zalano 35 μl płynu scyntylicyjnego i zmierzono aktywność w liczniku MicroBeta TriLux. Uzyskane wyniki wyrażone w ccpm (*ang. corrected counts per minute*), przeliczano wg wzoru:

$$\text{Crl} = \frac{A}{2200 * V * SA}$$

gdzie: Crl – rzeczywiste stężenie radioliganda w próbce [nM], A – zmierzona aktywność próbki [ccpm], V – końcowa objętość badanej próbki [ml], SA – aktywność specyficzna radioliganda [Ci/mM].

W celu wyznaczenia wiązania całkowitego (TOTAL) przygotowano próbki zawierające 25 μl buforu (skład opisany w punkcie 6.4), a dla pomiaru wiązania niespecyficznego (NS) próbki zawierające 25 μl 10 μM serotoniny.

Do każdej pary próbek TOTAL-NS dodano po 25 μl z kolejnych stężeń odpowiedniego radioliganda, a na końcu do wszystkich próbek dodano po 150 μl zawiesiny komórek, którą uprzednio przygotowano z zamrożonej porcji (punkt 6.1.4), przez homogenizację w 35 ml odpowiednio suplementowanego buforu Tris-HCl (Tabela 28). Próbki inkubowano do momentu osiągnięcia stanu równowagi (w przypadku receptorów 5-HT_{1A} inkubacja przez 60 min w temperaturze pokojowej, w przypadku receptorów 5-HT₇ inkubacja przez 60 min w 37°C). Po tym czasie, w celu oddzielenia niezwiązanego radioliganda od puli związanej z receptorem, próbki przesączało przez płytki UniFilter zawierające filtry z włókna szklanego GF/B w przypadku receptora 5-HT₇ oraz GF/C w przypadku receptora 5-HT_{1A}, przy pomocy urządzenia Unifilter Harvester. Po kilkukrotnym przemyciu osadu zimnym (4°C) buforem Tris-HCl filtry pozostawiono w temperaturze pokojowej na 12 godzin w celu wysuszenia. Następnie dno płytki

zabezpieczano folią Tape Multiscreen® Harvester Clear, a po dodaniu 35 µl płynu scyntylacyjnego Ultima Gold (PerkinElmer) do każdego z dołków, górę zaklejono taśmą Clear Seal (Thermo Scientific) za pomocą zgrzewarki ALPS™ 50 V. Ostatecznie poziom radioaktywności pozostającej na filtrach mierzono w liczniku MicroBeta TriLux.

Otrzymane wyniki analizowano przy użyciu programu GraphPad Prism 7.0. Wartości K_D i B_{max} obliczono w oparciu o równanie hiperboli, którym opisano krzywą wiązania ligand-receptor dla modelu pojedynczego miejsca wiążącego:

$$B \left[\frac{\text{pM}}{\text{mg białka}} \right] = \frac{B_{max} * CRL}{K_D + CRL}$$

gdzie: B_{max} – maksymalna aktywność próbki [ccpm]; CRL – rzeczywiste stężenie radioliganda w próbce [nM]; K_D – stała dysocjacji radioliganda [nM].

Wartości B_{max} wyrażone w ccpm przeliczono na [pM/mg białka] przy pomocy równania:

$$B_{max} \left[\frac{\text{pM}}{\text{mg białka}} \right] = \frac{B_{max} [\text{ccpm}]}{2220 * SA * m_{białka} [\text{mg}]}$$

gdzie: SA – aktywność specyficzna radioliganda [Ci/mM]; $m_{białka}$ – ilość białka w próbce [mg].

W analogiczny sposób wyznaczono parametry K_D i B_{max} w obecności jonów Zn^{2+} w zakresie stężeń 0,01 – 5 mM.

6.4.2 Badanie wpływu wybranych jonów metali na wiązanie specyficznego radioliganda

Eksperymenty wpływu jonów: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , na wiązanie specyficznych radioligandów z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT₇ przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych przy użyciu stacji pipetującej JANUS Automated Workstation – Expanded Platform (PerkinElmer). Stosując stałe stężenie radioliganda (równe wyznaczonej wartości K_D), wyznaczono wiązanie całkowite (TOTAL). W tym celu przygotowano mieszaninę 25 µl radioligandu, 25 µl jonów (500 µM i 5 mM) oraz 150 µl zawiesiny komórek. Dla pomiaru wiązania niespecyficznego (NS) przygotowano próbki zawierające, zamiast jonów, 25 µl 10 µM serotoniny dla obu receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇. Analogicznie do poprzednich eksperymentów, po osiągnięciu stanu równowagi przez układ, reakcje wiązania

zakończono poprzez przesączenie przez odpowiednie filtry, a po wysuszeniu i dodaniu płynu scyntylicyjnego zmierzono poziom aktywności w liczniku scyntylicyjnym.

6.4.3 Badanie współzawodnictwa o miejsce wiązania pomiędzy ligandem ortosterycznym a specyficznym radioligandem (testy kompetycji)

Aby wyznaczyć parametr K_i , czyli stałą wiązania dla liganda ortosterycznego, przeprowadzono testy kompetycji opierające się na współzawodnictwie ligandów ortosterycznego i specyficznego radioliganda o miejsce wiązania w badanym receptorze. Pomiar prowadzono w 96-dołkowych płytkach. Każde oznaczenie wykonano w tryplikacie. Przy użyciu stacji pipetującej JANUS Automated Workstation – Expanded Platform (PerkinElmer). w dołkach płytki umieszczono kolejno: 25 μ l roztworu radioliganda w stężeniu $\sim K_D$ (Tabela 29), 25 μ l liganda ortosterycznego (Tabela 30) w ośmiu różnych stężeniach oraz 150 μ l zawiesiny komórek.

Tabela 29. Wartości K_D dla stosowanych w badaniach radioligandów.

Receptor	K_D [nM]	Radioligand
5-HT_{1A}	2,5	[³ H]8-OH-DPAT
	0,8	[³ H]5-CT
5-HT₇	3,0	[³ H]SB-269970
	9,6	[³ H]mesulergina

Kolejne kroki były analogiczne z opisanymi dla eksperymentów saturacji (punkt 6.4.1). Po 60 min inkubacji reakcję wiązania zakończono poprzez przesączenie całości mieszaniny przez odpowiednie filtry, a po wysuszeniu i dodaniu płynu scyntylicyjnego zmierzono aktywność w liczniku.

Tabela 30. Ligandy ortosteryczne receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ badane w eksperymentach *in vitro*.

	Ligand ortosteryczny	Aktywność wewnętrzna
Dla receptorów 5-HT_{1A}	Serotonina	agonista
	(R)-(+)-8-Hydroxy-DPAT	agonista
Dla receptorów 5-HT₇	5-CT	agonista
	Klozapina	antagonista
	SB-269970	antagonista

W opisany powyżej sposób przeprowadzono także badanie współzawodnictwa o miejsce wiązania pomiędzy ligandami ortosterycznymi, a specyficznymi radioligandami w obecności jonów cynku, które użyto w dwóch stężeniach: 10 i 500 μ M.

6.4.4 Testy kinetycznych dysocjacji wiązania radioligand-receptor

Testy kinetyczne prowadzono stosując te same warunki, jakie opisano dla eksperymentów kompetycji (6.4.3) do momentu osiągnięcia przez układ stanu równowagi. Dla wyznaczenia wiązania całkowitego (TOTAL), na płytkach 96-dołkowych przygotowano mieszaninę 25 μl radioliganda (w stężeniu $\sim K_D$, Tabela 29), 150 μl zawiesiny komórek oraz 25 μl czystego buforu (Tabela 28). Niespecyficzne wiązanie (NS) określono stosując mieszaninę o takim samym składzie zawierającą zamiast 25 μl czystego buforu, 25 μl serotoniny w stężeniu 10 μM . Po osiągnięciu stanu równowagi, zarówno do dołków zawierających próbki TOTAL jak i NS, dodawano 10 μM serotoniny w celu wyparcia radioliganda. Reakcję prowadzono w równych odstępach czasowych od 0 do 60 min, kończąc ją szybką filtracją. Radioaktywność pozostałego na filtrach osadu zmierzono w liczniku scyntylicyjnym.

W analogiczny sposób przeprowadzono testy kinetyczne dysocjacji w obecności dwóch stężeń (10 i 500 μM) jonów cynku dla receptorów 5-HT_{1A}, oraz w stężeniu 500 μM cynku dla receptorów 5-HT₇.

6.4.5 Testy kinetyczne asocjacji radioliganda z receptorem

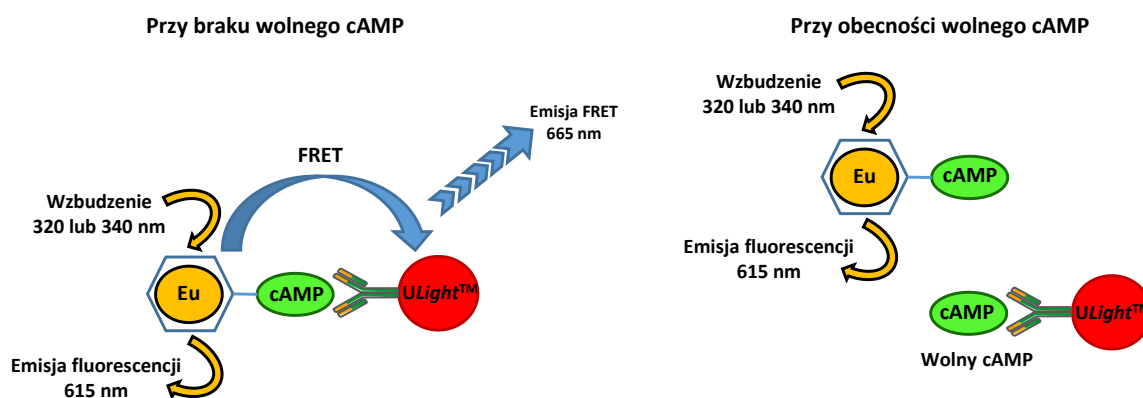
Testy prowadzono tylko do receptorów 5-HT_{1A} wyznaczając czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi procesu tworzenia kompleksu radioliganda ([³H]8-OH-DPAT) z receptorem 5-HT_{1A}. W płytkach 96-dołkowych próbki dla oznaczeń wartości TOTAL zawierały 25 μl radioliganda, 25 μl buforu oraz 150 μl tkanki, natomiast dla oznaczeń NS: 25 μl radioliganda (2,5 nM), 25 μl serotoniny 10 μM oraz 150 μl zawiesiny komórkowej. Dodając radioligand w równych odstępach czasu od 0 do 60 minut, wyznaczono stałą asocjacji dla wiązania specyficznego, wyliczonego po odjęciu wartości wiązania NS od wartości TOTAL.

Analogicznie zbadano czas asocjacji radioliganda [³H]8-OH-DPAT do receptorów 5-HT_{1A} w obecności jonów cynku w dwóch stężeniach 10 μM lub 500 μM .

6.5 Badanie wpływu cynku na efekty stymulacji receptorów

Całkowity poziom cAMP mierzono stosując zestaw LANCE Ultra cAMP Detection Kit (PerkinElmer), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Zasada działania testu (przedstawiona na rysunku 37) opiera się na kompetycji pomiędzy chelatem europu (Eu) związanym z cAMP, a specyficznym wobec cAMP przeciwciałem monoklonalnym znakowanym ULightTM (ULight-mAb). Kiedy przeciwciała są związane do Eu-cAMP

impuls świetlny przy długości fali 320 lub 340 nm pobudza cząsteczkę chelatu Eu w znaczniku. Energia emitowana przez wzbudzony chelat Eu jest przenoszona przez zjawisko FRET na przeciwciała do cząsteczek ULight™, które z kolei emitują światło przy 665 nm. Pozostała energia z chelatu Eu wytwarza światło przy długości 615 nm. W przypadku braku wytworzonego przez komórki cAMP osiąga się maksymalny sygnał FRET (Rysunek 37, lewy panel). Wolny cAMP wytwarzany przez stymulowane komórki konkuruje ze znacznikiem Eu-cAMP w celu wiązania się z ULight-mAb, powodując spadek sygnału FRET (Rysunek 37, prawy panel).



Rysunek 37. Zasada działania testu LANCE Ultra cAMP (PerkinElmer).

Eksperymenty prowadzono w 384-dołkowej nieprzezroczystej białej płytce mikrotitracyjnej. W każdym dołku umieszczano 5 μ l komórek (co odpowiadało liczbie 200 i 1000 komórek odpowiednio dla receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇), które inkubowano ze związkami/związkami (5 μ l) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie w celu zatrzymania reakcji i wywołania lizy komórek, dodawano 10 μ l roztworu roboczego (5 μ l Eu-cAMP i 5 μ l ULight anty-cAMP), po czym płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji (FRET) mierzono w czytniku M1000 Pro (Tecan) stosując ustawienia zgodne z instrukcją LANCE Ultra cAMP Detection kit.

6.5.1 Testy aktywności wewnętrznej agonisty do receptora 5-HT_{1A}

Właściwości funkcjonalne agonisty (R)-(+)-8-OH-DPAT oraz jonów cynku, badano poprzez zdolność do hamowania produkcji cAMP w stymulowanych forskoliną (1 μ M) komórkach linii HEK293 z ekspresją receptorów 5-HT_{1A}. Agonistę (R)-(+)-8-OH-DPAT testowano w 8 stężeniach w zakresie 10⁻¹¹ – 10⁻⁴ M, a jony cynku w dwóch stężeniach: 1 μ M i 10 μ M. Procedurę przygotowania komórek opisano w rozdziale 6.1.3.

6.5.2 Testy aktywności wewnętrznej ligandów receptorów 5-HT₇

Właściwości funkcjonalne badanych związków oceniano: w przypadku agonisty 5-CT poprzez wpływ na zdolność do zwiększania produkcji cAMP, natomiast dla antagonistów SB-269970 i mesulerginy mierzono stopień hamowania produkcji cAMP wywołanej przez 10 nM 5-CT (tj. w stężeniu ~ EC₉₀) w komórkach linii HEK293 z nad-ekspresją receptorów 5-HT₇. Każdy związek testowano w 8 stężeniach zakresie 10⁻¹¹ – 10⁻⁴ M. Wpływ jony cynku na efekty stymulacji i blokady receptorów 5-HT₇ badano w stężeniu 10 μM. Procedurę przygotowania komórek opisano w rozdziale 6.1.3.

6.6 Analiza danych

Wszystkie wyniki zostały uzyskane z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Dane eksperymentalne analizowano za pomocą programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com), a wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD).

Dane z eksperymentów saturacji (K_D), kompetycji (K_i) oraz kinetyki (k_{ob}/k_{off}) dopasowywano do modelu jednego lub dwóch miejsc wiążących, a wyboru dokonano w oparciu o test F sumy kwadratów (*ang. extra sum-of-squares F test*).

Dla danych otrzymanych w doświadczeniach saturacji, kompetycji i asocjacji lepsze dopasowanie uzyskano do modelu jednego miejsca wiążącego, natomiast wyniki testów dysocjacji [3H]-8-OH-DPAT do modelu dwóch miejsc. Krzywe saturacyjne wykreślono stosując równanie hiperboli podane w rozdziale (6.4.1).

Dane uzyskane z eksperymentów saturacyjnych analizowano zgodnie z równaniem uwzględniającym interakcje allosteryczne:

$$pK_{App} = -\log([B] + 10^{\log K_B}) + \log(\alpha[B] + 10^{\log K_B}) - \log d \quad \text{Równanie 23}$$

gdzie: pK_{App} to ujemny logarytm obserwowanej stałej równowagi dysocjacji radioliganda A w obecność modulatora B (ZnCl₂); K_A – stała równowagi dysocjacji radioliganda ; K_B – stała równowagi dysocjacji modulatora allosterycznego; logD – stała reprezentująca logarytm ilorazu K_A i α; α – współczynnik kooperatywności (wielkość zmiany stałej równowagi dysocjacji dla liganda do jego miejsca ortosterycznego spowodowana przez modulator). Wartości α mniejsza niż 1, ale większe niż zero, oznacza ujemną kooperatywność, natomiast wartości większe niż 1 oznaczają pozytywną kooperatywność. Wartości nieznacznie różniące się od 1 wskazują kooperatywność neutralną.

W testach kompetycji wobec znakowanego izotopowo liganda, stała powinowactwa (K_i) była obliczana za pomocą równania Chenga-Prusoffa [40]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[A]}{K_D}} \quad \text{Równanie 6}$$

gdzie: IC_{50} jest stężeniem związku produkującego 50% inhibicję wiązania radioliganda, $[A]$ jest stężeniem użytego radioligandu, a K_D to stałą równowagi dysocjacji, która została wyznaczona eksperymentalnie saturacji.

Wykres krzywej typu „bell-shape” otrzymano poprzez dopasowanie danych do modelu [56] w oparciu o równanie:

$$\rho_A = \frac{\frac{[A]}{K_A} \left(1 + \frac{\alpha[B]}{K_{B2}}\right)}{\frac{[A]}{K_A} \left(1 + \frac{\alpha[B]}{K_{B2}}\right) + \left[1 + \frac{[B]}{K_{B1}} + \frac{[B]}{K_{B2}} \left(1 + \frac{\beta[B]}{K_{B1}}\right)\right]} \quad \text{Równanie 20}$$

w którym: ρ_A oznacza frakcję związanego receptora przez ortosteryczny ligand; $[A]$ i $[B]$ są stężeniami liganda ortosterycznego oraz modulatora; K_A , K_{B1} i K_{B2} to stałe równowagowe dysocjacji, liczby 1 oraz 2 oznaczają odpowiednio wiązanie liganda B do miejsca ortosterycznego i allosterycznego; współczynnik kooperatywności α opisuje wzajemne oddziaływanie B i A; β określa interakcje między dwoma ligandami B.

Dane z eksperymentów kinetyki dysocjacji były dopasowane do modeli rozpadu jednej lub dwóch faz opisanych równaniami 24 i 25:

$$B_t = B_0 \cdot e^{-k_{\text{offobs}} \cdot t} \quad \text{Równanie 24}$$

$$B_t = B_{0\text{fast}} \cdot e^{-k_{\text{offobsfast}} \cdot t} + B_{0\text{slow}} \cdot e^{-k_{\text{offobs slow}} \cdot t} \quad \text{Równanie 25}$$

gdzie: B_t oznacza poziom radioaktywności zmierzony w czasie t , B_0 to poziom radioaktywności przed dodaniem modulatora, k_{offobs} to obserwowana stała szybkości dysocjacji w obecności modulatora, $B_{0\text{fast}}$ i $B_{0\text{slow}}$ oznaczają obliczone poziomy radioaktywności bez modulatora dla dwóch faz dysocjacji: szybkiej i wolnej; $k_{\text{offobsfast}}$ i $k_{\text{offobs slow}}$ to obserwowane w obecności modulatora stałe szybkości dysocjacji dla fazy szybkiej i wolnej. Kiedy modulator jest nieobecny stałe k_{offobs} , $k_{\text{offobsfast}}$ i $k_{\text{offobs slow}}$ są odpowiednio oznaczone jako: k_{off} , k_{offfast} i k_{offslow} .

Dane z eksperymentów asocjacji analizowano za pomocą równania:

$$Y = Y_{\max} \cdot (1 - e^{-k_{ob}t})$$

Równanie 26

Obserwowana stała asocjacji, k_{ob} jest miarą szybkości z jaką reakcja osiąga stan równowagi, Y oznacza poziom radioaktywności w czasie t , Y_{\max} to wartość maksymalnego sygnału po osiągnięciu plato.

Stała równowagi dysocjacji antagonisty (K_b) w testach funkcjonalnych, była obliczana z wariantu równania Chenga-Prusoffa [227]:

$$K_b = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{A}{EC_{50}}}$$

Równanie 27

w którym: A – stężenie agonisty użytego do wywołania odpowiedzi funkcjonalnej, IC_{50} – stężenie antagonisty hamujące o 50% odpowiedź receptorową, EC_{50} – stężenie agonisty wywołujące połowę maksymalnej odpowiedzi receptorowej.

Istotność statystyczna pomiędzy różnicami wartościami średnimi została oceniona za pomocą testu t-Studenta. Statystyczny poziom istotności ustalono na $p < 0,05$.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A (2010) Overview of Receptor Allostery. In: *Curr. Protoc. Pharmacol.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p Unit 1.21
2. Monod J, Jacob F (1961) Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 26:389–401. doi: 10.1101/SQB.1961.026.01.048
3. Monod J, Changeux J-P, Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 6:306–329. doi: 10.1016/S0022-2836(63)80091-1
4. Proska J, Tucek S (1994) Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 45:709–17.
5. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, et al (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev* 55:597–606. doi: 10.1124/pr.55.4.4
6. Burford NT, Clark MJ, Wehrman TS, et al (2013) Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the μ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10830–5. doi: 10.1073/pnas.1300393110
7. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1–51. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105159
8. Kenakin T (2017) Theoretical Aspects of GPCR–Ligand Complex Pharmacology. *Chem Rev* 117:4–20. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00561
9. Kew JNC, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4–29. doi: 10.1007/s00213-005-2200-z
10. Keov P, Sexton PM, Christopoulos A (2011) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology* 60:24–35. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.07.010
11. Colquhoun D (1998) Pharmacologic Analysis of Drug–Receptor Interaction (3rd edn). *Trends Pharmacol Sci* 19:515–516. doi: 10.1016/S0165-6147(98)01235-8
12. Christopoulos A, El-Fakahany EE (1999) Qualitative and quantitative assessment of relative agonist efficacy. *Biochem Pharmacol* 58:735–48.
13. van der Westhuizen ET, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A (2015) Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 353:246–60. doi: 10.1124/jpet.114.221606
14. Melancon BJ, Hopkins CR, Wood MR, et al (2012) Allosteric Modulation of Seven Transmembrane Spanning Receptors: Theory, Practice, and Opportunities for Central Nervous System Drug Discovery. *J Med Chem* 55:1445–1464. doi: 10.1021/jm201139r
15. Hedlund PB, Carson MJ, Sutcliffe JG, Thomas EA (1999) Allosteric regulation by oleamide of the binding properties of 5-hydroxytryptamine₇ receptors. *Biochem Pharmacol* 58:1807–13.
16. Thomas EA, Carson MJ, Neal MJ, Sutcliffe JG (1997) Unique allosteric regulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signal transduction by oleamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14115–9. doi: 10.1073/pnas.94.25.14115

17. Im W Bin, Chio CL, Alberts GL, Dinh DM (2003) Positive allosteric modulator of the human 5-HT_{2C} receptor. *Mol Pharmacol* 64:78–84. doi: 10.1124/mol.64.1.78
18. Barrondo S, Sallés J (2009) Allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptors by zinc: Binding studies. *Neuropharmacology* 56:455–462. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.09.018
19. Mizumura T, Auchampach JA, Linden J, et al (1996) PD 81,723, an allosteric enhancer of the A₁ adenosine receptor, lowers the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Circ Res* 79:415–23.
20. Bueters TJH, van Helden HPM, Danhof M, IJzerman AP (2002) Effects of the adenosine A₁ receptor allosteric modulators PD 81,723 and LUF 5484 on the striatal acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* 454:177–82.
21. Gao Z-G, IJzerman AP (2000) Allosteric modulation of A_{2A} adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol* 60:669–676. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00360-9
22. Hill SJ, May LT, Kellam B, Woolard J (2014) Allosteric interactions at adenosine A(1) and A(3) receptors: new insights into the role of small molecules and receptor dimerization. *Br J Pharmacol* 171:1102–13. doi: 10.1111/bph.12345
23. Gentry PR, Sexton PM, Christopoulos A (2015) Novel Allosteric Modulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* 290:19478–88. doi: 10.1074/jbc.R115.662759
24. Gao Z-G, Kim S-K, Gross AS, et al (2003) Identification of essential residues involved in the allosteric modulation of the human A(3) adenosine receptor. *Mol Pharmacol* 63:1021–31.
25. Gharagozloo P, Lazareno S, Popham A, Birdsall NJM (1999) Allosteric Interactions of Quaternary Strychnine and Brucine Derivatives with Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J Med Chem* 42:438–445. doi: 10.1021/jm970799y
26. Shirey JK, Brady AE, Jones PJ, et al (2009) A selective allosteric potentiator of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. *J Neurosci* 29:14271–86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3930-09.2009
27. Jones CK, Brady AE, Davis AA, et al (2008) Novel selective allosteric activator of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci* 28:10422–33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1850-08.2008
28. Langmead CJ, Austin NE, Branch CL, et al (2008) Characterization of a CNS penetrant, selective M₁ muscarinic receptor agonist, 77-LH-28-1. *Br J Pharmacol* 154:1104–1115. doi: 10.1038/bjp.2008.152
29. Mohr K, Tränkle C (1994) Allosteric effects of the alkane-bis-ammonium compound W84 and of tacrine on [³H]pirenzepine binding at M₁-receptors in rat cerebral cortex. *Pharmacol Toxicol* 75:391–4.
30. Espinoza-Fonseca LM, Trujillo-Ferrara JG (2005) Identification of multiple allosteric sites on the M₁ muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* 579:6726–6732. doi: 10.1016/j.febslet.2005.10.069
31. Tränkle C, Kostenis E, Mohr K (2001) Muscarinic allosteric modulation: M₂/M₃ subtype selectivity of gallamine is independent of G-protein coupling specificity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364:172–8.
32. Croy CH, Schober DA, Xiao H, et al (2014) Characterization of the Novel Positive

- Allosteric Modulator, LY2119620, at the Muscarinic M2 and M4 Receptors. *Mol Pharmacol* 86:106–115. doi: 10.1124/mol.114.091751
33. Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol* 5:157–67. doi: 10.2174/157015907781695946
 34. Byun NE, Grannan M, Bubser M, et al (2014) Antipsychotic Drug-Like Effects of the Selective M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulator VU0152100. *Neuropsychopharmacology* 39:1578–1593. doi: 10.1038/npp.2014.2
 35. Gannon RL, Millan MJ (2012) LY2033298, a positive allosteric modulator at muscarinic M4 receptors, enhances inhibition by oxotremorine of light-induced phase shifts in hamster circadian activity rhythms. *Psychopharmacology (Berl)* 224:231–240. doi: 10.1007/s00213-012-2743-8
 36. Shirey JK, Xiang Z, Orton D, et al (2008) An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nat Chem Biol* 4:42–50. doi: 10.1038/nchembio.2007.55
 37. Brady AE, Jones CK, Bridges TM, et al (2008) Centrally Active Allosteric Potentiators of the M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Reverse Amphetamine-Induced Hyperlocomotor Activity in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 327:941–953. doi: 10.1124/jpet.108.140350
 38. Kenakin T (2016) The mass action equation in pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 81:41–51. doi: 10.1111/bcp.12810
 39. Guldberg CM WP (1879) Concerning chemical affinity. *J Pr Chem* 69–114.
 40. Yung-Chi C, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108. doi: 10.1016/0006-2952(73)90196-2
 41. Burgen AS (1981) Conformational changes and drug action. *Fed Proc* 40:2723–8.
 42. Black JW, Leff P (1983) Operational Models of Pharmacological Agonism. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* 220:
 43. Del Castillo J, Katz B (1957) Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap Bioloical Character* 146:369–381. doi: 10.1098/rspb.1957.0018
 44. Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol* 12:88–118. doi: 10.1016/S0022-2836(65)80285-6
 45. Karlin A (1967) On the application of “a plausible model” of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J Theor Biol* 16:306–20.
 46. Colquhoun D (1973) The Relation between Classical and Cooperative Models for Drug Action. In: *Drug Recept.* Macmillan Education UK, London, pp 149–182
 47. Thron CD (1973) On the analysis of pharmacological experiments in terms of an allosteric receptor model. *Mol Pharmacol* 9:1–9.
 48. Roche D, Gil D, Giraldo J (2013) Mechanistic analysis of the function of agonists and allosteric modulators: reconciling two-state and operational models. *Br J Pharmacol* 169:1189–1202. doi: 10.1111/bph.12231
 49. Slack R, Hall D (2012) Development of operational models of receptor activation including constitutive receptor activity and their use to determine the efficacy of the

- chemokine CCL17 at the CC chemokine receptor CCR4. *Br J Pharmacol* 166:1774–1792. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01901.x
50. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255:7108–17.
 51. Kenakin T, Morgan P, Lutz M, Weiss J (2000) *The Evolution of Drug-Receptor Models: The Cubic Ternary Complex Model for G Protein-Coupled Receptors*. Springer Berlin Heidelberg, pp 147–165
 52. Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 33:187–94.
 53. Weber G (1975) Energetics of ligand binding to proteins. *Adv Protein Chem* 29:1–83.
 54. Ehlert FJ (1985) The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium. *Mol Pharmacol* 28:410–21.
 55. Bridges TM, Lindsley CW (2008) G-Protein-Coupled Receptors: From Classical Modes of Modulation to Allosteric Mechanisms. *ACS Chem Biol* 3:530–541. doi: 10.1021/cb800116f
 56. Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323–374. doi: 10.1124/pr.54.2.323
 57. Hall DA (2000) Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. *Mol Pharmacol* 58:1412–23.
 58. Bruns RF, Fergus JH (1990) Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. *Mol Pharmacol* 38:939–49.
 59. Hoare SR, Strange PG (1996) Regulation of D2 dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. *Mol Pharmacol* 50:1295–308.
 60. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268:4625–36.
 61. Costa T, Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7321–5.
 62. Kenakin T (2004) Efficacy as a Vector: the Relative Prevalence and Paucity of Inverse Agonism. *Mol Pharmacol* 65:2–11. doi: 10.1124/mol.65.1.2
 63. Maret W (2013) Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Adv Nutr An Int Rev J* 4:82–91. doi: 10.3945/an.112.003038
 64. Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79–118.
 65. Marger L, Schubert CRR, Bertrand D (2014) Zinc: An underappreciated modulatory factor of brain function. *Biochem Pharmacol* 91:426–435. doi: 10.1016/j.bcp.2014.08.002
 66. Floriańczyk B (2011) *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research
 67. Frederickson CJ, Koh J-Y, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6:449–462. doi: 10.1038/nrn1671
 68. Szewczyk B (2013) Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging*

Neurosci 5:33. doi: 10.3389/fnagi.2013.00033

69. Gapys Beata, Raszeja-Specht Anna BH (2014) Role of zinc in physiological and pathological processes of the body. *J Lab Diagnostics* 50(1):45–52.
70. Krishna SS, Majumdar I, Grishin N V (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* 31:532–50.
71. Klug A (2010) The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys* 43:1–21. doi: 10.1017/S0033583510000089
72. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci* 61:49–68. doi: 10.1007/s00018-003-3148-y
73. Maret W (2011) Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals*. doi: 10.1007/s10534-010-9406-1
74. Li Y V. (2014) Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine* 45:178–189. doi: 10.1007/s12020-013-0032-x
75. Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V (2011) Zinc in Specialized Secretory Tissues: Roles in the Pancreas, Prostate, and Mammary Gland. *Adv Nutr An Int Rev J* 2:101–111. doi: 10.3945/an.110.000232
76. Danscher G, Stoltenberg M (2005) Zinc-specific Autometallographic In Vivo Selenium Methods: Tracing of Zinc-enriched (ZEN) Terminals, ZEN Pathways, and Pools of Zinc Ions in a Multitude of Other ZEN Cells. *J Histochem Cytochem* 53:141–153. doi: 10.1369/jhc.4R6460.2005
77. Takeda A (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 34:137–48.
78. Tóth K (2011) Zinc in Neurotransmission. *Annu Rev Nutr* 31:139–153. doi: 10.1146/annurev-nutr-072610-145218
79. Bitanirwe BKY, Cunningham MG (2009) Zinc: The brain's dark horse. *Synapse* 63:1029–1049. doi: 10.1002/syn.20683
80. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, et al (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 130:1471S–83S.
81. Tyszka-Czochara M, Grzywacz A, Gdula-Argasińska J, et al The role of zinc in the pathogenesis and treatment of central nervous system (CNS) diseases. Implications of zinc homeostasis for proper CNS function. *Acta Pol Pharm* 71:369–77.
82. Takeda A, Tamano H (2016) Insight into cognitive decline from Zn²⁺ dynamics through extracellular signaling of glutamate and glucocorticoids. *Arch Biochem Biophys* 611:93–99. doi: 10.1016/j.abb.2016.06.021
83. Tamano H, Koike Y, Nakada H, et al (2016) Significance of synaptic Zn²⁺ signaling in zincergic and non-zincergic synapses in the hippocampus in cognition. *J Trace Elem Med Biol* 38:93–98. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.03.003
84. Takeda A, Tamano H (2016) Significance of the degree of synaptic Zn²⁺ signaling in cognition. *BioMetals* 29:177–185. doi: 10.1007/s10534-015-9907-z
85. Gower-Winter SD, Levenson CW (2012) Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *BioFactors* 38:186–193. doi: 10.1002/biof.1012
86. Levenson CW, Morris D (2011) Zinc and Neurogenesis: Making New Neurons from

- Development to Adulthood. *Adv Nutr An Int Rev J* 2:96–100. doi: 10.3945/an.110.000174
87. Shen Y, Yang X-L (1999) Zinc modulation of AMPA receptors may be relevant to splice variants in carp retina. *Neurosci Lett* 259:177–180. doi: 10.1016/S0304-3940(98)00938-0
 88. Kim T-Y, Hwang J-J, Hwan Yun S, et al (2002) Augmentation by zinc of NMDA receptor-mediated synaptic responses in CA1 of rat hippocampal slices: Mediation by Src family tyrosine kinases. *Synapse* 46:49–56. doi: 10.1002/syn.10118
 89. Molnár P, Nadler J V (2001) Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Res* 910:205–7.
 90. Zirpel L, Parks TN (2001) Zinc inhibition of group I mGluR-mediated calcium homeostasis in auditory neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 2:180–7.
 91. Smart TG, Xie X, Krishek BJ (1994) Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol* 42:393–441.
 92. Casagrande S, Valle L, Cupello A, Robello M (2003) Modulation by Zn(2+) and Cd(2+) of GABA(A) receptors of rat cerebellum granule cells in culture. *Eur Biophys J* 32:40–6. doi: 10.1007/s00249-002-0261-z
 93. Xie X, Smart TG (1993) Giant GABAB-mediated synaptic potentials induced by zinc in the rat hippocampus: paradoxical effects of zinc on the GABAB receptor. *Eur J Neurosci* 5:430–6.
 94. Chattipakorn SC, McMahon LL (2002) Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87:1515–25.
 95. Connor MA, Chavkin C (1992) Ionic zinc may function as an endogenous ligand for the haloperidol-sensitive sigma 2 receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 42:471–9.
 96. Patterson TA, Connor M, Appleyard SM, Chavkin C (1994) Oocytes from *Xenopus laevis* contain an intrinsic sigma-2-like binding site. *Neurosci Lett* 180:159–162.
 97. García-Colunga J, González-Herrera M, Miledi R (2001) Modulation of alpha2beta4 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by zinc. *Neuroreport* 12:147–50.
 98. Rosati AM, Traversa U (1999) Mechanisms of inhibitory effects of zinc and cadmium ions on agonist binding to adenosine A1 receptors in rat brain. *Biochem Pharmacol* 58:623–32.
 99. Hubbard PC, Lummis SC. (2000) Zn²⁺ enhancement of the recombinant 5-HT₃ receptor is modulated by divalent cations. *Eur J Pharmacol* 394:189–197. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00143-6
 100. Schetz JA, Chu A, Sibley DR (1999) Zinc modulates antagonist interactions with D₂-like dopamine receptors through distinct molecular mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 289:956–64.
 101. Schetz JA, Sibley DR (1997) Zinc allosterically modulates antagonist binding to cloned D₁ and D₂ dopamine receptors. *J Neurochem* 68:1990–7. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68051990.x
 102. Swaminath G, Steenhuis J, Kobilka B, Lee TW (2002) Allosteric modulation of beta₂-adrenergic receptor by Zn(2+). *Mol Pharmacol* 61:65–72. doi: 10.1124/mol.61.1.65
 103. Holst B, Elling CE, Schwartz TW (2002) Metal ion-mediated agonism and agonist enhancement in melanocortin MC₁ and MC₄ receptors. *J Biol Chem* 277:47662–47670. doi: 10.1074/jbc.M202103200

104. Hershinkel M, Moran A, Grossman N, Sekler I (2001) A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca²⁺ and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci* 98:11749–11754. doi: 10.1073/pnas.201193398
105. Low C-M, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci* 97:11062–11067. doi: 10.1073/pnas.180307497
106. Tejwani GA, Hanissian SH (1990) Modulation of mu, delta and kappa opioid receptors in rat brain by metal ions and histidine. *Neuropharmacology* 29:445–452. doi: 10.1016/0028-3908(90)90166-O
107. Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF (2003) A Novel Class of Ligand-gated Ion Channel Is Activated by Zn²⁺. *J Biol Chem* 278:712–717. doi: 10.1074/jbc.M208814200
108. Easaw JC, Jassar BS, Harris KH, Jhamandas JH (1999) Zinc modulation of ionic currents in the horizontal limb of the diagonal band of Broca. *Neuroscience* 94:785–795. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00308-5
109. Horning MS, Trombley PQ (2001) Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. *J Neurophysiol* 86:1652–60.
110. Green WN, Weiss LB, Andersen OS (1987) Batrachotoxin-modified sodium channels in planar lipid bilayers. Characterization of saxitoxin- and tetrodotoxin-induced channel closures. *J Gen Physiol* 89:873–903.
111. Kajita H, Whitwell C, Brown PD (2000) Properties of the inward-rectifying Cl⁻ channel in rat choroid plexus: regulation by intracellular messengers and inhibition by divalent cations. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 440:933–940. doi: 10.1007/s004240000387
112. Lin H, Zhu YJ, Lal R (1999) Amyloid β protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry* 38:11189–11196. doi: 10.1021/bi982997c
113. Vandenberg RJ, Mitrovic AD, Johnston GA (1998) Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. *Mol Pharmacol* 54:189–96.
114. Spiridon M, Kamm D, Billups B, et al (1998) Modulation by zinc of the glutamate transporters in glial cells and cones isolated from the tiger salamander retina. *J Physiol* 506:363–376. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.363bw.x
115. Richfield EK (1993) Zinc modulation of drug binding, cocaine affinity states, and dopamine uptake on the dopamine uptake complex. *Mol. Pharmacol.* 43:
116. Wu Q, Coffey LL, Reith MEA (2002) Cations Affect [3H]Mazindol and [3H]WIN 35,428 Binding to the Human Dopamine Transporter in a Similar Fashion. *J Neurochem* 69:1106–1118. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031106.x
117. Sunuwar L, Gilad D, Hershinkel M (2017) The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 22:1469–1492.
118. Młyniec K, Doboszevska U, Szewczyk B, et al (2014) The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology* 79:290–297. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.001
119. Młyniec K, Budziszewska BB, Holst B, et al (2015) GPR39 (Zinc Receptor) Knockout Mice Exhibit Depression-Like Behavior and CREB/BDNF Down-Regulation in the Hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol.* doi: 10.1093/ijnp/pyu002
120. Młyniec K, Gawęł M, Librowski T, et al (2015) Investigation of the GPR39 zinc receptor

- following inhibition of monoaminergic neurotransmission and potentialization of glutamatergic neurotransmission. *Brain Res Bull* 115:23–29. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.04.005
121. Młyniec K, Nowak G (2012) Zinc deficiency induces behavioral alterations in the tail suspension test in mice. Effect of antidepressants. *Pharmacol Rep* 64:249–55.
 122. Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Szewczyk B, et al (2011) Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests. *Pharmacol Rep* 63:1050–5.
 123. Szewczyk B, Poleszak E, Wlaź P, et al (2009) The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33:323–329. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.12.011
 124. Nowak G, Szewczyk B, Wieronska JM, et al (2003) Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull* 61:159–64.
 125. Szewczyk B, Kotarska K, Siwek A, et al (2017) Antidepressant activity of zinc: Further evidence for the involvement of the serotonergic system. *Pharmacol Reports* 69:456–461. doi: 10.1016/j.pharep.2017.01.008
 126. Doboszevska U, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, et al (2015) Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. *Behav Brain Res* 287:323–330. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.064
 127. Cichy A, Sowa-Kućma M, Legutko B, et al Zinc-induced adaptive changes in NMDA/glutamatergic and serotonergic receptors. *Pharmacol Rep* 61:1184–91.
 128. Göthert M (2013) Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. *Pharmacol Rep* 65:771–86.
 129. Levitt P, Rakic P (1982) The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Brain Res* 256:35–57.
 130. Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin Receptors. *Chem Rev* 108:1614–1641. doi: 10.1021/cr078224o
 131. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–54.
 132. Letunic I, Bork P (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44:W242–W245. doi: 10.1093/nar/gkw290
 133. Ramage AG, Villalón CM (2008) 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci* 29:472–81.
 134. Morgane PJ (1981) Monoamine theories of sleep: the role of serotonin--a review. *Psychopharmacol Bull* 17:13–7.
 135. Leonard BE Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. *Psychother Psychosom* 65:66–75.
 136. Kennett GA (1991) *Mechanisms of Serotonergic Affect Control*. Springer New York, pp 231–243
 137. McEntee WJ, Crook TH (1991) Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)* 103:143–9.

138. Messing RB, Lytle LD (1977) Serotonin-containing neurons: their possible role in pain and analgesia. *Pain* 4:1–21. doi: 10.1016/0304-3959(77)90083-5
139. Sicuteri F, Del Bene E, Fonda C (1976) Sex, migraine and serotonin interrelationships. *Monogr Neural Sci* 3:94–101.
140. Blundell JE (1977) Is there a role for serotonin (5-hydroxytryptamine) in feeding? *Int J Obes* 1:15–42.
141. Meltzer H (1989) Serotonergic dysfunction in depression. *Br J Psychiatry Suppl* 25–31.
142. Remington G (2008) Alterations of dopamine and serotonin transmission in schizophrenia. *Prog Brain Res* 172:117–140. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00906-0
143. Sargent BJ, Moore NA (2009) New central targets for the treatment of obesity. *Br J Clin Pharmacol* 68:852–60. doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03550.x
144. Jouvet M (1999) Sleep and Serotonin An Unfinished Story. *Neuropsychopharmacology* 21:24S–27S. doi: 10.1016/S0893-133X(99)00009-3
145. Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (2005) 5-HT₇ Receptor Inhibition and Inactivation Induce Antidepressantlike Behavior and Sleep Pattern. *Biol Psychiatry* 58:831–837. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.05.012
146. Švob Štrac D, Pivac N, Mück-Šeler D (2016) The serotonergic system and cognitive function. *Transl Neurosci* 7:35–49. doi: 10.1515/tnsci-2016-0007
147. Frazer A, Hensler JG (1999) Serotonin Neurons and Receptors as Drug Targets.
148. Kondaurova EM, Bazovkina D V., Naumenko VS (2017) 5-HT_{1A} /5-HT₇ Receptor Interplay: Chronic Activation of 5-HT₇ Receptors Decreases the Functional Activity of 5-HT_{1A} Receptor and Its Content in the Mouse Brain. *Mol Biol Orig Russ Text* © 51:26–8933. doi: 10.1134/S0026893316060108
149. Eriksson TM, Holst S, Stan TL, et al (2012) 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropharmacology* 63:1150–1160. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.061
150. Naumenko VS, Popova NK, Lacivita E, et al (2014) Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders. *CNS Neurosci Ther* 20:582–590. doi: 10.1111/cns.12247
151. Polter AM, Li X (2010) 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal* 22:1406–1412. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.03.019
152. Ohno Y (2011) Therapeutic Role of 5-HT_{1A} Receptors in The Treatment of Schizophrenia and Parkinson's Disease. *CNS Neurosci Ther* 17:58–65. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00211.x
153. Ohno Y (2010) New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10:148–57.
154. Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM (2013) Rethinking 5-HT_{1A} Receptors: Emerging Modes of Inhibitory Feedback of Relevance to Emotion-Related Behavior. *ACS Chem Neurosci* 4:72–83. doi: 10.1021/cn3002174
155. Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88:17–31. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.01.009
156. Nautiyal KM, Hen R (2017) Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Research* 6:123. doi: 10.12688/f1000research.9736.1

157. Wang S-M, Han C, Lee S-J, et al (2016) Vilazodone for the Treatment of Depression: An Update. *Chonnam Med J* 52:91–100. doi: 10.4068/cmj.2016.52.2.91
158. Orsolini L, Tomasetti C, Valchera A, et al (2016) New advances in the treatment of generalized anxiety disorder: the multimodal antidepressant vortioxetine. *Expert Rev Neurother* 16:483–495. doi: 10.1586/14737175.2016.1173545
159. Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED (2014) 5-HT_{1A} [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 231:623–36. doi: 10.1007/s00213-013-3389-x
160. Dawson LA, Bromidge SM (2008) 5-HT₁ receptor augmentation strategies as enhanced efficacy: therapeutics for psychiatric disorders. *Curr Top Med Chem* 8:1008–23.
161. Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, et al (2000) Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* 57:174–80.
162. Albert PR, François B Le (2010) Modifying 5-HT_{1A} receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front Neurosci* 4:35. doi: 10.3389/fnins.2010.00035
163. Szewczyk B, Brański P, Wierońska JM, et al Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. *Pol J Pharmacol* 54:681–5.
164. Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, et al (2016) Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT_{1A} Receptors: In Vitro and In Vivo Studies. *Mol Neurobiol* 53:6869–6881. doi: 10.1007/s12035-015-9586-3
165. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, et al (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8547–51.
166. Bard JA, Zgombick J, Adham N, et al (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268:23422–6.
167. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, et al (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449–58.
168. Kvachnina E (2005) 5-HT₇ Receptor Is Coupled to G Subunits of Heterotrimeric G₁₂-Protein to Regulate Gene Transcription and Neuronal Morphology. *J Neurosci* 25:7821–7830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005
169. Thomas DR, Hagan JJ (2004) 5-HT₇ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:81–90.
170. Hedlund, P. Sutcliffe J (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25:481–486. doi: 10.1016/j.tips.2004.07.002
171. Meltzer HY (2012) Serotonergic Mechanisms as Targets for Existing and Novel Antipsychotics. In: *Handb. Exp. Pharmacol.* pp 87–124
172. Mnie-Filali O, Lambas-Señas L, Scarna H, Haddjeri N (2009) Therapeutic potential of 5-HT₇ receptors in mood disorders. *Curr Drug Targets* 10:1109–17.
173. Terrón JA (1998) The 5-HT₇ receptor: a target for novel therapeutic avenues? *IDrugs* 1:302–10.
174. Pittalà V, Salerno L, Modica M, et al (2007) 5-HT₇ receptor ligands: recent developments and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem* 7:945–60.

175. Bieńkowski P, Dudek D, Samochowiec J (2015) W kierunku lepiej zaplanowanej nieselektywności: Rola receptorów 5-HT7 w działaniu leku przeciwpsychotycznego II generacji - Lurazydonu. *Psychiatr Pol* 49:243–253. doi: 10.12740/PP/38250
176. Shelton J, Yun S, Losee Olson S, et al (2014) Selective pharmacological blockade of the 5-HT7 receptor attenuates light and 8-OH-DPAT induced phase shifts of mouse circadian wheel running activity. *Front Behav Neurosci* 8:453. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00453
177. Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K, et al (2005) Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 48:492–502. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.11.015
178. Kobe F, Guseva D, Jensen TP, et al (2012) 5-HT7R/G12 Signaling Regulates Neuronal Morphology and Function in an Age-Dependent Manner. *J Neurosci* 32:2915–2930. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2765-11.2012
179. Zareifopoulos N, Papatheodoropoulos C (2016) Effects of 5-HT-7 receptor ligands on memory and cognition. *Neurobiol Learn Mem* 136:204–209. doi: 10.1016/j.nlm.2016.10.011
180. Thomas EA, Cravatt BF, Sutcliffe JG (1999) The endogenous lipid oleamide activates serotonin 5-HT7 neurons in mouse thalamus and hypothalamus. *J Neurochem* 72:2370–8.
181. Arafat ES, Trimble JW, Andersen RN, et al (1989) Identification of fatty acid amides in human plasma. *Life Sci* 45:1679–87.
182. Lerner RA, Siuzdak G, Prospero-Garcia O, et al (1994) Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9505–8.
183. Boger DL, Patterson JE, Jin Q (1998) Structural requirements for 5-HT2A and 5-HT1A serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4102–7.
184. Borovanský J, Riley PA (1989) Cytotoxicity of zinc in vitro. *Chem Biol Interact* 69:279–291. doi: 10.1016/0009-2797(89)90085-9
185. Sensi SL, Jeng J-M (2004) Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn(2+) in ischemic neuronal injury. *Curr Mol Med* 4:87–111.
186. PerkinElmer (2002) Stability of the Wallace LANCE Eu-chelates. In: Appl. Note. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_LANCEEuChelatesStability.pdf.
187. Besnard J, Ruda GF, Setola V, et al (2012) Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature* 492:215–220. doi: 10.1038/nature11691
188. Alberts GL, Chio CL, Im WB (2001) Allosteric modulation of the human 5-HT(7A) receptor by lipidic amphipathic compounds. *Mol Pharmacol* 60:1349–1355.
189. Thomas DR, Atkinson PJ, Ho M, et al (2000) [3H]-SB-269970 - a selective antagonist radioligand for 5-HT7 receptors. *Br J Pharmacol* 130:409–417. doi: 10.1038/sj.bjp.0703318
190. Andressen KW, Manfra O, Brevik CH, et al (2015) The atypical antipsychotics clozapine and olanzapine promote down-regulation and display functional selectivity at human 5-HT 7 receptors. *Br J Pharmacol* 172:3846–3860. doi: 10.1111/bph.13169
191. Avlani V, May LT, Sexton PM, Christopoulos A (2004) Application of a kinetic model to the apparently complex behavior of negative and positive allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1062–72. doi: 10.1124/jpet.103.059840

192. Romero G, Pujol M, Pauwels PJ (2006) Reanalysis of constitutively active rat and human 5-HT₇(a) receptors in HEK-293F cells demonstrates lack of silent properties for reported neutral antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:31–39. doi: 10.1007/s00210-006-0093-y
193. Mahé C, Loetscher E, Feuerbach D, et al (2004) Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. *Eur J Pharmacol* 495:97–102. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.05.033
194. Thomas DR, Gittins SA, Collin LL, et al (1998) Functional characterisation of the human cloned 5-HT₇ receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. *Br J Pharmacol* 124:1300–6. doi: 10.1038/sj.bjp.0701946
195. Lindsley CW, Emmitte KA, Hopkins CR, et al (2016) Practical Strategies and Concepts in GPCR Allosteric Modulator Discovery: Recent Advances with Metabotropic Glutamate Receptors. *Chem Rev* 116:6707–6741. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00656
196. Nickols HH, Conn JP (2014) Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis* 61:55–71. doi: 10.1016/j.nbd.2013.09.013
197. Müller CE, Schiedel AC, Baqi Y (2012) Allosteric modulators of rhodopsin-like G protein-coupled receptors: Opportunities in drug development. *Pharmacol Ther* 135:292–315. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.002
198. Miao Y, Goldfeld DA, Moo E Von, et al (2016) Accelerated structure-based design of chemically diverse allosteric modulators of a muscarinic G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci* 113:201612353. doi: 10.1073/pnas.1612353113
199. Jacobson KA, Gao Z-G, Goblyos A, Ijzerman AP (2011) Allosteric modulation of purine and pyrimidine receptors. *Adv Pharmacol* 61:187–220. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00007-2
200. Goblyos A, Ijzerman AP (2011) Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochim Biophys Acta* 1808:1309–18. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.013
201. Prasad R, Paila YD, Chattopadhyay A (2009) Membrane cholesterol depletion enhances ligand binding function of human serotonin_{1A} receptors in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390:93–96. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.072
202. Valant C, Aurelio L, Urmaliya VB, et al (2010) Delineating the Mode of Action of Adenosine A₁ Receptor Allosteric Modulators. *Mol Pharmacol* 78:444–455. doi: 10.1124/mol.110.064568
203. Gill CH, Peters JA, Lambert JJ (1995) An electrophysiological investigation of the properties of a murine recombinant 5-HT₃ receptor stably expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 114:1211–21.
204. Maksay G, Bíró T (2002) Dual cooperative allosteric modulation of binding to ionotropic glycine receptors. *Neuropharmacology* 43:1087–98.
205. Kenakin TP (2006) *A Pharmacology Primer, Second Edition: Theory, Application, and Methods*. *Tetrahedron Org Chem Ser* 22:1–294. doi: 10.1016/S1460-1567(02)80002-2
206. Ciolek J, Maïga A, Marcon E, et al (2011) Pharmacological characterization of zinc and copper interaction with the human alpha_{1A}-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* 655:1–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.042
207. Swaminath G, Lee TW, Kobilka B (2003) Identification of an allosteric binding site for Zn²⁺ on the beta₂ adrenergic receptor. *J Biol Chem* 278:352–356. doi: 10.1074/jbc.M206424200

208. Holst B, Schwartz TW (2003) Molecular mechanism of agonism and inverse agonism in the melanocortin receptors: Zn(2+) as a structural and functional probe. *Ann N Y Acad Sci* 994:1–11. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03156.x
209. Rosenkilde MM, Lucibello M, Holst B, Schwartz TW (1998) Natural agonist enhancing bis-His zinc-site in transmembrane segment V of the tachykinin NK3 receptor. *FEBS Lett* 439:35–40. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01331-3
210. Storjohann L, Holst B, Schwartz TW (2008) Molecular mechanism of Zn²⁺ agonism in the extracellular domain of GPR39. *FEBS Lett* 582:2583–2588. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.030
211. Sensi SL, Paoletti P, Koh J-Y, et al (2011) The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc. *J Neurosci* 31:16076–16085. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3454-11.2011
212. Weiss S, Sebben M, Kemp DE, Bockaert J (1986) Serotonin 5-HT₁ receptors mediate inhibition of cyclic AMP production in neurons. *Eur J Pharmacol* 120:227–230. doi: 10.1016/0014-2999(86)90544-3
213. Limbird LE (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *Faseb J* 2:2686–2695.
214. Raymond JR, Mukhin Y V, Gettys TW, Garnovskaya MN (1999) The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* 127:1751–64. doi: 10.1038/sj.bjp.0702723
215. Renner U, Zeug A, Woehler A, et al (2012) Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 125:2486–99. doi: 10.1242/jcs.101337
216. Lucki I (1991) Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry* 52:24–31.
217. Kinney GG, Griffith JC, Hudzik TJ (1998) Antidepressant-like effects of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists on operant responding under a response duration differentiation schedule. *Behav Pharmacol* 9:309–18.
218. Assié M-B, Bardin L, Auclair AL, et al (2010) F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:1285–1298. doi: 10.1017/S1461145709991222
219. Mnie-Filali O, Faure C, Lambás-Señas L, et al (2011) Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* 36:1275–88. doi: 10.1038/npp.2011.13
220. Tokarski K, Bobula B, Grzegorzewska-Hiczwa M, et al (2012) Stress- and antidepressant treatment-induced modifications of 5-HT₇ receptor functions in the rat brain. *Pharmacol Reports* 64:1305–1315.
221. Kim Y, Tae J, Lee K, et al (2014) Novel N-biphenyl-2-ylmethyl 2-methoxyphenylpiperazinylalkanamides as 5-HT_{7R} antagonists for the treatment of depression. *Bioorganic Med Chem* 22:4587–4596. doi: 10.1016/j.bmc.2014.07.026
222. Roth BL, Lopez E, Patel S, Kroeze WK (2000) The Multiplicity of Serotonin Receptors: Uselessly Diverse Molecules or an Embarrassment of Riches? *Neurosci* 6:252–262. doi: 10.1177/107385840000600408
223. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–42.

224. UniProt Consortium (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 45:D158–D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099
225. Paluchowska MH, Bugno R, Duszyńska B, et al (2007) The influence of modifications in imide fragment structure on 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor affinity and in vivo pharmacological properties of some new 1-(*m*-trifluoromethylphenyl)piperazines. *Bioorg Med Chem* 15:7116–7125. doi: 10.1016/j.bmc.2007.07.029
226. Bojarski AJ, Paluchowska MH, Duszyńska B, et al (2005) 1-Aryl-4-(4-succinimidobutyl)piperazines and their conformationally constrained analogues: Synthesis, binding to serotonin (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇), α ₁-adrenergic, and dopaminergic D₂ receptors, and in vivo 5-HT_{1A} functional characteristics. *Bioorganic Med Chem* 13:2293–2303. doi: 10.1016/j.bmc.2004.12.041
227. Craig DA (1993) The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. *Trends Pharmacol Sci* 14:89–91. doi: 10.1016/0165-6147(93)90070-Z

8 ZAŁĄCZNIK

Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, Rafalo A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, Tanaka KF, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, Szewczyk B. *Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT_{1A} Receptors: In Vitro and In Vivo Studies*. Mol Neurobiol. 2016, 53 (10):6869-6881.

Impact Factor = 5,397

Satała G, Duszyńska B, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ. *Allosteric Inhibition of Serotonin 5-HT₇ Receptors by Zinc Ions*. Mol Neurobiol. 2017, 28. doi:10.1007/s12035-017-05360.

Impact Factor = 5,397

Badania przedstawione w pracach zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM numer 2012/05/N/NZ7/02110.