DETERMINACIÓ DELS RECEPTORS DE DOPAMINA EN MOSTRES DE CERVELL

VERÒNICA CASADÓ ANGUERA
2n Batxillerat 2007-08
I.E.S. Berenguer d'Entença

TUTORA: Roser Mas

Per anar on no se sap,
s’ha d’anar per on no se sap
San Juan de la Cruz

ÍNDEX

1- INTRODUCCIÓ..... 1

2- MARC TEÒRIC.....

2.1- RECEPTORS HORMONALS 3

2.1.1- Generalitats 3

2.1.2- Segons missatgers i sistemes de transducció del senyal 4

- Transducció del senyal mitjançant proteïnes G 6

2.2- GPCRs: RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G..... 10

2.2.1- Estructura dels receptors de 7 dominis transmembrana 11

2.2.2- Classificació 13

2.3- RECEPTORS DE DOPAMINA 15

2.3.1- La dopamina com a neurotransmissor 15

2.3.2- Receptors de dopamina (D1, D2, D3, D4, D5)..... 16

a- Classificació 16

b- Estructura 17

c- Farmacologia 18

d- Expressió 18

2.3.3- El receptor de dopamina D2 20

2.4 - TÈCNIQUES D'ESTUDI DELS RECEPTORS 21

2.4.1- Mètode de separació entre el lligand unit a la mostra i el lligand lliure 22

2.4.2- Unió específica i no específica del radiolligand 22

2.4.3- Experiment típic de *binding* : l'assaig de competició .. 23

3- OBJECTIUS DEL TREBALL EXPERIMENTAL 24

4- METODOLOGIA 25

4.1- MATERIAL 25

4.1.1- Material d'estudi 25

4.1.2- Material i aparells 25

4.1.3- Reactius 26
4.2- PREPARACIÓ DE TAMPONS 26
4.3- SEPARACIÓ DE L'ESTRIAT CEREBRAL 26
4.4- OBTENCIÓ DE MEMBRANES D'ESTRIAT 27
4.4.1- Homogeneïtzació 27
4.4.2- Centrifugació 28
4.5- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL 30
4.6- ELABORACIÓ DE LA TAULA DE COMPOSICIÓ DELS INCUBATS D'UN ASSAIG DE COMPETICIÓ..... 32
4.7- PREPARACIÓ D'INCUBATS..... 33
4.8- FILTRACIÓ 34
4.9- COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT 36
4.9.1- Vials i líquid de centelleig 36
4.9.2- Comptador de radioactivitat 37
4.10- NETEJA, RESIDUS I ORDRE 38
4.11- ANÀLISI DE LES DADES DE *BINDING* 38

5- RESULTATS 41
5.1- SEPARACIÓ DE L'ESTRIAT CEREBRAL..... 41
5.2- OBTENCIÓ DE MEMBRANES D'ESTRIAT..... 42
5.3- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL.. 43
5.4- ASSAIG DE DESPLAÇAMENT O COMPETICIÓ DEL [^{3}H]YM-09151-2 PER LA DOPAMINA 48
5.4.1- Preparació dels incubats 48
5.4.2- Comptatge de l'experiment de radioactivitat 49
5.4.3- Ajust de les dades experimentals a una corba de desplaçament 51
5.5- ASSAIG DE DESPLAÇAMENT O COMPETICIÓ DEL [^{3}H]YM-09151-2 PER L'YM-09151-2 54
5.5.1- Preparació dels incubats 54
5.5.2- Comptatge de l'experiment de radioactivitat 55
5.5.3- Ajust de les dades experimentals a una corba de desplaçament 55

5.5.4- Determinació de l'afinitat de la dopamina a partir de l'afinitat del [^{3}H]YM-09151-2..... 59

6- ANÀLISI DELS RESULTATS 60

6.1- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL . 60

6.2- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE RECEPTOR DE DOPAMINA D2 62

6.3- DETERMINACIÓ DE L'AFINITAT DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 PER L'YM-09151-2 63

6.4- DETERMINACIÓ DE L'AFINITAT DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 PER LA DOPAMINA 64

6.5- COMPARACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS RECEPTORS DE DOPAMINA D2 EN LES DIFERENTS ESPÈCIES ESTUDIADES 67

7- CONCLUSIONS..... 70

8- VALORACIÓ PERSONAL..... 72

9- BIBLIOGRAFIA 73

10- AGRAÏMENTS..... 75

1 INTRODUCCIÓ

La comunicació cel·lular és una característica bàsica per intercanviar informació fisicoquímica amb altres cèl·lules i amb el medi que les envolta. Per permetre aquesta comunicació, és necessària l'existència d'uns missatgers, hormones i neurotransmissors, que portin la informació d'un lloc a un altre. Alguns d'aquests missatgers poden traspassar la membrana lliurement per la seva composició hidrofòbica però, en canvi, n'hi ha d'altres que són hidrofílics i per tal de transmetre la informació, s'acoblen a unes proteïnes que hi ha en les membranes i que actuen com a receptors, tot seguit els mecanismes de transducció provocaran l'aparició dins de la cèl·lula d'una altra molècula, el segon missatger, que desencadenarà els efectes fisiològics corresponents.

Amb aquest treball de recerca hem pretès abordar l'estudi de receptors de membrana des del punt de vista bibliogràfic i experimental. Més concretament estudiarem un tipus d'aquests receptors, els GPCR, que tenen la característica de travessar 7 vegades la membrana cel·lular.

Dins aquesta gran família ens centrarem en els receptors de dopamina; aquesta, actua com a neurotransmissor al sistema nerviós central i controla una gran varietat de funcions, com la modulació de l'activitat sensorial, l'activitat motora, l'activitat endocrina, l'aprenentatge, la memòria, l'emotivitat, l'afectivitat i la motivació.

Amb el nostre estudi, pretenem analitzar el contingut de receptor de dopamina D2 (implicat en neuropatologies com el Parkinson, l'esquizofrènia, la síndrome de Tourette i l'addicció a drogues) en mostres de cervell de diferents espècies animals, així com conèixer l'afinitat per l'hormona dopamina del receptor de cada espècie. Amb això, volem investigar quina espècie animal és més semblant a la humana i, per tant, podrà substituir-la en quantitat i disponibilitat per a la realització d'experiments.

Per tal de realitzar aquest Treball de Recerca i donat que als Instituts no hi ha infrastructura suficient per realitzar aquests tipus d'estudis, vam adreçar-nos a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona; allí, sota la supervisió d'un professor del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, el catedràtic Antoni Cortés, vaig realitzar tots els experiments.

Primer vaig haver de fer diverses visites al mercat de Reus i a les peixateries de Cambrils per adquirir tantes varietats de cervells d'animals com pogués, finalment en vaig aconseguir 8, l'humà me'l va proporcionar el Departament de la Universitat. Un cop al laboratori vam extreure'n la part que havia d'estudiar, vam homogenitzar els

teixits, els vam centrifugar per eliminar el citoplasma, i vam obtenir les membranes cel·lulars, que vam congelar. En una altra sessió vam determinar el contingut de proteïna mitjançant l'espectrofotometria per tal d'utilitzar-ne la mateixa quantitat de cadascun en l'estudi. Per acabar, vam realitzar l'experiment d'unió d'un lligand radioactiu a les mostres problema i de desplaçament d'aquest per competició amb hormones, la qual cosa ens permetria determinar la quantitat de receptor de dopamina D2 en les diferents espècies estudiades, així com la seva afinitat.

Per fer-ho vam preparar els incubats, en cadascun dels quals vam mantenir constant tot excepte la concentració de dopamina. A concentracions baixes de dopamina la majoria dels receptors es trobaven units al radiolligand i, a mesura que augmentava la quantitat de dopamina aquesta s'hi unia i anava desplaçant el radiolligand. Per tant, a més dopamina a l'incubat, menys senyal radioactiva.

A continuació vam realitzar la filtració, que té com a finalitat separar el radiolligand unit a les membranes de la mostra problema del radiolligand lliure no unit a res. Això s'aconsegueix ja que al filtre només s'hi poden quedar les membranes, per això només es queda el radiolligand unit; l'altre, traspassa el filtre. Un cop filtrades les mostres, vam ficar cada filtre dins d'un vial amb líquid de centelleig per a, finalment, posar-los al comptador de radioactivitat. Una vegada comptabilitzats tots els vials, vam passar els resultats a unes plantilles d'Excel i, mitjançant un programa d'ajust de dades i de gràfics (GraFit), vam obtenir el paràmetres que anàvem buscant: contingut total de receptor D2 i afinitat d'aquest pels seus lligands. Un cop obtingudes les dades vam procedir a la seva anàlisi i finalment a assolir unes conclusions.

A l'hora de redactar el treball, primer hem explicat el marc teòric en el que es troba l'estudi que hem fet en aquest Treball de Recerca. Hem continuat amb la Metodologia empratda en el treball pràctic, explicant cadascun dels passos seguits. A continuació hem exposat tots els resultats obtinguts, col·locant un representatiu de cada tipus per tal de fer la lectura més àgil. Finalment hem analitzat tots els resultats i hem formulat les conclusions a les que hem arribat.

Per fer aquest Treball de Recerca hem utilitzat una gran varietat de llibres generals de bioquímica, altres més específics sobre receptors, així com tesis doctorals sobre dopamina i els seus receptors. Aquests llibres/tesis els he obtingut de la biblioteca de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. A més hem consultat diferents pàgines web sempre intentant triar aquelles elaborades per organismes oficials, normalment entitats educatives ja que garanteixen una major rigorositat en els seus continguts.

2 MARC TEÒRIC

Com que el nostre objectiu és la determinació dels receptors D2 de dopamina, que són proteïnes de membrana cel·lular especialitzades en la recepció del senyal portat pel neurotransmissor dopamina, hem cregut oportú centrar el Marc teòric del present Treball de Recerca en el repàs del concepte dels receptors hormonals, que són un tipus de proteïnes de gran interès funcional per a la vida de la cèl·lula i la seva comunicació amb altres cèl·lules d'un mateix organisme.

Hem explicat també els diferents mecanismes emprats pels receptors per desencadenar uns efectes intracel·lulars com a resposta a la unió de l'hormona o neurotransmissor al receptor. Finalment, ens hem centrat en explicar algunes característiques d'un ampli grup de receptor de membrana, els GPCR, que constitueixen la família més important d'aquests receptors, entre els que es troben els receptors de dopamina, i concretament del subtipus D2, que són els que han centrat el present Treball de Recerca.

2.1- RECEPTORS HORMONALS

2.1.1- GENERALITATS

La transmissió intercel·lular de senyals constitueix un procés fonamental en el funcionament d'un ésser viu. Els receptors que reben i transmeten aquestes senyals juguen un paper clau en aquest procés.

Des d'un punt de vista fisiològic els receptors són aquelles molècules de la cèl·lula, de naturalesa proteica, a les que s'uneixen de forma específica els neurotransmisors, mediadors u hormones, generant-se a partir d'aquesta unió una resposta funcional cel·lular.

La dinàmica d'activació d'un receptor inclou necessàriament 3 fases:

1- L'associació específica entre el lligand endogen o exogen i el seu receptor (reconeixement). El lligand endogen és el que té de forma natural una cèl·lula com per exemple la dopamina: majoritàriament es tracta d'agonistes que al unir-se al seu receptor activen un sistema efector que provoca un senyal dins de la cèl·lula on es troba el receptor. El lligand exogen és un fàrmac sintetitzat en un laboratori farmacèutic que s'uneix al mateix receptor que la hormona endògena: poden ser agonistes com el quinpirole en el cas de la dopamina o antagonistes d'aquesta com l'YM-09151-2.

2- Les modificacions cel·lulars i moleculars desencadenades per la interacció entre ambdues molècules (transducció de senyal), ja sigui un canvi en la permeabilitat de la membrana per a un determinat ió, l'activació o inhibició d'un sistema enzimàtic, o una modificació transcripcional del genoma nuclear.

3- La resposta funcional que s'origina com a conseqüència final del procés.

Un mateix mediador endogen pot realitzar les seves funcions interactuant amb diversos receptors. La diferenciació funcional de diferents tipus de receptors s'ha vingut realitzant fonamentalment per l'anàlisi del rang de potència de diferents fàrmacs antagonistes i agonistes d'un determinat sistema davant una sèrie de respostes funcionals associades a ell.

Per començar a funcionar, els receptors, aparentment sempre en repòs o amb molt poca activitat, requereixen ser activats per un lligand endogen. Moltes molècules endògenes (neurotransmisores, hormones) i també exògenes (fàrmacs) interactuen amb els seus receptors amb un alt grau de selectivitat i sensibilitat i donen una resposta tissular. A aquests fàrmacs que indueixen respostes en algun teixit se'ls anomena agonistes.

En la teoria clàssica de la interacció fàrmac-receptor es diu que aquestes molècules posseeixen afinitat (capacitat d'un fàrmac per unir-se amb el receptor específic i formar un complex fàrmac-receptor) per un receptor i activitat intrínseca o eficàcia (capacitat que tenen els fàrmacs, un cop units al receptor, de generar un estímul i desencadenar la resposta o efecte farmacològic).

Aquelles substàncies que reuneixen aquestes dues característiques (afinitat i activitat intrínseca) són conegudes com a fàrmacs agonistes, però si únicament posseeixen afinitat per al receptor i no són capaços de produir una resposta cel·lular (no tenen activitat intrínseca o eficàcia) es coneixen com a fàrmacs antagonistes. Aquests fàrmacs antagonistes inhibeixen o competeixen amb els agonistes, per tant, no es pot parlar de la seva activitat però sí de la potència en anular l'activitat intrínseca d'un agonista.

2.1.2- SEGONS MISSATGERS I SISTEMES DE TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

Les hormones hidrofíliques (pèptids, petites molècules polars i/o carregades com els neurotransmissors) s'uneixen generalment als seus receptors específics de la membrana cel·lular ja que no poden atravessar lliurement (per difusió) l'entorn altament hidrofòbic de la bicapa lipídica. El receptor reconeix característiques estructurals de l'hormona que generen un alt grau d'especificitat i afinitat. La unió de l'hormona al receptor pot provocar canvis conformacionals en la molècula de receptor que permeten l'associació amb el transductor, el qual pot patir canvis addicionals que li permetin interaccionar

amb un enzim al costat citoplasmàtic de la membrana cel·lular. Els canvis conformacionals en l'enzim, al seu torn, fan que s'activi el seu lloc catalític. En alguns casos, el receptor "activat" per l'hormona pot, físicament, obrir un canal iònic a la membrana o tenir altres impactes profunds sobre la seva estructura. Aquests processos es coneixen com a transducció de senyal i a les molècules participants en les interaccions se les anomena genèricament transductors.

Les hormones que s'uneixen a receptors de membranes transmeten els seus senyals mitjançant la unió de tres tipus principals de receptors:

a) Receptors acoblats a proteïnes G, l'activació dels quals pot provocar:

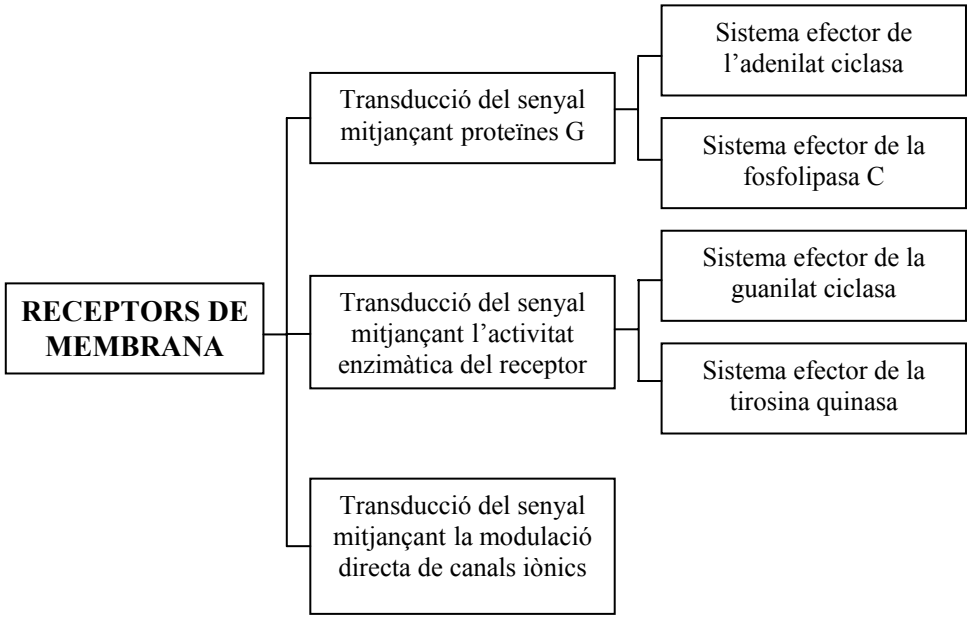
- L'augment o disminució de l'AMPc (adenosina monofosfat cíclic) i l'activació de la ruta de la proteïna quinasa A

- L'activació de la hidròlisi del fosfatidilinositol-4,5-bifosfat i l'estimulació de la ruta de la proteïna quinasa C per augment del calci citoplasmàtic.

b) Receptors-enzim: es tracta de receptors d'hormones que alhora tenen activitat enzimàtica, generalment guanilat ciclasa o tirosina quinasa.

c) Receptors-canal: una mateixa proteïna és alhora un receptor i un canal iònic que quan uneix l'hormona obre o tanca el pas de determinats ions a través de la membrana citoplasmàtica.

Els principals sistemes efectors utilitzats pels diferents tipus de receptors de membrana es veuen en el següent esquema:



A continuació comentarem els sistemes efectors de l'adenilat ciclasa i de la fosfolipasa C, que són els habitualment emprats pels receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs).

Transducció del senyal mitjançant proteïnes G

La majoria dels transductors de senyal dels receptors de la membrana cel·lular són proteïnes G, que consten de tres tipus de subunitats: α, β i γ.). Es coneixen 35 gens que codifiquen proteïnes G humanes: 16 tipus de subunitats α, 5 de β i 14 de γ.

La subunitat α és el component de fixació del nucleòtid de guanina (GTP i GDP), d'aquí el nom de proteïnes G, i es creu que interacciona indirectament amb el receptor a través de les subunitats β i γ, i directament amb un enzim, la qual cosa dóna com a resultat l'activació o inhibició de l'enzim. Existeixen diferents subunitats α cadascuna de les quals interacciona d'una o altra forma amb un enzim, com la α_S, α_i, α_q…

Segons l'enzim implicat, és parla d'un determinat sistema efector que transmet l'activació del receptor per una hormona extracel·lular fins a un determinat efecte fisiològic intracel·lular, mitjançant la producció més o menys directa d'una molècula senyal intracel·lular anomenada segon missatger.

Els receptors de membrana que utilitzen com a transductor de senyal les proteïnes G s'anomenen GPCR (receptors acoblats a proteïna G), i més endavant els comentarem en profunditat.

SISTEMA EFECTOR DE L'ADENILAT CICLASA

El sistema efector més conegut és el de l'activació o inhibició de l'enzim Adenilat Ciclasa pel complex hormona-receptor (H-R) i l'activació de proteïnes G, amb la conseqüent producció o inhibició d'AMPc intracel·lular, que és el missatger intracel·lular o segon missatger.

En realitat existeixen dues formes principals de la subunitat α de la proteïna G designades α_s, la subunitat α estimuladora de l'adenilat ciclasa i α_i, la subunitat α inhibidora. Dos tipus de receptors i, per tant, d'hormones controlen l'activitat catalítica de l'adenilat ciclasa: els que donen lloc a una estimulació de l'adenilat ciclasa i aquells que donen lloc a una inhibició d'aquest enzim (vegeu fig. 1).

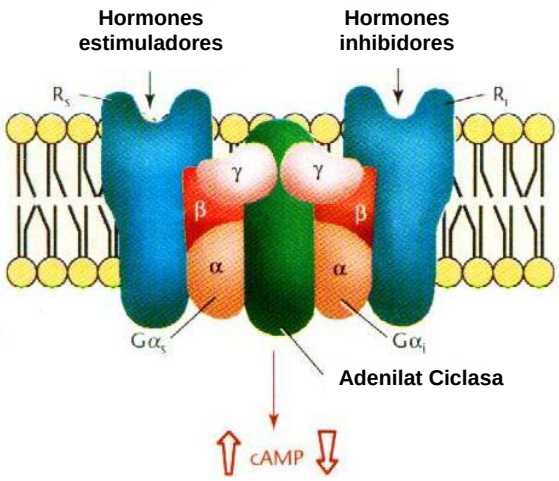


Fig. 1. Components del sistema efector de l'adenilat ciclasa (http://med.unne.edu.ar)

Un esquema de les diferents etapes en el procés d'activació d'un receptor per una proteïna estimuladora (Gs) de l'adenilat ciclasa apareix a la figura 2.

En el cas que una proteïna G inhibidora s'acobli al receptor, els fenòmens són similars, però la inhibició de l'activitat adenilat ciclasa pot produir-se aquí per interacció directa de la subunitat α inhibidora amb l'adenilat ciclasa o, alternativament, les subunitats βγ gene-, alternativament, les subunitats βγ generades poden reagrupar-se amb les subunitats α estimuladores de l'altre costat i evitar així indirectament l'estimulació de l'activitat de l'adenilat ciclasa.

La ruta completa utilitza quatre molècules d'AMPc que s'uneixen al complex format per dos subunitats reguladores (R), cosa que provoca l'alliberament de les dues subunitats catalítiques (C) de la proteïna quinasa. Les subunitats catalítiques de la proteïna quinasa A alliberades són capaces de fosforilar proteïnes per produir un efecte cel·lular. La fosforil·lació consisteix en la formació d'un enllaç éster entre un grup àcid del fosfat aportat per l'ATP i un alcohol d'un residu generalment de serina d'una proteïna. Si aquesta proteïna és un enzim la seva fosforilació provoca l'activació o inactivació del mateix.

La formació d'AMPc en la cèl·lula, normalment activa la proteïna quinasa A (dependent d'AMPc), seguint el que s'anomena ruta de la proteïna quinasa A.

SISTEMA EFECTOR DE LA FOSFOLIPASA C

Un altre segon missatger usat per molts receptors GPCR és el calci citosòlic. Els nivells d'aquest poden modificar-se tant per ingrés del calci extracel·lular, com per l'alliberament des del seu principal dipòsit intracel·lular: el reticle endoplasmàtic.

Una hormona que opera a través d'aquest sistema s'uneix a un receptor específic de la membrana cel·lular, que interacciona amb una proteïna G_q segons un mecanisme similar al de la ruta de la proteïna quinasa A i transdueix el senyal, el que dóna com a resultat l'estimulació de la fosfolipasa C. Aquest enzim intracel·lular cataliza la hidròlisi de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) per formar dos segons missatgers, diacilglicerol (DAG) i inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3). L'IP_3 difon pel citoplasma i s'uneix al seu receptor en la membrana del reticle endoplasmàtic, que actua com un dipòsit de calci.

Aquesta unió dóna com a resultat l'alliberament al citoplasma d'ions calci.

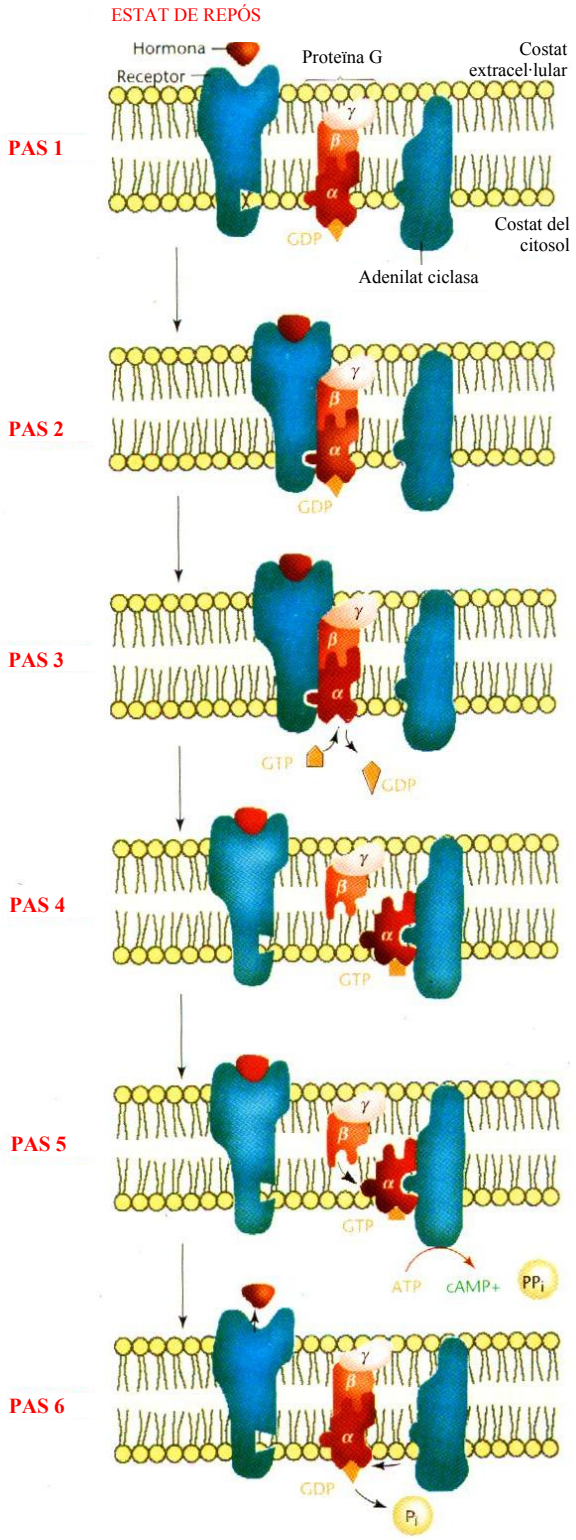


Fig. 2. Activació de l'adenilat ciclasa a cauda de la unió d'una hormona al seu receptor (http://med.unne.edu.ar)

1- L'hormona s'uneix al receptor de membrana

2- Això produeix un canvi conformacional al receptor que deixa exposat un lloc per a la fixació de la proteïna G

3- La proteïna G pot ser tan estimuladora, Gs, com inhibidora, G_i, en relació amb l'efecte final sobre l'activitat de la adenilat ciclasa; el receptor interacciona amb la subunitat βγ de la proteïna G permetent que la subunitat α intercanviï el GDP unit per GTP

4- L'entrada de GTP provoca la separació entre la subunitat α i la subunitat βγ de la proteïna G que alhora fa que la superfície de la subunitat α de la proteïna G origini un lloc d'unió amb l'enzim adenilat ciclasa

5- La subunitat α s'uneix a l'adenilat ciclasa i activa el seu centre catalític, de manera que l'ATP intracel·lular és converteix en AMPc (segon missatger)

6- El GTP s'hidrolitza a GDP per l'activitat GTPasa de la pròpia subunitat α, retornant-la a la seva conformació original i permetent de nou la seva interacció amb la subunitat βγ tot esperant un altre cicle d'activitat

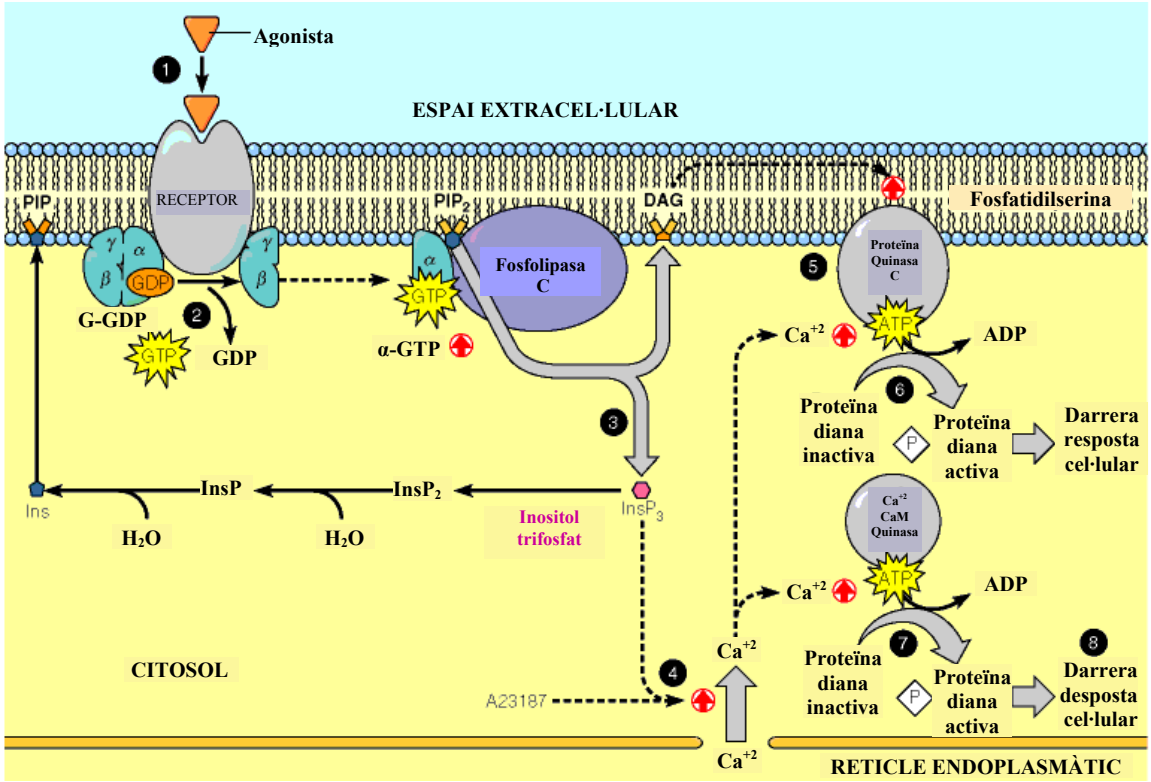


Fig. 3. Regulació hormonal mitjançant el sistema efector de fosfolipasa C: 1 unió de l'agonista al receptor, 2 activació de la proteïna G, 3 activació de la fosfolipasaC, 4 obertura de canals de calci per l'IP_3, activació de la proteïna quinasa C, 6 fosforil·lació de proteïnes diana per a la proteïna quinasa C, 7 fosforil·lació de la proteïna per la calci-calmodulina, 8 respostes fisiològiques finals (Mathews et al, 2002)

El DAG, juntament amb el Ca^{2+} citoplasmàtic induït per l'IP_3 activa la ruta de la proteïna quinasa C (dependent del calci) que fosforil·la, en serina i treonina, proteïnes específiques en el citosol o, en ocasions, en la membrana plasmàtica. Aquestes proteïnes fosforilades duen a terme funcions específiques que no poden realitzar en l'estat desfosforilat. Per exemple, una proteïna fosforilada podria migrar fins al nucli i incrementar la mitosi i el creixement (vegeu figura 3).

A més, el sistema IP_3-DAG pot modificar l'activitat d'una família d'enzims anomenats fosfodiesterases, l'activació de les quals permet la destrucció de molècules d'AMPc. D'aquesta manera hormones del segon missatger de les quals és el IP_3 poden reduir els nivells d'AMPc de forma indirecta.

El calci citoplasmàtic també pot regular una proteïna reguladora dependent del calci, la calmodulina, que té quatre llocs per a la fixació del calci i l'ocupació total d'aquests condueix a la fosforilació de determinats enzims que en aquest estat passen a ser actius o inactius, com per exemple la pròpia adenilat ciclasa, la glicerol-3 fosfat deshidrogenasa, la piruvat carboxilassa, la piruvat dashidrogenassa, entre altres.

També el complex calci/calmodulina regula l'activitat de nombrosos elements

estructurals en les cèl·lules, com el complex actina-miosina del múscul llis i diversos processos regulats per microfilaments en les cèl·lules no contràctils, com la mobilitat de la pròpia cèl·lula, la mitosi, l'alliberament de grans i l'endocitosi.

2.2- GPCRs: RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G

Moltes de les hormones i neurotransmissors que transporten informació entre les cèl·lules d'un organisme no entren dins de la cèl·lula i, per tal d'exercir la seva funció, interactuen amb un receptor de la superfície cel·lular. D'entre els diferents receptors que es poden trobar a la membrana citoplasmàtica destaquen els receptors acoblats a proteïna G (GPCRs, *G-protein coupled receptors*), també anomenats receptors de 7 dominis de transmembrana (HSMRs, *heptaspanning membrane receptors*) o 7T.

Aquesta família engloba el major nombre de proteïnes de membrana implicades en la transducció del senyal hormonal cap a l'interior cel·lular. Els receptors de 7 dominis de transmembrana estan codificats per una gran família de gens; en el cas del genoma humà, més de l'1% codifica més de 1000 proteïnes amb aquesta estructura, de les quals més del 90% s'expressen al sistema nerviós central (SNC).

Els GPCRs són activats per una gran varietat de lligands tan endògens com exògens, entre els que s'inclouen hormones, péptids, aminoàcids, ions i fotons de llum. Els GPCRs transdueixen el senyal a través d'un gran nombre d'efectors com les adenilat ciclases, les fosfolipases o els canals iònics, entre altres, i juguen un paper clau en la fisiologia cel·lular, controlant processos fisiològics com per exemple el metabolisme, la secreció, la diferenciació, el creixement cel·lular, les respostes inflamatòries i inmunològiques o la neurotransmissió, per aquest motiu la seva disfunció dona lloc a diverses malalties.

Més del 50% dels agents terapèutics que es comercialitzen avui en dia, actuen sobre aquestes proteïnes i, així, els GPCRs són considerats com a potencials dianes terapèutiques per al desenvolupament de nous fàrmacs amb aplicacions en pràcticament tots els camps de la medicina. Molts agents terapèutics usats en l'actualitat actuen ja sigui activant (agonistes) o bloquejant (antagonistas) a receptors acoblats a proteïna G. Per exemple, els agonistes dels receptors β-adrenèrgics s'utilitzen per al tractament de l'asma, mentre que els antagonistes d'aquests mateixos receptors s'usen per tractar la hipertensió i les fallades cardíaques.

En la figura 4 s'il·lustra la diversitat d'agonistes fisiològics que actuen mitjançant receptors acoblats a proteïna G. L'activació dels corresponents receptors condueix a la senyalització intracel·lular en la qual intervenen molècules diana, tant citoplasmàtiques com nuclears, a través de mecanismes dependents de proteïnes heterotrimèriques G i altres independents d'aquestes. Aquestes vies de senyalització regulen funcions

biològiques clau com la proliferació i la supervivència cel·lular.

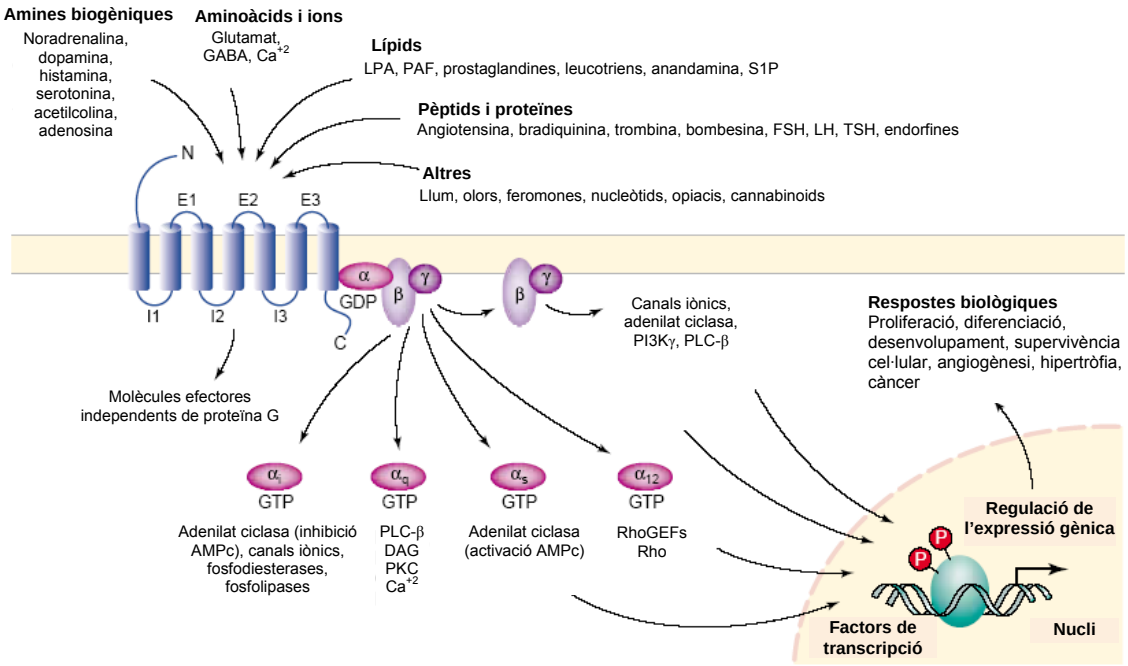


Fig 4. Hormones, neurotransmisors i estímuls fisiològics que actuen mitjançant GPCRs (Marinissen i Gutkind, 2001)

2.2.1- ESTRUCTURA DELS RECEPTORS DE 7 DOMINIS TRANSMEMBRANA

Per a què una proteïna sigui classificada com a receptor de 7 dominis de transmembrana o receptor acoblat a proteïna G, ha de complir dues premisses principals.

- La primera és estar constituït per una sola cadena proteica capaç de creuar 7 vegades la membrana cel·lular; per això, en la seva estructura ha de presentar 7 seqüències d'uns 25-35 residus consecutius, fonamentalment hidrofòbics, disposats en una estructura d'hèlixs α que s'internen en la membrana plasmàtica, cosa que permet que un lligand extracel·lular exerceixi el seu efecte específic dins de la cèl·lula.

- La segona premissa és l'habilitat d'interaccionar pel costat intracèl·lular amb una proteïna G, per la qual cosa reben també el nom de receptors acoblats a proteïna G.

Així, l'estructura general d'un GPCR mostra 7 hèlix de transmembrana (TM) separades per 3 bucles extracel·lulars (EC) i 3 intracel·lulars (IC), l'externa amino-terminal extracel·lular i l'extrem carboxi-terminal intracel·lular (vegeu figura 5).

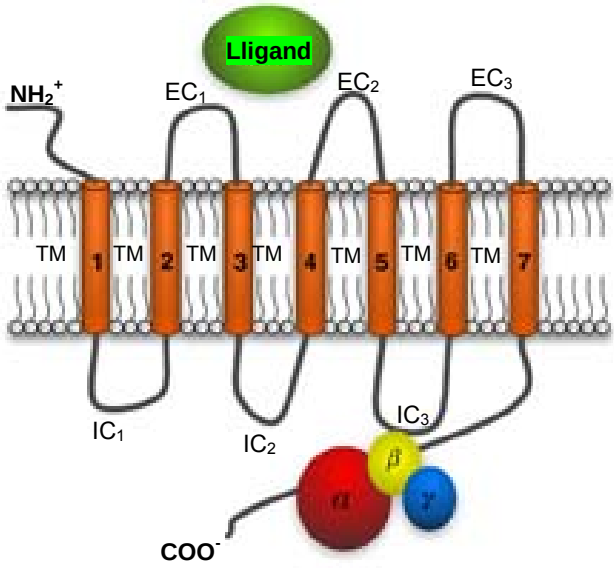


Fig. 5. Estructura general d'un GPCR

Encara que al laboratori podem recórrer a diverses tècniques experimentals per determinar les regions corresponents a segments transmembranals (estudis d'unió d'anticossos contra pèptids, proteòlisi, estudis espectroscòpics, unió de pèptids sintètics a bicapes sintètiques, etc.), la presència de regions de 20-30 aminoàcids amb elevada hidrofobicitat indica, en general, l'existència d'una regió transmembranal.

En els segments transmembranals poden aparèixer aminoàcids polars o amb certa càrrega neta a pH fisiològic, que podrien estar relacionats amb el lloc de fixació de lligands o facilitar el pas d'ions a través del lumen d'un porus de membrana. Per això, el càlcul d'hidrofilicitat (valor que indica la polaritat d'un aminoàcid) o d'hidrofobicitat (que indica la seva apolaritat) no es realitza aminoàcid per aminoàcid. L'anàlisi es realitza amidant, per a cada posició, el valor mitjà de l'aminoàcid en aquesta posició i dels residus colindants, anteriors i posteriors al mateix (normalment de 7 a 19 al voltant de cada posició). Els anàlisis més àmpliament utilitzats són l'índex de hidrofobicitat de Kyte i Doolittle i el de hidrofilicitat de Hoop i Woods (vegeu fig. 6).

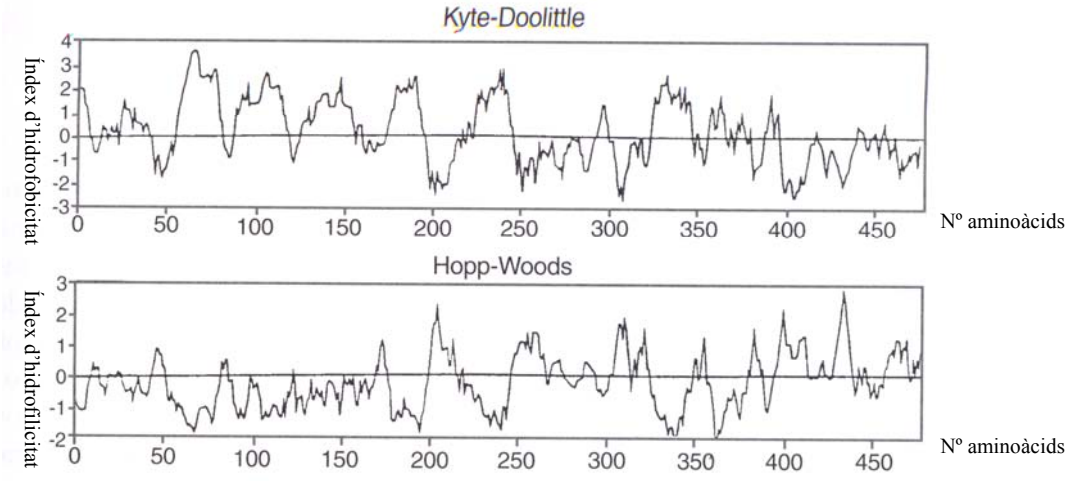
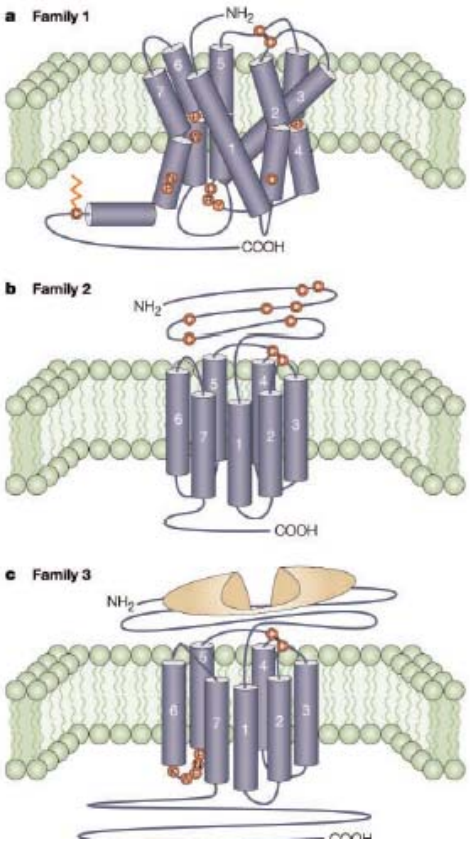


Fig. 6: Gràfics d'hidrofobicitat (Kyte-Doolittle) i hidrofilicitat (Hoop-Woods) de l'adrenoreceptor β2 humà que presenta 7 helix α de transmembrana (Garcia-Sevilla i Pazos, 2003)

2.2.2- CLASSIFICACIÓ

Els GPCRs s'han classificat segons diferents sistemes. Un dels més coneguts és el sistema Kolakowski en què es classifiquen els GPCRs en famílies segons las seva estructura i característiques genètiques. Tot i que entre les diferents famílies no existeix una similitud significativa de seqüència, totes presenten els 7 dominis de transmembrana característics. Com s'observa a la figura 7, les diferents famílies es diferencien en mida i funció del domini N-terminal, C-terminal i els bucles intracel·lulars. Cada un d'aquests dominis li confereix unes propietats específiques a pesar de què tots els GPCRs comparteixen una estructura comuna, les diferents famílies no tenen seqüències homòlogues, la qual cosa indica que probablement no estan relacionats filogenèticament i que la similitud en l'estructura del domini transmembrana es deu només a tenir uns requeriments funcionals comuns.

a) La família 1, també anomenada A o de tipus rodopsina, *rodopsin-like*, és el subgrup més gran ja què conté aproximadament el 90% de tots els GPCRs, uns 280. Aquesta família conté receptors per a odorants, neurotransmisors i hormones glicoproteiques. L'homologia entre els receptors d'aquesta família és baixa i restringida a un nombre limitat però altament conservat de residus aminoàcids. L'alt grau de conservació entre aquests residus suggereix que aquests tenen un paper essencial en l'estructura i funcionalitat dels receptors.



Família 1 (A)
- Receptors d'amines biogèniques (adrenalina, serotonina, dopamina, muscarínic d'acetilcolina, histamina)
- Receptors de neurotensina i TRH
- Receptors d'adenosina i cannabinoides
- Receptors de nucleòtids, oxitocina i somatostatina
- Receptors de melatonina

Família 2 (B)
- Receptors de calcitonina
- Receptors de PTH
- Receptors de glucagó, VIP i secretina
- Receptors de latrotoxina

Família 3 (C)
- Receptors metabotròpics de glutamat
- Receptors de GABA
- Receptors de calci
- Receptors de feromones vemeronasals
- Receptors gustatius

Fig. 7. Esquema de les tres principals famílies de receptors acoblats a proteïna G (modificat de George et. al, 2002)

Així succeeix per a: Asp-Arg-Tyr (DRY) en la cara citoplasmàtica del segment de transmembrana 3 (TM3), el qual se suposa que està implicat en l'activació del receptor per l'hormona. A més, els receptors d'aquesta família es caracteritzen per tenir un pont disulfur que connecta el primer i el segon bucle extracel·lular (EC1-2). Molts d'aquests receptors tenen també una cisteïna esterificada amb un àcid palmític a la cua C-terminal que li serveix per anclar-se a la membrana fosfolipídica. En aquesta família, el lligand s'uneix en una cavitat formada pels dominis de transmembrana encara que per a alguna subfamília, activada per petits pèptids, el reconeixement es produeix a nivell dels bucles extracel·lulars i del domini N-terminal.

b) La família 2 o família B inclou aproximadament 64 receptors diferents per a una varietat d'hormones peptídiques i neuropèptids, com el pèptid intestinal vasoactivu (VIP), la calcitonina, l'hormona paratiroidea (PTH) i el glucagó. Aquesta família es caracteritza per un extrem N-terminal relativament llarg (d'aproximadament uns 100 residus), el qual conté diverses cisteïnes que formen una xarxa de ponts disulfur. Són de morfologia semblant als receptors de la família 1, però no semblen palmitoilar-se i els residus aminoacídics conservats són diferents. Se sap poc de l'orientació dels dominis TM, però tenint en compte la divergència de la seqüència aminoacídica, probablement són diferents de la família 1.

c) La família 3 o C conté el receptor metabotròpic de glutamat i el receptor de GABA (àcid γ-aminobutíric); en total uns 20 tipus i subtipus de receptors. Aquests receptors es caracteritzen per un llarg extrem carboxi- i amino-terminal (500-600 aminoàcids). L'estructura del lloc d'unió s'ha deduït mitjançant estudis de cristalografia de l'extrem N-terminal del receptor metabotròpic de glutamat solubilitzat i unit a glutamat. S'ha vist que forma un dímer unit per un pont disulfur que pot obrir-se i tancar-se en el procés d'unió del lligand. Excepte per les cisteïnes en EC1-2 que formen un possible pont disulfur, la família 3 no té cap característica en comú amb la família 1 i 2. Una característica única d'aquests receptors és que el tercer bucle intracel·lular (IC3) és curt i altament conservat. A l'igual que en la família 2 tampoc es coneix l'orientació dels dominis TM.

d) Els receptors de feromones de llevat configuren dos famílies menors no relacionades, famílies D y E. Finalment, al *Dictyostelium Discoideum*, 4 receptors diferents d'AMPc constitueixen una altra família menor, però única, la família F.

Tot i que la classificació A-F està àmpliament acceptada, Fredriksson i col·laboradors han efectuat el primer estudi filogènic de tota la superfamília de GPCRs al genoma de mamífers, proposant una classificació més detallada. En els seus treballs es mostra què hi ha 5 famílies principals per als GPCRs humans: Glutamat, Rodopsina, Adhesió, *Frizzled/Tasted2* i Secretina (la classificació GRAFS, basada en les seves inicials) i que

dins de cada família els receptors comparteixen un origen evolutiu comú. Tres d'aquestes famílies, rodopsina (A), secretina (B) i glutamat (C), corresponen amb la classificació A-F, mentre que les altres dos famílies, adhesió i *frizzled*, no estan incloses.

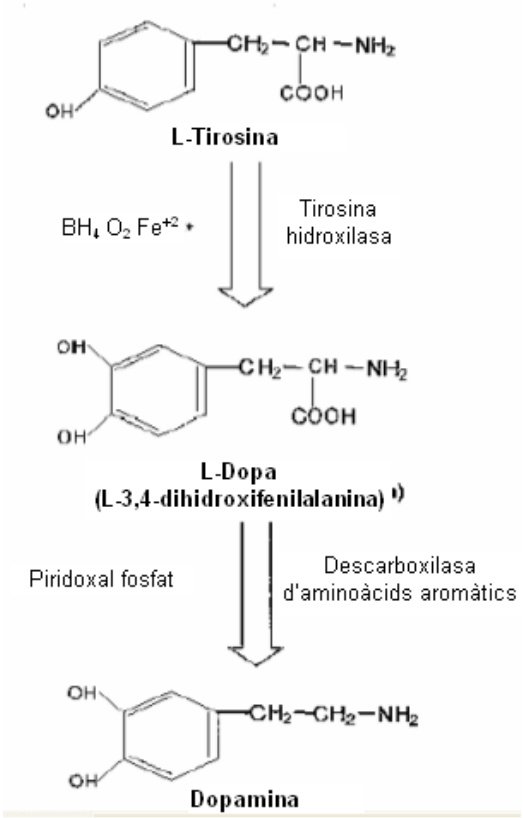
En aquesta classificació la superfamília de la rodopsina segueix essent la més gran i s'ha dividit en 4 grups principals amb 13 branques diferents. Els autors d'aquest nou sistema de classificació defensen la teoria de què els receptors acoblats a proteïna G van sorgir a partir d'un únic predecessor comú, que va evolucionar a través de duplicacions genètiques, evolucionant des de la major simplicitat en quant als seus orígens a l'enorme complexitat que mostra la superfamília d'aquests receptors en l'actualitat.

L'enorme diversitat que assoleix aquesta superfamília de receptors de membrana dóna a entendre el gran paper que juguen en la fisiologia de qualsevol organisme.

2.3- RECEPTORS DE DOPAMINA

2.3.1- LA DOPAMINA COM A NEUROTRANSMISSOR

La dopamina és la principal catecolamina què actua com a neurotransmissor al sistema nerviós central (representa el 80% del contingut total de catecolamines del cervell) i controla una gran varietat de funcions tals com la modulació de l'activitat sensorial, l'activitat motora, l'activitat endocrina, l'aprenentatge, la memòria, l'emotivitat, l'afectivitat i la motivació. La dopamina també exerceix múltiples funcions al sistema perifèric com a modulador de l'alliberament de catecolamines, de la secreció hormonal, del to vascular, de la funció renal i de la motilitat gastrointestinal.



Com altres neurotransmissors, la dopamina no és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica, però si els seus precursors fenilalanina i tirosina. Així doncs, a partir dels seus precursors, la biosíntesi de dopamina té lloc al citosol dels terminals nerviosos dopaminèrgics:

L'alliberament de dopamina en la fenedura sinàptica té lloc mitjançant un mecanisme clàssic d'alliberament de neurotransmissors: l'entrada de calci a través de canals de

calci dependents de voltatge dispara la fusió de vesícules amb la membrana pre-sinàptica, donant lloc a l'exocitosi de la dopamina, de forma què aquesta es difón a través de la fenedura sinàptica fins a unir-se als seus receptors tant pre- com post-sinàptics (vegeu figura 8).

El senyal dopaminèrgic finalitza amb l'eliminació de la dopamina de l'espai inter-sinàptic, implicant mecanismes de recaptació específics al terminal pre-sinàptic on es torna a emmagatzemar o es metabolitza.

Tot i que existeixen enzims extraneuronals que catabolitzen la dopamina alliberada, la fi de l'efecte es deu principalment a la captura del neurotransmissor pels propis terminals nerviosos que la van alliberar. Això té lloc mitjançant transportadors específics (DAT: *DopAmine Transporters*) que juguen un paper important en la funció, inactivació i reciclatge de la dopamina alliberada.

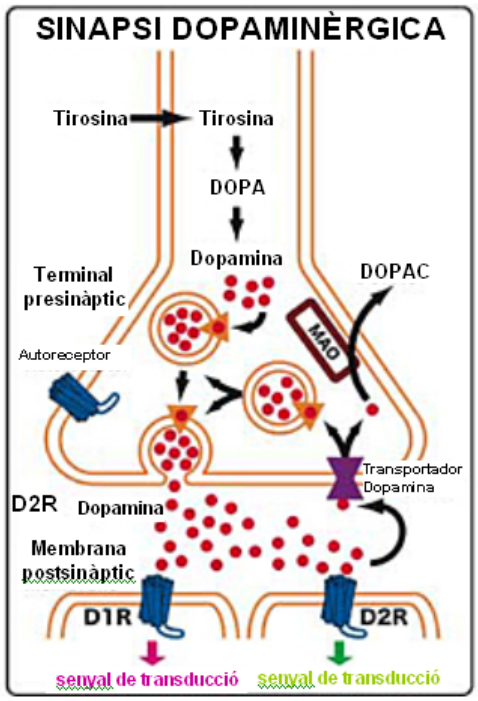


Fig 8. Esquema d'una sinapsi on el neurotransmissor és la dopamina. MAO: monoenzimoxidasa, enzim que degrada la dopamina (www.nibb.ac.jp)

2.3.2- RECEPTORS DE DOPAMINA (D1, D2, D3, D4, D5)

a) Classificació

El 1978, en base a evidències farmacològiques i bioquímiques, els receptors de dopamina es van classificar en dos grups: receptors activadors de l'adenilat ciclasa (AC) i receptors inhibidors de l'AC. Els receptors que estimulen l'AC s'anomenen receptores D1 i els que la inhibeixen, D2.

Estudis posteriors van donar suport a aquesta classificació i els receptors D1 i D2 van ser clarament diferenciats, bioquímica, fisiològica i farmacològicament, a més de per la seva distribució anatòmica. Tot i així, durant la dècada dels 90, usant tècniques de clonatge, s'han aïllat 5 receptors diferents per a la dopamina. Aquests receptors s'han classificat en dos subfamílies en funció de les seves propietats bioquímiques i farmacològiques: els receptors tipus D1 (*D1-like*), que comprenen als D1 i D5, i els receptors tipus D2 (*D2-like*) que inclouen als receptors D2, D3 i D4.

Els receptors tipus D1, d'acord amb la primera classificació proposada, produeixen increments d'AMPc mitjançant proteïnes Gs/olf que estimulen a l'AC i es localitzen principalment als terminals postsinàptics.

Els receptors tipus D2 inhibeixen l'AC per acoblament a proteïnes G i/o, a més d'activar canals de K^+ i disminuir l'entrada de Ca^{2+} mitjançant canals dependents de voltatge. Els receptors D2- *like* poden localitzar-se en terminals presinàptics i postsinàptics.

b) Estructura

Els dos subgrups presenten, a més, peculiaritats estructurals diferencials com es mostra a la figura 9: els receptors D1- *like* tenen un domini carboxil terminal unes set vegades més llarg que els D2- *like*, mentre que aquests últims tenen el tercer bucle intracel·lular (IC3) molt llarg, característica comuna en molts receptors acoblats a la proteïna Gi.

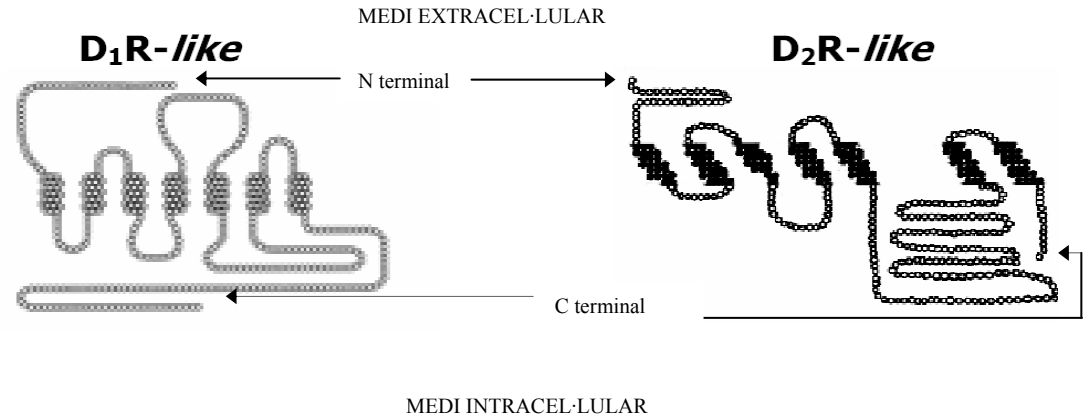


Fig. 9. Estructura general dels receptors tipus D1 i tipus D2 (Missale et al., 1998)

Existeix una alta homologia entre les seqüències d'aminàcids dels dos membres de la família de receptors D1- *like*, de l'ordre del 80%. Entre els membres del subgrup D2- *like* l'homologia és d'un 75% entre els receptors D2 i D3 i d'un 53% entre els D2 i D4.

Per contrast, l'homologia entre els receptors D1- like i D2- like és només del 42-46%. La homologia més elevada es troba en els dominis transmembrana (TM) i en aquells residus que són clau per a la unió de catecolamines, com el residu d'aspàrtic del TM3, que es creu actua com a contraió del grup amino de les amines biogèniques, com la dopamina.

Genèticament els receptors de dopamina semblen derivar per divergència de dues famílies de gens que es diferencien principalment per la presència o no d'introns (segments de DNA dins d'un gen que es transcriu però és eliminat del transcrit primari mitjançant una modificació post transcripcional –*splicing*-, encara que a vegades una part es conserva). Els gens corresponents als D1- *like* no contenen introns, característica que comparteixen amb molts GPCRs. En canvi, i per analogia amb el gen de la rodopsina, els gens que codifiquen els receptors D2- *like* contenen introns.

c) Farmacologia

Per a l'estudi de les propietats farmacològiques dels receptors de dopamina es disposa de lligands que fàcilment discriminen entre els dos subgrups, encara què molts d'aquests lligands no presenten especificitat clara entre els membres d'un mateix subgrup. Així doncs, els receptors D1-*like* presenten unes propietats farmacològiques semblants a les del receptor D1, és a dir, alta afinitat per benzazepines (agonistes) i baixa afinitat per butirofenones i benzamides substituïdes (antagonistas). Una diferència remarcable entre els receptors D1- *like* és l'afinitat que presenten els seus membres per la dopamina, ja que el D5 té una afinitat 10 vegades superior a la que mostra el D1.

Anàlogament, els receptors D2- *like* presenten propietats d'unió de lligands semblants a les del receptor D2: alta afinitat per butirofenones i baixa per benzazepines. Dels tres receptors que conformen el subgrup D2- *like*, el receptor D4 és el que presenta unes propietats farmacològiques més diferents. Aquest receptor presenta una baixa afinitat per molts dels antagonistes dopaminèrgics; per exemple, el D2 i D3 tenen una relativa alta afinitat per les benzamides com el raclopride, mentre que el D4 té una baixa afinitat per aquest compost. No obstant això, el receptor D4 presenta una alta afinitat per l'atípic antagonista neurolèptic clozapina. Dins d'aquest subgrup el receptor D3 és el que presenta major afinitat per la dopamina, amb una afinitat 10 vegades superior a la que presenta el D5.

La diferència d'afinitat que presenten els receptors de dopamina, tant la dels receptors D1- *like* com la dels D2- *like,* pel seu lligand endogen pot permetre l'activació d'uns receptors o uns altres en funció de la quantitat de dopamina alliberada. Atenent als diferents mecanismes de transducció de senyal de cada subtipus de receptor, això pot generar una gran amplitud de resposta a una mateixa substància.

A la taula I es resumeixen els diferents subtipus de receptors de dopamina, la proteïna G a la qual s'acoblen, les vies clàssiques de transducció de senyal i les molècules efectores que modulen. A més, es mostra l'afinitat que presenten per a la dopamina els diferents subtipus, i els agonistes i antagonistes més selectius per a cada membre del subgrup:

d) Expressió

Aquesta diversitat dins dels receptors de dopamina és un reflex de la diversitat funcional que exerceix aquest neurotransmissor, sobretot si es considera l'expressió diferencial d'aquests receptors dins del sistema nerviós central. L'expressió dels diferents subtipus ha estat determinada mitjançant la combinació de tècniques d'unió de radiolligands i d'hibridació *in situ*.

Així, s'ha demostrat que el receptor D1 és el més abundant i la seva distribució és la més àmplia de tots els receptors dopaminèrgics. Es troba en diverses regions del cervell

com l'estriat, el nucli *acumbens*, el tubercle olfactori, l'hipotàlem i el cerebel. L'altre receptor D1- *like,* el receptor D5, presenta una distribució més restringida a regions com l'hipocamp o el tàlem. Ambdós subtipus es localitzen preferentement de forma post-sinàptica. Referent als receptors D2- *like*, el receptor D2 s'expressa principalment al nucli *acumbens*, al tubercle olfactori i a l'hipocamp, tant presinàpticament com postsinàptica i la seva expressió és elevada en les neurones GABAèrgiques estriatopalidals.

TAULA I. SUBTIPUS DELS RECEPTORS DE DOPAMINA

Família	**D1- *like***		**D2- *like***		
Subtipus	D1	D5	D2	D3	D4
Seqüència d'aminoàcids	446 a.a.	477 a.a.	D2a443 a.a. D2b444 a.a.	400 a.a.	387 a.a.
Introns	No	No	Sí	Sí	Sí
Proteïna G	$G_{s/olf}$	$G_{s/olf}$	$G_{i/o}$	$G_{i/o}$	$G_{i/o}$
Adenilat ciclasa	+ AC	+ AC	- AC	- AC	- AC
Altres mecanismes transducció de senyal	+ PCL		+ PCL - canals Ca^{2+} - canals K^+	+ PCL - canals Ca^{2+} - canals K^+	+ PCL
Molècules efectores	↑AMPc ↑PKA ↑IP_3	↑AMPc	↓AMPc ↑IP_3 ↓Ca^{2+} ↑K^+	↓AMPc ↑IP_3 ↓Ca^{2+} ↑K^+ ↑NKE*	↓AMPc ↑à. araquidò. ↑NKE*
Afinitat per la dopamina K_D en nM	2340	261	2,8-474	4-27	28-450
Agonista K_D en nM	SKF-38393	NPA 187	Quinpirole 4,8-474	Bromocriptina 5-7,4	(-) Apomorfina 4
Antagonista K_D en nM	SCH-23390 0,11-0,35	SCH-23390 0,11-0,54	YM-09151-2 1	UH 232 2,9-9,2	Clozapina 9-42
Regions d'alta densitat	Neoestriat SNr	Hipotàlam Hipocamp	Neoestriat	Paleoestriat	Escorça frontal

Aquest receptor actua com autoreceptor als terminals dopaminèrgics on regula la síntesi i alliberament de dopamina. El receptor D3 es localitza específicament en regions límbiques del nucli *acumbens* amb una localització postsinàptica, en neurones que expressen substància P i neurotensina. Per últim, el receptor D4 s'expressa en interneurones GABAèrgiques tant piramidals com no-piramidals del còrtex frontal, l'hipocamp, el bulb olfactori, l'amígdala i el mesencèfal.

Durant els últims anys el sistema dopaminèrgic ha estat de gran interès per la relació entre la desregulació d'aquest sistema i algunes patologies com el Parkinson,

l'esquizofrènia, la síndrome de Tourette, la hiperprolactinèmia i l'addicció a drogues. De fet en situacions patològiques s'ha observat l'existència de diferències quantitatives en quant a l'expressió dels receptors de dopamina o bé en la seva senyalització. Per exemple, els receptors D1 es veuen incrementats en l'esquizofrènia i la seva senyalització vària en la malaltia de Parkinson. La densitat dels receptors D2 localitzats post-sinàpticament incrementa en l'esquizofrènia i també en els malalts de Parkinson no tractats amb L-DOPA (profàrmac que, a diferència de la dopamina, pot traspassar la barrera hematoencefàlica i que és un precursor biològic de la dopamina).

2.3.3- EL RECEPTOR DE DOPAMINA D2

El receptor D2 de dopamina ha estat àmpliament estudiat, demostrant-se la seva participació en nombroses i importants funcions fisiològiques com el control de l'activitat motora. Aquest receptor es distribueix àmpliament pel cervell i es localitza a nivell postsinàptic i presinàptic.

Al sistema nerviós central existeix una alta densitat de receptor de dopamina D2 a l'estriat; aquest ha estat el motiu de triar l'estriat cerebral com a teixit d'estudi per a la determinació del contingut i afinitat del receptor D2 en el nostre Treball de Recerca. Aquesta és una regió cerebral formada pel nucli *caudat-putamen* (estriat dorsal), responsable del control motor de l'individu, i pel nucli *acumbens* (estriat ventral), responsable del control emocional i, per exemple, els fenòmens de recompensa associats a l'addicció a les drogues d'abús. Altres àrees on es troba el receptor D2, en menor proporció, són l'hipocamp, el tubercle olfactori, la substància *nigra*, l'escorça cerebral, l'amígdala, el tàlem i l'hipotàlem.

El receptor D2 presinàptic actua com un autoreceptor i inhibeix l'alliberament de dopamina. Això fa què els D2R representin la principal diana de drogues antipsicòtiques, a més d'estar implicats en diverses neuropatologies com el Parkinson, la síndrome de Tourette i l'addicció a drogues. El receptor de dopamina D2 també es localitza en els lòbuls anteriors i neurointermedis de la glàndula pituitaria, sent un dels principals receptors dopaminèrgics que regulen l'alliberament d'hormones. A la figura 10 es representa l'estructura tipus del receptor de dopamina D2. En vermell s'indiquen els aminoàcids que només estan presents en la isoforma llarga (D2-*long*) i no en la curta. (D2-*short*).

Els receptors D2 tenen un extrem C-terminal molt curt i un IC3 molt llarg, el qual sembla estar implicat en l'acoblament a la proteïna G, a més de permetre-li interaccionar amb altres proteïnes, com poden ser altres receptors amb els que pot formar complexos multi-receptor.

Ambdues isoformes del receptor D2 (D2-*long* i D2-*short*), tenen la mateixa capacitat d'unir lligand però difereixen tant en l'expressió com en la capacitat d'acoblar-se a la proteïna G. La isoforma llarga s'expressa unes 10 vegades més que la curta i existeixen evidències que indiquen què la isoforma llarga i la curta s'acoblen a diferents proteïnes G, Gi i Go respectivament, degut principalment a les seves diferències estructurals. Les proteïnes Gi i Go inhibeixen a l'adenilat ciclasa (AC), el que sembla ser la via de senyalització predominant utilitzada pels receptors D2, almenys a l'estriat.

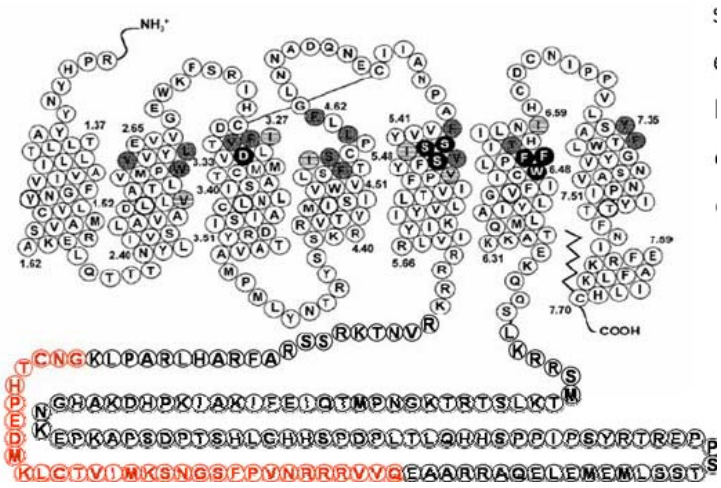


Figura 10. Estructura tipus del receptor de dopamina D2. El D2 *short* no conté els aminoàcids indicats en vermell (Malek et al., 1993)

2.4. TÈCNIQUES D'ESTUDI DELS RECEPTORS

Una de les tècniques més emprades per a l'estudi dels receptors hormonals es la d'unió de radiolligands. Aquesta tècnica es basa en la unió d'un lligand, fàrmac o hormona a la mostra que conté el receptor, sigui de membrana o soluble. Es parla de fàrmac per referir-se a les molècules sintètiques que es poden unir als receptors, a diferència de l'hormona que és natural; per englobar els dos conceptes es parla en general de lligand, com a qualsevol molècula (natural o artificial, agonista o antagonista – vegeu apartat 2.1.1 -) amb capacitat d'unir-se a un receptor. Com que els receptors es troben en concentracions molt baixes és necessari una tècnica molt sensible per detectar aquesta unió i poder-la quantificar per conèixer tant la concentració del receptor en la mostra com l'afinitat que presenta pel seu lligand. Aquesta tècnica és l'ús de la radioactivitat que dóna un gran senyal a molt baixes concentracions; per tant, utilitzant lligands marcats amb un isòtop radioactiu (radiolligands) es poden localitzar, quantificar i caracteritzar els receptors als que s'han unit. Els isòtops més àmpliament utilitzats en recerca bioquímica i farmacològica són el triti (^{3}H), el carboni-14, el fòsfor-32, el sofre-35 i el iode-125.

Les diverses tècniques d'unió de radiolligands permeten resoldre des de la localització i distribució regional de receptors mitjançant autorradiografia de talls histològics, fins a les característiques moleculars de receptors solubilizats. No obstant, el mètode mes utilitzat, tant als laboratoris l'investigació acadèmica com als laboratoris de les

indústries farmacèutiques, és la unió de radiolligands a fraccions de membrana. En l'actualitat, les tècniques d'unió de radiolligands es poden aplicar a la gran majoria dels sistemes de neurotransmisors i hormones coneguts, ja que existeixen centenars de radiolligands assequibles. En els diversos camps de la neurociència, aquestes tècniques han permès la quantificació de receptors involucrats en diversos processos fisiològics i patològics, utilitzant tant cèl·lules com teixits, inclòs cervell humà *post mortem*.

2.4.1- MÈTODE DE SEPARACIÓ ENTRE EL LLIGAND UNIT A LA MOSTRA I EL LLIGAND LLIURE

La quantificació de la unió exigeix la separació del radiolligand unit al receptor del que queda lliure en dissolució en una incubació de tots els components que intervenen en el procés (membranes, radiolligand, tampó, efectors,...). En els assaigs d'unió a membranes, els mètodes de separació comunament utilitzats són la filtració ràpida a través de filtres de fibra de vidre i la centrifugació. El principal factor limitant de la tècnica és la velocitat de dissociació del complex radiolligand-receptor. D'aquesta manera, els complexos radiolligand-receptor que es dissocien ràpidament necessiten una tècnica que minimitzi la quantitat de radiolligand dissociat. El procés de separació mitjançant filtració ràpida pot completar-se entre 5 i 10 segons. Els fragments de membrana que contenen els complexos radiolligand-receptor són retinguts pel filtre, mentre que el radiolligand lliure passa a través d'ell. Per reduir la unió inespecífica, les membranes i el filtre es renten amb tampó.

2.4.2- UNIÓ ESPECÍFICA I NO ESPECÍFICA DEL RADIOLLIGAND

Una de les consideracions més importants en qualsevol estudi que impliqui la unió de radiolligands consisteix en la determinació de la unió específica. Conceptualment, la unió específica es defineix com la veritable unió del radiolligand al receptor que interessa estudiar. Per tant, la unió no específica és la unió del radiolligand a qualsevol altra molècula o part de la mostra.

Pràcticament, la unió no específica es considera com aquella que es dóna en presència d'un excés apropiat de lligand no radioactiu (generalment una concentració 100 vegades superior al valor de IC_{50}, o en defecte 100 vegades superior a la concentració màxima de radiolligand utilitzada), que és capaç de bloquejar completament els receptors d'interès. La unió no específica inclou la unió del radiolligand a altres receptors, als filtres de fibra de vidre, així com l'absorció del teixit i la seva dissolució en els lípids de membrana.

La unió específica es calcula com la diferència entre la unió total i la unió no específica (fig. 11). Idealment, la unió no específica no ha de saturar-se al incrementar la concentració del radiolligand, sinó que ha d'augmentar linealment.

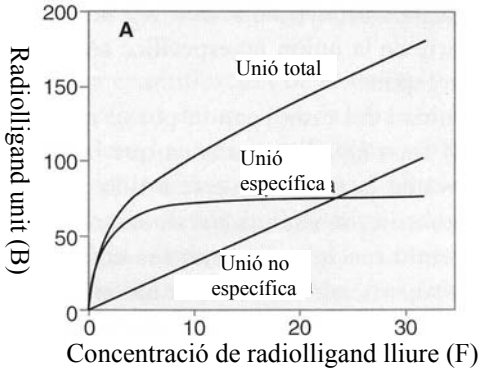


Figura 11. Corba de saturació del receptor pel radiolligand; es mostra la unió total, la unió específica i la unió no específica (Garcia-Sevilla i Pazos, 2003)

2.4.3- EXPERIMENT TÍPIC DE *BINDING*: L'ASSAIG DE COMPETICIÓ

En els experiments de saturació es determina la quantitat de radiolligand unit a la mostra problema que conté el receptor en funció de la concentració de radiolligand lliure (vegeu figura 11). Els paràmetres obtinguts d'aquests experiments són l'afinitat del radiolligand pel receptor (K_D), que és la concentració necessària de radiolligand per ocupar el 50% de receptors, i el nombre o densitat dels receptors (B_{max}), que és el valor d'unió que s'obté quan el radiolligand ocupa (satura) tots els receptors. D'aquestes definicions es dedueix que quan la K_D és petita, l'afinitat del radiolligand pel receptor és molt gran i a l'inrevés.

El problema d'aquests experiments consisteix en què el lligand ha d'estar marcat sempre amb radioactivitat. Si es tenen molts lligands per determinar la seva afinitat per un determinat receptor resulta llarg i costós marcar-los tots amb radioactivitat. Per tal de no haver de marcar-los tots amb radioactivitat es van dissenyar els experiments de *binding* coneguts com a experiments de desplaçament, competició o inhibició.

En els experiments de desplaçament el fàrmac o fàrmacs no marcats competeixen i desplacen al radiolligand dels centres d'unió del receptor i no dels llocs d'unió no específica del radiolligand a la mostra problema. En un experiment d'aquest tipus són constants en cada incubat la concentració de receptor, la concentració del radiolligand, el tampó, els efectors, la temperatura i el temps d'incubació, però varia la concentració del fàrmac o lligand competidor. Al augmentar la concentració del competidor no radiomarcat en els diferents incubats, aquest va desplaçant gradualment en cadascun d'ells al radiolligand del receptor, amb la qual cosa disminueix el radiolligand unit.

3- OBJECTIUS DEL TREBALL EXPERIMENTAL

L'**objectiu** de la investigació d'aquest treball experimental és determinar quina espècie animal és més adient per substituir al teixit humà en l'estudi del receptor de dopamina D2, l'alteració del qual és responsable de múltiples desordres neuronals en l'home, que condueixen a malalties com el Parkinson, l'esquizofrènia, l'addicció a drogues...

La **hipòtesi** que ens hem plantejat és que l'espècie animal que tingui un contingut de receptor de dopamina D2 en l'estriat cerebral (que és el lloc del sistema nerviós amb més alta densitat d'aquests receptors) més semblant a l'espècie humana i una afinitat d'aquest receptor per a la dopamina també més similar, pot ser un bon model animal d'estudi d'aquest receptor en substitució del teixit humà, de difícil obtenció i utilització per disponibilitat i motius ètics. Entre les espècies animals que hem pogut aconseguir, creiem que la que pot presentar un comportament més semblant a la humana és el porc, ja que el metabolisme del porc i l'humà són força similars en molts aspectes, així com la seva dieta omnívora.

Les **variables** que voldrem correlacionar són:

- el contingut de receptor amb la quantitat de proteïna total de la mostra en cada espècie
- la concentració de receptor en cada espècie i la seva afinitat pels lligands
- l'afinitat per agonistes i per antagonistes
- l'afinitat dels lligands pel receptor i l'espècie animal
- les característiques del receptor en cada espècie i la seva relació filogenètica (evolutiva)

Donada la baixa concentració dels receptors en les mostres biològiques la **metodologia** emprada requereix un mètode molt sensible, per això haurem d'utilitzar tècniques radioquímiques basades en la unió d'una hormona o fàrmac marcat amb radioactivitat (radiolligand) a la mostra problema de membranes d'estriat de les diferents espècies que tinguem a l'abast.

Concretament, la **tècnica** que utilitzarem serà els experiments de *binding* de competició entre un lligand no marcat (dopamina) i un radiolligand (YM-09151-2), ja que aquest radiolligand antagonista és molt més específic pel receptor D2 que la dopamina endògena. Aquesta s'uneix a tots els subtipus de receptor D, a més de a altres proteïnes com el transportador de dopamina i diversos enzims hidrolítics, de forma que si s'utilitzés radioactiva s'uniria a molts llocs mentre que si s'utilitza desplaçant l'YM només veiem quan s'uneix als receptors D2.

4- METODOLOGIA

4.1- MATERIAL

4.1.1- MATERIAL D'ESTUDI

El material d'estudi ha estat l'estriat de cervells de diferents procedències. Els cervells de lluç i tonyina els vam obtenir de la peixateria Matas i de la peixateria Savall de Cambrils. Els de cavall, conill, pollastre, porc i corder procedien recent sacrificats de l'escorxador i els vam obtenir mitjançant la Carnisseria Miquel, la Casa Borrull, la cansaladeria Red Porc i els Menuts Anna Mari, tots ells ubicats al Mercat Central de Reus. El cervell de vaca procedia de l'escorxador Carns Mercabarna de Barcelona. L'interval entre la mort de l'animal i la seva dissecció va ser de 4 a 6 hores.

Les mostres d'estriat humà les vam obtenir de l'Institut Basc de Medicina Legal (Bilbao). Les mostres corresponien a 4 individus d'entre 72 i 83 anys (2 homes i 2 dones), sense una història coneguda de desordres neurològics o psiquiàtrics detectats en el moment de l'autòpsia; l'interval entre la mort i la dissecció i congelació de l'estriat va ser entre 3 a 22 hores.

4.1.2- MATERIAL I APARELLS

- Erlenmeyers
- Vasos de precipitats
- Provetes
- Rotor 35FA
- Tubs de centrífuga
- Plaques de microvaloració de 96 pous
- Tubs de polipropilè de 3 i 5 mL
- Tubs Eppendorf de 1,5 i 0,5 mL
- Agitador de tubs vòrtex
- Gradetes
- Guants de làtex
- Caixes de porexpan amb gel
- Filtres de fibra de vidre
- Vials de centelleig
- Dosificador de líquids
- Tisores
- Bisturí
- Pinces
- Micropipetes Gilson 1000, 200 i 20
- Balança analítica
- Balança granatari de 2 braços
- pHmetre
- Polytron
- Ultracentrífuga Beckman Optima L90
- Incubadora de plaques
- Espectrofotòmetre de plaques
- Vitrina amb extracció de gasos
- Aparell de filtració Brandel Cell Harvester
- Agitador orbital
- Comptador de radioactivitat Packard 1600

4.1.3- REACTIUS

- Tris-hidroximetilaminometà
- Àcid clorhídric
- Inhibidors de proteases (IP)
- BSA (seroalbúmina bovina)
- Reactius A i B (mètode del BCA)
- [^{3}H]YM-09151-2
- YM-09151-2
- Clorur de magnesi
- Dopamina
- Líquid de centelleig Ecoscint H

4.2- PREPARACIÓ DE TAMPONS

La manipulació de la mostra problema que conté el receptor (teixit, cèl·lules...) es fa resuspenent-la en un medi líquid que generalment manté el pH fisiològic (per a què les càrregues de les proteïnes no s'alterin i la seva estructura quaternària no es modifiqui) i una quantitat de sals relativament baixa per donar una solució hipotònica, que facilitarà el trencament de les cèl·lules i dels teixits en el procés següent d'homogeneïtzació. Aquestes condicions les compleix una dissolució tampó, com és el Tris 50 mM-HCl de pH 7,4 que utilitzarem en les nostres pràctiques.

El tampó que nosaltres utilitzem és el Tris 50 mM-HCl de pH 7,4. El Tris és una molècula orgànica (tris-hidroximetilaminometà o 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, $C_4H_{11}NO_3$) que està formada per una espècie bàsica (el Tris desprotonat) i una àcida (el Tris protonat per efecte de l'HCl).

Per preparar 5 L de tampó Tris 50 mM-HCl de pH 7,4: pm (Tris)= 121,14 g

$$5\ L \times \frac{50 \cdot 10^{-3}\ mol}{1\ L} \times \frac{121{,}14\ g}{1\ mol} = 30{,}3\ g\ Tris$$

- Es pesen 30,3 g de Tris.
- Es dissolen en 1 L d'aigua desionitzada.
- S'introdueix en la dissolució l'electrode per mesurar el pH (la dissolució inicialment és bàsica).
- S'addicionen uns 200 mL d'HCl 1 M, al final gota a gota amb cura fins ajustar el pH a 7,4
- S'ajusta el volum a 5 L afegint aigua desionitzada, es barreja i es comprova el pH.

4.3- SEPARACIÓ DE L'ESTRIAT CEREBRAL

- Primer cal obtenir cervells de diferents espècies animals (cavall, vaca, pollastre, lluç, tonyina, corder, humà...).

- S'obre cada cervell per la meitat separant els dos hemisferis, i amb unes tisores s'extreu l'estriat (fig 12).

- Els estriats de cada espècie es col·loquen en un vas de precipitats envoltat de gel tan bon punt es va extraient.

- Se seca i pesa cada vas i, per diferència amb la tara, es calcula el pes d'estriat de cada espècie.

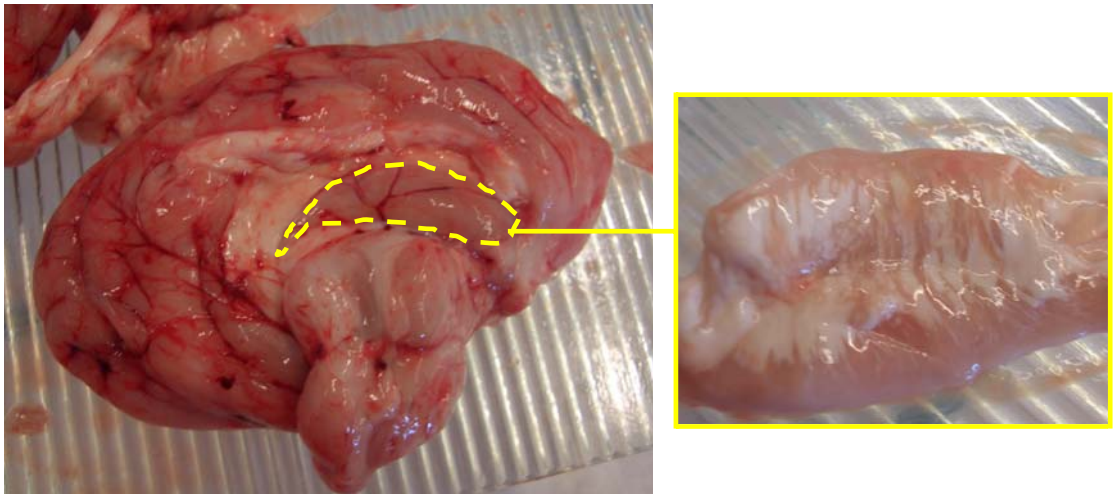


Fig 12. A l'esquerra imatge d'un cervell de porc disseccionat per la meitat amb l'estriat marcat amb puntejat. A la dreta detall de l'estriat extret.

4.4- OBTENCIÓ DE MEMBRANES D'ESTRIAT

4.4.1- HOMOGENEITZACIÓ

- Dins el vas de precipitats es talla una mica l'estriat amb les tisores.

- En un erlenmeyer s'afegeix l'estriar, el tampó Tris-HCl (en una porció x 10 mL respecte el pes en grams de teixit) i el còcktail d'inhibidors de proteases IP (en proporció 1/1000 respecte el volum total).

1g estriat a 10 mL amb Tris 50 mM-HCl pH 7,4

n grams estriat x 10 = a mL totals

a mL – n grams = mL Tris a addicionar

a mL totals/1000= b mL IP

- S'homogenitza amb un Polytron. Aquest és un homogeneitzador de teixits mecànic fort, que per una recirculació de la suspensió del teixit a alta velocitat provoca un fregament intens de la mostra que trenca les membranes plasmàtiques de les cèl·lules i també les membranes dels orgànuls subcèl·lulars. La ruptura d'orgànuls com els lisosomes que alliberen grans quantitats de proteases fan necessari la utilització d'inhibidors d'aquestes per evitar la degradació de les proteïnes de la mostra. Es realitzen les homogeneitzacions 3 impulsos a velocitat 5 (unes 12000 rpm) durant 5 segons, descansant entre cada impuls de 5 a 10 segons. Sempre s'ha de tenir la mostra en gel per evitar el seu escalfament i la desnaturalització de les proteïnes (vegeu figura 13).

Fig. 13. Procés de la homogeneització amb el Polytron

4.4.2- CENTRIFUGACIÓ

La centrifugació en un medi de densitat homogènica (en el nostre cas Tris 50 mM-HCl pH 7.4 de densitat ≈ 1,0 g/L) s'anomena centrifugació diferencial i permet separar les partícules en suspensió segons la seva grandària, de forma que les partícules grans sedimenten abans (a baixa força centrífuga, o sigui gravetats, i amb menys temps), mentre que les partícules més petites necessiten més força centrífuga i més temps. Centrifugant a altes forces centrífugues (ultracentrifugant) podem, en un temps relativament curt 30-60 minuts, sedimentar totes les membranes cel·lulars i separar-les del citoplasma que queda en suspensió:

- Es col·loca la mostra homogeneïtzada en tubs amb uns 40 mL cadascun.

- Abans de col·locar-los dins de la ultracentrífuga, cal assegurar-se que cada un dels 2 tubs oposats pesa exactament el mateix. Cal ajustar el seu pes amb tub, tap i mostra (vegeu figura 14).

Fig. 14. A l'esquerra les mostres d'estriat en els tubs de 40 mL en gel; a la dreta l'ajustament dels pesos 2 a 2.

- Es tapen els tubs, es col·loquen al rotor 35FA i aquest s'encaixa dins la ultracentrífuga Beckman Optima L90. Es posa en funcionament a 30.000 rpm, 4 ºC, durant 40 minuts, fent el buit per evitar que el fregament de l'aire amb el rotor que volta a gran velocitat escalfi les mostres, tot i l'acció del refrigerador. Les mostres dins del rotor pateixen un moviment circular uniforme, amb una velocitat angular constant de 30000 rpm i un radi de rotació de 10,4 cm (vegeu figura 15).

Força centrífuga:

$F_c = m \cdot a_n = m \cdot v^2 / r = m \cdot \omega^2 \cdot r$

Força de gravetat

$F_g = m \cdot g$

Força centrífuga relativa (nº de gravetats):

$$FCR = \frac{F_c}{F_g} = \frac{m \cdot \omega^2 \cdot r}{m \cdot g} = \frac{\omega^2 \cdot r}{g}$$

com:

$$\frac{\text{voltes}}{\text{min}} \times \frac{2\pi \text{ rad}}{1 \text{ volta}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} = \frac{\text{rpm} \cdot \pi}{30} \text{ rad/s} = \omega$$

$$FCR = (\pi \text{ rpm} / 30)^2 \cdot r / 980$$

$$\boxed{\text{nº g} = 1{,}119 \cdot 10^{-5} \text{ rpm}^2 \cdot r}$$

- Quan acaba el procés es desfà el buit i s'extreuen els tubs del rotor.

- A l'extreure'ls es veu com ha quedat separat el citoplasma (a dalt) de les membranes (sedimentades a baix) (vegeu figura 16). Es retira el citoplasma (líquid) per decantació i les membranes es barregen amb un volum de tampó similar a l'inicial.

Fig. 16. Separació de membrana i citoplasma

Fig. 15. A l'esquerra els tubs tapats dins el rotor, a la dreta la centrífuga on girarà el rotor amb les mostres.

- S'homogenitza la mostra novament . (2 cops durant 5 segons)

- Se centrifuga a 30.000 rpm a 4 ºC durant 40 minuts.

- Es torna a retirar el líquid sobrenedant (rentat de les membranes) i es tanca el tub amb parafilm per congelar-lo a 30ºC fins a la seva utilització.

4.5- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL

- Abans de realitzar la determinació del contingut de receptor en cada mostra d'estriat, es descongela una quantitat suficient d'aquest. Aquesta quantitat ha de ser suficient per obtenir uns 10 mg de proteïna total de membrana, que és la que emprarem en l'experiment de determinació del receptor. El càlcul es fa d'acord amb la relació:

1g de residu d'estriat → ± 40 mg de proteïna total
x g residu → ± 10 mg de proteïna
x= 0,25g

- S'agafa un tros d'estriat congelat i ràpidament es pesa la quantitat necessària per l'experiment guardant la resta altre cop al congelador.

- Se separen en sengles tubs uns 0,25g de membranes d'estriat de cada animal, que es conserven sempre sobre gel.

- S'afegeixen uns 7 mL de tampó Tris i es resuspenen les membranes al Polytron 2x5'', velocitat 3 i s'ajusta el volum de cada mostra amb una proveta, addicionant Tris fins a tenir 8 mL totals.

- Se separen en un tub Eppendorf de 500 µL uns 60 µL de cada mostra homogeineïtzada per fer la determinació exacta del contingut de proteïna total.

- Es preparen 7 dissolucions patró de proteïna (BSA: seroalbúmina bovina) amb aigua desionitzada, essent la més concentrada la de 2000 µg/mL i fent dilucions a partir d'aquesta també amb aigua.

- La dissolució mare de 2000 µg/mL es prepara dissolent 20 mg de BSA en un volum final de 10 mL amb aigua desionitzada.

[BSA] µg/mL	µL dissolució mare	volum final (µL)
2000	1000	1000
1500	750	1000
1000	500	1000
750	375	1000
500	250	1000
250	125	1000
125	62,5	1000

- Dins una placa de microvaloració de 96 pous (vegeu figura 17) es col·loquen per triplicat, a cada un dels pous 10 µL de la mostra (membranes d'estriat), del blanc (aigua o Tris) o de les dissolucions patró i 200 µL del reactiu A+B com s'indica a continuació:

H_2O							Tris			Tonyina
125 (patró)							Corder			Lluç
250 (")							Cavall			
500 (")							Porc			
750 (")							Conill			
1000 (")							Humà			
1500 (")							Vaca			
2000 (")							Pollastre			

Preparació del reactiu A+B:

- 18 mostres x 3 rèpliques = 54 pous x 0'2 mL A+B = 10'8 mL A+B
- Cal fer uns 12 mL de reactiu A+B en la proporció: 50A +1B en volum, per tant farem 12,5 mL de A + 0,25 mL de B

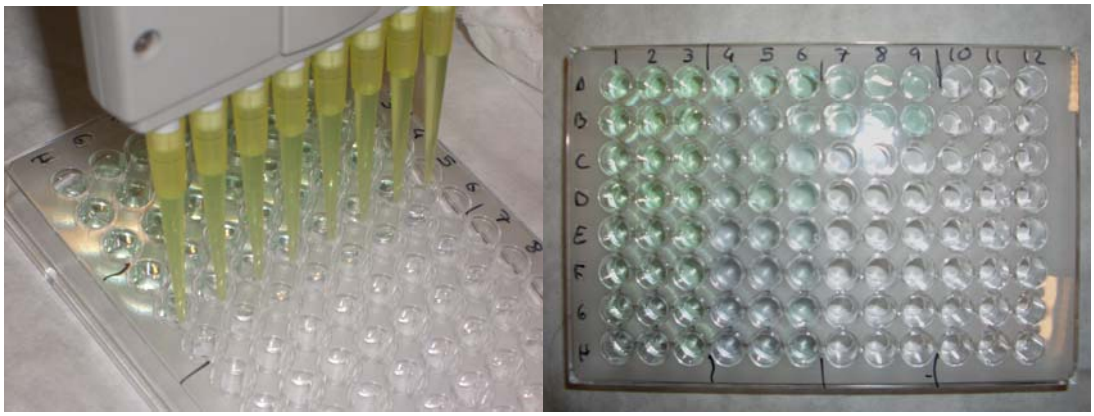


Fig. 17. A l'esquerra col·locant les mostres a la placa amb una micropipeta de 8 puntes; a la dreta, la placa amb tots els reactius

- Es col·loca la placa en una incubadora durant 30 minuts a 37ºC per desenvolupar la reacció colorimètrica quantitativa amb la proteïna problema típica d'aquest mètode, conegut com a BCA o àcid bicinconínic (vegeu figura 18).

Fig. 18. A l'esquerra la incubadora de plaques; a la dreta, la placa un cop ha sortit de la incubadora amb el color desenvolupat

- Es llegeix l'absorbància a l'espectrofotòmetre amb una llum de 550 nm de longitud d'ona (llum visible) i es guarden les dades en un disquet (format .xls) (vegeu figura 19).

Fig. 19. Espectrofotòmetre de plaques

- A partir de les dades d'absorbància i la concentració de les mostres patró de proteïna s'ha de construir la corba patró, en la qual s'han d'interpol·lar les dades d'absorbància de les mostres problema per calcular la seva concentració de proteïna. Cal tenir en compte que a l'absorbància de cada mostra s'ha de restar l'absorbància del seu blanc.

- Un cop coneguda la concentració de les mostres problema d'estriat se sedimenten per centrifugació novament i es resuspenen en el volum de tampó Tris necessari per a què donin totes una concentració final de 2 mg/mL de proteïna total.

4.6- ELABORACIÓ DE LA TAULA DE COMPOSICIÓ DELS INCUBATS D'UN ASSAIG DE COMPETICIÓ

- Cal dissenyar la taula d'incubats amb tots els components que inclouran:

  - Mostra biològica amb el receptor hormonal (estriat de diferents espècies); cal conèixer la seva concentració total de proteïna. La concentració final serà de 0'5 mg/mL de proteïna

  - Radiolligand tritiat (calent): [^{3}H] YM-09151-2, antagonista del receptor de dopamina D2. La seva concentració serà de 2 nM.

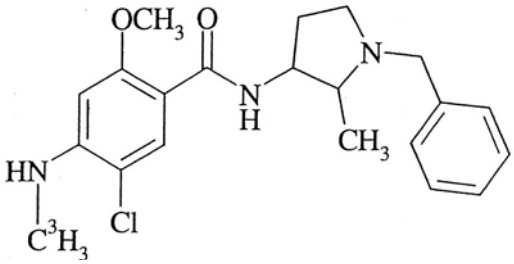


Fig. 20: Estructura del radiolligand [^{3}H]YM-09151-2 (Perkin Elmer)

- Tampó de pH i força iònica determinats: Tris 50 mM-HCl pH 7,4.

- Competidors del radiolligand : dopamina o YM-09151-2, sense radiomarcar (freds)

- Moduladors diversos: Mg^{+2} a una concentració final de 10 nM.

- El volum total de cada incubat ha de ser de 1750 µL ja que es faran 3 rèpliques de filtració de 500 µL.

- Es faran experiments del tipus desplaçament o competició, amb 8 concentracions diferents de desplaçant, per a la determinació de les característiques farmacològiques dels receptors de dopamina D2 en les 9 diferents mostres d'estriat.

- La composició i els volums de cada incubat apareixen en la taula III de Resultats.

4.7- PREPARACIÓ D'INCUBATS

- S'agafen 9x8 tubs de polipropilè de 3mL i es retolen amb la concentració del competidor i el nom de cada espècie (vegeu figura 21).

- Es preparen les dissolucions mare necessàries, agitant-les sempre abans d'addicionar-les, especialment si són suspensions (membranes) o s'han descongelat (vegeu figura 22).

- S'addicionen els reactius en el següent ordre: tampó, efectors (Mg^{+2}), competidors (freds) i s'agita l'incubat amb suavitat.

- Es traslladen els incubats a gradetes radioactives a la vitrina radioactiva i es manipulen sempre amb guants i micropipetes també radioactives.

- S'agafa la dissolució comercial de radiolligand conservada a -20ºC i en la vitrina radioactiva es prepara la seva dilució en un Eppendorf.

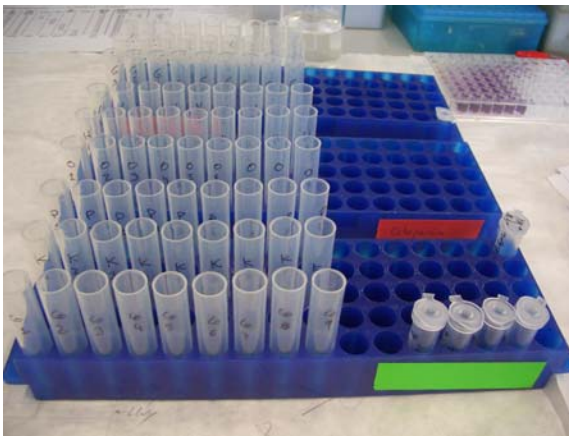


Fig. 21. Tubs de polipropilè retolats

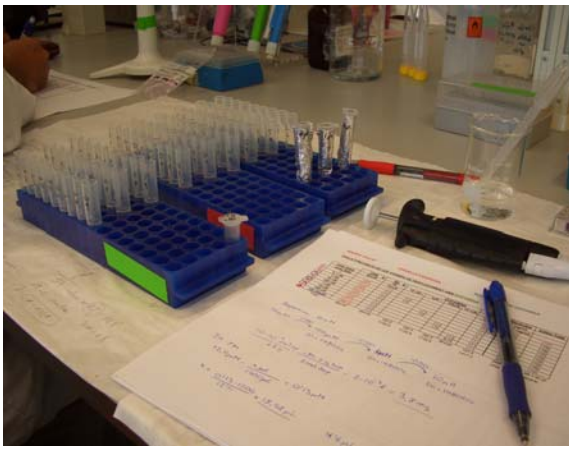


Fig. 22. Taula d'incubats a la dreta i mostres i reactius a l'esquerra.

- S'addiciona el radiolligand# i s'agita suaument (vegeu figura 23).

Fig.23. A l'esquerra preparant la dissolució mare de radiolligand. A la dreta, addicionant el radiolligand als incubats

- S'addiciona la membrana# d'estriat, es tapa el tub de l'incubat amb seguretat i s'agita vigorosament (cada 3 addicions de membrana es tapa i s'homogeneïtza la mateixa per inversió ja que és una suspensió i tendeix a sedimentar).

Canviar la punta de micropipeta cada cop que es pugui contaminar l'incubat següent per l'anterior.

- Es deixen els incubats a T ambient (25ºC) el temps& necessari per arribar a l'equilibri, amb 1-2 agitacions ocasionals, tapats amb paper d'alumini donat que el radiolligand i la dopamina són fotosensibles.

& El temps depèn de la concentració del lligand i de les constants cinètiques: per 1-2 nM es ±2 h.

4.8- FILTRACIÓ

Consisteix en separar el radiolligand unit (RL*) a la mostra problema (R) del radiolligand lliure (L*) en equilibri amb aquell:

$$R + L^* \rightleftharpoons RL^*$$ (cal separar RL* de L* ja que totes dos són especies radioactives)

- Es prepara una caixa de porexpan amb gel i s'inserten tubs de polipropilè (PP) de 5 mL (vegeu figura 24).

Fig. 24. Caixa de porexpan amb gel i els tubs de PP

- S'agita vigorosament cada incubat i se separen 3 aliquotes d'incubat de 500 µL.

- Cada 12 tubs preparats es poden filtrar de cop a l'aparell *Brandel Cell Harvester* equipat amb una tira de filtre de fibra de vidre.

- Es posa la bomba del harvester en marxa i es comprova que la botella de residus és buida.

- Es deixa la palanca de succió en OFF (tancat) i es col·loca una tira de filtre centrada sobre els 12 cercles de succió.

- Es tanca el sistema amb la tira dins.

- Es col·loca les 12 sondes de succió dins dels corresponents tubs. Es posa la palanca de succió en "*harvest*", deixant que absorbeixi les mostres i es filtrin (figura 25).

- Un cop ha absorbit la mostra, es col·loca a cada tub amb un dispensador uns 5 mL de tampó Tris per netejar-lo i arrossegar totes les gotes d'incubat i rentar també el filtre de l'excés d'incubat (figura 26).

Fig. 25. Succionant les mostres per filtrar-les

Fig. 26. Rentant amb el tampó Tis

- Es deixa passar aire durant 1-2 minuts per a què s'assequin els filtres.

- Es posa la palanca de succió en OFF i s'obre el sistema (figura 27).

- Al treure la tira cal tenir cura de l'ordre del filtre per conèixer la mostra que correspon a cadascun (figura 28).

Fig. 27: Tira de filtre de fibra de vidre un cop filtrats els incubats

Fig. 28. Extraient el filtre de l'aparell

4.9- COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT

4.9.1- VIALS I LÍQUID DE CENTELLEIG

- Es deixa la tira de filtre sobre un paper net a la taula de vials.

Prèviament s'hauran omplert els vials amb 10 mL de líquid de centelleig# amb un dispensador (vegeu figura 29).

Aquest líquid transforma l'energia dels electrons (de l'emissió β del 3H, 14C, 35S, 32P, o del electrons fotoelèctrics fruit de la interacció d'un emissor γ com el 125I) en llum.

- Cal preparar: vials=nº inc.(repli.+1) i retolar només als taps.

- Amb unes pinces primes cal separar cada cercle de filtració de la resta de la tira agafant per la zona que pressionen les juntes de goma de l'aparell de filtració i que maquen el filtre (vegeu figura 30).

Amb la cara superior sempre amunt, s'introdueix el filtre dins el vial** (vegeu figura 31).

Fig. 29. Omplint els vials amb el líquid de centelleig

** Compte!! El vial té una boca de menys diàmetre que el filtre.

Fig. 30. Traient els cercles de filtració.

Fig. 31. Col·locant els cercles de filtre dins els vials

- Es tanca el vial amb el tap i se sacseja fins observar que el filtre neda lliurement al líquid; cal un íntim contacte entre el líquid i el filtre ja que el primer conté un dissolvent orgànic molt apolar i el filtre amb la mostra biològica conté tampó polar. Un detergent contingut al líquid facilita aquest contacte.

- Per conèixer la concentració exacta de radiolligand a cada incubat, al final s'introdueixen en sengles vials 100 µL de l'incubat que ha quedat a cada tub.

4.9.2- COMPTADOR DE RADIOACTIVITAT

- Els vials es deixen a les fosques i en agitació tota la nit a l'agitador orbital de la instal·lació radioactiva (IR) com es veu a la figura 32.
- Es col·loquen els vials que han estat en agitació, ordenadament, als racks del comptador de centelleig líquid Packard 1600 de la IR (vegeu figura 33).

Fig. 32. Agitador orbital de la IR

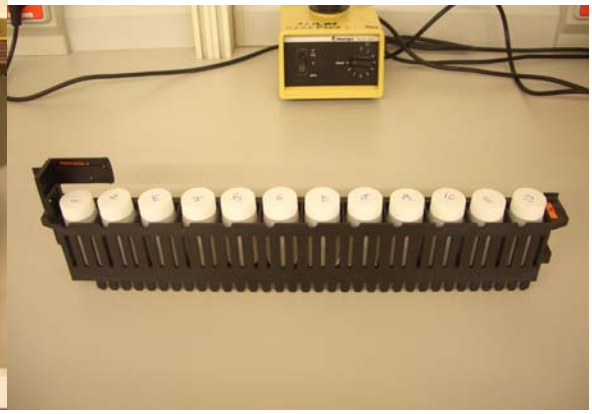


Fig. 33. Els 12 vials en un rack

- Cada rack admet 12 vials: la posició 1 del comptatge del 1r rack ha de portar inserida una bandereta indicant el nº de protocol de comptatge (la xapeta cap a enfora indica protocol per comptar i cap a endins indica comptat) (vegeu figura 34). La posició 12 es troba al costat que porta el nº de rack sobre fons taronja.

Figura 34: Detall de la bandereta amb el nº de protocol

- Es deixen els racks plens de vials al carril dret del comptador, davant el primer, darrere el segon,... Amb la posició 1 a l'esquerra i la 12 a la dreta. Si ja hi ha vials comptant caldrà deixar-los a cua tot tenint en compte que els racks avancen sempre en sentit contrari a les agulles del rellotge, en cercle sense fi fins que tots han estat comptats (si no prémer F2 Start) (vegeu figura 35).

- Es poden modificar les condicions de comptatge del nostre protocol, bàsicament:
    - temps de comptatge/vial (norm. 5 min)
    - factor divisor per transformar dpm a pmol
    - mg prot/vial per donar les dades en pmol/mg prot

Fig. 35. Comptador de radioactivitat

4.10- NETEJA, RESIDUS I ORDRE

- En acabar totes les filtracions, cal netejar el *Harvester* succionant amb la sonda aigua destil·lada.
- S'obren les 4 tanques del sistema i es deixa la palanca en "*Harvest*" abans de tancar la bomba de buit. L'extractor de la vitrina es deixa sempre en marxa per eliminar del laboratori possibles vapors d'aigua tritiada.
- Es buida la botella de residus de filtració en una garrafa de residus que s'haurà de portar a la IR (Instal·lació Radioactiva de la Facultat). Les restes d'incubats s'han d'abocar també en aquesta garrafa i netejar els tubs d'incubats amb 2 mL d'aigua.
- Aquests tubs d'incubats, tubs de filtrar, puntes de micropipeta,...es deixen a la pica circulant aigua 24-48 h (dilució infinita).
- Cal netejar el dispensador de rentar els filtres dosificant aigua destil·lada.
- Cal endreçar tot el material als seus armaris.
- S'ha de buidar el líquid de les caixes de vials ja comptats i analitzats a la IR (al bidó de líquid orgànic) i netejar els vials oberts i els taps en un bany d'ultrasons segons instruccions de la IR. Finalment es llencen els vials i els taps al contenidor corresponent de la IR.

4.11- ANÀLISI DE LES DADES DE *BINDING*

Per l'anàlisi de dades dels experiments de *binding* hem emprat un programa d'ajust de dades experimentals a una corba (programa de regressió no lineal). La corba a la que s'ajusten les dades segueix una expressió matemàtica determinada i triada per l'usuari segons el tipus d'experiment. El programa determina els paràmetres de la funció matemàtica elegida que fan que la corba passi el millor possible per tots els punts

experimentals.

Els punts experimentals són parelles de valors (*x*,*y*) que han de complir la funció. En el cas d'un experiment de *binding* de competició o desplaçament del radiolligand unit a la mostra problema, l'abscissa és la concentració de competidor, generalment en unitats logarítmiques de la concentració de competidor fred en molar (log [C] en M). L'ordenada és la unió de radiolligand a la mostra problema, referida a la quantitat de proteïna de la mostra (pmol/mg prot); aquesta és la unió total del radiolligand, tant la unió específica al receptor que es determina (en el nostre cas el receptor de dopamina D2) com la unió inespecífica a altres components de la mostra (unió molt poc afí) (vegeu apartats 2.4.2 i 2.4.3 del Marc teòric).

Els valors (*x*,*y*) els determinem experimentalment i el programa d'ajust de les dades ens donarà els paràmetres de la funció matemàtica que millor relacionen la *x* amb la *y*. Per donar més fiabilitat a les dades experimentals, per a cada *x* hem determinat 3 cops el valor de *y*, es a dir, hem fet triplicats. Els triplicats s'introdueixen en el programa com 3 dades experimentals o parelles (*x*,*y*) independents, així el programa ajusta més dades i els resultats obtinguts són més fiables; a més, el programa pot detectar els punts individuals que es desvien apreciablement de la resta i, per tant, de la funció matemàtica que s'està buscant, i els hi dona menys o cap importància (menys pes) en el càlcul final, informació que es perd si es fan mitjanes de les rèpliques.

Es pot utilitzar qualsevol programa de regressió no lineal, sempre que contingui les expressions matemàtiques que segueixen aquest tipus d'experiments o es puguin introduir manualment per l'usuari. També ha de permetre fer les representacions gràfiques corresponents, tant de les dades experimentals com de la funció matemàtica trobada. El programa que hem utilitzat és el *software* GraFit (*Data Analysis and Graphics Program*) d'Erithacus Software Ltd. (UK) l'autor del qual és R.J. Leatherbarrow.

Generalment en aquests experiments s'utilitza com a radiolligand un antagonista (en el nostre treball el [3H]YM-09151-2) que, ja que reconeix un únic estat d'afinitat del receptor al que s'uneix i generalment ho fa amb bona afinitat, acaba marcant a una bona part de tots els receptors de la mostra problema, fins i tot el ≈100% si s'utilitza una concentració gairebé saturant (diversos cops superior a la seva afinitat K_D) del radiolligand.

Quan s'utilitza un antagonista també per desplaçar, com és el nostre cas amb l'YM-09151-2, s'obté un únic desplaçament ja que aquest detecta i s'uneix a tota la població de receptors amb la mateixa afinitat. La funció introduïda al programa per ajustar les dades experimentals d'un assaig de desplaçament és:

$$y = B_{oesp} * (IC_{50} / (10^{C}+IC_{50})) + Bi$$

on B_{oesp} és la unió específica inicial del radiolligand, en absència de competidor fred, IC_{50} és la concentració de competidor que desplaça el 50% de la unió inicial (B_{oesp}), C és el logaritme de la concentració de competidor (en M) i B_i és la unió inespecífica del radiolligand constant i que no es desplaça pel competidor). Cal comentar que en aquesta funció C és la variable independent o *x*.

Per contra, quan s'utilitza un agonista (en el nostre cas la dopamina) per desplaçar l'antagonista radioactiu, se sol obtenir un desplaçament amb dos salts, ja que els agonistes sovint distingeixen entre els receptors GPCR units efectivament a una proteïna G i els que no es troben units. Els acoblats a proteïna G uneixen amb més afinitat als agonistes i els desacoblats amb menys. Per aquest motiu els experiments de desplaçament amb agonistes s'ajusten millor a funcions com:

$$y = B_{oesp1} * (IC_{50}1 / (10^{C}+IC_{50}1)) + B_{oesp2} * (IC_{50}2 / (10^{C}+IC_{50}2)) + Bi$$

on són la unió específica inicial del radiolligand a la població 1 de receptor (per exemple receptor-proteïna G) i a la 2 (per exemple receptor sol), respectivament, i $IC_{50}1$ i $IC_{50}2$ són les concentracions de competidor que desplacen el 50% de la unió inicial B_{oesp1} i B_{oesp2}, respectivament. Aquests valors d'IC_{50} estan relacionats amb les constants reals d'afinitat K_{D1} i K_{D2} que correspondrien a l'afinitat de l'agonista pels receptors acoblats (alta afinitat, baixa K_D) i pels desacoblats (baixa afinitat, alta K_D), respectivament, segons:

$$K_{D1} = IC_{50}1 / (1+(L^{*}/K_D^{*}))$$

on L^{*} és la concentració del radiolligand emprat i K_D^{*} la seva afinitat.

També a partir de les dades d'unió específica B_{oesp} es pot calcular la quantitat total de receptor present a la mostra problema B_{max} segons:

$$B_{max} = B_{oesp} * (K_D + L^{*}) / L^{*}$$

5- RESULTATS

5.1- SEPARACIÓ DE L'ESTRIAT CEREBRAL

Mostra	Nº cervells	pes del vas (g)	pes vas+ estriat (g)	pes estriat (g)	mL Tris 50 mM-HCl	µL IP
Corder	4	29,3	46,4	17'1	154	171
Porc	4	49,1	66,6	17,5	157,5	175
Cavall	1	29,3	47,4	18,1	163	181
Conill	2	32,4	33,1	0'7	6,3	7
Pollastre	4	52,7	54,2	1,5	13,5	15
Tonyina	2	56,9	62,2	5,3	47,7	53
Lluç	2	37,5	37,8	0,3	2,7	3
Humà	2	32,4	40,6	8,2	73,8	82
Vaca	2	37,5	49,8	12,3	110,7	123

1g estriat a 10 mL amb Tris 50 mM-HCl pH 7,4

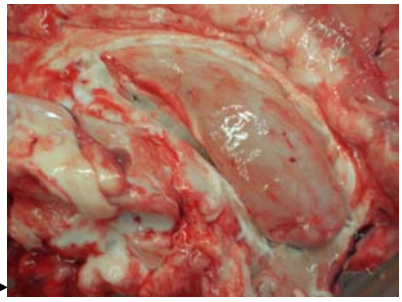
n grams estriat ·10 = x mL totals

x mL – n grams = mL Tris a addicionar

x mL totals/1000= y mL IP

Un exemple del procés de separació de l'estriat s'observa en les següents imatges obtingudes amb cervell de cavall:

Pas 1: Obtenció del cervell



Pas 2: Separació dels 2 hemisferis per visualitzar l'estriat

Pas 3: Aïllament de l'estriat

Pas 4: Secció de l'estriat

Pas 5: Conservació en fred per pesar-los

Altres fotografies de cervells obtinguts són:

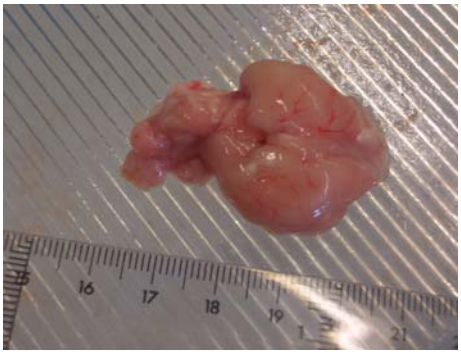


Fig. 36. Cervell de conill

Fig. 37. Cap de conill

Fig. 38. Cervell de pollastre

Fig. 39. Cervell de lluç

5.2- OBTENCIÓ DE MEMBRANES D'ESTRIAT

Un cop pesades les mostres de les 9 espècies que apareixen a la taula anterior, vam procedir a la homogeneïtzació dels teixits segons la metodologia explicada a l'apartat 4.4.1. Tot seguit vam efectuar la seva centrifugació per obtenir les membranes cel·lulars i separar-les del material soluble cel·lular que inclou totes les proteïnes citoplasmàtiques. La centrifugació i el rentat de les membranes resultants els vam realitzar seguint els pasos explicats a l'apartat 4.4.2. El resultat de la primera centrifugació s'observa a la figura 40:

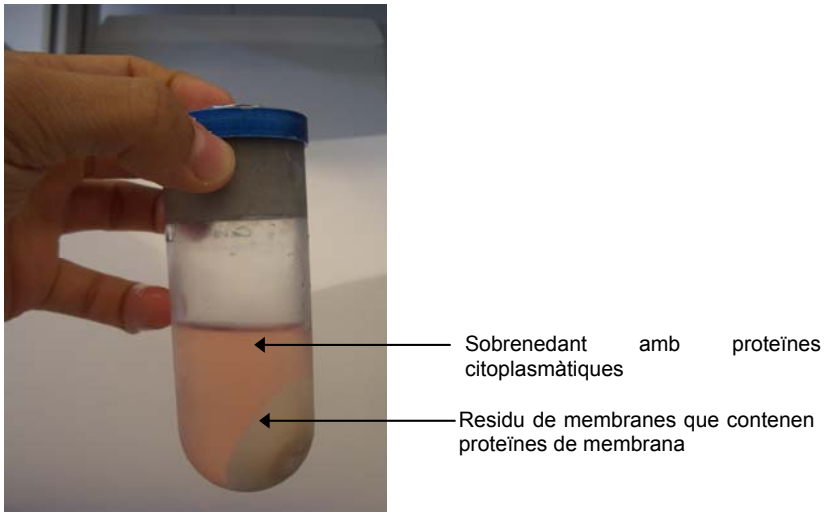


Figura 40: Tub d'ultracentrífuga desprès de sedimentar l'homogeneïtzat d'estriat

Amb el rotor utilitzat (35FA de Beckman) que té un radi de 10,4 cm i centrifugant a una velocitat angular de 30.000 rpm, la força centrífuga que pateixen les mostres en aquest procés expressada en nombre de vegades la gravetat la podem obtenir emprant la fòrmula ja vista a l'apartat 4.4.2:

$$\boxed{\text{nº g} = 1{,}119 \cdot 10^{-5}\ \text{rpm}^2 \cdot r} \quad (r = \text{cm})$$

$$\text{nº g} = 1{,}119 \cdot 10^{-5} \cdot 30.000^2 \cdot 10{,}4 = 105.000 \text{ gravetats}$$

5.3- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL

Tal com hem explicat a l'apartat 4.5 de Metodologia, per la determinació del contingut de receptor en cada mostra d'estriat, necessitàvem uns 10 mg de proteïna total de membrana. Amb el càlcul abans indicat era necessari pesar 0,25 g de residu de membranes congelades de cada estriat.

Els pesos realment processats de cada mostra són els que apareixen a continuació:

Mostra	Nom	grams de mostra
Corder	Co	0,257
Cavall	K	0,244
Porc	P	0,254
Conill	O	0,251
Humà	H	0,242
Vaca	V	0,247
Pollastre	G	0,260
Tonyina	T	±0,25
Lluç	L	±0,2

Un cop descongelades i resuspeses amb el Polytron, vam efectuar la determinació del contingut total de proteïna en cada mostra, blancs (aigua i tampó Tris) i corba patró d'albúmina (BSA) seguint el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA), tal com es detalla a l'apartat 4.5 de Metodologia.

Els resultats obtinguts van ser els que es mostren a la placa de la figura 41; la disposició de cada mostra en la placa es va fer segons l'esquema presentat a l'apartat 4.5 de Metodologia. Els valors de la mesura d'absorbància de cada mostra i els càlculs efectuats amb aquests valors apareixen al full de càlcul d'Excel: taula II. Amb els valors de concentració de proteïna i d'increment d'absorbància de les mostres patró vam construir la gràfica i vam ajustar els punts experimentals obtinguts a una expressió matemàtica curvilínia arbitrària emprant el programa GraFit. Aquest gràfic apareix a la figura 42. El valor d'absorbància de les mostres problema (proteïna dels estriats) menys el valor del seu blanc (tampó Tris) el vam interpolar en la corba patró traslladant les dades del full de càlcul al programa GraFit. Les interpolacions obtingudes amb aquest programa les vam tornar a exportar al full de càlcul on, amb els factors corresponents vam obtenir la quantitat total de proteïna de cada mostra d'estriat (vegeu full de càlcul Excel: taula II).

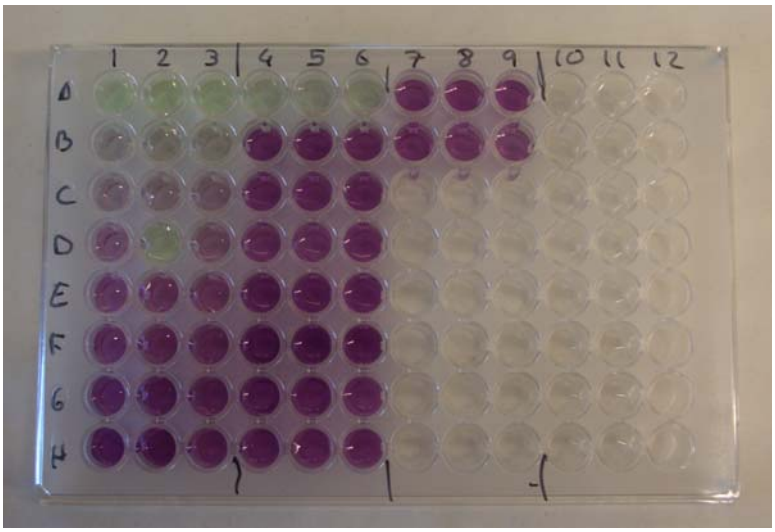


Figura 41. Placa amb les mostres colorejades després de l'assaig del BCA.

Un cop coneguda la quantitat total de proteïna en cada mostra d'estriat, vam poder calcular el volum de tampó Tris necessari per resuspendre cadascuna per a què donessin totes una concentració final de 2 mg/mL de proteïna total; aquesta és la concentració adient que han de tenir les mostres per realitzar l'assaig de determinació de receptor amb radiolligands (*binding*).

Els resultats de la determinació de la proteïna de les mostres emprades en el segon experiment de binding (desplaçament de [^{3}H]YM-09151-2 per YM-09151-2, 09/08/2007) apareixen als fulls següents on es mostren les lectures directes d'absorbància, els càlculs fets amb les dades de la proteïna patró, la corba patró i l'equació que segueix obtingudes amb el programa d'ajust GraFit, així com els càlculs amb les mostres problema.

Els resultats de la determinació de la proteïna de les mostres emprades en el primer experiment de binding (desplaçament de [^{3}H]YM-09151-2 per dopamina, 18/07/2007) es calculen de forma similar.

TAULA II. FULLS DE CÀLCUL PER LA DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA

Lectura de la placa 2: Filtre: 550 nm 09/08/2007

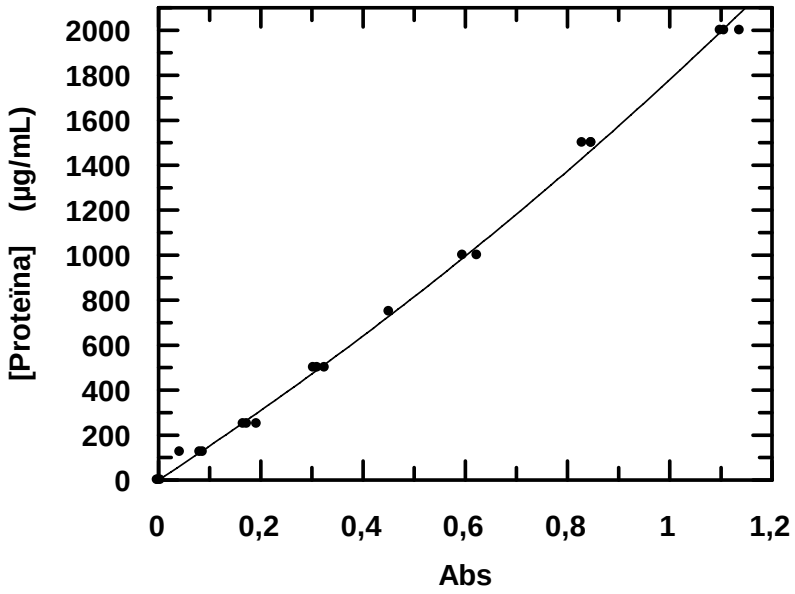
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,086	0,093	0,088	0,111	0,108	0,104	0,391	0,372	0,363			
B	0,131	0,170	0,176	0,711	0,706	0,681						
C	0,255	0,281	0,262	0,663	0,611	0,619						
D	0,414	0,401	0,393	0,680	0,684	0,695						
E	0,540	-	-	0,805	0,831	0,833						
F	0,684	0,712	-	0,618	0,665	0,642						
G	0,936	0,936	0,919	0,728	0,734	0,711						
H	1,226	1,188	1,196	0,751	0,724	0,745						

CORBA PATRÓ

µg prot/mL	abs.1	abs.2	abs.3	mitj. Abs	Δ abs.1	Δ abs.2	Δ abs.3	mitj. Δ abs	SD Δ abs
0	0,086	0,093	0,088	0,089	-0,003	0,004	-0,001	0,000	0,003689625
125	0,131	0,170	0,176	0,159	0,042	0,081	0,087	0,070	0,024494149
250	0,255	0,281	0,262	0,266	0,166	0,192	0,173	0,177	0,013271398
500	0,414	0,401	0,393	0,402	0,325	0,311	0,303	0,313	0,01097406
750	0,540	-	-	0,540	0,451	-	-	0,451	0
1000	0,684	0,712	-	0,698	0,595	0,623	-	0,609	0,019516147
1500	0,936	0,936	0,919	0,930	0,847	0,847	0,829	0,841	0,010165792
2000	1,226	1,188	1,196	1,203	1,137	1,099	1,107	1,114	0,019843723

Les dades de la corba patró es van ajustar amb el programa GraFit a l'equació que s'observa dalt que és: $y = a \cdot (e^{bx}-1)$

amb y = [proteïna] i x = ΔAbs



Proteina
Simple weighting
Reduced Chi squared = 1144

Variable	Value	Std. Err.
a	4,4265e+003	2,1399e+002
b	3,3817e-001	1,4389e-002

Fig. 42. Corba patró de BSA per la determinació de proteïna pel mètode del BCA

TAULA II cont. FULLS DE CÀLCUL PER LA DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA

MOSTRES PROBLEMA										**VALOR INTERPOLAT**			**VOLUM RESUSP. FINAL (mL)**
espècie	abs.1	abs.2	abs.3	mitj. Abs	Δ abs.1	Δ abs.2	Δ abs.3	mitj. abs	Δ SD abs	**µg prot/mL prot mostres**	volum	proteïna total	
tris	0,111	0,108	0,104	0,108	0,003	0,001	-0,004	0,000	0,00338		mL	mg	**2 mg/mL**
corder	0,711	0,706	0,681	0,699	0,603	0,598	0,573	0,592	0,01596	**981**	7,94	7,79	**3,9**
cavall	0,663	0,611	0,619	0,631	0,555	0,503	0,511	0,523	0,02786	**856**	7,94	6,80	**3,4**
porc	0,680	0,684	0,695	0,686	0,572	0,576	0,587	0,578	0,00744	**956**	7,94	7,59	**3,8**
conill	0,805	0,831	0,833	0,823	0,697	0,723	0,726	0,715	0,01593	**1211**	7,94	9,61	**4,8**
humà	0,618	0,665	0,642	0,642	0,510	0,557	0,535	0,534	0,02326	**876**	15,88	13,91	**7,0**
vaca	0,728	0,734	0,711	0,725	0,620	0,626	0,604	0,617	0,0118	**1027**	7,94	8,15	**4,1**
pollastre	0,751	0,724	0,745	0,740	0,643	0,616	0,637	0,632	0,01445	**1055**	7,94	8,37	**4,2**
tonyina	0,391	0,372	0,363	0,375	0,283	0,264	0,255	0,267	0,01414	**418**	7,94	3,32	**1,7**

5.4- ASSAIG DE DESPLAÇAMENT O COMPETICIÓ DEL [^{3}H]YM-09151-2 PER LA DOPAMINA

5.4.1- PREPARACIÓ DELS INCUBATS

Amb les mostres d'estriat de les 9 espècies de què disposàvem, i coneguda ja la concentració de proteïna de cadascuna segons l'apartat anterior 5.3, vam realitzar les corresponents 9 corbes de desplaçament del radiolligand [^{3}H]YM-09151-2 per la dopamina. El [^{3}H]YM-09151-2 és un antagonista que s'uneix i marca els receptors D2 de dopamina. La dopamina és un agonista dels receptors de dopamina que desplaçarà el radiolligand a una determinada concentració (IC_{50}) que ens donarà idea de la seva afinitat. De cadascuna de les corbes de desplaçament podrem determinar l'afinitat de la dopamina i el contingut de receptor D2 en cada espècie. A partir del procediment indicat a l'apartat 4.6 de Metodologia, vam elaborar la següent taula de composició dels 8 incubats de concentracions diferents de dopamina que constitueixen cadascuna de les corbes de desplaçament. La taula és igual per a les 9 corbes dels estriats de les 9 espècies animals (taula III).

TAULA III. COMPOSICIÓ DELS INCUBATS DE LES CORBES DE DESPLAÇAMENT DE 3H-YM AMB DOPAMINA

	TRIS	**Mg**	**DOPAMINA**				**3H-YM**	**Membrana**	**Volum Total**
conc mare	**50mM**	**1M**	**10 nM**	**1µM**	**100µM**	**10 mM**	**150 nM**	**2 mg/mL**	
conc final		**10mM**					**1,5 nM**	**0,367 mg/mL**	
C	1395	17,5					17,5	320	1750
0,1 nM	1377,5	17,5	17,5				17,5	320	1750
1 nM	1220	17,5	175				17,5	320	1750
10 nM	1377,5	17,5		17,5			17,5	320	1750
100 nM	1220	17,5		175			17,5	320	1750
1 µM	1377,5	17,5			17,5		17,5	320	1750
10 µM	1220	17,5			175		17,5	320	1750
100 µM	1377,5	17,5				17,5	17,5	320	1750
YM (50µM)	1386,25	17,5				**8,75**	17,5	320	1750
Total	directe	Directe	192,5	192,5	192,5	Directe	157,5	2880	tots els v en µl
			1732,5	1732,5	1732,5		*1417,5*	*3200*	*vol. a preparar*

CÀLCULS:

DOPAMINA: Preparació de la solució mare de dopamina 10 mM.

$$\frac{1000\ mg}{1\ g} \times \frac{10 \cdot 10^{-3}\ mols\ dop}{1\ L\ dop} \times \frac{189{,}6\ g\ dop}{1\ mol\ dop} \times 2 \cdot 10^{-3}\ L\ dop = \mathbf{3{,}8\ mg}$$

Per tant, vam pesar 3,8 mg de dopamina i els vam dissoldre en 2 mL de tampó Tris.

Preparació de les solucions de dopamina a partir de la dissolució mare 10 mM; les dilucions es van fer amb el tampó Tris habitual, fent dilucions seriades 1/100; els volums de la solució mare precedent i del tampó estan en µL:

$$10\text{mM} \xrightarrow[20+1980\ \text{Tris}]{} 100\mu\text{M} \xrightarrow[20+1980\ \text{Tris}]{} 1\mu\text{M} \xrightarrow[20+1980\ \text{Tris}]{} 10\text{nM}$$

[^{3}H]-YM: Preparació de la dilució del radiolligand a partir de la dissolució comercial que és 12,11 µM.

$$12{,}11\ \mu\text{M} \times \frac{n\ \mu\text{M}}{1500\ \mu\text{M}} = 0{,}15\ \mu\text{M}$$

$$n = \frac{0{,}15 \cdot 1500}{12{,}11\ \mu\text{M}} = 18{,}58\ \mu\text{L} \qquad 18{,}6\ \mu\text{L} + 1481{,}4\ \mu\text{L Tris}$$

Per tant, vam agafar 18,58 µL del radiolligand comercial i els vam diluir amb el volum indicat de tampó Tris.

5.4.2- COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT

Amb aquestes dades i un cop preparats els incubats tal i com s'explica a l'apartat 4.7 de Metodologia, els vam deixar 2 hores a 25ºC per tal que es produís la unió al receptor. Després vam separar tres rèpliques de cada incubat i vam procedir a la seva filtració per retenir el radiolligand unit a la mostra problema tal com s'indica a l'apartat 4.8 de Metodologia. Finalment vam procedir al comptatge de la radioactivitat en un comptador Packard 1600 (vegeu 4.9). Als resultats apareix:

- S#: número de mostra (vial).
- PID: número del rack de 12 mostres.
- TIME: temps de comptatge de la radioactivitat de cada vial.
- CPMA: senyal donada per cada vial en comptes (senyals lluminoses) per minut.
- A:2S%: error associat a la determinació, en %.
- DPM1: quantitat real de radioactivitat en unitats de desintegracions de nuclis de triti per minut. Aquest valor el calcula l'aparell a partir del senyal detectat (cpm) i de la eficiència de detecció del comptador i del líquid de centelleig segons:

  dpm = cpm/efic
- pmol: quantitat de producte radioactiu (en el nostre cas [^{3}H]YM-09151-2) present en la mostra problema; es calcula a partir de les DPM i de les especificacions del producte comercial segons els factors de conversió que mostrarem a l'apartat de Càlculs.

- pmol/ mg: quantitat de producte radioactiu unit per mg de proteïna de la mostra problema; els mg de proteïna són els presents en 0,5 mL d'incubat filtrat; en el nostre cas van ser 0,183 mg de proteïna per filtre (vegeu taula III).
- efic: eficàcia del comptatge, és a dir, de la transformació del senyal radioactiu en senyal lluminós.
- tSIE: paràmetre determinat per l'aparell de comptatge per calcular la eficiència real mostra a mostra.
- LUM: luminiscència de la mostra problema provocada per excitació del líquid de centelleig per la llum de l'ambient; per aquest motiu els vials s'han de mantenir a les fosques.
- FLAG: notes o observacions del comptatge.

CÀLCULS:

Amb les dades del producte comercial del [^{3}H]YM-09151-2:

radioactivitat específica (A_0): 71,4 Ci / mmol el 10/10/2005

desintegració radioactiva segons l'expressió:

$A = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$ pel triti $\lambda = 1{,}56 \cdot 10^{-4}$ dies^{-1}

descomposició química: 0'5% mensual.

puresa inicial del 97%

per definició: 1 Curie (Ci) = $3{,}7 \cdot 10^{10}$ desintegracions/s (dps)

podem calcular el factor de conversió de dpm a pmol continguts en cada filtre:

$$\frac{\text{desintegr}}{\text{min}} \times \frac{1\ \text{min}}{60\ \text{s}} \times \frac{1\ \text{Ci}}{3{,}7 \cdot 10^{10}\ \text{dps}} \times \frac{1\ \text{mmol}}{71{,}4\ \text{Ci}} \times \frac{1}{e^{-1{,}55 \cdot 10^{-4} \cdot 600\text{dies}}} \times \frac{10^9\ \text{pmol}}{1\ \text{mmol}} =$$

$$= 6{,}923 \cdot 10^{-6}$$

per tant: dpm x $6{,}923 \cdot 10^{-6}$ = pmol

També podem calcular el factor de conversió de dpm a pmol totals continguts en un vial amb 0,1 mL d'incubat. Això ens permet determinar la quantitat exacta de radiolligand en cada incubat. El factor de conversió és similar al utilitzat abans, però tenint en compte també la descomposició química del radiolligand ja que els productes de la seva degradació també són radioactius però ja no són YM i no s'uniran al receptor (no seran retinguts al filtre).

$$\frac{\text{desintegr}}{1\ \text{min}} \times \frac{1\ \text{min}}{60\ \text{s}} \times \frac{1\ \text{Ci}}{3{,}7 \cdot 10^{10}\ \text{dps}} \times \frac{1\ \text{mmol}}{71{,}4\ \text{Ci}} \times \frac{0'97 - 0'10}{e^{-1{,}55 \cdot 10^{-4} \cdot 600\text{dies}}} \times \frac{10^9\ \text{pmol}}{1\ \text{mmol}} =$$

$$= 6{,}024 \cdot 10^{-6}$$

per tant: dpm x $6{,}024 \cdot 10^{-6}$ = pmol

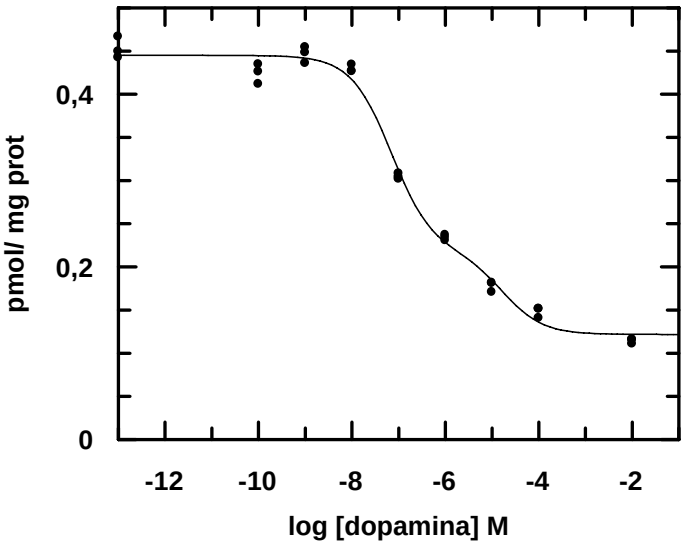
i: pmol/ 0,1 mL = nM

5.4.3- AJUST DE LES DADES EXPERIMENTALS A UNA CORBA DE DESPLAÇAMENT

Amb les dades experimentals obtingudes per a cada mostra d'estriat vam omplir les corresponents plantilles de full de càlcul Excel on vam introduir els pmols/mg prot de les tres rèpliques de cada incubat i la concentració total de radiolligand en cadascun. La plantilla calcula la concentració de radiolligand lliure i efectua una correcció dels pmol/mg prot que tindria cada mostra si el radiolligand lliure hagués estat el mateix en tots els punts de la corba de desplaçament:

$$L^*_{lliure} = L^*_{total} - L^*_{unit} = L^*_{total} - (\text{pmol/mg prot} \cdot \text{mg prot/mL}) \qquad \text{amb } L^* \text{ en nM.}$$

Els resultats obtinguts per a l'estriat de corder es mostren a la taula IV i la resta de mostres es realitzen de forma semblant. Les dades de pmol/mg prot corregides i de concentració de desplaçant o competidor ([dopamina] en unitats logarítimiques) les vam portar al programa d'ajust de dades experimentals GraFit que ens dona la millor corba que passa per tots els punts i els seus paràmetres (vegeu Anàlisi de les dades de *binding* de l'apartat 4.11). La corba i els paràmetres d'unió específica i inespecífica i d'afinitat obtinguts per a l'estriat de corder apareixen a la figura 43. La resta de gràfics es realitzen de forma semblant. Hem seleccionat el millor ajust (1 o 2 centres) en cada cas.



File : (untitled)
Sunday 30/12/07 17:00
Desplaçament 2 centres
Simple weighting
Reduced Chi squared = 0,00018

Variable	Value	Std. Err.
B equil. 1	2,2611e-001	1,3222e-002
IC50 d´1	7,0304e-008	1,4784e-008
B equil. 2	9,7012e-002	1,3554e-002
IC50 de 2	1,6797e-005	7,6881e-006
Unió inesp.	1,2181e-001	6,7074e-003

Fig. 43. Corba de competició de dopamina vs 3H-YM en

TAULA IV. FULL DE CÀLCUL DE LA CORBA DE COMPETICIÓ DOPAMINA vs 3H-YM EN CORDER

CORBES DE COMPETICIÓ DE DOPAMINA vs 3H-YM 1,5 nM **Estriat Corder 19,07,2007**

Dopamina	pmol/mg pr	pmol/mg pr	pmol/mg pr	X pmol/mg pr	YM* (nM)	YM* lliure	Bi	correcció	correcció	correcció	Mitja cor	SD	log [ ]
0 nM	0,3479	0,3614	0,3424	0,351	0,98	0,85	0,084	0,4495	0,4666	0,4425	0,4529	0,0124	-13
0,1 nM	0,3619	0,3495	0,3693	0,360	1,09	0,95	0,094	0,4260	0,4116	0,4346	0,4240	0,0116	-10
1 nM	0,3789	0,3898	0,3951	0,388	1,12	0,98	0,096	0,4358	0,4482	0,4542	0,4461	0,0094	-9
10 nM	0,3665	0,3728	0,366	0,368	1,10	0,97	0,095	0,4269	0,4342	0,4263	0,4291	0,0044	-8
100 nM	0,2614	0,2648	0,2592	0,262	1,07	0,97	0,095	0,3042	0,3081	0,3017	0,3047	0,0032	-7
1 □M	0,2396	0,2431	0,246	0,243	1,30	1,21	0,119	0,2307	0,2341	0,2369	0,2339	0,0031	-6
10 µM	0,1927	0,1923	0,1813	0,189	1,31	1,24	0,122	0,1815	0,1811	0,1707	0,1778	0,0062	-5
100 □M	0,157	0,1687	0,1685	0,165	1,37	1,31	0,128	0,1407	0,1514	0,1513	0,1478	0,0062	-4
inesp.	0,1445	0,1389	0,1454	0,143	1,51	1,46	0,143	0,1153	0,1106	0,1161	0,1140	0,00299	-2

0,114

Bi	0,14293	1,21	1,16	0,114
[L]	1,45809			
Ki	0,09803			

prot=0,183 mg/vial **0,366** mg/mL

KD (nM) 3,4

Totes les dades obtingudes en aquests experiments de desplaçament d'YM tritiat per dopamina no radioactiva les hem resumit a la taula V on apareix per a cadascuna de les 9 espècies estudiades els valors d'unió específica al receptor (B_{esp}), concentració de competidor dopamina que desplaça el 50% de la radioactivitat unida al receptor (IC_{50}) i unió inespecífica del radiolligand a altres components de la mostra problema (B_{inesp}). Una explicació detallada d'aquests conceptes es troba als apartats 2.4.2 i 2.4.3. Les unitats s'especifiquen a la taula i els valors que apareixen són la mitjana ± l'error estàndard donats pel programa d'ajust de les dades experimentals GraFit.

TAULA V. RESULTATS DEL DESPLAÇAMENT DE [^{3}H]YM-09151-2 PER DOPAMINA EN MOSTRES D'ESTRIAT DE DIFERENTS ESPÈCIES

Espècie	L* nM	B esp 1 pmol/mg prot	IC50 1 nM	B esp 2 pmol/mg prot	IC50 2 µM	B inesp pmol/mg prot
Corder	1,16	0,226 ±0,013	70 ±14	0,097 ±0,013	17 ±8	0,122 ±0,007
Cavall	1,16	0,155 ±0,013	76 ±20	0, 051 ±0,013	13 ±9	0,122 ±0,006
Porc	1,17	0,249 ±0,012	49 ±11	0,117 ±0,014	66 ±33	0,121 ±0,011
Conill	1,19	0,145 ±0,012	58 ±18	0,114 ±0,012	11 ±5	0,129 ±0,006
Humà	1,1	0,223 ±0,011	149 ±34	0,300 ±0,014	670 ±290	0,100 ±0,014
Vaca	1,21	0,082 ±0,012	29 ±18	0,086 ±0,013	6 ±3	0,132 ±0,006
Pollastre	1,22	0,084 ±0,012	260 ±160	0,088 ±0,015	205 ±120	0,126 ±0,010
Tonyina	1,28	-	-	0,059 ±0,012	2 ±2	0,171 ±0,010
Lluç	1,21	-	-	0,376 ±0,024	186 ±48	0,181 ±0,023

A partir de l'afinitat experimental IC_{50} de l'estat 1 i de l'estat 2, podem calcular les constants reals d'afinitat (K_{D1} i K_{D2}). Es poden calcular emprant l'expressió següent aplicada a cadascun dels estats:

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L^*}{K_D^*}}$$

Com s'observa, per aplicar l'equació necessitem la concentració de lligand lliure a la que s'ha fet cada experiment (L*), que figura a la taula, i l'afinitat del radiolligand (K_D*) que no la sabem, tot i que hi ha dades bibliogràfiques i de la pròpia casa comercial, però no estan determinades ni a les mateixes condicions experimentals (sals, temperatura...) ni en la diversitat de teixits que nosaltres emprem; per això vam considerar necessari el càlcul de l'afinitat del [^{3}H]YM-09151-2 efectuant una sèrie d'experiments de desplaçament similars als abans explicats però desplaçant el radiolligand amb el mateix

producte sense marcar (YM-09151-2). Els resultats els mostrem en l'apartat 5.5 següent.

5.5- ASSAIG DE DESPLAÇAMENT O COMPETICIÓ DEL [^{3}H]YM-09151-2 PER L'YM-09151-2

5.5.1- PREPARACIÓ DELS INCUBATS

Amb les mostres d'estriat de les 8 espècies de què disposàvem (no teniem més mostra d'estriat de lluç), i coneguda ja la concentració de proteïna de cadascuna segons l'apartat anterior 5.3, vam realitzar les corresponents 8 corbes de desplaçament del radiolligand [^{3}H]YM-09151-2 per YM-09151-2. A partir del procediment indicat a l'apartat 4.6 de Metodologia, vam elaborar la següent taula de composició dels 8 incubats de concentracions diferents d' YM-09151-2 que constitueixen cadascuna de les corbes de desplaçament. La taula és igual per a les 8 corbes dels estriats de les 8 espècies animals (taula VI).

TAULA VI. COMPOSICIÓ DELS INCUBATS DE LES CORBES DE DESPLAÇAMENT DE 3H-YM AMB YM

BINDING 09-08-07 CERVELLS D'ESPÈCIES RECEPTOR D2 DE DOPAMINA

	TRIS	**Mg**	**YM-09151-2**			**3H-YM**	**Membrana**	**Volum Total**
conc mare	**50mM**	**1M**	**1 nM**	**100 nM**	**10 µM**	**150 nM**	**2 mg/mL**	
conc final		**10mM**				**1,5 nM**	**0,367 mg/mL**	
C	1395	17,5				17,5	320	1750
0,01 nM	1377,5	17,5	17,5			17,5	320	1750
0,1 nM	1220	17,5	175			17,5	320	1750
1 nM	1377,5	17,5		17,5		17,5	320	1750
3 nM	1395	17,5				17,5	320	1750
10 nM	1220	17,5		175		17,5	320	1750
100 nM	1377,5	17,5			17,5	17,5	320	1750
1 µM	1220	17,5			175	17,5	320	1750
Total	directe	directe	192,5	192,5	192,5	140	2560	tots els v en µl
			1540	1540	1540	*1120*		*v a preparar*

CÀLCULS:

YM: Preparació de la solució mare d'YM 10 mM.

$$\frac{1000\ mg}{1\ g} \times \frac{10 \cdot 10^{-3}\ mols\ YM}{1\ L_D} \times \frac{387{,}91\ g\ YM}{1\ mol\ YM} \cdot 1{,}5 \cdot 10^{-3}\ L_D = \mathbf{5{,}8\ mg}$$

Per tant, vam pesar 5,8 mg d'YM i els vam dissoldre en 1,5 mL de dissolvent DMSO (dimetilsulfòxid), donada la seva alta hidrofobicitat.

Preparació de les solucions d'YM a partir de la dissolució mare 10 mM; la primera dilució 1/10 la vam fer amb DMSO i la resta amb el tampó Tris habitual, fent dilucions seriades 1/100; els volums de la solució mare precedent i del dissolvent estan en µL:

10mM	→	1 mM	→	10µM	→	100nM	→	1 nM
DMSO		10+90 DMSO		18+1782 Tris		18+1782 Tris		18+1782 Tris

[^{3}H]-YM: Preparació de la dilució del radiolligand a partir de la dissolució comercial que és 12,11 µM.

$$12{,}11\ \mu M \times \frac{n\ \mu M}{1400\ \mu M} = 0{,}15\ \mu M$$

$$n = \frac{0{,}15 \cdot 1400}{12{,}11\ \mu M} = 17{,}3\ \mu L \qquad 17{,}3\ \mu L + 1383\ \mu L\ TRIS$$

Per tant, vam agafar 17,3 µL del radiolligand comercial i els vam diluir amb el volum indicat de tampó Tris.

5.5.2- COMPTATGE DE LA RADIOACTIVITAT

Amb aquestes dades i un cop preparats els incubats tal i com s'explica a l'apartat 4.7 de Metodologia, els vam deixar 2 hores a 25ºC per tal que es produís la unió al receptor. Després vam separar tres rèpliques de cada incubat i vam procedir a la seva filtració per retenir el radiolligand unit a la mostra problema tal com s'indica a l'apartat 4.8 de Metodologia. Finalment vam procedir al comptatge de la radioactivitat en un comptador Packard 1600 (vegeu 4.9).

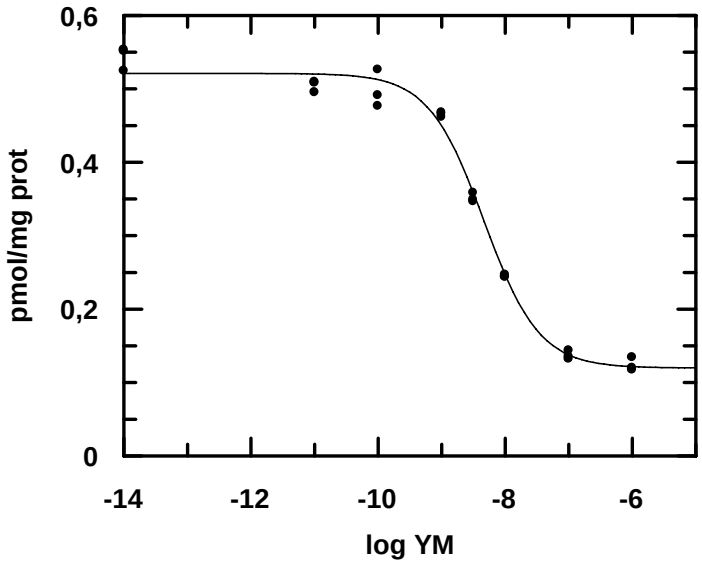
Podem calcular el factor de conversió de dpm a pmol continguts en cada filtre i la concentració exacta de radiolligand en cada incubat fent els càlculs que ja hem explicat a l'apartat 5.4.2 de Resultats.

5.5.3- AJUST DE LES DADES EXPERIMENTALS A UNA CORBA DE DESPLAÇAMENT

Amb les dades experimentals obtingudes per a cada mostra d'estriat vam omplir les corresponents plantilles de full de càlcul Excel on vam introduir els pmols/mg prot de les tres rèpliques de cada incubat i la concentració total de radiolligand en cadascun. La plantilla calcula la concentració de radiolligand lliure i efectua una correcció dels pmol/mg prot que tindria cada mostra si el radiolligand lliure hagués estat el mateix en

tots els punts de la corba de desplaçament.

Els resultats obtinguts per a l'estriat de corder es mostren a la taula VII, la resta de mostres es realitzen de forma semblant. Les dades de pmol/mg prot corregides i de concentració de desplaçant o competidor ([YM-09151-2] en unitats logarítimiques) les vam portar al programa d'ajust de dades experimentals GraFit que ens dona la millor corba que passa per tots els punts i els seus paràmetres (vegeu Anàlisi de les dades de *Binding* de l'apartat 4.11). La corba i els paràmetres d'unió específica i inespecífica i d'afinitat obtinguts per a l'estriat de corder apareixen a la figura 44. Amb YM-09151-2 com a desplaçant, el millor ajust ha estat sempre a 1 centre d'afinitat del receptor.



File : YMYMDEF.GFD
Directory: C:\DOCUME~1\VERãNICA\ESCRIT~1\A-TREB~1\VVVV
Thursday 27/12/07 21:21
Desplaçament 1 centre
Simple weighting
Reduced Chi squared = 0,0002862

Variable	Value	Std. Err.
B equil.	4,0113e-001	8,8112e-003
IC50	4,6095e-009	4,1897e-010
B inesp.	1,1996e-001	7,3261e-003

Fig. 44. Corba de competició d'YM vs 3H-YM en corder

TAULA VII. FULL DE CÀLCUL DE LA CORBA DE COMPETICIÓ YM vs 3H-YM EN CORDER

CORBES DE COMPETICIÓ DE YM vs 3H-YM 1,5 nM **Estriat Corder 19,07,2007**

Dopamina	pmol/mg pr	pmol/mg pr	pmol/mg pr	X pmol/mg pr	YM* (nM)	YM* lliure	Bi	correcció	correcció	correcció	Mitja cor	SD	log [ ]
0 nM	0,4497	0,4728	0,4745	0,466	1,15	0,98	0,103	0,5246	0,5513	0,5533	0,5431	0,0160	-14
0,01 nM	0,4392	0,4505	0,452	0,447	1,19	1,02	0,107	0,4952	0,5078	0,5095	0,5042	0,0078	-11
0,1 nM	0,4239	0,4543	0,4111	0,430	1,15	0,99	0,104	0,4912	0,5260	0,4765	0,4979	0,0255	-10
1 nM	0,41	0,4115	0,4059	0,409	1,16	1,01	0,106	0,4661	0,4678	0,4615	0,4651	0,0033	-9
3 nM	0,336	0,3384	0,3473	0,341	1,26	1,14	0,119	0,3467	0,3492	0,3583	0,3514	0,0061	-8,5
10 nM	0,2438	0,2468	0,2442	0,245	1,27	1,18	0,124	0,2437	0,2467	0,2441	0,2449	0,0016	-8
100 nM	0,1598	0,1507	0,147	0,153	1,37	1,32	0,138	0,1436	0,1352	0,1318	0,1369	0,0061	-7
1 µM	0,1469	0,1637	0,1442	0,152	1,50	1,44	0,152	0,1199	0,1343	0,1175	0,1239	0,00909	-6

0,124

Bi	0,15160	1,26	1,18	0,124
[L]	1,44411			
Ki	0,10498			

prot=0,183 mg/vial **0,366** mg/mL

KD nM) 3,8

Totes les dades obtingudes en aquests experiments de desplaçament d'YM tritiat per YM no radioactiu les hem resumit a la taula VIII, on apareix per a cadascuna de les 8 espècies estudiades els valors d'unió específica al receptor (B_{esp}), concentració de competidor YM que desplaça el 50% de la radioactivitat unida al receptor (IC_{50}) i unió inespecífica del radiolligand a altres components de la mostra problema (B_{inesp}). Una explicació detallada d'aquests conceptes es troba als apartats 2.4.2 i 2.4.3. Les unitats s'especifiquen a la taula i els valors que apareixen són la mitjana ± l'error estàndard donats pel programa d'ajust de les dades experimentals GraFit. A partir de les dades d'unió específica del radiolligand (B_{esp}) podem calcular la quantitat total de receptor present a la mostra problema (B_{max}) segons l'expressió:

$$\boxed{B_{max} = B_{esp} \cdot (K_D + L^*) / L^*}$$

on la constant real d'afinitat (K_D) apareix també a la taula i l'hem calculat a partir de l'afinitat experimental IC_{50} emprant l'expressió:

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L^*}{K_D^*}}$$

però com el desplaçant i el producte radioactiu són el mateix:

$$\begin{array}{l} YM = YM^* \\ K_D = K_D^* \end{array} \longrightarrow \quad IC_{50} = K_{DYM} + L^*$$

l'expressió se simplifica i l'afinitat del radiolligand es calcula de forma simple a partir de la IC_{50} obtinguda i la concentració de radiolligand (L*) emprada segons:

$$\boxed{K_{DYM} = IC_{50} - L^*}$$

TAULA VIII. RESULTATS DEL DESPLAÇAMENT DE [^{3}H]YM-09151-2 PER YM-09151-2 EN MOSTRES D'ESTRIAT DE DIFERENTS ESPÈCIES

Espècie	L* nM	B esp pmol/mg prot	IC50 nM	B inesp pmol/mg prot	B max pmol/mg prot	K_D nM
Corder	1,18	0,401 ±0,009	4,6 ±0,4	0,200 ±0,007	1,56	3,4
Cavall	1,18	0,330 ±0,009	4,4 ±0,5	0,101 ±0,007	1,23	3,2
Porc	1,23	0,450 ±0,019	4,3 ±0,8	0,120 ±0,016	1,57	3,1
Conill	1,26	0,350 ±0,010	4,2 ±0,5	0,118 ±0,008	1,17	2,9
Humà	1,25	0,456 ±0,009	3,9 ±0,3	0,200 ±0,007	1,42	2,7
Vaca	1,24	0,410 ±0,014	4,4 ±0,6	0,118 ±0,011	1,45	3,2
Pollastre	1,26	0,223 ±0,007	14 ±2	0,114 ±0,006	2,48	12,7
Tonyina	1,23	0,083 ±0,008	32 ±15	0,126 ±0,008	2,16	30,8

5.5.4- DETERMINACIÓ DE L'AFINITAT DE LA DOPAMINA A PARTIR DE L'AFINITAT DEL [^{3}H]YM-09151-2

Un cop determinada l'afinitat (K_D*) de l'YM en l'estriat de cada espècie podem aplicar la fòrmula que hem comentat a l'apartat 5.4.3:

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L^*}{K_D^*}}$$

i calcular l'afinitat de la dopamina per l'estat 1 (alta afinitat) i 2 (baixa afinitat) del receptor a partir dels valors d'IC_{50} corresponents que apareixien a la taula VIII. Aquests valors es mostren a la següent taula IX.

TAULA IX. VALORS D'AFINITAT DE LA DOPAMINA PEL RECEPTOR D2

Espècie	K_D 1 (nM)	K_D 2 (µM)
Corder	52	13
Cavall	56	10
Porc	36	48
Conill	41	8
Humà	106	476
Vaca	21	4
Pollastre	237	187
Tonyina	-	2

6- ANÀLISI DELS RESULTATS

6.1- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE PROTEÏNA TOTAL

La determinació del contingut de proteïna total en les mostres problema és necessari efectuar-la prèviament ja que la quantitat de receptor present es relaciona sempre amb la proteïna total i es dona en unitats de picomols de receptor per mil·ligram de proteïna (pmol/mg prot).

La determinació del contingut de proteïna la vam realitzar emprant el mètode del BCA. Les mostres que tenen proteïna reaccionen amb l'àcid bicinconínic i donen una coloració específica. L'estructura de l'àcid bicinconínic apareix a la figura 45. Es tracta d'un reactiu altament específic de l'ió Cu^{+} i quan interaccionen a la vegada amb els aminoàcids cisteïna, triptòfan i tirosina de les proteïnes donen una típica coloració porpra en presència de medi alcalí (vegeu figura 46). Aquests productes es troben en el reactiu A (medi bàsic i àcid bicinconínic) i en el reactiu B (Cu^{+}) que hem emprat.

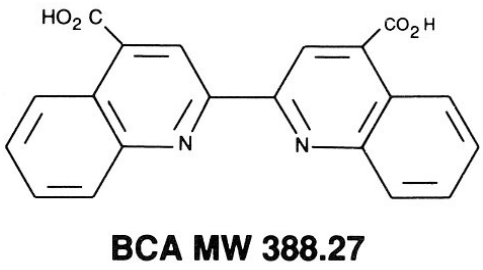


Fig. 45. Estructura de l'àcid bicinconínic (Protein Assay Reagent. BCA. Instructions, 1989)

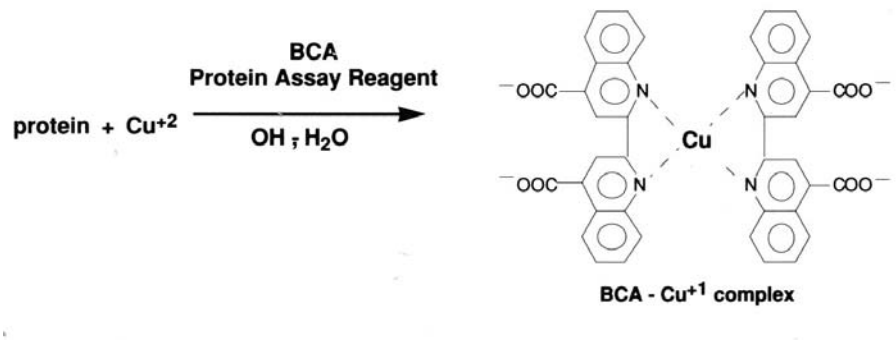


Fig. 46. Esquema de la reacció del BCA (Protein Assay Reagent. BCA. Instructions, 1989)

Com que altres molècules presents a la mostra problema, a part de les proteïnes, poden reaccionar amb el BCA, és necessari, com en la majoria de mètodes colorimètrics i espectrofotomètrics, fer un blanc lo més semblant a la mostra problema, però sense

proteïna. Per transformar els resultats d'intensitat del color desenvolupat a quantitat de proteïna present vam realitzar paral·lelament un assaig amb quantitats conegudes de proteïna, en el nostre cas albúmina (BSA), i vam representar una corba patró en la que interpolàrem els resultats de la mostra problema un cop restat el valor del seu blanc (mostra de Tris). Com la corba patró d'albúmina es prepara amb aigua, el blanc a sostraure a les mostres de la corba patró és el blanc d'aigua.

La patró obtinguda no és una línia recta, com seria d'esperar de l'equació de Lambert-Beer que regeix la majoria d'assaigs espectrofotomètrics:

$$A = \varepsilon \times C \times b$$

A: absorbància de la mostra a una λ determinada

ε: la constant de proporcionalitat o coeficient d'extinció molar

C: la concentració de la mostra

b: gruix o pas de llum en cm (vegeu figura 47)

La forma corba obtinguda per nosaltres (vegeu apartat 5.3 de Resultats) és habitual treballant amb proteïnes, ja que a concentracions altes (normalment per sobre d'1 mg/mL) solen agregar-se i el reactiu dóna menys color del compte perquè no pot penetrar a l'interior dels agregats.

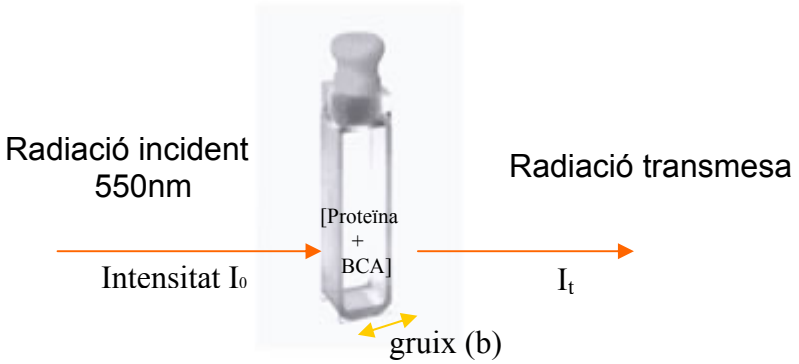


Fig. 47. Esquema de la incidència d'una radiació sobre la mostra problema en un assaig espectrofotomètric

Amb les dades a la mà de la concentració de proteïna de les mostres problema del primer assaig (18/07/07), podem observar que els valors obtinguts presenten certes diferències amb un valor més baix per a l'estriat de lluç (0,8 mg/mL) i un més alt per a l'humà (2 mg/mL). Tot i que aquests valors obtinguts en les diferents espècies són comparables, ja que corresponen aproximadament a la mateixa quantitat de teixit i de volum de resuspensió final per a totes elles, les diferències no deuen ser significatives ja que els valors obtinguts en el segon assaig (09/08/07) són diferents. La impossibilitat de

comparar els valors de contingut de proteïna en una espècie i en una altra i també entre un dia d'assaig o un altre, es basa en el fet de què cada cop s'agafa un fragment aleatòriament diferent del residu de membranes obtingut i congelat. Efectivament, depenent del fragment de residu que s'agafa, si és superficial sol ser més ric en lípids i menys en proteïnes, raó per la qual sedimenta al final; al contrari, un fragment del fons del residu és més ric en proteïna i menys en lípids, i al ser més dens, sedimenta abans.

6.2- DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE RECEPTOR DE DOPAMINA D2

Per a la determinació del contingut de dopamina D2 i de la seva afinitat per l'agonista dopamina i l'antagonista YM-09151-2 hem utilitzat la tècnica de *binding,* fent experiments d'unió d'un lligand marcat amb triti [^{3}H]YM-09151-2, que després hem desplaçat del receptor amb concentracions creixents de dopamina o de YM-09151-2.

A partir de les dades experimentals es poden representar les corresponents corbes de desplaçament per cada lligand i espècie animal, després d'haver calculat la concentració real de radiolligand lliure en cada incubat i d'haver efectuat la correcció dels pmol/ mg proteïna que tindria cada mostra si el radiolligand lliure hagués estat el mateix en tots els casos (vegeu 6.5.3).

Les dades d'unió específica de [^{3}H]YM-09151-2 en cada una de les mostres d'estriat no indiquen la quantitat total de receptor present en cadascuna sinó més aviat al nombre de receptors als que s'ha unit el radiolligand que no té perquè ser necessàriament el 100%. El percentatge de receptor detectat (grau de saturació) depèn de l'afinitat d'unió del radiolligand al receptor en cada mostra i, per tant, per a la seva avaluació necessitem conèixer prèviament aquesta afinitat.

És per això que necessitem primer que tot avaluar els experiments de competició del [^{3}H]YM-09151-2 per l'YM-09151-2. Els resultats que vam obtenir apareixen a la taula VIII de l'apartat 5.5.3. Primer que tot vam haver de calcular l'afinitat real (K_D) de l'YM-09151-2 en l'estriat de cada espècie a partir del valor experimental obtingut (IC_{50}). Amb el valor de K_D i el lligand lliure (L*) emprat en cada cas, es pot saber el percentatge de saturació (100 x L*/ (K_D+ L*)) i, per tant, estimar la quantitat total de receptor present en cada estriat a partir del valor experimental d'unió (B esp), segons:

$$B_{max} = B \cdot (K_D + L^*) / L^*$$

A la mateixa taula VIII apareixen aquests valors de B max que representen la quantitat total de receptor present en cada mostra independentment de la saturació que haguem

obtingut experimentalment. Les unitats emprades habitualment són pmol/mg prot que mostra, per tant, la concentració del receptor (pmol) en el conjunt total de proteïna (mg proteïna).

Els valors obtinguts en les diferents espècies de mamífers són molt semblants, entre 1,2 i 1.6 pmol/mg prot, mentre que són sensiblement superiors en pollastre i tonyina, entre 2,2 i 2,5 pmol/mg prot. Això pot ser degut a què es tracta de grups animals diferents (aus i peixos front a mamífers), encara que també podria ser fruit de la baixa saturació amb radiolligand que s'ha tingut en els experiments amb aquests animals (9% i 4% front un 30% en mamífers), el que obliga a extrapolar massa el càlcul i pot introduir apreciables errors en la seva determinació.

6.3- DETERMINACIÓ DE L'AFINITAT DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 PER L'YM-09151-2

Per a la determinació de l'afinitat del receptor de dopamina D2 per l'antagonista YM-09151-2 hem emprat igualment la tècnica de *binding,* fent experiments d'unió d'un lligand marcat amb triti [^{3}H]YM-09151-2, que desprès hem desplaçat del receptor amb concentracions creixents d'YM-09151-2.

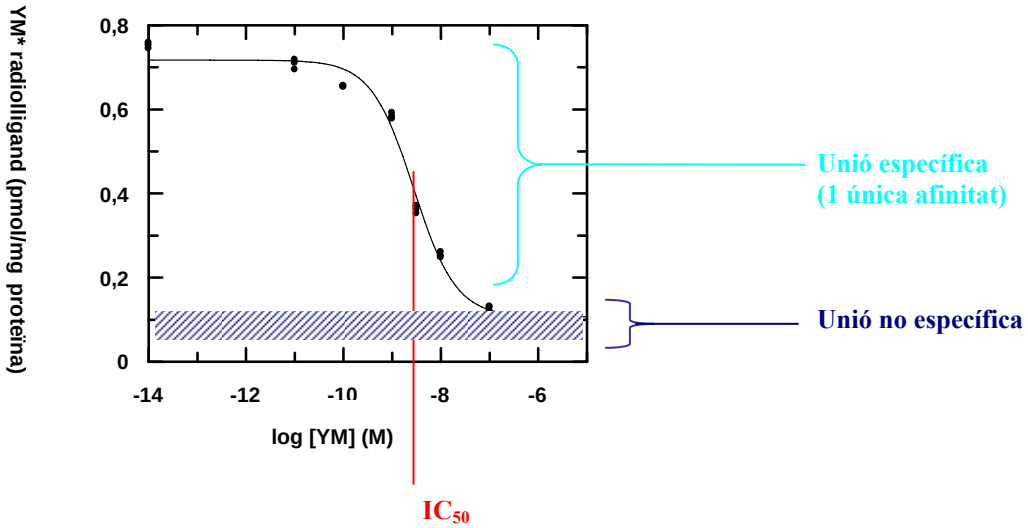
Tal com hem explicat abans, primer que tot vam haver de calcular l'afinitat real (K_D) de l'YM-09151-2 en l'estriat de cada espècie a partir del valor experimental obtingut (IC_{50}). A la mateixa taula VIII apareixen aquests valors de K_D en unitats de nM. El valor de K_D indica la concentració necessària del lligand en qüestió per ocupar el 50% de receptors; per tant, quant més baix sigui el valor de K_D millor ocupa el receptor, és a dir, és més afí.

Els valors de K_D obtinguts en les diferents espècies de mamífers són molt semblants, entre 2,7 i 3,4 nM, mentre que són molt superiors en pollastre i sobretot en tonyina (12,7 i 30,8 nM respectivament). Això reflexa novament una diferència filogenètica entre els diferents grups d'animals (aus, peixos i mamífers). Els nostres resultats concorden amb la idea general de què la unió dels lligands antagonistes als receptors no és excessivament alterada per modificacions d'aquests receptors; així en tots els mamífers l'afinitat de l'YM-09151-2 és sorprenentment similar.

Les diferències apreciables en l'afinitat trobada en pollastre i tonyina deuen reflectir unes diferències ja força acusades entre l'estructura del receptor d'aquestes espècies respecte la dels mamífers. Aquest punt el discutirem més endavant (vegeu apartat 6.5).

Un altre fet remarcable a comentar és que en tots els casos el desplaçament de [^{3}H]YM-09151-2 per YM-09151-2 ha mostrat un únic salt, com es pot observar en la corba de la figura 44. Com s'ha comentat a l'apartat introductori 2.4.3 i al metodològic 4.11

(Anàlisi de les dades de *binding*) quan el millor ajust de les dades experimentals correspon a un únic salt de desplaçament es diu que el lligand competidor presenta un únic estat d'afinitat pel receptor, i per tant, una única IC_{50} i una K_D. Això vol dir que el lligand en qüestió detecta i s'uneix a tots els receptors D2 amb la mateixa afinitat:



6.4- DETERMINACIÓ DE L'AFINITAT DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 PER LA DOPAMINA

Per a la determinació de l'afinitat del receptor de dopamina D2 per l'agonista endogen dopamina hem emprat igualment la tècnica de *binding,* fent experiments d'unió d'un lligand marcat amb triti [^{3}H]YM-09151-2, que desprès hem desplaçat del receptor amb concentracions creixents de dopamina.

A partir de les dades experimentals vam obtenir els resultats que es mostren a la taula V. Amb els valors d' IC_{50} obtinguts amb el programa GraFit vam haver de calcular les constants reals d'afinitat de la dopamina (K_D) emprant l'equació:

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L^*}{K_D^*}}$$

tal com s'indica a l'apartat 5.4.3. Necessitàvem, per tant, calcular prèviament l'afinitat real (K_D) de l'YM-09151-2 en l'estriat de cada espècie.

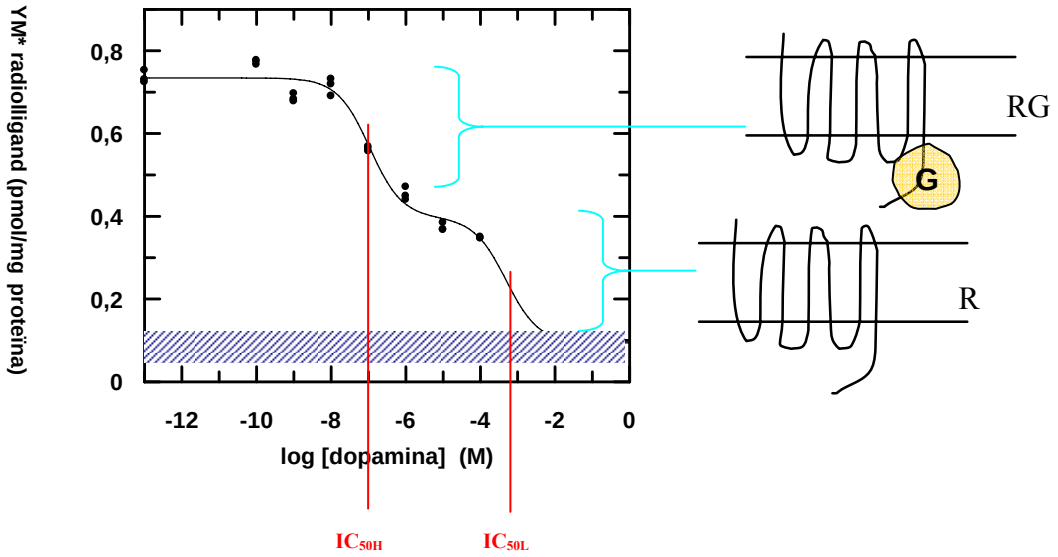
Hem de senyalar que, a diferència dels desplaçaments realitzats amb l'antagonista, utilitzant l'agonista dopamina vam obtenir, generalment, desplaçaments amb dos salts, com es pot observar en la corba de la figura 43. Com s'ha comentat a l'apartat introductori 2.4.3 i en la metodologia 4.11 (Anàlisi de les dades de *binding*) quan el

millor ajust de les dades experimentals correspon a dos salts de desplaçament es diu que el lligand competidor presenta dos estats d'afinitat pel receptor, i per tant, dos IC_{50} i dos K_D diferents. Això vol dir que el lligand en qüestió detecta i s'uneix a dos poblacions dels receptors D2 amb diferents afinitats. L'explicació d'aquest fet és que els agonistes, com la dopamina, tenen 2 afinitats diferents pels GPCR, una més afí pels receptors quan es troben acoblats a proteïna G (on la dopamina desplaça més ràpidament al radiolligand) i l'altra menys afí, quan els receptors no estan acoblats a cap proteïna G (on es necessària més dopamina per poder desplaçar el radiolligand).

En els nostres experiments el programa d'ajust de dades GraFit ens dóna dos valors d'IC_{50} (quantitat de dopamina necessària per desplaçar la meitat del radiolligand):

- IC_{50H}: quantitat de dopamina necessària per desplaçar la meitat del radiolligand dels receptors d'afinitat més alta (RG).
- IC_{50L}: quantitat de dopamina necessària per desplaçar la meitat del radiolligand dels receptors d'afinitat més baixa (R).

Els nostres resultats són com els del gràfic següent:



A la taula IX apareixen els valors de K_D, en unitats de nM, calculats per als dos estats d'afinitats detectats per la dopamina. Hem de recordar que quant més baix sigui el valor de K_D millor ocupa el receptor, és a dir, el lligand és més afí.

En tots els casos vam obtenir dos afinitats diferents a excepció dels peixos on, tant en la tonyina com en el lluç, vam obtenir un desplaçament amb només un salt.

Si ens fixem en l'estat d'alta afinitat, els valors de K_{D1} (K_{DH}) es troben sempre en el rang nM i és en els peixos on aquest estat no apareix. En el pollastre vam obtenir la pitjor afinitat (més alta K_{D1}), mentre que en la vaca vam obtenir la millor (amb una K_{D1} aproximadament 10 vegades més baixa). Els valors de K_{D1} de la dopamina obtinguts en

les diferents espècies de mamífers són ara relativament diferents, oscil·lant entre 21 nM de la vaca i 106 nM en humans, la resta d'espècies tenen valors intermedis que oscil·len entre 36 i 56 nM en porc, conill, corder i cavall. Novament observem, però, unes afinitats millors pels mamífers (tot i que no iguals) i unes pitjors pel pollastre i encara més pels peixos, que no tenen aquest estat d'alta afinitat.

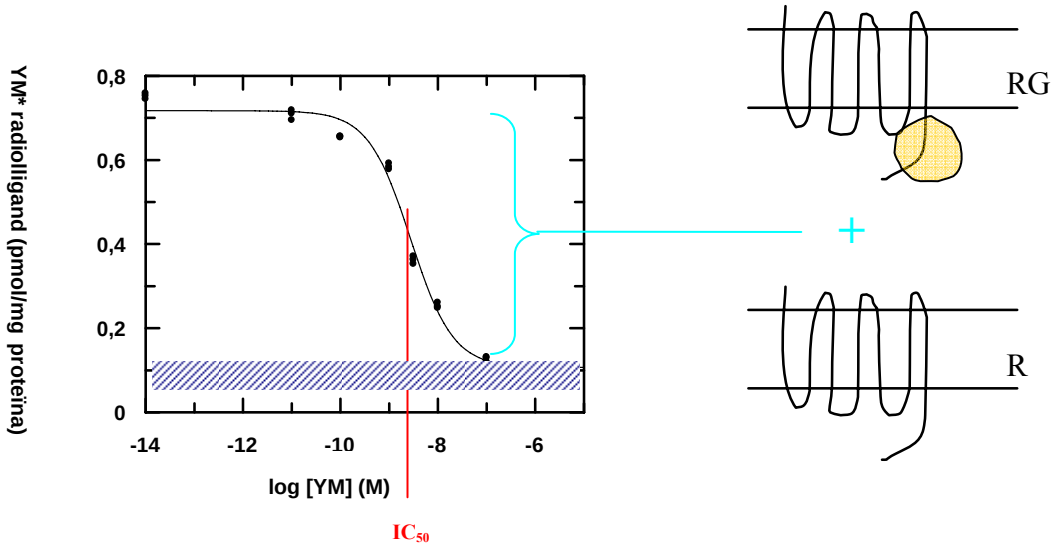
Quant a l'estat de baixa afinitat, els valors de K_{D2} (K_{DL}) es troben sempre en el rang µM. Els valors que hem obtingut són força més variables que els de K_{D1} ja que oscil·len entre 2 i 476 µM de la tonyina i l'humà respectivament. El valor en pollastre és també força alt, 187 µM, mentre que els mamífers oscil·len entre els 4 µM en la vaca i els 48 µM en el porc.

En conjunt, l'estriat boví és el que presenta millors afinitats per la dopamina en els dos estats i l'estriat humà és el pitjor entre els mamífers. L'afinitat de la dopamina en pollastre és també força dolenta, tot i que els resultats no són molt diferents dels obtinguts en estriat humà. Els peixos serien però els pitjors ja que no arriben a presentar l'estat d'alta afinitat. Caldria comprovar si aquesta pobra afinitat del receptor D2 d'estriat humà per la dopamina és real o fruit de la manipulació de la mostra ja que en les mostres que hem utilitzat han passat entre 3 i 22 hores des de la mort de l'individu fins a l'extracció i congelació de l'estriat. En la resta d'animals el període entre la mort i el processat de la mostra ha sigut inferior, han passat de 4 a 6 hores.

Els nostres resultats concorden amb la idea general de què la unió dels lligands agonistes als receptors és bastant alterada per modificacions d'aquests receptors; així, fins i tot els mamífers, que presenten una afinitat per l'YM-09151-2 gairebé idèntica, mostren afinitats molt diferents per la dopamina, amb valors entre 10 i 100 vegades diferents. Aquest punt el discutirem més endavant (vegeu apartat 6.5).

Els valors d'afinitat més baixos obtinguts en pollastre i tonyina (aus i peixos), no només per l'antagonista l'YM-09151-2 sinó també per l'agonista dopamina, poden ser l'explicació de perquè hem trobat un contingut més elevat de receptor en aquestes espècies que en mamífers, ja que és un fet habitual que quan un receptor té baixa afinitat pels seus lligands, s'expressa més en el teixit per contrarestar aquest efecte i donar una resposta fisiològica apreciable; és a dir, quant pitjor és el receptor, més n'hi ha.

Els resultats obtinguts amb l'antagonista amb un desplaçament d'un únic salt, els podem interpretar paral·lelament a com ho hem fet amb els dos salts observats amb l'agonista tenint en compte que l'antagonista és incapaç de distingir entre els receptors acoblats o no a proteïna G i s'uneix, per tant, amb la mateixa afinitat a les dos poblacions de receptors. Això es representa en la figura següent:



Un resum de les dades calculades tant de contingut total de receptor D2 en l'estriat de les diferents espècies animals com d'afinitat per l'agonista dopamina i l'antagonista YM-09151-2 apareix a la taula X.

TAULA X RESUM DE PARÀMETRES DETERMINATS PEL RECEPTOR D2 DE DOPAMINA

ESPÈCIE	CONTINGUT DE RECEPTOR	YM-09151-2	DOPAMINA	
	B_{max} (pmol/mg prot)	K_D*	K_D 1 (nM)	K_D 2 (µM)
Corder	1,56	3,4	52	13
Cavall	1,23	3,2	56	10
Porc	1,57	3,1	36	48
Conill	1,17	2,9	41	8
Humà	1,42	2,7	106	476
Vaca	1,45	3,2	21	4
Pollastre	2,48	12,7	237	187
Tonyina	2,16	30,8	-	2
Lluç	-	-	-	-

6.5- COMPARACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS RECEPTORS DE DOPAMINA D2 EN LES DIFERENTS ESPÈCIES ESTUDIADES

Per confirmar les nostres conclusions que diuen que els receptors D2 de dopamina en mamífers són diferents (ja que les afinitats per la dopamina varien) però no massa ja que els resultats amb YM són molt iguals, hem fet una cerca bibilogràfica de les seqüències

aminoacídiques conegudes dels receptors D2 de dopamina. Això també ens servirà per confirmar que les diferències entre mamífers i altres grups animals són més importants ja que les afinitats que hem obtingut en el nostre Treball de Recerca en peixos i aus són força diferents tant en l'afinitat de l'agonista com de l'antagonista.

Amb aquest objectiu hem fet una cerca a la base de dades de seqüències de proteïnes del *National Center for Bioyechnology Information* del Institut Nacional de la Salut d'USA (NIH) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), que es basa en les seqüències aminoacídiques deduides del genoma de diferents espècies animals del *GenBank* de la *National Library of Medicine*.

Les seqüències aminoacídiques del receptor de dopamina D2 de dos de les espècies que hem utilitzat en el nostre Treball de Recerca (humana i bovina) apareixen a continuació com a exemple:

HUMÀ *Homo sapiens* 443 aa

```
  1 MDPLNLSWYD DDLERQNWSR PFNGSDGKAD RPHYNYYATR LTLLIAVIVF GNVLVCMAVS
 61 REKALQTTTN YLIVSLAVAD LLVATLVMPW VVYLEVVGEW KFSRIHCDIF VTLDVMMCTA
121 SILNLCAISI DRYTAVAMPM LYNTRYSSKR RVTVMISIVW VLSFTISCPL LFGLNNADQN
181 ECIIANPAFV VYSSIVSFYV PFIVTLLVYI KIYIVLRRRR KRVNTKRSSR AFRAHLRAPL
241 KGNCTHPEDM KLCTVIMKSN GSFPVNRRRV EAARRAQELE MEMLSSTSPP ERTRYSPIPP
301 SHHQLTLPDP SHHGLHSTPD SPAKPEKNGH AKDHPKIAKI FEIQTMPNGK TRTSLKTMSR
361 RKLSQQKEKK ATQMLAIVLG VFIICWLPFF ITHILNIHCD CNIPPVLYSA FTWLGYVNSA
421 VNPIIYTTFN IEFRKAFLKI LHC
```

BOU *Bos taurus* 444 aa

```
  1 MDPLNLSWYD DDPESRNWSR PFNGSEGKAD RPPYNYYAML LTLLIFVIVF GNVLVCMAVS
 61 REKALQTTTN YLIVSLAVAD LLVATLVMPW VVYLEVVGEW KFSRIHCDIF VTLDVMMCTA
121 SILNLCAISI DRYTAVAMPM LYNTRYSSKR RVTVMIAIVW VLSFTISCPM LFGLNNTDQN
181 ECIIANPAFV VYSSIVSFYV PFIVTLLVYI KIYIVLRRRR KRVNTKRSSR AFRANLKAPL
241 KGNCTHPEDM KLCTVIMKSN GSFPVNRRRV EAARRAQELE MEMLSSTSPP ERTRYSPIPP
301 SHHQLTLPDP SHHGLHSTPD SPAKPEKNGH AKTVNPKIAK IFEIQSMPNG KTRTSLKTMS
361 RRKLSQQKEK KATQMLAIVL GVFIICWLPF FITHILNIHC DCNIPPVLYS AFTWLGYVNS
421 AVNPIIYTTF NIEFRKAFLK ILHC
```

El conjunt de totes les espècies animals on s'ha determinat (clonat) la seqüència del receptor de dopamina D2.

Emprant l'aplicació AlignX del *software* Vector NTI Suite 9.0.0 d'Informax es poden

alinear les seqüències aminoacídiques de les espècies que vulguem comparar i el programa determina la identitat d'aminoàcids entre dos o més espècies, la similitud bioquímica entre dos aminoàcids diferents, la falta total de relació entre aminoàcids disposats en la mateixa posició o la falta d'un o molts aminoàcids en una espècie respecte a una altra. Al final el programa dóna, també, el percentatge d'aminoàcids idèntics en una determinada posició entre les diferents espècies comparades i el percentatge d'aminoàcids conservats (idèntics + similars).

Un cop alineats tots els mamífers, observem que tenen un 90,5% d'identitat (99,8% d'aminoàcids conservats) el que ens suggereix que són prou similars per unir igual l'antagonista, però que el 9,5% d'aminoàcids diferents és suficient per donar apreciables diferències d'afinitat per l'agonista dopamina, tot i que no són canvis d'aminoàcids aparentment molt importants (són canvis conservats

Les seqüències d'aminoàcids dels receptors de dopamina D2 clonats dels diferents animals que apareixen al Treball de Recerca (pollastre, bou, humà i cavall) presenten un 72'2% d'identitat donat que la inclusió en aquesta anàlisi del pollastre introdueix major variabilitat en la seqüència d'aminoàcids, com es demostra també a la taula que els compara per parelles. Aquesta diferència podria ser l'explicació del perquè hem trobat unes afinitats pitjors tant per l'agonista com per l'antagonista en el pollastre respecte els mamífers. Si s'analitza, però, el percentatge d'homologia (aminoàcids idèntics més similars) entre aquelles quatre espècies és molt superior, un 99,6%, el que demostra que els canvis d'aminoàcids no poden ser molt dràstics ja que en cas contrari l'especificitat del receptor per la seva hormona es perdria.

Les seqüències dels receptors D2 clonats en diferents peixos i aus són bastant diferents a les dels mamífers. El baix percentatge d'identitat entre els receptors no només de pollastre sinó també de la resta d'aus i peixos respecte als mamífers, indicaria que els canvis d'aminoàcids que presenten aquells grups d'animals dificulten la unió de la hormona al receptor. Això es correspondria amb el fet que hem trobat nosaltres pitjors afinitats per la dopamina i per l'antagonista tant en pollastre com en tonyina i lluç, i podríem concloure que la seqüència d'aminoàcids dels receptors D2 de mamífers està més optimitzada evolutivament que la dels altres grups animals que hem analitzat.

7- CONCLUSIONS

♣ Pel que fa a la relació entre el contingut de proteïna i la espècie estudiada, no s'observen diferències apreciables en el contingut total de proteïna en l'estriat cerebral de les diferents espècies animals analitzades. Tanmateix amb la metodologia que hem emprat no podem comparar estrictament aquests valors entre espècies i dies diferents d'assaig amb la metodologia utilitzada ja que cada cop que s'agafa aleatòriament un fragment del residu de membranes congelades el contingut de proteïna és diferent si és superficial (més ric en lípids i menys en proteïnes) o si és un fragment del fons del residu (més ric en proteïna i menys en lípids).

♣ Respecte a la relació entre el contingut de receptor i la espècie estudiada, els valors del contingut de receptor de dopamina D2 obtinguts en els estriats de les diferents espècies de mamífers són molt semblants, mentre que són sensiblement superiors en pollastre i tonyina. Això pot ser degut a què es tracta de grups animals diferents (aus i peixos front a mamífers), encara que també podria ser fruit de la baixa saturació amb radiolligand que s'ha tingut en els experiments amb aquests animals, el que obliga a extrapolar massa el càlcul i pot introduir apreciables errors en la seva determinació.

♣ Quant a la relació entre l'afinitat del receptor pels seus antagonistes i l'espècie estudiada, els valors de l'afinitat (K_D) de l'antagonista YM-09151-2 del receptor de dopamina D2 obtinguts en les diferents espècies de mamífers són molt semblants, mentre que són molt superiors en pollastre i sobretot en tonyina. Això reflexa novament una diferència filogenètica entre els diferents grups d'animals (aus, peixos i mamífers). Els nostres resultats concorden amb la idea general de què la unió dels lligands antagonistes als receptors no és excessivament alterada per modificacions d'aquests receptors. Les diferències apreciables en l'afinitat trobada en pollastre i tonyina deuen reflectir unes diferències ja força acusades entre l'estructura del receptor d'aquestes espècies respecte la dels mamífers.

♣ En tots els casos el desplaçament realitzat per l'antagonista YM-09151-2 ha mostrat un únic salt. Això vol dir que aquest antagonista detecta i s'uneix a tots els receptors D2, estiguin o no acoblats a la proteïna G, amb la mateixa afinitat, és a dir, presenta una sola K_D.

♣ Utilitzant l'agonista dopamina hem obtingut, generalment, desplaçaments amb dos salts ja que els agonistes, com la dopamina, tenen 2 afinitats diferents pels GPCR, una més afí pels receptors quan es troben acoblats a proteïna G i l'altra menys afí, quan els receptors no estan acoblats a cap proteïna G. Les excepcions han estat els peixos ja

que tant en la tonyina com en el lluç, vam obtenir un desplaçament amb només un salt.

♣ Pel que fa a la relació entre l'afinitat del receptor per la dopamina i l'espècie estudiada, la K_D de l'estat d'alta afinitat (K_{DH}) de la dopamina en les diferents espècies es troba sempre en el rang nanomolar. En el pollastre vam obtenir la pitjor afinitat, mentre que la vaca presentava la millor. Els valors de K_{DH} de la dopamina obtinguts en les diferents espècies de mamífers són relativament diferents, essent el valor en humans el pitjor.

El valor de K_D de l'estat de baixa afinitat (K_{DL}) de la dopamina en les diferents espècies es troba sempre en el rang micromolar. Els valors obtinguts són força més variables que els de K_{DH}. Els valors obtinguts en pollastre i en humà han estat els més alts, mentre que el valor en la vaca ha estat el més baix.

♣ En conjunt, l'estriat boví és el que presenta millors afinitats per la dopamina en els dos estats i l'estriat humà és el pitjor entre els mamífers. L'afinitat de la dopamina en pollastre és també força dolenta, tot i que els resultats no són molt diferents dels obtinguts en estriat humà. Els peixos serien però els pitjors ja que no arriben a presentar l'estat d'alta afinitat. Caldria comprovar si aquesta pobra afinitat del receptor D2 d'estriat humà per la dopamina és un fet general o concret de les nostres mostres ja que s'hauria de controlar el temps *post-mortem*, l'edat dels pacients...

Els nostres resultats concorden amb la idea general de què la unió dels lligands agonistes als receptors és bastant alterada per modificacions d'aquests receptors; així, fins i tot els mamífers, que presenten una afinitat per l'YM-09151-2 gairebé idèntica, mostren afinitats molt diferents per la dopamina. Els valors d'afinitat més baixos obtinguts en pollastre i tonyina es podrien explicar ja que, generalment, quan un receptor té baixa afinitat pels seus lligands, s'expressa més en el teixit per contrarestar aquest efecte i donar una resposta fisiològica apreciable.

♣ Al comparar les seqüències d'aminoàcids dels receptors D2 conegudes en diferents espècies de mamífers, observem que presenten una gran homologia encara que no una identitat absoluta, el que ens suggereix que són prou similars per unir igual l'antagonista però que els aminoàcids diferents són suficients per donar apreciables diferències d'afinitat per l'agonista dopamina. A diferència, les seqüències del receptor D2 en peixos i aus són bastant diferents a les dels mamífers el que suggereix que els canvis d'aminoàcids que presenten aquests grups animals dificulten la unió de la hormona al receptor.

♣ Això ens permet concloure que l'espècie ideal per estudiar el receptor D2 quan no es disposa de mostra humana és un altre mamífer i entre els estudiats consideraríem millor la vaca perquè permet obtenir una gran quantitat de teixit, presenta un apreciable contingut de receptor i la seva afinitat per la dopamina és molt bona.

8- VALORACIÓ PERSONAL

Un cop acabat aquest Treball de Recerca puc assegurar que he après moltes coses i d'arees diverses. A part dels conceptes relacionats directament amb el treball, de Biologia i de Química he après a treballar en un laboratori, a fer experiments seguint unes pautes, a netejar el material, a analitzar les dades un cop obtingudes... també he descobert com les cèl·lules per mitjà de receptors i missatgers reben la informació necessària per dur a terme totes les seves funcions... Resulta increïble que puguem ser tan complexos! A més he treballat formules de cinemàtica de l'assignatura de Física per usar la centrífuga, he emprat diverses llengües, ja sigui el català per a la redacció del Treball de Recerca, o el castellà i fonamentalment l'anglès fent traduccions de revistes científiques i llibres de consulta.

El meu Treball de Recerca m'ha servit, a part de millorar els meus coneixements en gairebé totes les assignatures, per elaborar per primer cop un "Treball d'Investigació", buscar hipòtesis, cercar informació, realitzar el treball pràctic, analitzar les dades obtingudes, buscar conclusions, organitzar la informació, revisar dades, redacció,... Aquest sistema de treball només l'havia fet a petita, petitíssima escala. Estic segura que aquesta experiència i tot el que he après em servirà molt aviat, sobretot si agafo una carrera de ciències.

Com ja he dit anteriorment he après moltes coses i de molts vessants i aspectes diferents, però no totes han estat fàcils; hi ha coses que m'han costat molt,, entre elles la traducció de la informació de revistes científiques, que totes estan en anglès; canviar totes les anotacions que apareixien a les imatges al català... pot semblar fàcil, però és una veritable feina "de xinos"... m'hi vaig passar moltes hores... Més que el treball d'investigació i la realització dels experiments, el que més em va costar va ser el fet de relacionar la part teòrica cercada amb la pràctica, analitzar els resultats obtinguts, donar forma al treball relacionant tota la informació, escriure la bibliografia...

Per finalitzar puc afirmar que tot i l'esforç que m'ha suposat fer el Treball de Recerca, tot i les moltes hores que hi he dedicat, ha valgut la pena, ja que, personalment, treballar al laboratori analitzant aspectes de biologia humana ha resultat una experiència magnífica i m'ha obert nous horitzons.

En treballs futurs sobre aquest tema, caldria estudiar més classes de peixos, aus, amfibis i rèptils per veure si, com en els mamífers, entre ells no hi ha gaires variacions tan en resultats com en seqüències aminoacídiques. També caldria comprovar si aquesta pobra afinitat del receptor D2 d'estriat humà per la dopamina és real o fruit de la manipulació de la mostra o de l'edat dels pacients.

9- BIBLIOGRAFIA

ANGULO, E. (2004) *Nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas*. Tesi doctoral inèdita Universitat de Barcelona. Barcelona.

CARRIBA, P. (2006) *Heteromerización de receptores de adenosina A2a, dopamina D2 y cannabinoides CB1.Implicaciones farmacológicas y funcionales*. Tesi doctoral inèdita Universitat de Barcelona. Barcelona.

FOUILLIOUX, C, CONTRERAS, F, RIVERA, M (2004). *"Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas"*. *AVFT*, 23: 99-108.

GARCIA-SEVILLA, J.A. i PAZOS, A. (eds.) (2003). *Receptores para neurotransmisores*. Monografías de neurociencias. Ediciones en neurociencias. Barcelona

GEORGE, S.R., O'DOWD, B.F. AND LEE, S.P. (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery". *Nature Rev*. 30: 808-820.

Gilson guide to pipetting (1998). Gilson. Villiers-le-Bel, France.

GONZÁLEZ DE BUITRAGO, J.M. et al. (1998). *Bioquímica clínica*. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. Madrid

LEHNINGER, A. L. (2002). *Bioquímica*. Omega. Barcelona

MALEK D., MUNCH G. i PALM D. (1993). "Two sites in the third inner loop of the dopamine D2 receptor are involved in functional G protein-mediated coupling to adenylatecyclase". *FEBS Lett*. 325:215-219.

MARCELLINO, D. J. (2007). *Interactions between membrane receptors in the central nervous system*. Tesi doctoral inèdita. Universitat de Barcelona. Barcelona.

MARINISSEN, M. J. i J. S- GUTKIND (2001). "G-Protein- coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*."* *Trends Pharmacol* Sci 22 (7): 368-76.

MATHEWS, C.K., van HOLDE, K.E. i AHERN, K.G. (2002). *Bioquímica*. Addison Wesley. Harlow. England.

MILLIGAN, G. i KOSTENIS, E. (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British J. Pharmacol.* 147: S46-S55.

MISSALE, C., NASH, S.R., ROBINSON, S.W., JABER, M. AND CARON, M.G. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function*"*. *Physiol*. *Rev*. 78: 189-225.

Protein Assay Reagent. BCA. Instructions (1989). Pierce, Rockford, IL.

Rotors, Trubes & Accessories for Beckman Preparative Ultracentrifugues (1990). Beckman Instruments, Palo Alto, CA.

INFORMACIÓ TELEMÀTICA

- Angel Herráez. Universitat d'Alcalà Biolodel: páginas de complemento al estudio de Bioquímica y Biología Molecular, (On Line).

Direcció URL: http://biomodel.uah.es/

- Prof. John L.Giannini, Biology Department, St.Olaf College, Northfield, MN., EE.UU Biological Animations, (On Line).

Direcció URL: http://www.stolaf.edu/people/giannini/biological%20anamations.html

- Lundbeck Institute.Explorador cerebral-control neurológico-neurotransmisores, (On Line).

Direcció URL: http://es.brainexplorer.org/neurological_control/

- ADERIS Farmaceuticals. Science technology, (On Line).

Direcció URL: http://www.aderis.com/science/receptors.htm

- Wikimedia. Acethylcholine receptor, (On Line).

Direcció URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Acethylcholine_receptor.png

- Sasaoka, Toshikuni LABORATORY OF NEUROCHEMISTRY, (On Line).

Direcció URL: http://www.nibb.ac.jp/annual_report/2004/240.html

- IUPHAR. IUPHAR RECEPTOR DATABASE, (On Line).

Direcció URL: http://www.iuphar-db.org/index.jsp

- GEODON. Bases moleculares del tratamiento antipsicótico, (On Line).

Direcció URL: http://www.cuentospintados.com/portfolio/geodon/centro_enf/art3c.htm

- Department of Chemistry at Emory University. Introduction to Structure and Kinetics of Monoamine Transporters, (On Line).

Direcció URL: http://www.chemistry.emory.edu/justice/research/reviewof.htm

- UNNE. Receptores, (On Line).

Direcció URL: http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimicaanterior/receptor.htm

- U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health. PubMed Home, (On Line).

Direcció URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

10- AGRAÏMENTS

Sens dubte la consecució d'aquest Treball de Recerca no hauria estat possible sense la base que m'han donat aquests darrers 6 anys a l'Institut Berenguer d'Entença. Encara recordo les primeres pràctiques que vam fer a l'arribar amb les professores d'experimentals Joana Escoda i Eva Baila; era el primer cop que entrava en un laboratori i gràcies a aquells petits experiments vaig adonar-me que realment m'agradava la ciència, el treball experimental.

A part de tots aquests coneixements adquirits en l'àmbit del laboratori, tots els conceptes bàsics que apareixen al treball haguessin estat incomprensibles si no hagués estat per les classes de biologia que vaig començar a primer de batxillerat amb la meva professora, i tutora del Treball de Recerca, Roser Mas. A les seves classes vaig descobrir per primer cop el concepte de receptors cel·lulars i això, i el fet que el meu pare treballés amb receptors a la Universitat, em va acabar de despertar l'interès i la curiositat que em va fer decidir estudiar aquest tema.

A part d'agrair l'esforç i dedicació de la meva tutora del centre, també l'he d'agrair al meu tutor de la Universitat de Barcelona, el catedràtic Antoni Cortés, per haver-me ofert la possibilitat de fer els experiments d'aquest treball als laboratoris del Grup de Neurobiologia Molecular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Facultat de Biologia) de la Universitat de Barcelona i del CIBERNED, per haver-me ajudat en tot moment, haver-me resolt dubtes en la part teòrica, haver-me ensenyat la part pràctica i haver-me ajudat a l'hora de realitzar l'anàlisi de les dades obtingudes.

He de donar les gràcies és al Dr. J. Javier Meana del Departament de Farmacolgia, de la Universitat del País Basc *(CIBERSAM)* per haver-nos facilitat les mostres de teixit humà emprades en aquest treball

També he d'agrair al meu pare el fet d'haver-me orientat en la realització del treball, d'haver-me resolt dubtes, explicat tot allò que no entenia i d'haver-me ajudat quan estava encallada i no sabia com continuar.

Una altra persona a qui hauria d'agrair el seu ajut és a la meva mare ja que em va ajudar en tot moment en els meus dubtes sobre qüestions lingüístiques.

Sense totes aquestes persones i sense els amics que sempre estaven disposats a sentir els *rollos* sobre el Treball de Recerca, aquells amics amb qui em recolzava quan em pensava que no l'acabava i amb qui ens animàvem mútuament per seguir endavant, sense tots ells, aquestes pàgines no haurien pogut ser escrites. GRÀCIES