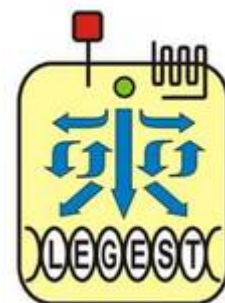


Studie van de interactie tussen de dopamine D2-type receptoren en de μ -opioïd receptor

Gabrielle VAN DER ECKEN

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de Biochemie en de Biotechnologie
Major Biomedische biotechnologie
Academiejaar 2011-2012

Promotoren: Dr. Kathleen Van Craenenbroeck en Prof. dr. Guy Haegeman
Wetenschappelijk begeleiders: Drs. Jolien Duchou en Béatrice Lintermans
Vakgroep Fysiologie
LEGEST (Lab for Eukaryotic Gene Expression & Signal Transduction)



Dankwoord

Gedurende vier maanden kreeg ik de mogelijkheid om mijn kennis en praktische ervaring te testen en bij te schaven in het labo van Prof. Dr. Haegeman. Hiervoor, bedankt!

Graag had ik ook Dr. Kathleen Van Craenenbroeck bedankt voor de vele correcte aantekeningen en de goede begeleiding. Daarbovenop heeft ze veel tijd uitgetrokken om mijn thesis na te lezen en de nodige verbeteringen aan te brengen. Mijn dank gaat ook uit naar Béatrice Lintermans, Kamilla Skieterska, Dorien Clarisse en alle collegas van LEGEST. Zij slaagden erin om een aangename werksfeer te creëren en stonden paraat om mijn vele vragen te beantwoorden.

Als laatste wil ik me toch even speciaal richten tot Jolien Duchou. Zij stond mij bij van begin tot einde. Ook al had ze zelf zoveel werk, ik kon steeds bij haar terecht met mijn duizenden vragen.

1. Table of Contents

| | |
|--------------------|-----|
| Dankwoord..... | ii |
| Afkortingen | v |
| Samenvatting | vii |
| Summary | vii |

INLEIDING

| | |
|---|-----------|
| 1.GPCR's | 2 |
| 1.1. Inleiding | 2 |
| 1.2. Structuur en classificatie | 2 |
| 1.3. Signalisatie | 3 |
| 1.4. G-eiwit gereguleerde signalisatiewegen..... | 5 |
| 1.4.1. Adenylyl cyclase | 5 |
| 1.4.2. Fosfolipase C..... | 6 |
| 1.4.3. ERK1/2 signalisatie..... | 6 |
| 1.5. Negatieve regulatie van GPCR signalisatie | 7 |
| 1.5.1. Heterologe en homologe desensitisatie | 7 |
| 1.5.2. Sequestratie..... | 8 |
| 2.Dopamine receptoren | 9 |
| 2.1. Inleiding | 9 |
| 2.2. D2-type receptoren | 10 |
| 2.2.1. D2 receptor (D2R) | 10 |
| 2.2.2. D4 receptor (D4R) | 10 |
| 3.Opioïd receptoren..... | 12 |
| 3.1. Inleiding | 12 |
| 3.2. μ-opioïd receptor (MOR) | 12 |
| 4.Oligomerisatie van GPCR's | 14 |
| 4.1. Inleiding | 14 |
| 4.2. Interactie tussen GPCR's | 14 |
| 4.3. Functie | 14 |
| 4.3.1. Opvouwing..... | 14 |
| 4.3.2. Signalisatie | 15 |
| 4.4. D4R-MOR dimerisatie | 15 |

DOELSTELLING

| | |
|---|-----------|
| 1.Algemeen | 18 |
| 2.Directe interactie | 18 |
| 3.Functie..... | 18 |
| 4.Indirecte interactie | 19 |
| 5.Conclusie | 19 |
| 6.Personen die hebben bijgedragen tot de resultaten en de gebruikte materialen | 20 |

RESULTATEN

| | |
|---|-----------|
| 1.Directe interactie | 22 |
| 1.1. De rol van de IC3-lus van D4R op de D4R-MOR dimerisatie | 22 |
| 1.1.1. Coimmunoprecipitatiestudie | 22 |
| 1.1.2. GST 'pull-down' assay | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2. Productie van Rluc-vectoren voor BRET-assay..... | 27 |
| 1.3. Onderzoek naar de dimerisatie tussen D2R-splicevarianten en MOR via verschillende biochemische technieken..... | 30 |
| 1.1. D2R internalisatie na agonist-stimulatie | 34 |
| 2.Functie..... | 36 |
| 2.1. Gevolgen van D4.2R-MOR dimerisatie op ERK1/2-fosforylatie | 36 |
| 2.2. Desensitiseringsassay..... | 38 |
| 3.Indirecte interactie | 41 |
| 3.1. Indirecte gevolgen van de D2-type receptor-MOR interactie..... | 41 |

DISCUSSIE

| | |
|------------------------------|----|
| 1.Algemeen | 44 |
| 2.Directe interactie | 44 |
| 3.Functie..... | 47 |
| 4.Indirecte interactie | 47 |
| 5.Conclusie | 48 |

MATERIAAL EN METHODEN

| | |
|---|----|
| 1.Weefselcultuur | 50 |
| 2.Fusieproteïnen en expressievectoren..... | 50 |
| 3.Klonering voor productie van BRET-vector | 50 |
| 4.Transiënte transfectie | 50 |
| 5.Immunoprecipitatie | 51 |
| 5.1. Coimmunoprecipitatie | 51 |
| 5.2. Membraanimmunoprecipitatie..... | 51 |
| 6.GST pull-down assay | 52 |
| 7.MAPK-fosforylatie en desensitiserings assay | 52 |
| 8.Western Blot analyse | 52 |
| 9.Immunofluorescentie..... | 53 |
| 10.Kwantitatieve PCR (QPCR): primer test | 53 |

REFERENTIES

BIJLAGEN

Afkortingen

| | |
|------------------|---|
| AC | Adenylyl cyclase |
| ADHD | Attention-deficit hyperactivity disorder |
| AKAP | cAMP-afhankelijke kinase-verankerde eiwitten |
| AP2 | Clathrine-adaptor |
| ATP | Adenosinetrifosfaat |
| BCA | Bicinchoninic acid |
| BRET | Bioluminescentie resonantie energie transfer |
| cAMP | Cyclisch adenosinemonofosfaat |
| CCK1R | Cholecystokine receptor |
| CCP | Clathrin-coated pit |
| CHO-cellen | Chinese hamster ovary cellen |
| CMV | Cytomegalovirus |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| D1R-D5R | Dopamine D1-D5 receptor |
| D2LR | Lange splicevariant van D2R |
| D2SR | Korte splicevariant van D2R |
| DA | Dopamine; 3-hydroxytyramine |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAMGO | [D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkephalin |
| DOR | δ-opioïd receptor |
| EC | Extracellulaire lus van GPCR |
| ER | Endoplasmatisch reticulum |
| ERK | extracellulaire signaal-regulerende kinasen = p44/p42 |
| GAP | GTPase activeringseiwit |
| GEF | Guanine nucleotide exchange factor |
| GFP | Green fluorescent protein |
| G-eiwit | Guanine nucleotide-bindend eiwit |
| GIRK | G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels |
| GPCR: | G-eiwit gekoppelde receptoren |
| GRK | GPCR kinasen |
| HEK293 | Human Embryonic Kidney 293 cells |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IB | Immunoblotting |
| IC | Intracellulaire lus van GPCR |
| IP | Immunoprecipitatie |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trifosfaat |
| KOR | κ-opioïd receptor |
| MAPK | Mitogen-geactiveerde proteïne kinase |
| MEK | MAPK/ERK kinase |
| MOR | μ-opioïd receptor |
| OPRM1 | Gen coderend voor MOR |
| PDGFR | Platelet derived growth factor receptor |
| PIP ₂ | Fosfadylinositol 4,5-bifosfaat |
| PKA | Proteïne kinase A |

| | |
|------|---|
| PKC | Proteïne kinase C |
| PLC | Fosfolipase C |
| QP | Quinpirole |
| QPCR | Kwantitatieve polymerase ketting reactie |
| RGS | Regulator van G-eiwit signalisatie |
| RIPA | Radioimmunoprecipitatie |
| Rluc | Renilla luciferase |
| RTK | Receptor tyrosine kinasen |
| SVM | Serum vrij medium |
| TM | Transmembranair domein van GPCR |
| VNTR | Variabel aantal tandem herhalingen; D4R-polymorfisme in IC3 |
| YFP | Yellow fluorescent protein |

Samenvatting

G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCR) zijn de grootste familie membraan gelokaliseerde receptoren. Hoewel er vroeger gedacht werd dat deze receptoren als monomeer aan de membraan voorkwamen, wordt nu algemeen aanvaard dat de meerderheid van deze transmembranaire eiwitten quaternaire structuren vormen, heteromeren genoemd. Stimulatie van zo een heteromeer kan leiden tot verschillende signalisatie en ligandbinding in vergelijking met deze van de monomeren. Recente studies hebben aangetoond dat leden van de dopamine D2-type receptoren (oa. Dopamine D4 receptor (D4R) en dopamine D2 receptor (D2R)) interageren met de μ -opioid receptor (MOR). In deze studie worden de eerste stappen gezet naar het achterhalen van de receptordomeinen betrokken bij deze dimerisatie en de functie van deze interactie. Ook de indirecte gevolgen van deze receptor-receptor interactie werden nader onderzocht. Via verschillende coprecipitatie technieken en door gebruik te maken van verschillende D4R-mutanten werd achterhaald dat de positief geladen regio's in de derde intracellulaire lus van D2-type receptoren een negatieve invloed hebben op de receptordimerisatie. Langdurige receptorstimulatie zorgt voor desensitisatie van de receptoren zoals blijkt uit ERK1/2-fosforylatieassays. Daarentegen werd geen additief- of inhiberend effect op ERK1/2-fosforylatie indien beide receptoren samen gestimuleerd werden.

Summary

G-protein coupled receptors (GPCR) are the biggest family of membrane located receptors. Although it used to be thought that these receptors existed as monomers, it is now generally accepted that these transmembrane signalling proteins form quaternary structures, called heteromers. Stimulation of such a heteromer will lead to novel and distinct pharmacology and mechanisms of regulation as opposed to these of the monomer. Recent studies have shown that members of the dopamine D2-type receptors (eg. Dopamine D4 receptor (D4R) en dopamine D2 receptor (D2R)) interact with the μ -opioid receptor (MOR). In this study the first steps are taken towards elucidating the receptor domains that are involved in the dimerization and the function of the interaction. Also indirect interactions between both of these receptors were investigated. Through different coprecipitation techniques and by using different D4R-mutants, we found that positively charged regions in the third intracellular loop of D2-type receptors have a negative effect on the receptor dimerization. Also when the receptors are induced for a long period of time we could see that desensitisation took place. This was measured by looking at the ERK1/2-phosphorylation potential of receptors after they underwent long agonist stimulation. Both homologous as well as heterologous desensitisation was observed for both D4R and MOR. On the other hand neither an additive nor an inhibiting effect on ERK1/2-fosforylation was observed when both receptors were stimulated together.

INLEIDING

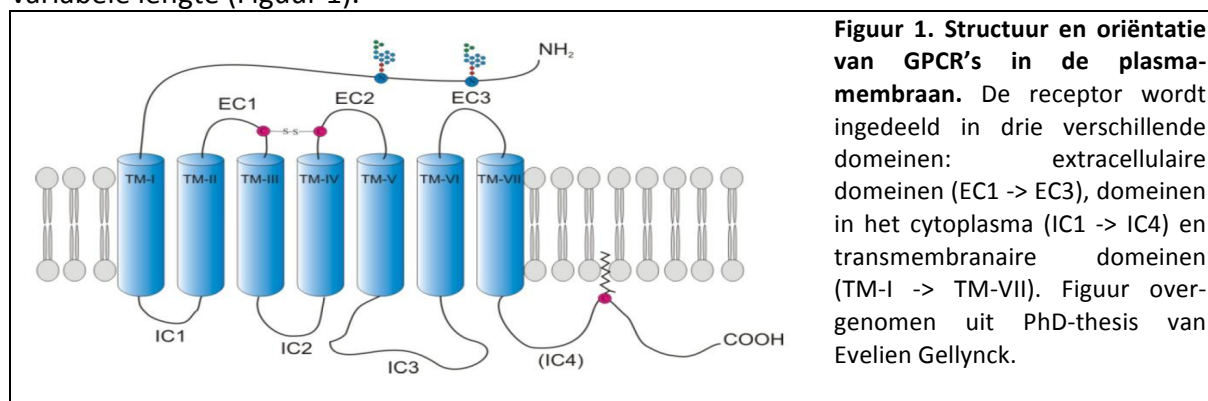
1. GPCR's

1.1. Inleiding

Multicellulaire organismen coördineren moleculaire processen en reacties door hun cellen onderling met elkaar, en met de omgeving, te laten communiceren op verschillende manieren. Neuronen maken gebruik van elektrische impulsen, andere cellen staan direct met elkaar in contact via kleine kanalen ('gap-junctions') maar de meest gebruikte manier om onderling te communiceren gaat via receptoren gelegen aan de plasmamembraan. Signalen van buiten de cel kunnen zo ontvangen en geïnterpreteerd worden via receptoren aan de plasmamembraan. Deze receptoren kunnen onderverdeeld worden in verschillende groepen waarvan de guanine nucleotide-bindend eiwit (G-eiwit)-gekoppelde receptoren, of kortweg GPCR's, de meest bestudeerde groep is. GPCR's vormen de grootste familie celoppervlakte gelocaliseerde receptoren die gecodeerd worden in het humaan genoom. Ze bevatten meer dan duizend leden, coderen voor meer dan 1% van het totaal genoom en kunnen tot 5% van alle proteïnen aanwezig in één bepaalde cel vertegenwoordigen (Luttrell, 2008). GPCR's zijn betrokken bij heel veel processen in het lichaam waaronder celproliferatie, differentiatie, groei en apoptose maar ook neurotransmissie. Ze zijn dan ook in staat om veel verschillende signalen te herkennen gaande van hormonen tot eiwitten, ionen en zelfs fotonen. Verstoring van deze receptoren en hun signalisatie kan dus leiden tot heel veel verschillende ziekten en symptomen. Meer dan 30% van alle farmaceutische producten richten zich specifiek op het beïnvloeden van slecht werkende GPCR's en meer dan 50% beïnvloeden hun functie. Daar staat tegenover dat de meerderheid van deze therapieën zich slechts op een klein percentage verschillende GPCR's focust (Fredholm et al, 2007). Het achterhalen van welk ligand bindt, en wat de functie van zogenoemde 'wees'-receptoren is, zou dus tot nieuwe therapieën kunnen leiden die zich richten op andere GPCR's.

1.2. Structuur en classificatie

GPCR's vertonen een sterk geconserveerde structuur alhoewel ze slechts weinig sequentiesimilariteit vertonen. Er zijn twee hoofdvoorwaarden die voldaan moeten worden om eiwitten in te delen bij de GPCR's. Eerst en vooral moet het eiwit opgebouwd zijn uit zeven transmembranaire domeinen. Dit zijn sterk hydrofobe regio's, van vergelijkbare lengte met een alfa-helix structuur, die ervoor zorgen dat de receptor zich in hydrofobe membranen kunnen verankeren. Ten tweede moet het in staat zijn om te interageren met een G-eiwit, alhoewel deze interactie nog niet werd bevestigd voor vele receptoren die toch worden geclassificeerd bij de GPCR's (Fredriksson et al, 2003). De transmembranaire domeinen worden afgewisseld door hydrofiele intra- en extracellulaire (IC en EC) lussen van variabele lengte (Figuur 1).



Liganden interageren met extracellulair gelegen domeinen zoals de N-terminale staart¹, EC-lussen en/of groeven tussen de TM-domeinen, terwijl intracellulaire domeinen zoals het C-terminaal domein² en IC-lussen interageren met intracellulaire signalisatie partners. EC1 en EC2 kunnen met elkaar verbonden worden door een zwavelbrug die, onder andere teruggevonden wordt bij dopamine receptoren. GPCR's ondergaan ook posttranslationele modificaties. De belangrijkste zijn: fosforylaties, ubiquitinatie, N-glycosylatie van de N-terminale staart en palmitoylatie van de C-terminus. N-terminale glycosylaties worden bijvoorbeeld geassocieerd met endoplasmatisch reticulum (ER)-kwaliteitscontrole en membraanlokalisering. De derde intracellulaire lus (IC3-lus) van de receptor bepaalt het ermee geassocieerde G-eiwit, en aldus ook de respons. De specificiteit en de toxinegevoeligheid van de G-eiwitten worden bepaald door de G_{α} -subeenheid.

Binnen de GPCR's bestaat er heel weinig sequentie-homologie en eiwitten worden dan ook op structurele kenmerken (zie hoger) ingedeeld in deze familie. Een significante sequentie homologie wordt echter wel teruggevonden binnen de verschillende subfamilies (A-F) waarin ze ingedeeld worden (Kolakowski, 1994). De subfamilie A, die zowel de dopamine receptoren als de opioïd receptoren bevat, bestaat uit de rhodopsine/ $\beta 2$ adrenerge receptor-type receptoren en is de grootste en meest bestudeerde groep binnen de GPCR's. Deze groep kan nog eens ingedeeld worden in zes subgroepen. Homology binnen deze groep is niet zo groot en beperkt zich tot een aantal essentiële residuen. De hoge graad aan conservatie binnen deze residuen zou kunnen verwijzen naar een belangrijke functie in het behouden van de structuur en/of functie van de receptoren. Het enige motief dat voorkomt in alle leden van deze groep is het arginine in het DRY-motief³ (Probst et al, 1992). Recenter werd een ander classificatiesysteem voorgesteld waarin GPCR's ingedeeld worden in vijf families die de GRAFS (Glutamaat, Rhodopsin, Adhesion, Frizzed/taste2 en Secretin) genoemd worden (Fredriksson et al, 2003). Deze indeling wordt echter heel zelden gebruikt.

1.3. Signalisatie

Uit de omgeving krijgen cellen verschillende signalen te verwerken. GPCR's vormen een heel belangrijke verbindingsweg tussen uiteenlopende extracellulaire liganden en de hieraan gekoppelde intracellulaire signalisatiewegen. Door interactie van een ligand met de GPCR zal de receptor een conformationele verandering ondergaan. Dit zorgt ervoor dat de receptor zal binden aan G-eiwitten die intracellulair gebonden is aan de plasmamembraan. G-eiwitten zijn trimere eiwitten bestaande uit een G_{α} -subeenheid en een functionele $G_{\beta\gamma}$ -monomeer, die enkel dissocieert na denaturatie. De geactiveerde receptor werkt nu als GEF ('guanine nucleotide exchange factor') en promoot de dissociatie van GDP ⁴ van G_{α} . Deze zal snel vervangen worden door GTP ⁴ die in veel hogere concentraties voorkomt in de cel. Het hydrofoob domein, dat G_{α} - GDP in staat stelt om te interageren met $G_{\beta\gamma}$, verdwijnt in de GTP -gebonden vorm waardoor de affiniteit tussen beide sterk daalt (Cabrera-Vera et al, 2003). De inwisseling van deze ribonucleotiden zorgt dus voor twee dissociaties: het $G_{\alpha}G_{\beta\gamma}$ -complex komt los van de receptor en G_{α} dissocieert van $G_{\beta\gamma}$. Zowel G_{α} als $G_{\beta\gamma}$ zijn nu actief en kunnen verschillende intracellulaire signaalwegen beïnvloeden (Figuur 2). G_{α} bepaalt de

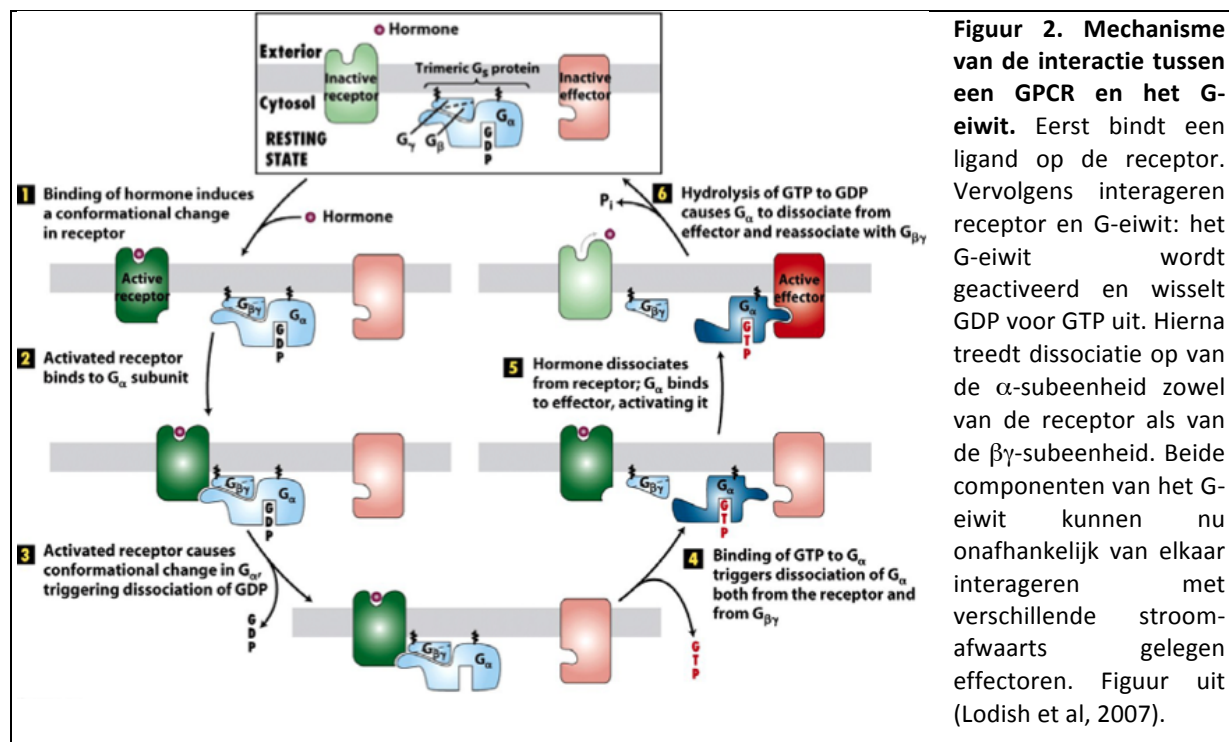
¹ N-terminale staart: NH_2 , amino terminus van DNA

² C-terminale domein: $COOH$, carboxy terminus van DNA

³ DRY = Asp-Arg-Tyr

⁴ GDP = Guanine difosfaat; GTP = Guanine trifosfaat

duur van de signalisatie en blijft in actieve GTP-gebonden vorm tot GTP-hydrolyse optreedt door zijn eigen intrinsieke GTPase activiteit. GDP-gebonden G_α associeert nu opnieuw met $G_{\beta\gamma}$ en de signalisatie stopt (Luttrell, 2008). De GTPase activiteit van G_α kan door sommige effectoren beïnvloed worden en dus zo ook de duur van signalisatie reguleren. Andere moleculen die de 'regulators van de G-signalisatie' (RGS) genoemd worden zijn in staat om de GTPase activiteit van G-eiwitten te doen toenemen en doen dus dienst als 'GTPase activerings-eiwitten', ook wel GAP genoemd (Cabrera-Vera et al, 2003; Pierce et al, 2002).



G-eiwitten zijn geen integraal membraaneiwitten maar zijn verankerd in de plasmamembraan via een prenylatie-modificatie op het C-terminaal domein van de G_γ -subeenheid (Oldham & Hamm, 2008). Bij het activeren van één soort GPCR zal het slechts interageren met één enkel type G-eiwit (Dohlman et al, 1991; Gudermann et al, 1996; Hedin et al, 1993; Raymond, 1995; Savarese & Fraser, 1992). Er bestaan veel verschillende soorten G-eiwitten die, al zijn deze structureel heel gelijkaardig, toch verschillende signaalwegen kunnen activeren. Ze worden onderverdeeld in vier groepen gebaseerd op het type G_α waarmee ze interageren (Tabel 1) (Cabrera-Vera et al, 2003; Pierce et al, 2002).

| G_α | Effector | Sec. boodschapper | Receptor |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| $G_{\alpha s}$ | Adenylyl cyclase | cAMP ↑ | β -Adrenerge, glucagon, serotonine, vasopressine receptor |
| $G_{\alpha i/o}$ | Adenylyl cyclase, fosfolipase C | cAMP ↓ IP ₃ , DAG ↑ | α_2 -Adrenerge, dopamine D4, μ -opioïd receptor |
| $G_{\alpha q/11}$ | Fosfolipase C | IP ₃ , DAG ↑ | α_1 -Adrenerge receptor |
| $G_{\alpha 12}$ | Rho-GEF | Rho-GTP ↑ | CCK1R, M3 |

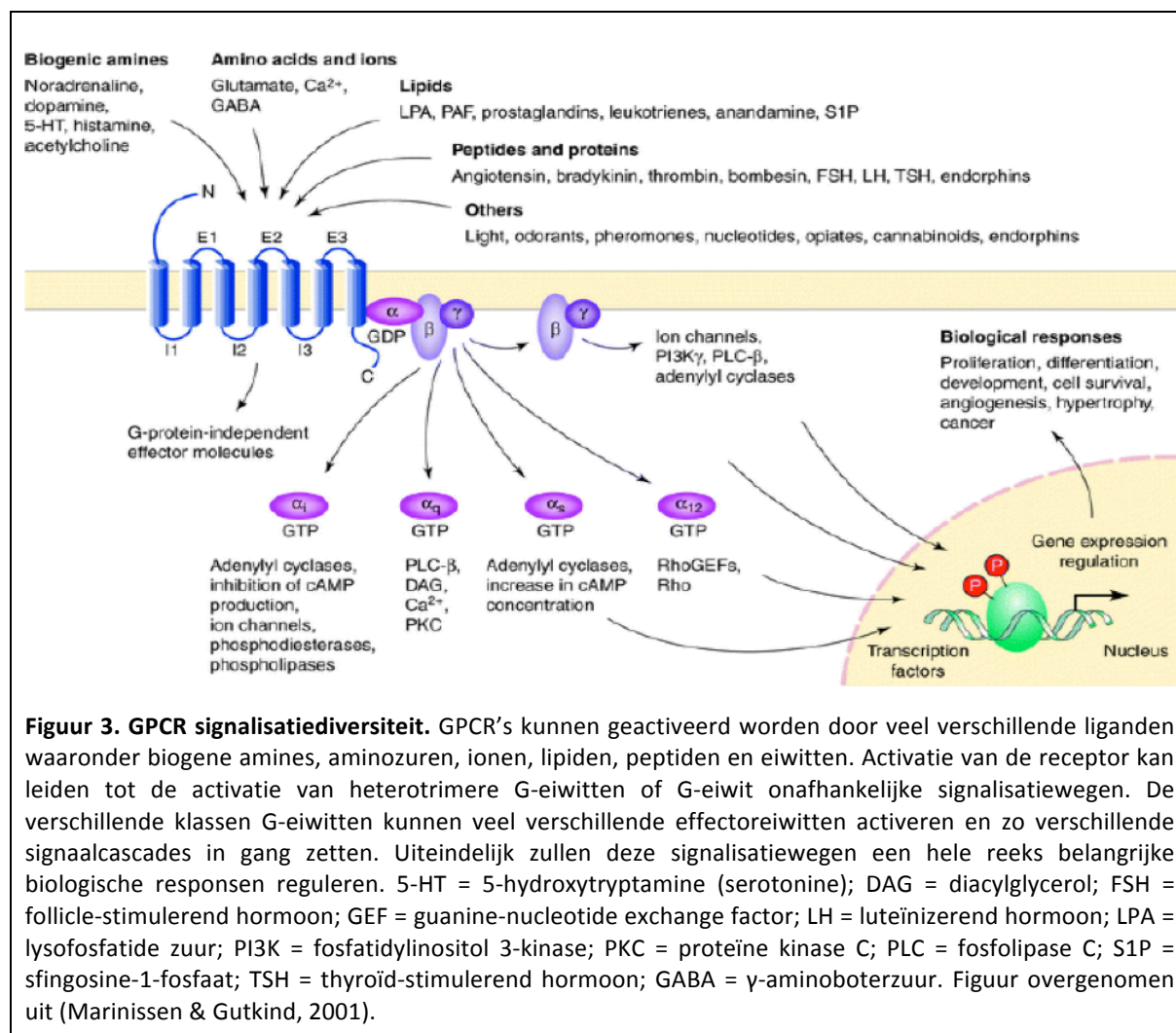
Tabel 1. Overzicht van de vier families trimere G-eiwitten. IP₃ = inositol 1,4,5-trifosfaat; DAG = 1,2-diacylglycerol; CCK1R= Cholecystokine receptor; M3 = M3 muscarinic acetylcholine receptor. (Tabel overgenomen, vertaald en aangepast uit (Cabrera-Vera et al, 2003; Hermans, 2003; Lodish et al, 2007).

Het $G_{\beta\gamma}$ -dimeer kan interageren met vele membraangelokaliseerde of -gerekruteerde effectoren gaande van CCK1R tot ionkanalen. Zestien genen coderen voor G_α -subeenheden, vijf voor G_β en twaalf voor G_γ . In vitro kunnen G_β -subeenheden dimeriseren met bijna alle

G γ -subeenheden, wat suggereert dat ook *in vivo* verschillende combinaties voorkomen (Schmidt et al, 1992). Recenter werd aangetoond dat de samenstelling van dit dimeer de efficiëntie van effectoractivatie zou kunnen beïnvloeden (Cabrera-Vera et al, 2003).

1.4. G-eiwit geregeerde signalisatiewegen

Bij binding van een ligand aan een GPCR aan de plasmamembraan van de cel wordt een signalisatiecascade in gang gezet. G-eiwitten worden geactiveerd door binding van GTP met de G α -subeenheid en het trimeer dissocieert. Zowel G α als G $\beta\gamma$ kunnen nu verschillende signalisatiewegen en effectoren activeren. Een overzicht van al die signalisatiewegen is voorgesteld in Figuur 3.



Figuur 3. GPCR signalisatiediversiteit. GPCR's kunnen geactiveerd worden door veel verschillende liganden waaronder biogene aminen, aminozuren, ionen, lipiden, peptiden en eiwitten. Activatie van de receptor kan leiden tot de activatie van heterotrimerie G-eiwitten of G-eiwit onafhankelijke signalisatiewegen. De verschillende klassen G-eiwitten kunnen veel verschillende effectoreiwitten activeren en zo verschillende signaal cascades in gang zetten. Uiteindelijk zullen deze signalisatiewegen een hele reeks belangrijke biologische responsen reguleren. 5-HT = 5-hydroxytryptamine (serotonine); DAG = diacylglycerol; FSH = follicle-stimulerend hormoon; GEF = guanine-nucleotide exchange factor; LH = luteïniserend hormoon; LPA = lysofosfatide zuur; PI3K = fosfatidylinositol 3-kinase; PKC = proteïne kinase C; PLC = fosfolipase C; S1P = sfingosine-1-fosfaat; TSH = thyroïd-stimulerend hormoon; GABA = γ -aminoboterzuur. Figuur overgenomen uit (Marinissen & Gutkind, 2001).

1.4.1. Adenylyl cyclase

Adenylyl cyclases (AC) ondergaan tegenovergestelde regulatie afhankelijk van welk type G α -eiwit ermee interageert. Zo wordt dit enzym geactiveerd door G_s en geïnhibeerd door G_i (zie ook Tabel 1). Het actief enzym katalyseert de vorming van intracellulair cAMP (3',5'-cyclisch adenosine monofosfaat) uit ATP. cAMP is een belangrijke secundaire boodschapper die onder andere cAMP-afhankelijke proteïne kinase A (PKA) kan activeren. Op zijn beurt fosforyleert PKA een hele reeks substraateiwitten. PKA heeft een brede substraat specificiteit en moet signalen afkomstig van verschillende AC's interpreteren die op hun beurt geactiveerd kunnen worden door verschillende GPCR's. Tien verschillende isovormen

van AC zijn tot nu toe bekend met een verschillende weefselverdeling en ze worden verschillend gereguleerd door G-eiwitten (Hur & Kim, 2002; Sunahara & Taussig, 2002). Ze bezitten een gemeenschappelijke structuur bestaande uit twaalf membraanoverspannende transmembranaire domeinen. De substraatspecificiteit van PKA zou deels verklaard kunnen worden door cAMP-afhankelijke kinase-verankerde eiwitten (AKAP's). Dit zijn eiwitten die zich zowel aan PKA als aan andere eiwitten kan verankeren en zo een multi-component signalisatiecomplex vormen (Han et al, 2002; Pierce et al, 2002).

1.4.2. Fosfolipase C

Een tweede effector van Gq/11 en Gi/o gekoppelde receptoren is het fosfolipase C (PLC). Er bestaan vier klassen PLC's ($\beta, \gamma, \delta, \epsilon$) die het membraanverankerde fosfolipide fosfadylinositol 4,5-bifosfaat (PIP₂) kunnen hydrolyseren. Hierbij worden twee secundaire boodschappers gevormd: inositol-1,4,5-trifosfaat (IP₃) en diacylglycerol (DAG). IP₃ induceert de export van calcium uit het ER naar het cytoplasma via calciumkanalen (Wilcox et al, 1998) en DAG kan, samen met calcium, de activiteit van verschillende isovormen van proteïne kinase C (PKC) reguleren (Pierce et al, 2002). Verder kan IP₃ gefosforyleerd worden tot IP₄ wat de influx van calcium via calciumkanalen in de plasmamembraan activeert. Calcium is een belangrijke secundaire boodschapper die veel verschillende processen in de cel kan beïnvloeden. Daarom kunnen GPCR's de calciumconcentratie ook beïnvloeden via een hele reeks andere mechanismen zoals: directe modulatie van voltage-gereguleerde calciumkanalen, indirecte signaalwegen door hyperpolarisatie van kaliumkanalen of door het activeren van plasmamembraan-gebonden calcium-ATPasen (Pangalos, 2002).

1.4.3. ERK1/2 signalisatie

De mitogen-geactiveerde proteïne kinasen (MAPK's) vormen een sterk geconserveerde familie van eiwitkinasen en zijn van groot belang in de overdracht van vele signalen van het celoppervlak naar de kern, met effecten op transcriptie en translatie. Vele GPCR's zijn in staat om de MAPK signalisatieweg te activeren. Dit is een belangrijke regulatieweg voor celdifferentiatie, proliferatie, overleving en apoptose. Via deze weg worden drie opeenvolgende kinasen gefosforyleerd die op hun beurt het volgende component uit de cascade fosforyleren. Drie klassen MAPK's worden teruggevonden bij de mens: de extracellulaire signaal-regulerende kinasen (ERK), c-Jun N-terminaal kinasen/stress-geactiveerde proteïne kinasen (JNK/SAPK) en de p38/HOG1 MAPK's. Elke klasse kan geactiveerd worden door GPCR's op twee manieren, ofwel via het G-eiwit ofwel via β -arrestine. Omdat de ERK1/2 signalisatieweg (ook gekend onder de naam p44^{MAPK} en p42^{MAPK}) de meest bestudeerde is zal verder voornamelijk deze signalisatiewegen besproken worden.

In de ERK1/2 cascade wordt opeenvolgend Raf, MAPK/ERK kinase (MEK) en ERK gefosforyleerd. Raf wordt gerekruteerd naar de plasmamembraan en gefosforyleerd door kleine G-eiwitten zoals Ras, Rap-1 en CDC42. Geactiveerd Raf kan dan MEK1 en MEK2 fosforyleren op twee serine residuen. Gefosforyleerde MEK1/2 fosforyleren dan op hun beurt ERK1 en ERK2 op een tyrosine en een threonine residu in het TEY-motief. Zo worden respectievelijk het pERK1/2 MAPK gevormd. Actief ERK1/2 is in staat om veel verschillende substraten te fosforyleren zowel in het cytoplasma als in de nucleus (Chen et al, 2001).

G α i kan de ERK1/2 cascade activeren door het onderdrukken van twee inhibitiewegen. Zoals eerder vermeld kan G α i AC inhiberen wat zorgt voor lagere concentraties cAMP en zo ook lagere PKA-activiteit. Omdat PKA inhiberend kan werken op Raf zorgt dit voor een activatie

van de ERK1/2 signalisatieweg (Radhika & Dhanasekaran, 2001). Anderzijds kunnen sommige G α i-GTP specifieke Rap-1 GTPase activerende proteïnen naar de plasmamembraan rekruteren waar de GTPase activiteit van Rap-1 versneld wordt en het dus zo sneller naar zijn inactieve vorm wordt omzet. Rap-1-GDP komt los van Raf, waarna Raf nu vrij is om te associëren met Ras. Ras zorgt voor Raf fosforylatie en de MAPK cascade is geactiveerd. Gekoppelde receptoren induceren de G $\beta\gamma$ -subeenheid om MAPK te activeren in een PKC-onafhankelijke en een Ras-afhankelijke manier (Hur & Kim, 2002; Marinissen & Gutkind, 2001). Het mechanisme via welke dit gebeurt blijkt verschillend te zijn afhankelijk van welke GPCR betrokken zijn en in welk celtype het bestudeerd wordt (Della Rocca et al, 1997).

In inactieve cellen wordt ERK1/2 in het cytosol gehouden door associatie met MEK1/2 dat een nucleus export sequentie bevat. Na fosforylatie van ERK1/2 door MEK1/2 dissocieert het ERK-MEK complex zich van elkaar. Hierdoor is ERK1/2 nu vrij om naar de nucleus te gaan (Adachi et al, 1999). Zowel β -arrestine, G α - als G $\beta\gamma$ -complexen kunnen de activiteit van ERK1/2 moduleren (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007). β -arrestine binding op GPCR in de afwezigheid van G-eiwitactivatie kan voldoende en noodzakelijk zijn voor ERK1/2-activatie.

Zoals eerder vermeld kan ERK1/2 vele substraten fosforyleren gaande van nucleaire transcriptiefactoren tot membraan, cytosolaire en cytoskelet substraten. De substraatspecificiteit van dit kinase wordt dan ook bepaald door zowel de locatie in welke het zich bevindt als de duur in welke ze geactiveerd is. Eens in de nucleus zal ERK1/2 snel gedesactiveerd worden door defosforylatie-enzymen die afwezig zijn in het cytoplasma, waar ERK1/2 langer actief is. Afhangelijk van de signalisatieweg zal actief-ERK1/2 eerder gesequestreerd worden naar het cytosol of eerder migreren naar de nucleus. Dat kan leiden tot verschillende, soms wel tegenovergestelde, resultaten. GPCR's kunnen ook ERK activeren via G-eiwit afhankelijke transactivatie van sommige receptor tyrosine kinasen (RTK's) zoals de 'platelet derived growth factor receptor' (PDGFR).

1.5. Negatieve regulatie van GPCR signalisatie

Er bestaan verschillende mechanismen om de signaaltransductie, dat in gang wordt gezet bij ligandbinding op de receptor, stop te zetten. Receptor desensitisatie, sequestratie en transcriptie kunnen op veel verschillende manieren geactiveerd worden gaande van secundaire boodschapper inactivatie tot rekruteren van moleculen zoals β -arrestine die ontkoppeling van receptor en G-eiwit induceren. Dit is van belang om overstimulatie tegen te gaan en ervoor te zorgen dat de receptor snel weer op nieuwe signalen kan reageren.

1.5.1. Heterologe en homologe desensitisatie

Al heel snel na receptoractivatie kunnen serine en threonine residuen in alle intracellulaire delen van de receptor gefosforyleerd worden door kinasen die afhankelijk zijn van secundaire boodschappers (Pitcher et al, 1992). Hierdoor zal de receptor ontkoppelen van het G-eiwit waarmee het geassocieerd is, wat desensitisatie genoemd wordt. Er kan een onderscheid gemaakt worden tussen twee soorten desensitisatie.

Heterologe desensitisatie kan plaatsvinden in afwezigheid van agonistbinding op de receptor. Door het in gang zetten van één signalisatieweg via één bepaalde GPCR kunnen specifieke kinasen, zoals PKA en PKC, geactiveerd worden. Deze kunnen dan in een feedback mechanisme verschillende GPCR-types fosforyleren wat zorgt voor desensitisatie van de GPCR. Kinasen geactiveerd door één type receptor kunnen dan zo een andere type receptor inactiveren (Freedman & Lefkowitz, 1996).

Homologe desensitisatie, ook wel agonist-specifieke desensitisatie genoemd, vindt enkel plaats bij ligandgebonden receptoren. Deze worden gefosforyleerd aan de derde intracellulaire lus (IC3) door specifieke GPCR kinasen (GRK). Fosforylatie op zich zorgt niet voor desensitisatie van de receptor maar arrestines worden nu naar de receptor gerekruteerd en zullen op hun beurt zorgen voor de ont koppeling van de receptor en het ermee geassocieerd G-eiwit (Lohse et al, 1992). Er zijn zeven GRKs gekend waarvan twee enkel in de retina tot expressie komen (GRK1 en GRK7) en de andere (GRK2-GRK6) in heel het lichaam (Stoffel et al, 1997). Ze kunnen allen binden aan de membraan via hun C-terminaal domein wat van belang is voor hun functie.

1.5.2. Sequestratie

Sequestratie of internalisatie van de receptor is een proces dat zorgt voor het herlokaliseren van de receptor weg van de plasmamembraan. Meestal gebeurt dit via het clathrine mechanisme waarbij dit eiwit een soort mantel vormt rond vesikels die het doelwit-eiwit naar andere cellulaire locaties brengt. Dit proces wordt gestuurd door β -arrestine dat fungeert als adaptoreiwit. Het kan zowel op de gefosforyleerde receptor als op clathrine en de clathrine-adaptor (AP2) binden. Dynamine speelt ook een belangrijke rol in dit proces. Het is een groot GTPase dat zorgt voor de loskoppeling van vesikels van de membraan (Wolfe & Trejo, 2007). Clathrin-adaptor eiwitten kunnen binden op specifieke receptor motieven, gefosforyleerde receptoren of geubiquitineerde receptoren. Meestal is echter receptorfosforylatie gevolgd door β -arrestine binding noodzakelijk voor endocytose van de receptor. Constitutieve internalisatie van sommige GPCR's, onafhankelijk van fosforylatie of β -arrestine interactie, werd ook al aangetoond. Er wordt echter beweerd dat dit op een andere soort endocytose mechanisme berust. Andere observaties hebben ook aangetoond dat homologe GPCR subtypes via verschillende endocytose mechanismen in parallel zouden kunnen geïnternaliseerd worden in dezelfde cel zoals werd aangetoond voor de D1 en D2 receptor (Vickery & von Zastrow, 1999).

Het lot van een geïnternaliseerde receptor is divers. De receptoren die naar grote endosomen gestuurd worden kunnen gerecycleerd worden naar de membraan of gedegradeerd worden in lysosomen. Retentie van de receptoren in intracellulaire membranen zonder afbraak kan leiden tot langdurige desensitisatie zonder daling in receptorconcentratie. Bij langdurige receptoractivatie observeert men echter wel een daling in het aantal receptoren aanwezig in de cel. Dit proces leidt tot attenuatie van de signaaltransductie en kan slechts traag of gedeeltelijk hersteld worden. Dit proces blijkt een rol te spelen in het tolerantiemechanisme dat ontstaat voor sommige neuropsychiatrische medicatie in neuronen waarbij langdurige toediening van een bepaald middel na enige tijd aan doeltreffendheid zal verliezen (Roth et al, 1998).

2. Dopamine receptoren

2.1. Inleiding

Dopamine (3-hydroxytyramine, DA) is een neurotransmitter behorende tot de groep van catecholamines en is een metaboliet van het aminozuur tyrosine (Carlsson et al, 1957). Via biochemisch onderzoek werd aangetoond dat dopamine in staat is adenylylcyclasen te stimuleren wat op het bestaan van dopamine receptoren wijst (Kebabian & Greengard, 1971). Later werd deze receptor ingedeeld bij de GPCR superfamilie. Dopamine is een traag werkende neurotransmitter dat geen simpele activerende of inhiberende functie uitvoert maar eerder een modulerend effect heeft in het centraal zenuwstelsel. Het kan binden op vijf verschillende subtypes dopaminereceptoren (D1R-D5R) (Bunzow et al, 1988; Van Tol et al, 1991), behorende tot twee subfamilies. De dopamine D1-type receptor en de D2-type receptor subfamilies (Andersen et al, 1990; Civelli et al, 1993; Niznik & Van Tol, 1992; Sibley et al, 1992; Sokoloff et al, 1992; Vallone et al, 2000). Oorspronkelijk was deze indeling gebaseerd op hun vermogen om met verschillende types G-eiwitten te binden. D1-type receptoren (D1R en D5R) associëren met AC stimulerende G α s-eiwitten en de D2-type receptoren (D2R, D3R, D4R) binden met G α i-eiwitten die cAMP productie inhiberen. Deze twee groepen dopamine receptoren verschillen niet enkel in biochemische karakteristieken maar ook in sequentiesimilariteit, functionaliteit, ligandbindingscapaciteit en evolutionaire oorsprong. Zo behoren ze ook tot twee verschillende gen-families. De D1-type receptoren bevatten, zoals de meeste GPCR's, geen intronen in hun coderende sequentie. Terwijl de genen coderend voor D2-type receptor wel intronen bevatten wat hen in staat stelt voor verschillende receptorvarianten te coderen.

Alle receptorsubtypes vertonen een N-terminaal domein van vergelijkbare lengte met een variabel aantal plaatsen waar N-glycosylatie kan plaatsvinden. Grotere verschillen tussen de twee subtypes worden echter teruggevonden in het C-terminaal domein. Dit deel van de receptor is zeven maal langer bij de D1-type receptoren en bevat een geconserveerd cysteïneresidu-regio, waarvan werd aangetoond dat het wordt gepalmitoyleerd en zorgt voor membraanverankering van het C-terminaal domein, aan het begin van deze sequentie. In D2-type receptoren bevindt deze palmitoylatie-regio zich op het uiteinde van het C-terminaal domein (Grunewald et al, 1996). Een disulfidebrug tussen twee andere cysteïneresiduen in EC2 en EC3 aanwezig in alle dopamine receptoren (evenals de meeste GPCR's) heeft als functie om de receptorstructuur te stabiliseren (Dohlman et al, 1990). Een ander groot verschil tussen beide types dopaminereceptoren bevindt zich in het feit dat de D2-type receptoren een veel langere IC3 bevatten dan dat van D1-type receptoren.

Dopamine is actief in verschillende hersenregios waaronder deze die motorfunctie, motivatie en het endocriensysteem regelen. Dit monoamine speelt ook een belangrijke rol in het beloningssysteem en stimuleert het aanleren van nieuw gedrag (Girault & Greengard, 2004). De ontregeling van dit mechanisme kan leiden tot verschillende pathologische condities waaronder de meest bekende de ziekte van Parkinson (Ehringer & Hornykiewicz, 1960), schizofrenie (Carlsson et al, 2001; Creese et al, 1976; Seeman et al, 1976; Snyder et al, 1970) en 'Attention-Deficit Hyperactivity Disorder' (ADHD) (Gizer et al, 2009; Swanson et al, 2007).

2.2. D2-type receptoren

Analyse van de D2-type receptorstructuur vertoont een aanzienlijk percentage homologie ter hoogte van hun transmembranaire domeinen tussen de verschillende subtypes: 75% homology tussen D2R en D3R, en 58% homology tussen D2R en D4R (Civelli et al, 1993). D2R bevat vier potentiële glycosilatie sites in hun N-terminaal domein, D3R bevat er drie en de D4R bevat er slechts één (Missale et al, 1998). D2-type receptoren spelen een rol in mitogenese en celdifferentiatie via de MAPK signaalcascade. Er blijkt echter nog verwarring te bestaan over het feit of deze receptoren een positieve of een negatieve invloed hebben op mitogenese. Dit blijkt afhankelijk te zijn van de cellijn waarin dit onderzocht werd (Lajiness et al, 1993; Missale et al, 1998; Narkar et al, 2001). Nog andere studies tonen aan dat ERK activatie via verschillende signalisatiewegen gebeurt, afhankelijk van het celtype (Oak et al, 2001; Wang et al, 2005).

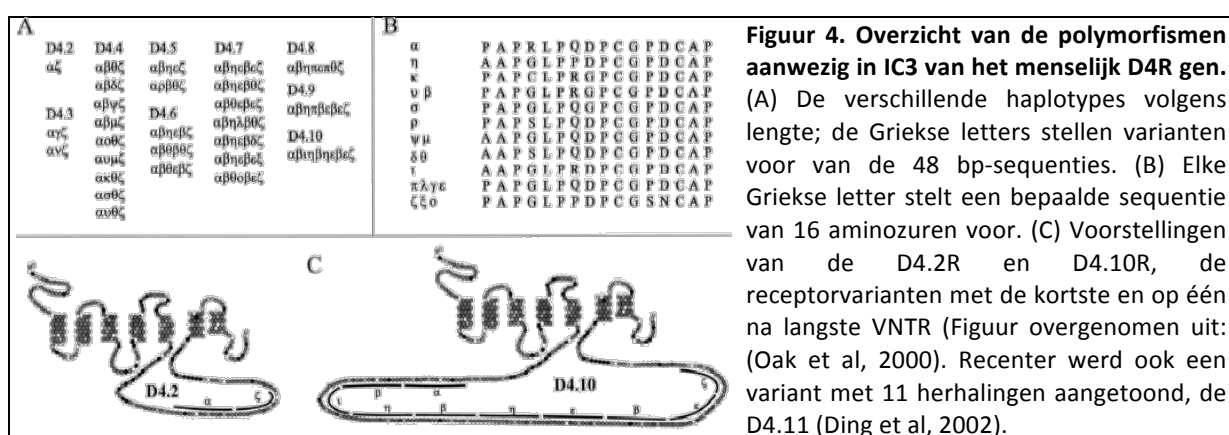
2.2.1. D2 receptor (D2R)

D2R was de eerste dopamine receptor die gekloneerd werd en ingedeeld werd in de GPCR superfamilie (Bunzow et al, 1988). D2R behoort tot de D2-types receptoren en hun genen bevatten dus intronen wat hen in staat stelt om voor verschillende receptorvarianten te kunnen coderen. Zo wordt er door alternatieve splicing twee hoofdvarianten van deze receptor gevormd van verschillende lengte: de lange (D2LR) en de korte (D2SR) (Giros et al, 1989). De D2L receptor bevat een insertie van 29 aminozuren in het IC3 domein. Omdat dit domein belangrijk wordt geacht voor de interactie tussen receptor en G-eiwit zou dit kunnen wijzen op functionele diversiteit tussen beide splicevarianten. Deze receptoren worden naar verschillende neurale compartimenten gestuurd en dragen bij tot verschillende aspecten van de dopamine signalisatie (Lane et al, 2008; Lindgren et al, 2003). Over internalisatie van deze receptoren na agonist-stimulatie bestaat er nog onduidelijkheid, sommige artikels beweren dat er steeds internalisatie plaatsvindt (Kim et al, 2001; Vickery & von Zastrow, 1999); (Spooren et al, 2010), terwijl andere beweren dat dit enkel onder specifieke omstandigheden plaatsvindt zoals na dimerisatie met de D1R of in aanwezigheid van GRK2 (Iwata et al, 1999; So et al, 2005). Deze bevindingen zijn ook celtype afhankelijk en extra onderzoek hieromtrent is nodig. Dimerisatie van deze receptoren werd geobserveerd (Zawarynski et al, 1998) en er wordt gesuggereerd dat de minimale signalisatie-eenheid van deze receptor uit twee receptoren en een G-eiwit bestaat (Han et al, 2009). Ook heterodimerisatie van deze receptor met verschillende andere types receptoren werd aangetoond waaronder de D3R (Scarselli et al, 2001), D1R (So et al, 2005) en niet-dopamine receptoren zoals de adenosine A2A receptor (Hillion et al, 2002).

2.2.2. D4 receptor (D4R)

D4R maakt het deel uit van de D2-type dopaminereceptoren en is één van de minst bestudeerde subtypes dopamine receptoren. Het gen coderend voor de D4R is gelegen op chromosoom 11 (11q15.5) en bevat een groot aantal polymorfismen waarvan de belangrijkste gelegen is in het derde exon wat codeert voor de IC3 (Van Tol et al, 1992). Dit polymorfisme bestaat uit een variabel aantal tandem herhalingen (VNTR). Dit is een 48 basepaar herhalingssequentie dat codeert voor 16 aminozuren die tussen de twee en elf keer herhaald kunnen worden. De varianten worden aangeduid van D4.2R tot D4.11R (Oak et al, 2000). De drie meest voorkomende polymorfe varianten zijn D4.4R (64%), D4.7R (21%) en D4.2R (8%) en de verdeling van deze varianten verschilt afhankelijk van de populatie waarin ze onderzocht worden (Ding et al, 2002). De gerepeteerde eenheid verschilt in

sequentie en er zijn tot nu toe 18 verschillende haplotypes gekarakteriseerd, die worden aangeduid met een Griekse letter (Figuur 4). In eenzelfde gen kunnen dus verschillende herhaalde eenheden voorkomen. De eerste en laatste eenheid zijn echter sterk geconserveerd (Asghari et al, 1994; Lichter et al, 1993; Van Tol et al, 1992). Er is een significante correlatie gevonden tussen het D4.7 receptor allel (DRD4 met 7 herhalingssequenties) en de ontwikkeling van ADHD (Faraone et al, 2001). Biochemische en farmacologische studies hebben aangetoond dat D4R slechts op één plaats geglycosyleerd kan worden op zijn N-terminale staart en dat deze glycosylatie niet bijdraagt tot de receptorlokalisatie in de cel of ligandbinding (Lanau et al, 1997; Missale et al, 1998; Van Craenenbroeck, 2005). Andere posttranslationele modificaties op de D4R zijn twee constitutief gefosforyleerd serine-residuen in de IC3-lus (Spooren et al, 2010).



Alhoewel de D4R in veel lagere hoeveelheden in de hersenen tot expressie komen dan de D2R, werd D4R-expressie aangetoond in diverse hersenregio's waaronder de cerebrale cortex, amygdala, hippocampus en het striatum (Callier et al, 2003). Ook bestaat er een significante overlap in distributie tussen de D4R en de D2R wat kan verwijzen naar een redundantie in functie tussen beide receptorsubtypes (Rondou et al, 2010). Ook in de retina en in regio's buiten het centraal zenuwstelsel, zoals hart, lymfocyten en nieren, werd D4R expressie aangetoond (Bondy et al, 1996; Matsumoto et al, 1995; O'Malley et al, 1992; Rivera et al, 2002; Seamans & Yang, 2004; Sun et al, 1998).

D4R zijn in staat om ERK1/2 te stimuleren in CHO cellen (Oak et al, 2001). Recenter werd er ook aangetoond dat intracellulair PDGFβ receptoren getransactiveerd kunnen worden door D4R (Gill et al, 2010). Door transactivatie van de PDGFβ receptor grijpt autofosforylatie van deze receptor plaats in een proces dat afhankelijk is van de βγ-subeenheid. D4R-siginaaltransductie heeft ook invloed op de calciumconcentratie in de cel. Verschillende mechanismen van calciumregulatie werden aangetoond in verschillende celtypen en deze stijging in calciumconcentratie kan vele gevolgen hebben op andere cellulaire processen zoals glutaminerge transmissie (Herve et al, 1993; Lane et al, 2008). Naast de regulatie van calciumkanalen kan D4R ook interageren met GIRK ('G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels⁵), een belangrijke regulator in neuronale reactiviteit (Lavine et al, 2002; Pillai et al, 1998; Werner et al, 1996). De opening van GIRK zorgt voor een tragere neuronale signaaltransductie, en interactie met de D4R werd aangetoond in *Xenopus* oocyten (Wedemeyer et al, 2007).

⁵ GIRK= G-eiwit gekoppelde kalium kanalen = Kir3

De D4R vertoont resistentie voor agonist-geïnduceerde internalisatie waarbij proline-rijke domeinen in de IC3-lus een rol blijken te spelen (Spooren et al, 2010). Deze regio's interageren met moleculen die een SH3-domein bevatten, zoals β -arrestine2, en indien ze allen gedeleteerd worden ondergaan de receptoren constitutieve internalisatie (Oldenhof et al, 1998). Andere karakteristieken van deze D4R-deletiemutanten is dat ze nog steeds in staat zijn om te interageren met dopamine en G-eiwitten maar niet meer met AC.

3. Opioïd receptoren

3.1. Inleiding

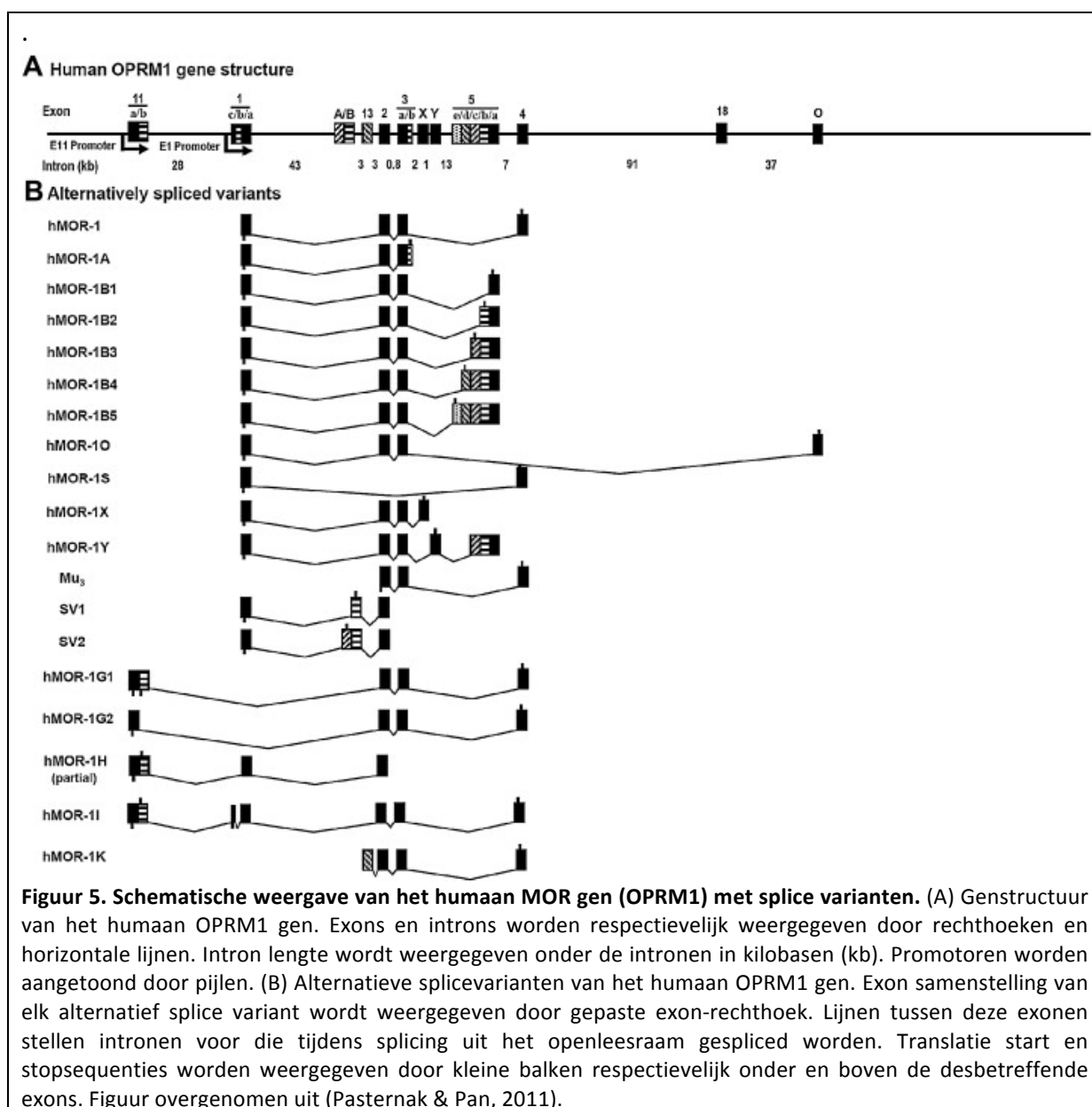
Opiaten zijn de meest gebruikte klasse pijnstillers. Door aanhoudend gebruik daalt hun efficiëntie na enige tijd, dit fenomeen wordt tolerantie genoemd. Hierdoor zijn artsen genoodzaakt steeds hogere concentraties medicatie voor te schrijven aan hun patiënten zodat deze hetzelfde pijnstillend effect zouden waarnemen. De meeste van deze pijnstillers binden specifiek op de μ -opioïd receptor (MOR) en hebben een heel lage affiniteit voor de twee andere opioïd receptoren aanwezig in het lichaam: de δ - en de κ -opioïd receptoren (DOR en KOR) (Kosterlitz & Leslie, 1978; Lord et al, 1977; Martin et al, 1976).

Onderzoek op deze receptoren gebeurt meestal door gebruik te maken van een synthetisch opioïd peptide [D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol]-enkephalin of kortweg, DAMGO. Het werd gesynthesiseerd als een biologische stabiele analoog van twee opioïd receptor agonisten met een preferentie voor DOR: leu- en met-enkefaline (Handa et al, 1981). DAMGO wordt echter ook beschouwd als een volwaardige MOR-agonist (McPherson et al, 2010). Enkel MOR (niet DOR of KOR) speelt een rol in analgesia en tolerantie geïnduceerd door morfine (Matthes et al, 1996). Verder onderzoek verwijst echter eerder op een coöperatieffect, eerder dan directe interactie, tussen DOR en MOR expresserende neuronen (Matthes et al, 1998). Fysische interactie tussen deze receptoren werd echter ook aangetoond en deze dimeren zouden farmaceutische eigenschappen vertonen die verschillen van de overeenstemmende monomeren (Fan et al, 2005).

3.2. μ -opioïd receptor (MOR)

Het is al lang geweten dat patiënten een heel variabele respons kunnen hebben op drugs die op MOR binden (Payne, 1992). Dit werd voor het eerst geobserveerd na farmacologisch onderzoek die meer dan één klasse MOR suggereerde. Deze observaties zijn nu bevestigd na het ontdekken van verschillende MOR-varianten. MOR werd voor het eerst gekloneerd in 1993 (Chen et al, 1993; Eppler et al, 1993; Thompson et al, 1993; Wang et al, 1993), waarna snel verschillende MOR-1 splice varianten geïdentificeerd werden. Dit toonde het begin van de complexiteit van het MOR-gen aan (Bare et al, 1994; Zimprich et al, 1995). MOR-1 alternatieve splicing werd in verschillende species aangetoond. Meerdere splicevarianten werden geobserveerd in knaagdieren (Kvam et al, 2004; Narita et al, 2003; Pan et al, 1999; Pan et al, 2000; Pasternak et al, 2004) en de mens (Pan et al, 2005; Pan et al, 2003) (Figuur 5). MOR-splicevarianten kunnen in twee categorieën ingedeeld worden gebaseerd op hun promotorsequentie. Het gen coderend voor MOR-1 is complex met twee verschillende promotoren. De hoofdpromotor is geassocieerd met exon 1 (Liang et al, 1995; Mayer et al, 1996) en produceert volledige receptoren bestaande uit zeven transmembranaire domeinen. Structureel verschillen deze receptoren enkel ter hoogte van hun C-terminale staart. De splicing heeft weinig effect op de ligand-bindingscapaciteit van deze receptoren maar kleine structurele verschillen hebben wel een inpakt op het activatiepotentiaal van

opiaten op de verschillende splicevarianten. De tweede promotor associeert met exon 11 (Pan et al, 2001; Xu et al, 2009). Deze receptoren hebben een unieke structuur met slechts zes transmembranaire domeinen. Ook deze receptoren zijn farmacologisch van groot belang. MOR komen voornamelijk tot expressie in het striatum maar ook in de neocortex, de thalamus, de hippocampus en de amygdala (Besse et al, 1990).



Veel pijnstillers werken door het moduleren van de μ -opioïd receptor respons. Activatie van opioïd receptoren door morfine leidt tot inhibitie van adenylylcyclase activiteit, MAPK fosforylatie, activatie van kalium-stroom en inhibitie van calciumkanalen. Na activatie zal de opioïd receptor desensitiseren en internaliseren (Narita et al, 2006) (zie INLEIDING 1.6). Dit kan leiden tot receptorafbraak. Deze neerregulatie kan ook door andere factoren geregeld worden, zoals stimulatie van andere GPCR's en activatie van PKA.

4. Oligomerisatie van GPCR's

4.1. Inleiding

Recente studies hebben aangetoond dat GPCR's niet enkel als monomeren functioneren maar dat oligomerisatie, met andere GPCR's, vereist is om hun functie uit te voeren (Angers et al, 2002; Devi, 2001; Fotiadis et al, 2003; Milligan, 2007; Milligan, 2009b). Hoewel hun bestaan algemeen aanvaard wordt is het belang van deze interactie nog onbekend voor de meeste van deze oligomeren. Conformationele veranderingen binnen een dimeer, in de aan- of afwezigheid van liganden, kunnen horizontaal doorgegeven worden via het receptor-receptor raakvlak. Dit allosterisch mechanisme verandert vele aspecten van GPCR-signalisatie waaronder ligandbindingscapaciteit, receptorinternalisatie en intracellulaire signaaltransductie. Dit toont het belang aan van het samen bestuderen van deze receptoren. De ontdekking dat GPCR's kunnen oligomeriseren geeft een heel nieuwe targetgroep voor drugsontwikkeling. Drie aspecten van GPCR functie tonen deze mogelijkheid aan. Ten eerste kunnen oligomeer-specifieke liganden ontwikkeld worden. Ten tweede kunnen GPCR heterodimeren specifiek verschillende signaalwegen in gang zetten dan homodimeren. Ten derde is de expressie van GPCR's in verschillende cellen heel variabel waardoor heterodimeren een mogelijkheid bieden tot het verbeteren van weefsel-specificiteit voor weefsel- of zelfs celspecifieke therapieën. Dit zou dus kunnen leiden tot het ontstaan van bivalente drugs waarbij twee verschillende receptorspecifieke liganden gescheiden worden door een linker sequentie van variabele lengte (Milligan, 2009a).

4.2. Interactie tussen GPCR's

Voor de meeste GPCR's is er evidentie gevonden dat dimerisatie voornamelijk plaatsvindt ter hoogte van transmembranaire domeinen (Vohra et al, 2007). Anderzijds werd er ook aangetoond dat er elektrostatische interacties plaatsvinden tussen sterk geconserveerde arginine-rijke gebieden in de IC3-lus voor verschillende dopaminereceptoren. Dit basismotief zou dan interageren met een gefosforyleerd domein in een adenosinereceptor (Ciruela et al, 2004). Het arginine-fosfaat interactiemotief, dat gereguleerd wordt door (de)fosforylatie, zou een algemeen mechanisme kunnen zijn in receptor-receptor dimerisatie (Woods & Ferre, 2005). Cross-linking experimenten tonen aan dat, de structureel aan D4R verwante D2R bij ligandbinding een conformationele verandering in TM-IV (Figuur 1) ondergaat (Guo et al, 2005).

4.3. Functie

4.3.1. Opvouwing

Het ontstaan van oligomeren vormt een belangrijke stap in het ER-kwaliteitscontrole waarbij slecht opgevouwen receptoren het ER niet kunnen verlaten en later afgebroken worden via het proteasoom. Een belangrijke stap in ER-receptorbiogenese is de vorming van oligomeren omdat dit de retentiesequenties of hydrofobe domeinen kan maskeren die er anders voor zorgen dat de receptoren in het ER blijven. Verschillende studies tonen aan dat er GPCR-dimerisatie plaatsvindt in het ER, zoals voor de GABA-B1R en GABA-B2R⁶ waarbij oligomerisatie noodzakelijk is voor de vorming van functionele receptoren (Galvez et al, 2001). Dit werd bijvoorbeeld ook aangetoond voor de dopamine D3R-dimeren waarbij

⁶ GABA-R= γ -aminoboterzuur receptor

splice-varianten, die niet in staat waren om te dimeriseren, niet teruggevonden werden op de plasmamembraan (Karpa et al, 2000). Al deze data versterken de hypothese dat dimerisatie, in vroege stadia van de receptorontwikkeling, de biogenese en opvouwing van receptoren beïnvloedt. Extra bewijs voor deze theorie werd geleverd door Van Craenenbroeck et al., in 2011 bij het uitvoeren van drie onafhankelijke experimenten (Van Craenenbroeck et al, 2011). Immunofluorescentie, BRET (bioluminescentie resonantie energie transfer) en coimmunoprecipitatie data toonden aan dat heterodimerisatie van receptoren een chaperon-effect zou kunnen hebben op receptoropvouwing.

4.3.2. Signalisatie

GPCR-dimeren vertonen een verschillende signaaltransductie dan indien beide receptoren apart voorkomen aan de plasmamembraan. Obligatoire dimerisatie voor signaaltransductie werd nog maar aangetoond voor een paar receptoren, zoals de smaakreceptoren (Nelson et al, 2001). Het is geweten dat dimerisatie van GPCR een verandering in signaaltransductiekenmerken teweegbrengt bij co-expressie van de receptoren. Voorbeelden hiervan zijn de dimerisatie van DOR en MOR (Gomes et al, 2000) of chemokine receptoren CCR5-CCR2 (Mellado et al, 2001). Heterodimerisatie zou ook de G-eiwit selectiviteit van receptoren beïnvloeden zoals aangetoond voor MOR-DOR dimeren. Co-expressie van deze receptoren zorgt voor een verlies in de capaciteit om te interageren met het Gi-eiwit (George et al, 2002). Agonist-gestimuleerde internalisatie van receptoren gebeurt voor sommige GPCR enkel in de aanwezigheid van dimeren zoals werd aangetoond voor de D1R-D2R dimerisatie (So et al, 2005). Cross-antagonisme tussen heterodimere receptoren werd ook aangetoond door indirecte technieken zoals het analyseren van MAPK-fosforylatie na stimulatie of inhibitie van receptoren (Carriba et al, 2007; Ferrada et al, 2009; Moreno et al, 2011; Navarro et al, 2010). Alhoewel deze technieken werden gebruikt voor het valideren van de aanwezigheid van dimeren op de plasmamembraan zou het ook kunnen dat deze variatie in fosforylatie een gevolg is van een interactie die verder in de signaaltransductieweg plaatsvindt.

4.4. D4R-MOR dimerisatie

De D4R hetero- en homodimeriseert met zichzelf, zowel op de plasmamembraan als in het ER wat zou kunnen wijzen op de rol van dimerisatie in receptor biogenese en maturatie (Van Craenenbroeck et al, 2011).

MOR kan zowel homodimeriseren, als heterodimeriseren met DOR (Gomes et al, 2000). Hiernaast werd ook aangetoond dat MOR kunnen dimeriseren met niet-opioïd receptoren zoals CB1-R, ORL1, NK1 of de chemokine 5 receptor (Rios et al, 2001). De rol van dimerisatie in maturatie en receptorlokalisatie werd ook gesuggereerd voor verschillende GPCR's waaronder de MOR (Rozenfeld & Devi, 2007).

In het striatum werd aangetoond dat de D2-type receptor-MOR interactie transcriptiefactoren kan moduleren (Gago et al, 2011). Er werd aangetoond dat D4R agoniststimulatie in striosomen zorgt voor een daling in MOR-detectie (Gago et al, 2007). Het bewijs voor de specificiteit van dit experiment werd geleverd voor D4R-antagonist binding waarna een inhibitie in MOR-neerregulatie werd waargenomen. Daarentegen hadden inductie en inhibitie met D2/D3 agonisten en antagonist geen effecten op MOR-immunoreactiviteit. Een daling in MOR-immunoreactiviteit in striosomen zou kunnen wijzen op het feit dat D4R activatie, MOR-expressie inhibeert of MOR-degradatie promoot.

Onderzoek in striatum-coupees toonde interactie aan tussen D4R en MOR in striatale eilanden waar beide receptoren voorkomen (Rivera et al, 2002).

Preliminare studies, uitgevoerd door Jolien Duchou (in samenwerking met het labo van professor Lefebvre aan de UGent), toonde aan dat MOR-inductie (met DAMGO) in de hippocampus van de rat een negatief effect zou hebben op D4R-agonist signalisatie. Het experiment bestond erin om de acetylcholine concentraties na te gaan in de hippocampus van de rat na inductie van D2-type receptoren of MOR. Dit experiment werd nog maar tweemaal herhaald en zal in de toekomst nog herhaald worden⁷. De directe interactie tussen D4R en MOR werd bevestigd met CoIP en BRET studies uitgevoerd in LEGEST en het Karolinska institute in Zweden.

⁷ Dit experiment heb ik zelf éénmaal meegevolgd

DOELSTELLING

1. Algemeen

Diepgaande kennis over de specifieke regulatie van neuronale activiteit via neurotransmitters is noodzakelijk voor het ontdekken van receptoren waarop nieuwe drugs kunnen binden. GPCR heterodimeren vormen een nieuwe, en nog niet benutte bron van moleculen waarmee drugs kunnen interageren. Mijn onderzoek bestaat erin om zoveel mogelijk te weten te komen over de interactie tussen de D2-type receptoren en de MOR, en de gevolgen van deze dimerisatie. De kennis over de functionele implicaties van GPCR dimerisatie is nog vrij beperkt. Het doel is om verschillende *in vitro* technieken te combineren om zo een beter begrip te krijgen over de mogelijke 'crosstalk' tussen D2-type receptoren en MOR. Hiervoor deel ik mijn onderzoek op in drie luiken.

2. Directe interactie

In reeds bestaand onderzoek werd evidentie gevonden dat MOR en D4R elkaar beïnvloeden (Gago et al, 2007). Hier werd nagegaan indien deze receptoren, en ook andere leden van de D2-type familie, op directe wijze met elkaar heterodimeriseren in de plasmamembraan en welke specifieke domeinen hierbij betrokken zijn. Receptor-receptor interacties kunnen bestaan uit covalente en niet-covalente interacties tussen extracellulaire domeinen, intracellulaire domeinen (Boroto-Escuela et al, 2011) en transmembranaire domeinen (Vohra et al, 2007). Dit werd onderzocht via (membraan)coimmunoprecipitatie, immunofluorescentie en BRET methodes uitgevoerd in HEK293 cellen waarin de receptoren tot overexpressie gebracht werden. Door verschillende domeinen te muteren in de receptor werd nagegaan welke domeinen hierbij betrokken zijn. We beperkten ons hierbij tot het bestuderen van verschillende D4R-varianten (D4.0R, D4.2R, D4.ΔΔR) en de twee meest voorkomende D2R-splicevarianten (D2L en D2S). D4.0R en D4.ΔΔR zijn twee synthetische D4 deletiemutanten die niet voorkomen in de natuur. In D4.0R zijn alle VNTR gedeleteerd en D4.ΔΔR is een D4.2R mutant de arginine rijke-domeinen die de polymorfe regio in de IC3-lus flankeren gedeleteerd. Nog een andere methode om de receptorinteractiedomeinen in kaart te brengen is een GST⁸-'pull-down' assay. Hierbij werden specifieke domeinen van de D4R (C-terminaal en IC3 lus) gefuseerd aan een GST-epitoom. Zo werd via een techniek vergelijkbaar aan de immunoprecipitatie nagegaan welke van deze domeinen met de MOR zou kunnen interageren.

3. Functie

Over de functie en de gevolgen van de receptor-receptor interactie kan er enkel nog gespeculeerd worden. Hiervoor werd nagegaan indien de dimerisatie van D4.2R en MOR gevolgen heeft op fosforylatie van ERK1/2 MAPK. Dit werd nagegaan door HEK293S cellen, waarin de receptoren tot overexpressie gebracht werden, te induceren met verschillende receptor specifieke (ant)agonisten en na te gaan welke de gevolgen waren op ERK1/2 fosforylatie. Twee experimentele opstellingen werden hiervoor gebruikt.

Ten eerste werden de cellen onderworpen aan verschillende concentraties en combinaties van de receptor specifieke agonisten⁹. Ten tweede werd een desensitatieassay uitgevoerd waarbij een lange inductieperiode met een receptorspecifieke agonisten¹⁰ gevolgd werd

⁸ GST= Glutathion S-transferase, fusiepeptide met hoge affiniteit voor het glutathion tripeptide.

⁹ Dopamine en DAMGO: respectievelijk D4R en MOR specifieke agonisten.

¹⁰ Dopamine, quinpirole en DAMGO.

door een drieminuut durende inductie waarna er nagegaan werd indien de receptorsignalisatie geïnhibeerd werd door receptor-desensitisatie ten gevolge van langdurige receptorstimulatie.

4. Indirecte interactie

Verminderde expressie van MOR aan de plasmamembraan, na D2-type receptor stimulatie, kan op twee manieren gebeuren: door internalisatie van de plasmamembraan met de daarop gebonden receptoren (direct) of door intracellulaire signalisatie die uiteindelijk de transcriptie van MOR beïnvloedt (indirect). Internalisatie wordt onderzocht in het tweede luik van het onderzoek (DOELSTELLING 3.). Transcriptieregulatie is een indirect mechanisme en kan nagegaan worden via Q-PCR analyse van cDNA uit SH-SY5Y cellen. Deze cellen brengen zowel D4R als MOR endogeen tot expressie waardoor geen overexpressie van de receptoren vereist is.

5. Conclusie

De resultaten van dit onderzoek zullen helpen bij het identificeren van D2-type receptor en MOR heterodimeren, het bepalen van de specifieke domein waarmee ze interageren en de rol van de complexe receptor-receptor interactie in het moduleren van D2-type receptor en MOR signalisatie.

6. Personen die hebben bijgedragen tot de resultaten en de gebruikte materialen

- Aanmaken en in cultuur houden van stabiel getransfecteerde HEK293S cellen (Béatrice Lintermans)
- Aanmaken van D-MEM en F12 medium (Béatrice Lintermans)
- Uitvoeren van CoIP en mIP assays, waar vermeld in thesis (Jolien Duchou)
- Aanmaken van GST-fusiepeptiden (Jolien Duchou)
- QPCR (Jolien Duchou)
- Opstarten van SH-SY5Y cellijn (Jolien Duchou)

RESULTATEN

7. Directe interactie

7.1. De rol van de IC3-lus van D4R op de D4R-MOR dimerisatie

7.1.1. Coimmunoprecipitatiestudie

D4R-MOR interactie werd reeds aangetoond (Gago et al, 2007), en de dimerisatie van beide receptoren werd bevestigd in LEGEST. Om na te gaan welke domeinen specifiek betrokken zijn bij deze dimerisatie werden verschillende HA-D4R-varianten (D4.0R, D4.2R, D4.ΔΔR) samen met MOR-YFP transiënt getransfecteerd, en tot overexpressie (pCMV¹¹) gebracht in HEK293T cellen. Als controle werden ook HEK293T cellen getransfecteerd met pcDNA3. D4.0R en D4.ΔΔR zijn twee mutanten van D4R die niet voorkomen in de natuur. D4.0R is een deletiemutant waarbij alle VNTR's in de IC3-lus gedeleteerd zijn en D4.ΔΔR komt overeen met D4.2R waarin de gebieden die de VNTR's flankeren gedeleteerd zijn¹². Dit gebied bevat een aantal positief geladen arginine residuen. D4.2R werd meegenomen in het experiment als positieve controle.

De getransfecteerde cellen werden 48 uur na transfectie geïncubeerd en bewaard bij -70°C. Cellen werden gelyseerd in RIPA buffer waarna de concentratie van alle stalen werd gemeten met een BCA-assay. De stalen konden nu naar gelijke concentraties verdund worden zodat vergelijkbare hoeveelheden celmateriaal op gel geladen kon worden. Hierdoor zou de intensiteit van de banden een beeld kunnen geven van de sterkte van de interactie tussen beide receptoren. Voordat de cellysaten op gel werden geladen, werd een immunoprecipitatie (IP) van de HA-fusie-eiwitten uitgevoerd met een muis anti-HA antilichaam en antilichaam-bindende beads. Nadat de cellysaten gescheiden werden op gel en overgeblot op een nitrocellulosemembraan kon MOR-YFP gedetecteerd worden met anti-GFP-HRP¹³ antilichaam (voor de CoIP stalen) en anti-GFP muis gevolgd door anti-muis-HRP die enkel de lichte keten van het antilichaam herkent (voor het lysaat).

Verschillende banden kunnen waargenomen worden in Figuur 6A. Gewoonlijk vertoont MOR één brede band rond de 60-65kDa op Western blot na scheiding via SDS-PAGE gel. In het lysaat (Figuur 6C) lopen deze banden op een hogere positie (90-100kDa) omdat MOR gefuseerd is aan YFP dat een moleculair gewicht van 27kDa vertoont op gel. Er is ook een smeer bovenaan in de lanen die afkomstig is van aggregatie van de receptoren onderling. Deze band kan echter niet teruggevonden worden na IP (Figuur 6A), hier wordt er een bandenpatroon waargenomen dat specifiek is voor YFP-gefuseerd MOR. Het YFP-fusie-eiwit is C-terminaal (intracellulair) gekoppeld aan de receptor. Dit in tegenstelling tot de meest andere fusiepeptiden die hier, en in de literatuur, gebruikt worden voor IP-experimenten. Deze zijn meestal N-terminaal gekoppeld en significant kleiner, eg. FLAG- en HA-fusiepeptiden (1kDa). Dit fusie-construct zou verschillend kunnen interageren met de IP-beads waardoor een verschuiving in het bandenpatroon geobserveerd wordt. Dit zou dus (deels) kunnen verklaren waarom er een verschil in bandenpatroon wordt geobserveerd.

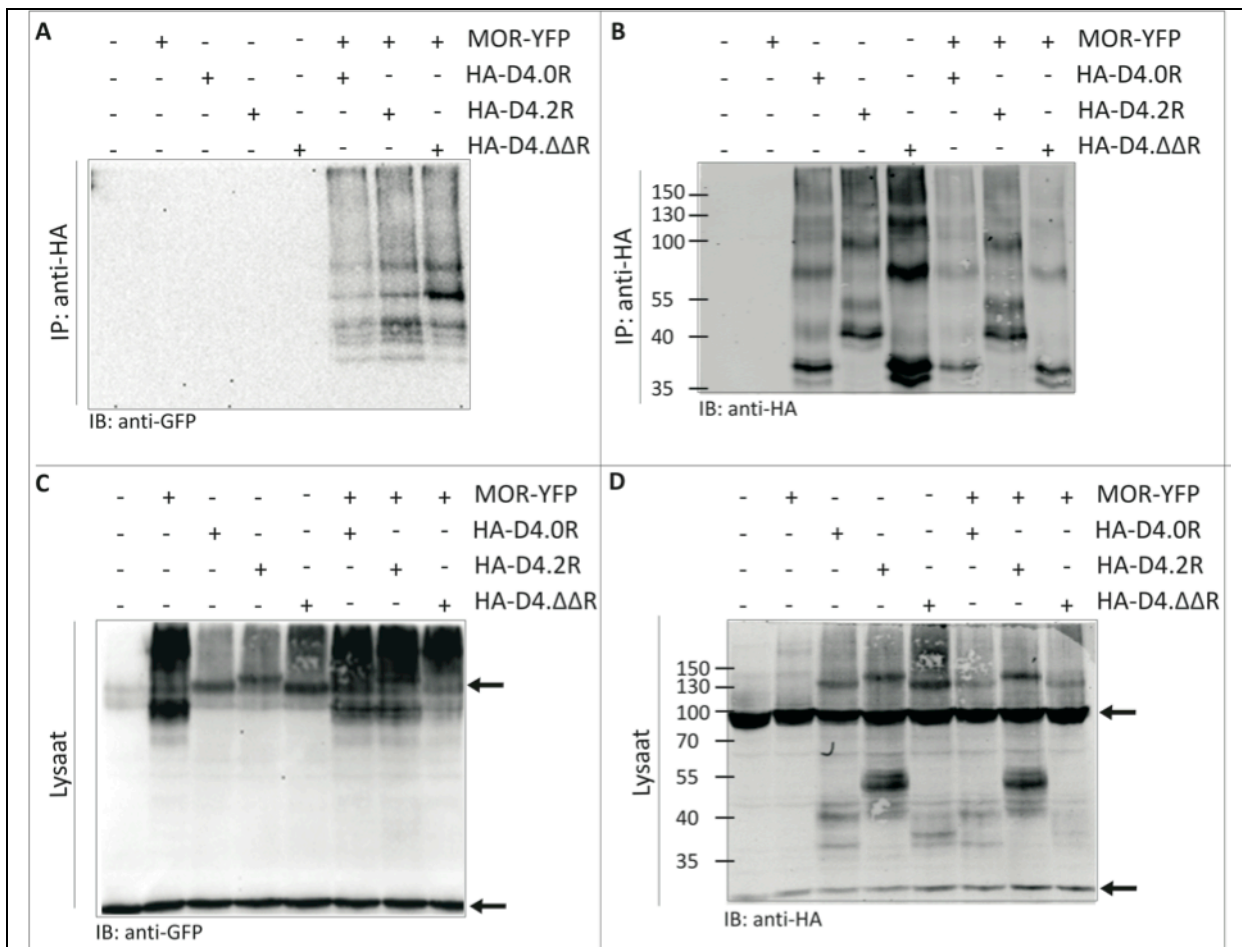
Detectie van MOR-YFP door immunoblotting (IB) na immunoprecipitatie (IP) van HA-gefuseerde D4R-mutanten uit heterologe cellysaten toont aan dat alle drie de D4R-varianten

¹¹ pCMV: 'Immediate-early Cytomegalovirus' promotor voor sterke expressie in een breed spectrum van zoogdiercellen

¹² De gedeleteerde sequenties van D4.ΔΔR = [233-253] en [283-307]

¹³ HRP = Horseradish peroxidase

interageren met MOR-YFP (Figuur 6A). De afwezigheid van de VNTR in de D4.0R-mutant heeft geen invloed op het dimerisatiepotentiaal tussen beide receptoren (Figuur 6A, laan 6).



Figuur 6. Coimmunoprecipitatie van D4R-varianten met MOR als gevolg van dimerisatie. De dimerisatie van verschillende D4R-mutanten in de IC3 lus (D4.0R en D4.ΔΔR) met MOR-YFP. Coimmunoprecipitatie studie, van HA-D4.0R, HA-D4.2R en HA-D4.ΔΔR met MOR-YFP, werd uitgevoerd in HEK293T cellen. HA-D4.2 werd meegenomen als positieve controle. (A)+(B) Immunoprecipitatie (IP) werd uitgevoerd met muis anti-HA (16B12) serum (2μg). (A) De receptoren werden gevisualiseerd na immunoblotting (IB) met geit anti-GFP-HRP (verdunding: 1/1000). (B) Controle om na te gaan indien de immunoprecipitatie gelukt is. De D4R-mutanten werden gedetecteerd met het rat anti-HA antilichaam (verdunding: 1/2000) en het secundair anti-rat rood (verdunding: 1/10000) antilichaam. (C)+(D) Herladen van controle stalen waarbij geen IP werd uitgevoerd om na te gaan indien de cellen de receptoren tot expressie brengen (C) IB met muis anti-GFP (verdunding: 1/5000) en secundair geit anti-muis-HRP antilichaam die enkel de lichte keten van het antilichaam herkent. (D) IB met muis anti-HA (verdunding: 1/5000) en het secundair anti-muis groen (verdunding: 1/15000). De pijlen verwijzen naar de detectie van de antilichamen die gebruikt werden voor de immunoprecipitatie van de receptoren. De ladders weergegeven in figuren B en D representeren het moleculair gewicht van de eiwitten in kDa. De figuren waarbij geen moleculaire ladder voorgesteld wordt, werden bekomen met het KODAK-toestel waarbij enkel visualisatie van HRP kan plaatsvinden. . ladders zijn dus onleesbaar op deze membranen. MOR = μ-opioïd receptor; D4.0R = Dopamine receptor D4 waarbij het polymorfisme gedeleteerd werd; D4.ΔΔR = Dopamine receptor D4 waarbij de regio's die het polymorfisme flankeren gedeleteerd werden; IB = immunoblotting; IP = immunoprecipitatie; HRP = Horseradish peroxidase. Deze assay werd herhaald in drie onafhankelijke experimenten, door Jolien Duchou en Gabrielle Van der Eecken.

Ook de afwezigheid van regio's die het polymorfisme flankeren in de D4.ΔΔR-mutant verstoren deze dimerisatie niet, in tegendeel zelfs. Dit experiment werd meermaals

herhaald¹⁴ en elke keer kan er een versterking in bandintensiteit geobserveerd worden bij de interactie tussen D4.ΔΔR en MOR (Figuur 6A, laatste laan). Deze versterking in bandintensiteit is zeker niet te wijten aan het feit dat deze receptormutant sterker tot expressie komt omdat de bandintensiteit die kan waargenomen worden in het lysaat niet hoger is dan voor de andere receptor-varianten (Figuur 6C). Deze observatie zou kunnen wijzen op het feit dat D4.ΔΔR en MOR sterker interageren in vergelijking met de andere onderzochte D4R-varianten.

Figuur 6C en D tonen aan dat de transfectie van de cellen gelukt is en dat de receptoren tot expressie komen in deze cellen. Het bandenpatroon dat geobserveerd wordt bij de detectie van HA-D4R-mutanten (Figuur 6B en D) werd reeds beschreven (Rondou et al, 2008; Van Craenenbroeck, 2005). Kort: banden voorkomend tussen 38-56kDa stellen monomere receptoren voor, waarvan de lagere banden de immature, ER-weerhouden receptoren met kortere N-glycosylatieketens voorstellen en de hoogste de mature, volledig geglycosyleerde receptoren. Hogere specifieke, banden stellen aggregaten van deze receptoren voor. Dit kunnen zowel hetero- (lanen 6-8) als homodimeren (lanen 3-8) zijn. Ook hier worden immature ER-gelokaliseerde receptoren beter geïmmunoprecipiteerd dan de volledig mature vorm. In sommige opstellingen kunnen er extra banden (aangeduid met pijl) geobserveerd worden ter hoogte van 25, 50, 75 of 100kDa. Deze banden zijn afkomstig van de lichte (25kDa) en zware (50kDa) ketens, of niet volledig gedenameerde vormen daarvan, van het antilichaam waarmee de immunoprecipitatie werd uitgevoerd. Indien er antilichamen gebruikt worden afkomstig uit hetzelfde species voor de IB en IP zal het secundair antilichaam gebruikt voor IB ook de ketens van het antilichaam herkennen waarmee er geprecipiteerd werd. Dit kan opgelost worden door gebruik te maken van antilichamen afkomstig uit twee verschillende species (die niet steeds beschikbaar zijn op het labo) of door een HRP-gekoppeld primair antilichaam te gebruiken voor immunodetectie. Bij het uitvoeren van dit experiment werden de controlestalen pas apart genomen na incubatie met het IP-antilichaam waardoor ook in deze stalen specifieke antilichaambanden teruggevonden worden (zie Figuur 6C lanen 1, 3-5; ook waarneembaar in Figuur 6D).

Er kan dus gesteld worden dat het deleteren van alle herhalingssequenties of hun flankerende sequenties in de IC3-lus geen invloed hebben op de D4R-MOR dimerisatie. Er wordt zelfs waargenomen dat D4.ΔΔR sterker met MOR interageert dan receptoren met positief geladen residuen in de VNTR-flankerende sequenties. De interactie tussen deze D4R-varianten en MOR kan bevestigd worden via andere technieken zoals BRET en 'GST 'pull-down' assays. Verder onderzoek met andere receptor-mutanten is noodzakelijk om de domeinen, die interageren bij dimerisatie, te bepalen.

7.1.2. GST 'pull-down' assay

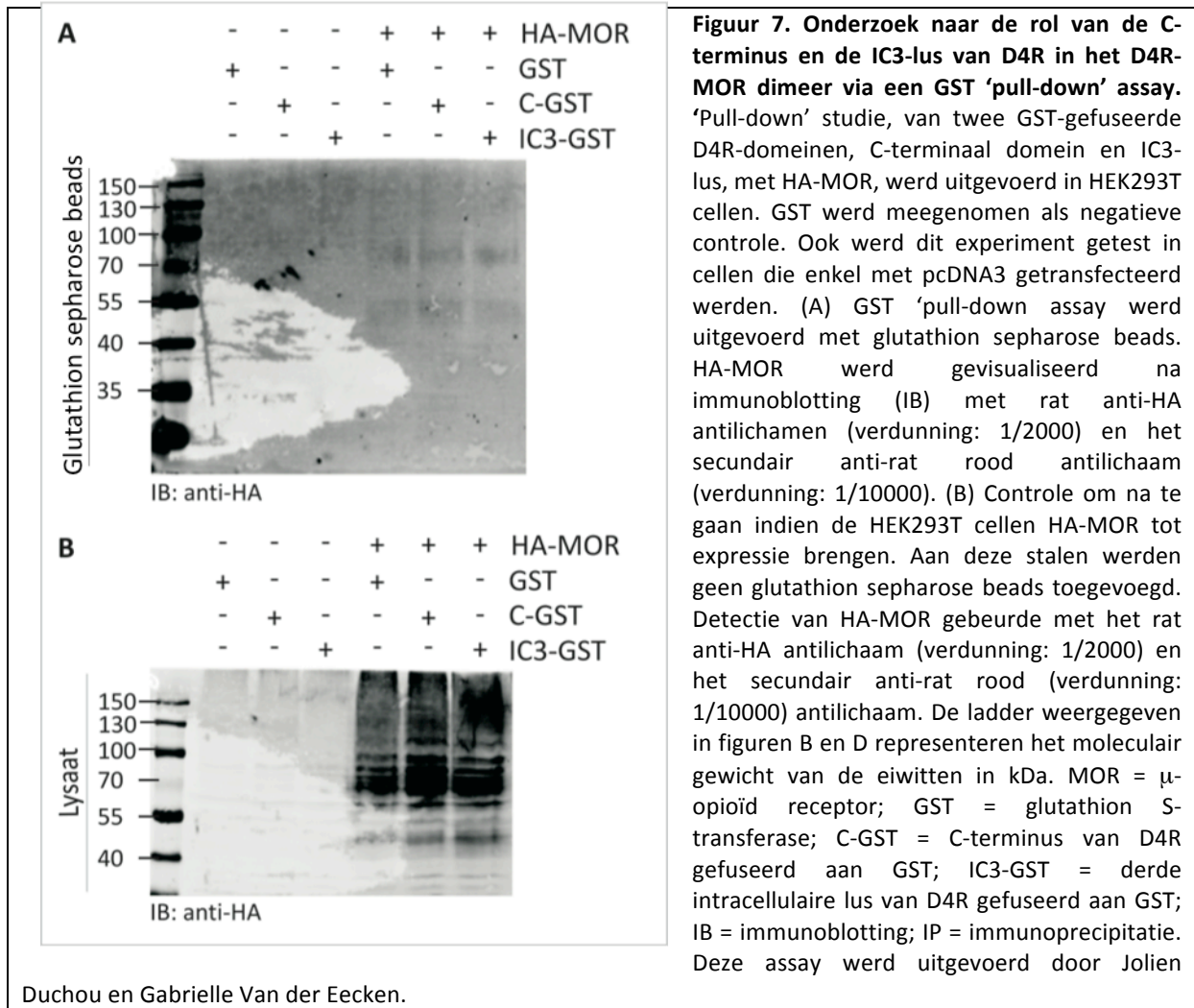
Voorafgaande coimmunoprecipitatie-experiment tonen aan dat D4R en MOR dimeriseren en dat zowel het polymorfisme als hun flankerende domeinen niet betrokken zijn bij deze dimerisatie. Om te achterhalen welke receptordomeinen wel betrokken zijn bij deze dimerisatie werd een GST 'pull-down' assay uitgevoerd. Het principe van deze assay berust op het feit dat het GST-fusiepeptide bindt aan het glutathion-tripeptide. Via een experiment, vergelijkbaar aan een immunoprecipitatie, worden zo de GST-fusie-eiwitten samen met de eiwitten die hiermee interageren opgezuiverd uit het cellysaat. Voor deze assay de

¹⁴ Zowel door Jolien Duchou en Gabrielle Van der Eecken.

openleesramen coderend voor het C-terminaal domein en de IC3-lus van de D4R gefuseerd aan het GST-peptide. De vectoren die deze constructen bevatten werden getransformeerd en tot expressie gebracht in een *E.coli* stam. Van deze getransformeerde stammen werden kolonies opgegroeid en de receptordomeinen gefuseerd aan GST werden hieruit opgezuiverd¹⁵. Voor de GST 'pull-down' assay werden HEK293T cellen transiënt getransfecteerd met pHA-MOR, of de lege expressievector pcDNA3 als controle. Achtenveertig uur na transfectie werden deze cellen geïncubeerd en bewaard bij -70°C. De celpelleten werden geresuspendeerd en gelyseerd in celextractiebuffer. Zoals voor een IP-assay werd ook hier een deel van de celsuspensies apart gehouden ter controle van de transfectie. Voor de 'pull-down' assay werden de verschillende GST-fusieconstructen aan het cellysaat toegevoegd. Hierna werden er glutathion-sepharose beads toegevoegd die binden met het GST-fusiepeptide. De GST-peptiden werden vervolgens samen met hun interagerende proteïnen opgezuiverd en gescheiden via SDS-PAGE gelelectroforese. Detectie gebeurde via een Western blot assay en immunoblotting (IB) gebeurde met een primair rat anti-HA antilichamen gevolgd door het secundair anti-rat antilichamen gekoppeld aan een fluorofoor voor visualisatie onder de Odyssey.

Figuur 7A toont aan dat HA-MOR niet meer aanwezig was in het opgezuiverd cellysaat. Er worden geen banden waargenomen op de membraan. Hieruit volgt dat HA-MOR, in dit experiment, niet bindt aan de GST-fusieconstructen. In de drie laatste lanen wordt een vage smeer geobserveerd maar omdat deze ook waarneembaar is in de laan waar enkel GST zonder fusiepeptide (negatieve controle) waargenomen wordt kan interactie met HA-MOR uitgesloten worden. Uit Figuur 7B kan afgeleid worden dat HA-MOR tot expressie komt in de HEK293T cellen. Hier worden banden geobserveerd die lopen op een hoogte van ongeveer 60-65kDa. Dit is kenmerkend voor MOR op Western blot na scheiding op een SDS-PAGE gel. Deze assay werd voor het eerst en slechts éénmaal uitgevoerd en is nog niet geoptimaliseerd in het labo waarin deze werd uitgevoerd. Om er zeker van te zijn dat MOR niet interageert met deze receptordomeinen zou er een positieve controle in het experiment geïncorporeerd moeten worden. Hiervoor zou men gebruik kunnen maken van HEK293T cellen waarin KLHL12 getransfecteerd is. Dit is een eiwit dat interageert met het polymorfisme gelegen ter hoogte van de derde intracellulaire lus van de D4R (Rondou et al, 2008). Verder zou ook de aanwezigheid van de GST-fusieconstructen nagegaan kunnen worden door immunoblotting uit te voeren met antilichamen die de GST-fusiepeptide herkennen. Door gebrek aan materiaal kon dit hier niet uitgevoerd worden.

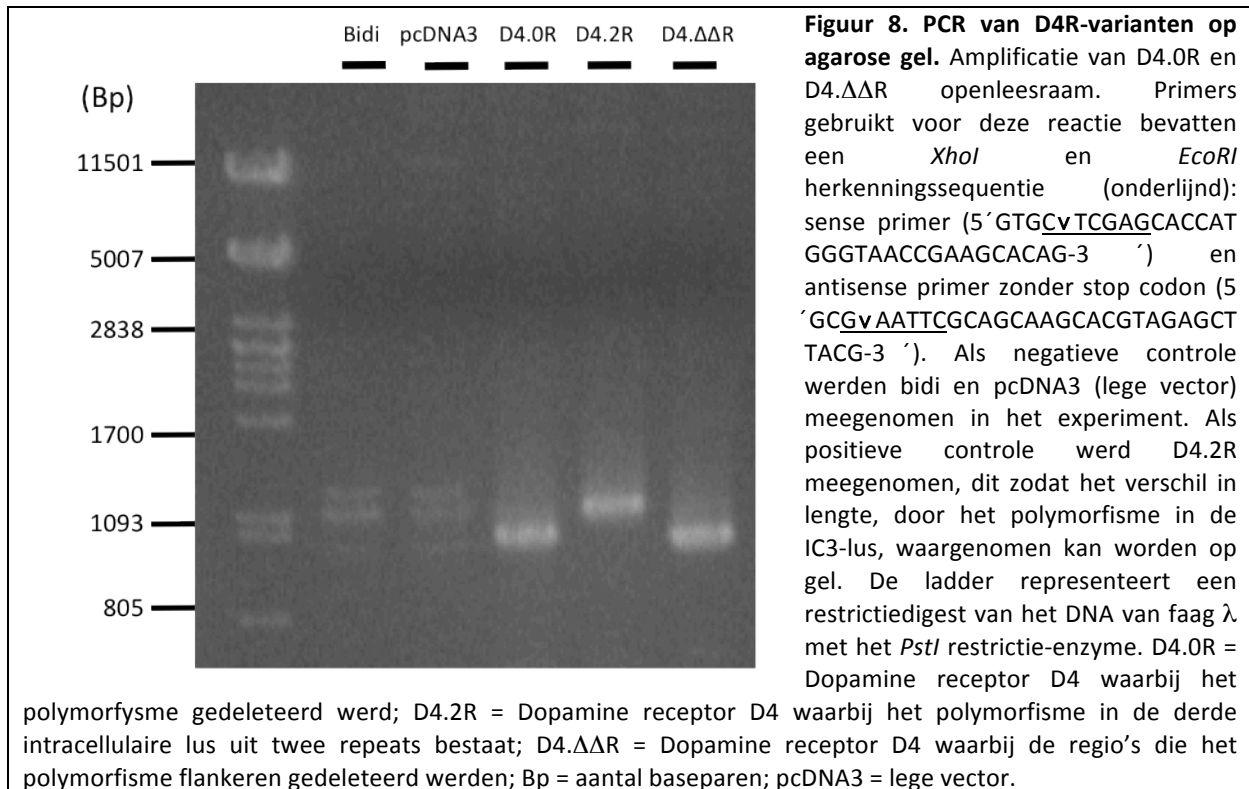
¹⁵ De constructie en opzuivering van de GST-fusiepeptiden werd uitgevoerd door Jolien Duchou.



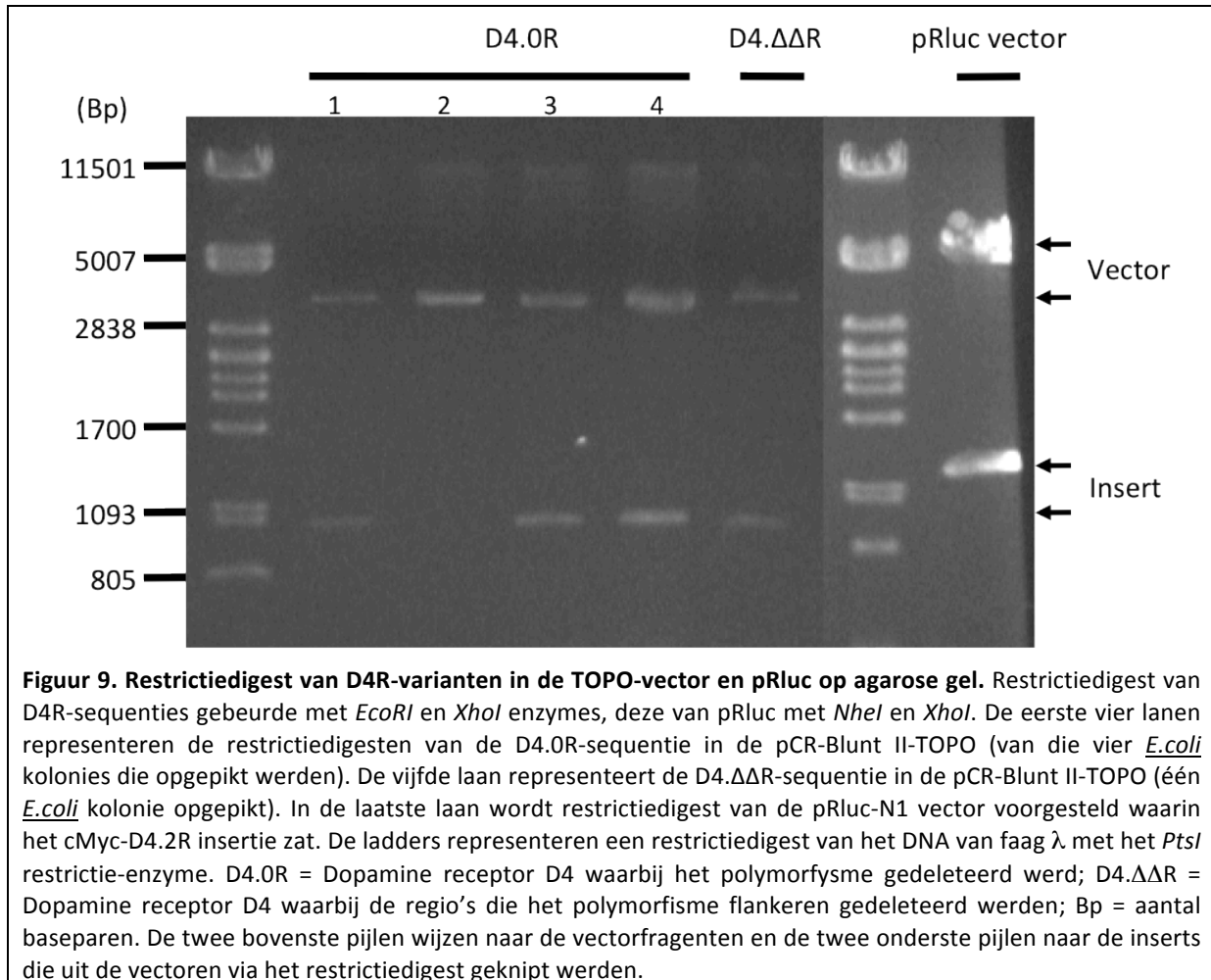
Uit dit experiment blijkt dat HA-MOR niet interageert met het C-terminaal domein of de IC3-lus van D4R. Het is echter niet duidelijk of dit te wijten is aan een probleem in het experiment of dit komt omdat er werkelijk geen interactie plaatsvindt. Een betere experimentele opstelling zal hier een verduidelijking bieden.

7.2. Productie van Rluc-vectoren voor BRET-assay

Tegenwoordig is het niet meer voldoende om enkel een coimmunoprecipitatie assay uit te voeren om een GPCR-dimerisatie te bevestigen. Hiervoor zullen bovenstaande data bevestigd worden aan de hand van een BRET¹⁶-assay. Eerst werden de gepaste vectoren gemaakt. Voor het uitvoeren van een BRET-assay zijn er twee fusie-eiwitten nodig. Eén eiwit dat gefuseerd is aan het YFP-eiwit en een ander aan het Renilla luciferase (Rluc). Het MOR-YFP construct is reeds beschikbaar en moet dus niet meer gemaakt worden. D4.0R en D4.ΔΔR moeten N-terminaal gefuseerd worden aan het Rluc. Er werd gestart met pcDNA3 vectoren waarin beide receptoren gekloneerd waren. Via een polymerase ketting reactie (PCR) waarbij primersequenties gebruikt werden die een *EcoRI*- en een *XhoI*-herkenningssequentie bevatten werden de coderingssequentie van beide receptoren uit deze vector geamplificeerd. Een deel van deze PCR-producten werden op agarose gel geladen om na te gaan indien fragmenten met een correcte lengte geamplificeerd werden. Als negatieve controle werden bidi en pcDNA3 (lege vector) meegenomen in het experiment. Als positieve controle werd D4.2R meegenomen, dit zodat het verschil in lengte, door het polymorfisme in de IC3-lus, waargenomen kan worden op gel. Na de scheiding van de DNA-fragmenten op agarose gel, konden de DNA-fragmenten gevisualiseerd worden door de gel in een ethidiumbromide-bad te dompelen waarna de fragmenten oplichtten onder UV-licht. Figuur 8 toont aan dat zowel D4.0R als D4.ΔΔR correct geamplificeerd werden en fragmenten van ongeveer 1000bp vormen. Het DNA-fragment dat codeert voor D4.2R is iets hoger gelegen op gel omdat deze receptor twee extra herhalingssequenties bevat in de IC3-lus. De negatieve controles vertonen beide aspecifieke banden. Dit is waarschijnlijk het gevolg van een aspecifieke DNA-amplificatie van het gecontamineerd Bidi dat gebruikt werd.



¹⁶ BRET = Bioluminescentie resonantie energie transfer



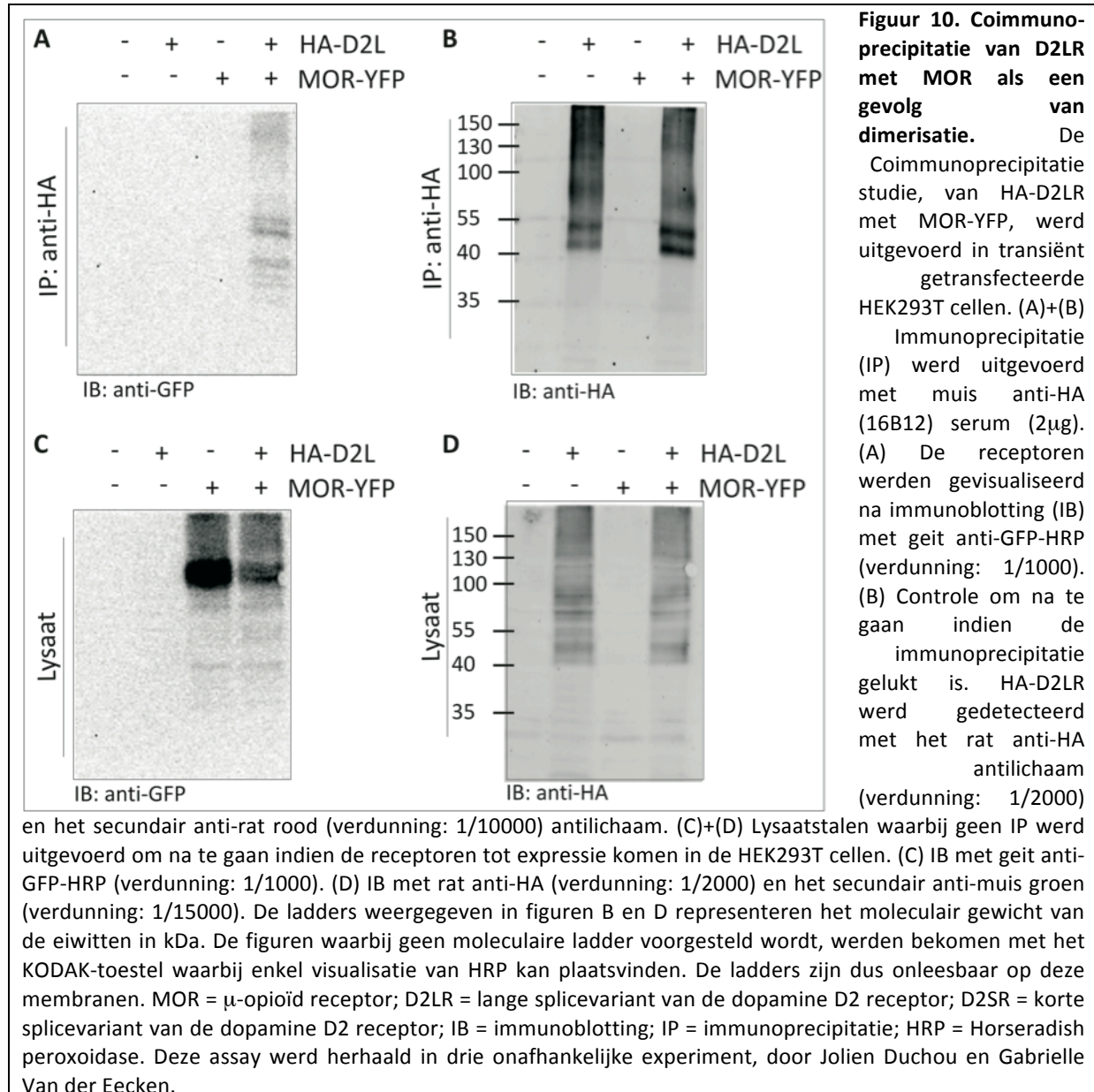
Eens bevestigd was dat de correcte fragmenten geamplificeerd waren konden deze in een pCR-Blunt II-TOPO vector geligeerd worden. Er werd gebruik gemaakt van een pCR-Blunt II-TOPO omdat de PCR uitgevoerd werd met een *Pfu* polymerase enzyme waarbij de gegenereerde fragmenten geen overhangende nucleotiden bevatten. De geproduceerde pCR-Blunt II-TOPO-vectoren, die de D4-receptoren bevatten, werden getransformeerd in *E. coli*-stammen en opgegroeid op selectieve kanamycine platen. De pCR-Blunt II-TOPO-vectoren bevatten namelijk een kanamycine-selectiemerker waardoor enkel bacteriën die getransformeerd werden met deze vector overleven op deze platen. Vier kolonies, die de D4.0R vector bevatten, en één kolonie (er was slechts één kolonie aanwezig), die de D4.ΔΔR-vector bevatte, werden opgepikt en uitgegroeid. Uit deze bacterieculturen werden de vectoren opgezuiverd. Op deze vectoren werd een restrictiedigest uitgevoerd. De sequenties coderend voor de receptoren werden uit de pCR-Blunt II-TOPO vectoren geknipt met restrictie-enzymen met herkenningsequentie die aanwezig waren in de primerparen: *EcoRI* en *XhoI*. De pRLuc-vector waarin deze sequenties gekloneerd werden ondergingen ook een restrictiedigest met *NheI* en *XhoI*. De volledige digesten werden op agarose gel geladen (Figuur 9). Hieruit blijkt dat de plasmide aanwezig in kolonie 2 geen insert bevatte (er werd niet verdergewerkt met deze staal). Bij de ander stalen kan er telkens een groot (de vector) en een klein (de insert) fragment gedetecteerd worden. Voor de D4.0R en D4.ΔΔR werd telkens verder gewerkt met de insert en voor de RLuc-vector werd verder gewerkt met het groot vectorfragment. Deze fragmenten werden uit de gel gesneden en opgezuiverd.

Uiteindelijk werden de DNA-fragmenten coderend voor de receptoren geligeerd in de vector en getransformeerd in *E.coli* stammen. Dit bleek echter niet te lukken en er waren geen kolonies uitgegroeid op de selectieve platen.

Na nader onderzoek van de pCR-Blunt II-TOPO wordt vermoed dat de *EcoRI* restrictiesites, die de de insertiesequentie flankeren, een preferentiële restrictiesequentie vormen voor het *EcoRI*-enzyme waardoor het bekomen fragment langs beide kanten een *EcoRI* restrictie ondergaat in plaats van een *EcoRI* en een *XhoI* restrictie. Hierdoor zou er geen ligatie kunnen plaatsvinden.

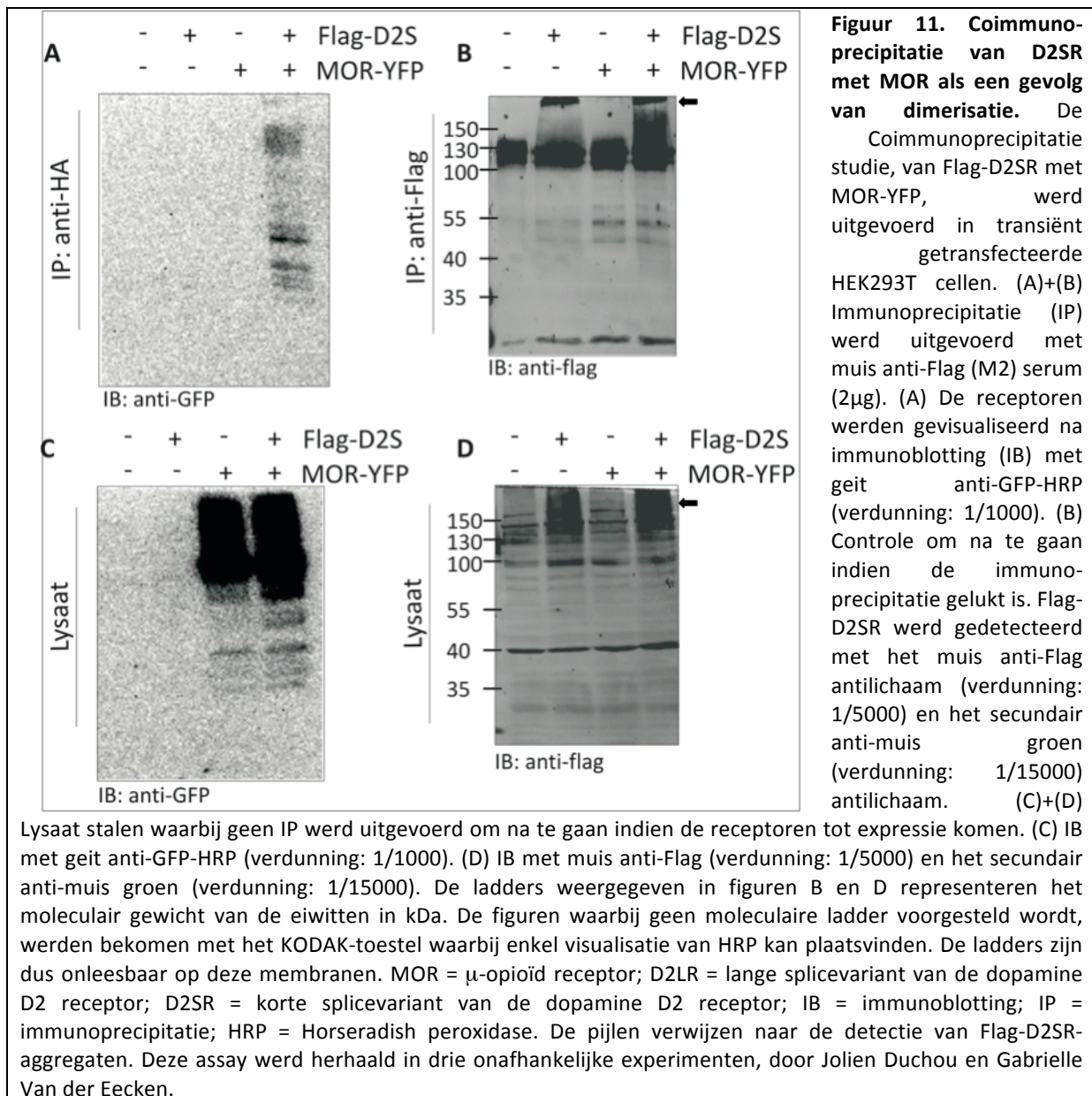
7.3. Onderzoek naar de dimerisatie tussen D2R-splicevarianten en MOR via verschillende biochemische technieken

D4R en D2R maken beide deel uit van de D2-type receptoren en vertonen een vrij grote sequentiesimilariteit. Het zou dus kunnen dat ook D2R interageert met MOR. Er bestaan twee hoofdvarianten van de D2R; de D2LR en de D2SR. Om na te gaan indien de insertie, in de IC3-lus, van D2LR, maar afwezig in de D2SR, een invloed heeft op het dimerisatiepotentiaal van D2R met MOR werden beide D2 receptoren onderzocht.



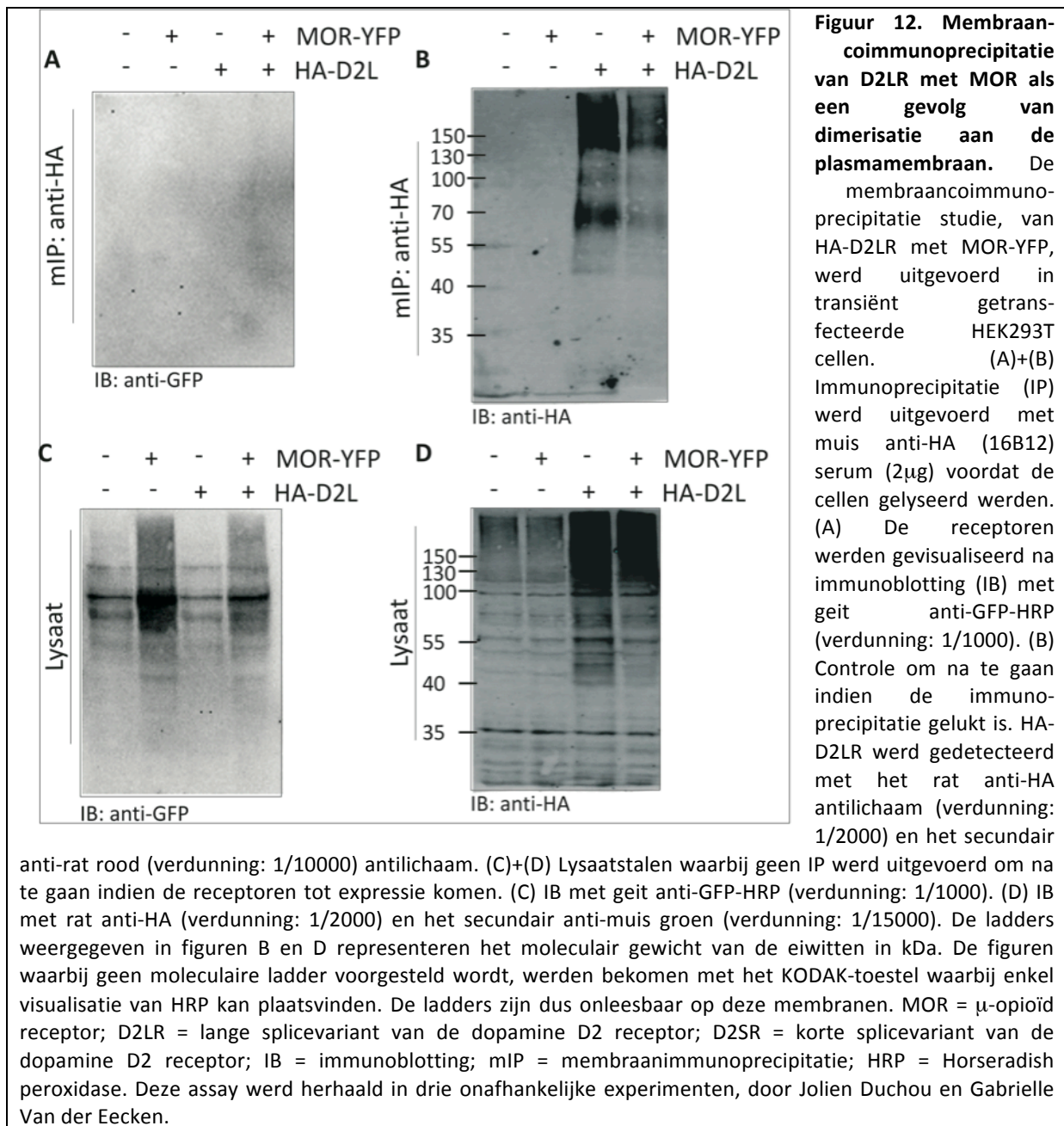
Om dit te onderzoeken werden HEK293T cellen transiënt getransfecteerd met MOR-YFP, HA-D2L/SR of beide. De getransfecteerde cellen, die de receptoren tot overexpressie brengen, werden gecollecteerd en bewaard bij -70°C. De cellen werden gelyseerd in RIPA buffer en de HA- of Flag-gefuseerde receptoren werden geprecipiteerd aan de hand van anti-HA of anti-Flag antilichamen en beads. Zo werd nagegaan indien beide D2R's interageren met MOR. Figuur 10A toont aan dat HA-D2LR interageert met MOR-YFP in deze cellen en Figuur 11A toont aan dat dit ook het geval is voor Flag-D2SR. Ook hier kan een bandenpatroon

waargenomen worden bij detectie van MOR-YFP (zie ook Resultaten Figuur 6A). De verschillende banden verwijzen waarschijnlijk naar de diverse maturatie- en glycosylatietoestanden van de receptor en de aggregatie van deze onder elkaar of de onvolledige denaturatie van het YFP-fusiepeptide. In het lysaat vertoont MOR-YFP zowel bij HA-D2LR als bij Flag-D2SR één brede band ter hoogte van +/- 90-100kDa (Figuur 10B en Figuur 11B). Voor meer uitleg zie bespreking bij RESULTATEN 1.1. Vergelijkbare hoeveelheden van de receptor worden waargenomen in de verschillende experimentele opstellingen (Figuur 10C en D en Figuur 11C + D). Detectie van HA-D2LR vertoont zowel bij de IP als in het lysaat een smeer (Figuur 10B + D, pijlen). Dit komt waarschijnlijk door onvolledige denaturatie van de receptoren en onderlinge aggregatie met zichzelf en andere eiwitten. Dit kan ook waargenomen worden bij detectie van Flag-D2S (Figuur 11B + D). In Figuur 11B worden ook de verschillende antilichaambanden waargenomen na detectie van het IP-antilichaam door het secundair antilichaam gebruikt voor IB. De banden Figuur 11D die voorkomen in elke laan zijn te wijten aan aspecifieke detectie of door onvoldoende blokkeren van de nitrocellulosemembraan.

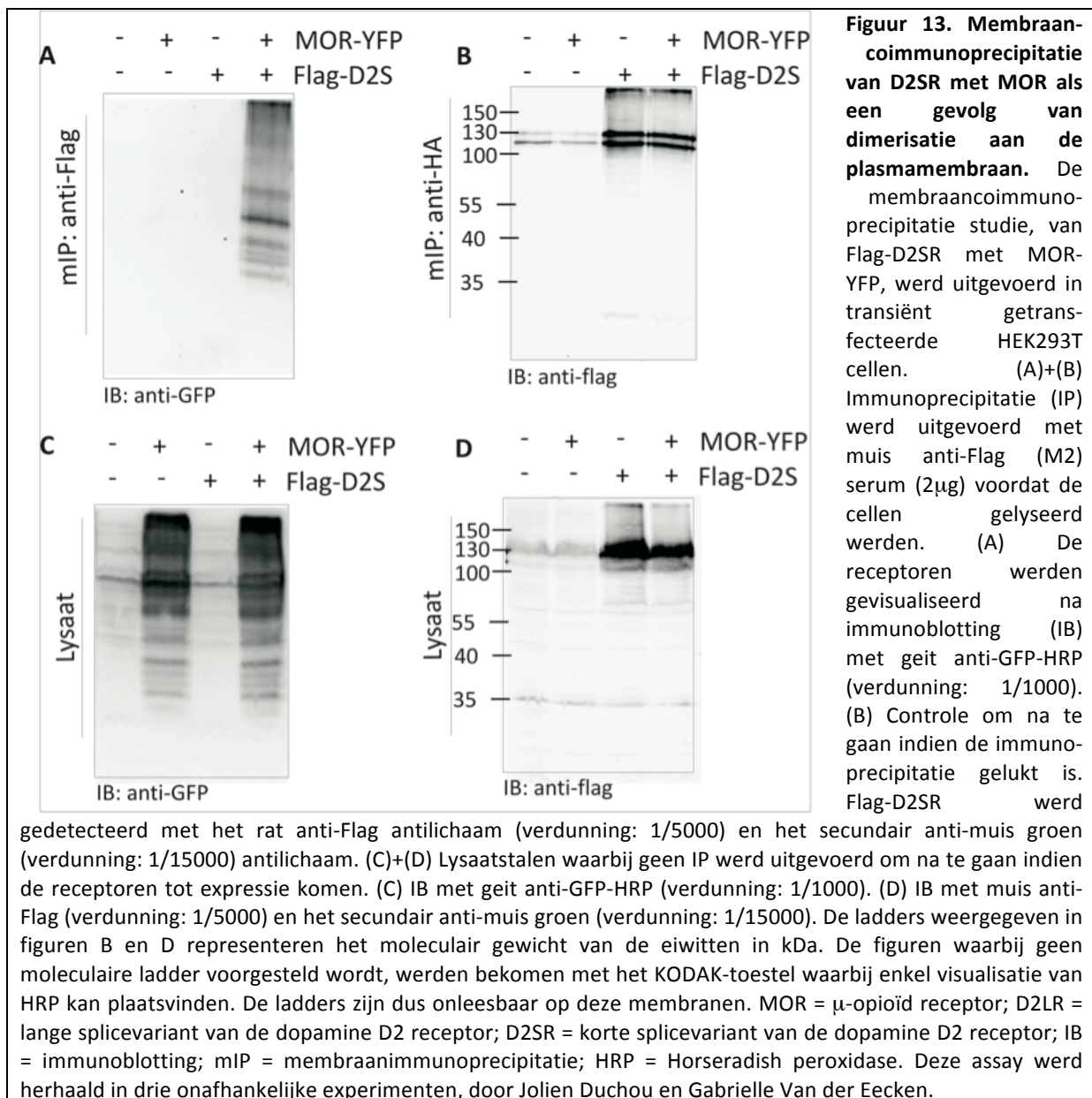


Om na te gaan of deze receptoren ook aanwezig zijn aan de plasmamembraan van deze cellen werd een immunofluorescentieassay uitgevoerd. Hierbij werden de receptoren gevisualiseerd op de plasmamembraan via fusiepeptide specifieke antilichamen en secundaire fluorofoorantilichaam. De visualisatie gebeurde met behulp van een fluorescentiemicroscop. Hieruit kan geconcludeerd worden dat zowel D2LR als D2SR voornamelijk voorkomen op de plasmamembraan van de HEK293T cellen (Figuur 14, eerste kolom). Detectie van MOR-YFP op de plasmamembraan van HEK293T cellen werd reeds bepaald via immunofluorescentie door Jolien Duchou (figuren niet weergegeven).

Nu bevestigd is dat zowel MOR-YFP, HA-D2LR als FLAG-D2SR, in transiënt getransfecteerde HEK293T cellen, aan de plasmamembraan tot expressie komen, werd er nagegaan indien deze receptoren ook onderling interageren aan de membraan. Dit werd onderzocht door een membraanimmunoprecipitatie (mIP) uit te voeren op transiënt getransfecteerde cellen.

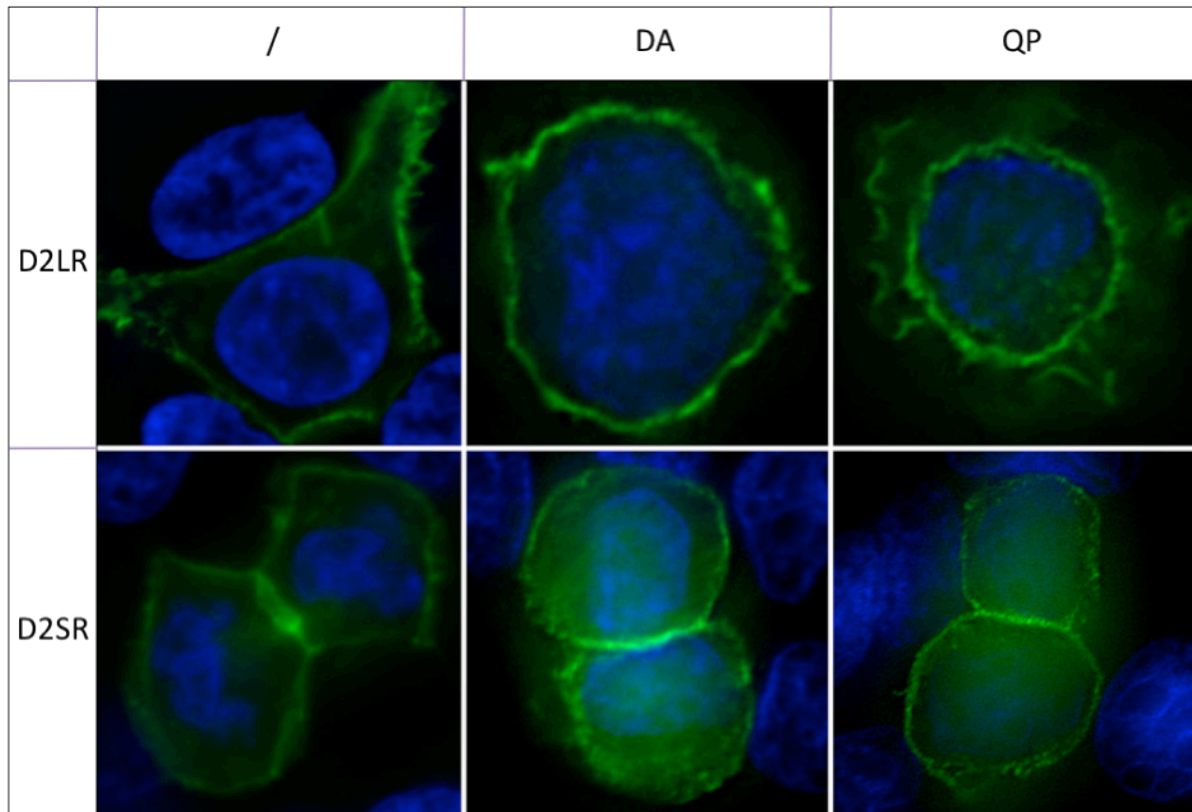


Deze assay is vergelijkbaar met de gewone immunoprecipitatieassay behalve dat de cellen nu vóór het lyseren geïncubeerd werden met antilichamen specifiek voor het fusiepeptiden: anti-HA (voor D2LR) of anti-FLAG (voor D2SR), zodat enkel de receptoren gelegen aan de plasmamembraan gedetecteerd zouden worden, zie MATERIAAL EN METHODEN 5.2 voor een uitgebreid protocol. De bekomen Western blots tonen aan dat HA-D2LR, in tegenstelling tot wat gedacht kan worden uit voorgaande experiment, niet interageert met MOR-YFP aan de plasmamembraan (Figuur 12A). FLAG-D2SR dimeriseert daarentegen wel met MOR-YFP aan de celmembraan (Figuur 13A). Het zou dus kunnen dat D2LR interageert met een andere molecule of receptor aan de plasmamembraan die de dimerisatie met MOR inhibeert. Daaruit kan vermoed worden dat de insertie in de IC3-lus niet noodzakelijk is voor dimerisatie tussen D2R en MOR, noch inhibeert deze regio de interactie tussen deze receptoren. Dit kan afgeleid worden uit het feit dat er wel dimerisatie tussen deze receptoren geobserveerd wordt bij het uitvoeren van een gewone coimmunoprecipitatie assay (zie Figuur 10). Verder onderzoek hieromtrent is echter verijst voor uitsluitel.



7.1. D2R internalisatie na agonist-stimulatie

Over de internalisatie van de D2R na agonist stimulatie bestaat er nog veel verwarring (zie INLEIDING 2.2.1) en omdat een andere lid van de D2-type receptoren, de D4R, resistentie vertoont op agonist gestimuleerde internalisatie werd dit hier nogmaals onderzocht.



Figuur 14. Internalisatie van D2R-varianten na agonist stimulatie. HEK293T cellen werden transient getransfecteerd met pHA-D2LR of pFlag-D2SR. Receptoren aanwezig op de membraan werden gedetecteerd met (muis) antilichamen die de receptor fusiepeptide binden: anti-HA (16B12) voor detectie van HA-D2LR en anti-Flag (M2) voor detectie van Flag-D2S. Vervolgens werden de cellen geïnduceerd voor 30' met dopamine (10 μ M) of quinpirole (10 μ M) bij 37°C. Visualisatie van de receptoren gebonden aan het primair antilichaam gebeurde met fluorofore anti-muis antilichamen (Alexa fluo® 488 ; Groen); blauw = celkernen gevisualiseerd met DAPI (4',6'-diamidino-2-fenylindole).

Hiervoor werden HEK293T cellen die transient ofwel D2LR ofwel D2SR tot overexpressie brengen op behandelde drekgelaten gegroeid. Twee dagen na transfectie werden de cellen onderworpen aan een immunofluorescentieassay. Hierbij werden de membraan-gelocaliseerde receptoren gedetecteerd met een primair antilichaam gericht tegen het fusiepeptide: anti-HA voor detectie van HA-D2LR en anti-Flag voor detectie van Flag-D2S. Hierna werden de receptoren gedurende een halfuur gestimuleerd bij 37°C met een algemene agonist, DA, of met een selectieve D2-type receptor agonist, quinpirole. Voor de visualisatie van de receptoren gebonden aan het primair antilichaam werden de cellen gepermeabiliseerd en geïncubeerd met een secundair fluorofoor antilichaam die het primair antilichaam bindt. Voor visualisatie van de celkern werd DAPI gebruikt.

Onder een fluorescentiemicroscopie werd waargenomen dat beide D2R-varianten voorkomen aan de plasmamembraan in afwezigheid van receptorstimulatie (Figuur 14, eerste kolom). Na stimulatie met dopamine komen de receptoren nog steeds voornamelijk tot expressie aan de membraan (Figuur 14, tweede kolom). Sommige cellen die D2LR of

D2SR tot expressie brengen vertonen wel een klein percentage aan internalisatie maar dit wordt niet in alle cellen waargenomen. Receptorstimulatie met quinpirole induceerde de internalisatie van de receptoren ook niet. Zoals voor de inductie met dopamine kan een lage graad van internalisatie waargenomen worden in sommige cellen zowel voor D2SR als D2LR. Uit deze resultaten kunnen geen duidelijk conclusies getrokken worden over wat betreft het internalisatiepotentiaal van D2R na stimulatie en verder onderzoek is zeker aangeraden.

8. Functie

8.1. Gevolgen van D4.2R-MOR dimerisatie op ERK1/2-fosforylatie

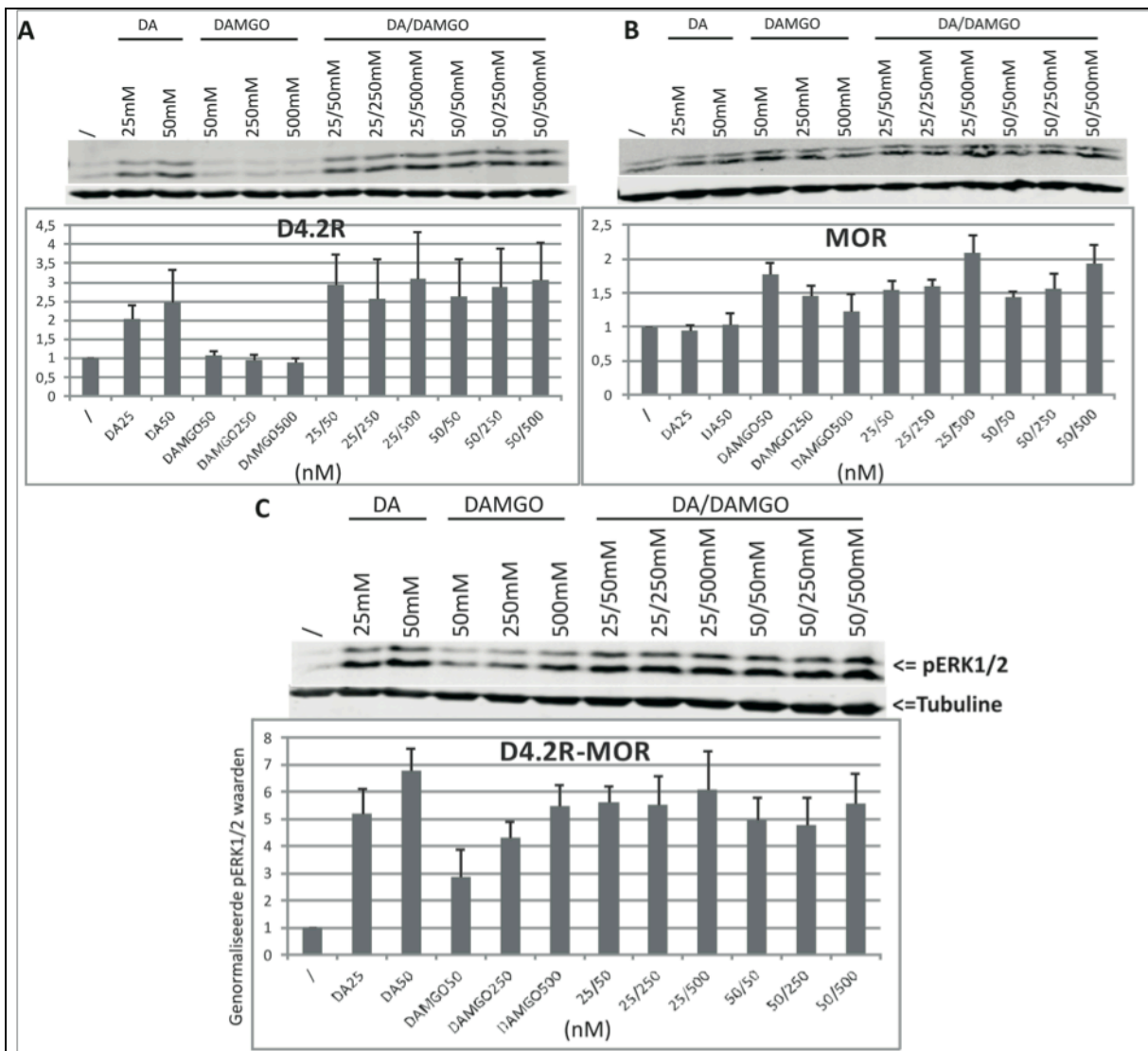
Directe fysische interactie tussen de D4R en MOR is meerdere malen bevestigd in verschillende onafhankelijke experimenten. Over de functie en de gevolgen van deze receptor-receptor interactie is echter nog heel weinig geweten. Hiervoor wordt hier onderzocht indien de dimerisatie van D4.2R, één van de meest voorkomende D4R-polymorfismen, en MOR gevolgen heeft op de fosforylatie van ERK1/2 MAPK (pERK1/2). Dit werd nagegaan door de stijging in ERK1/2-fosforylatie na te gaan na receptorstimulatie met selectieve agonisten. Hiervoor werden HEK293S cellen, die stabiel getransfecteerd werden met zowel pHA-D4.2R- als pFlag-MOR-overexpressievectoren (dubbel stabiele cellen), aangemaakt¹⁷. Transiënt getransfecteerde HEK293S cellen, die ofwel HA-D4.2R ofwel Flag-MOR tot expressie brengen, werden gebruikt ter controle om na te gaan indien er specifieke ERK1/2-fosforylatie plaatsvindt. Cellen, die minstens twee uur voor de start van het experiment overgebracht werden in serum-vrij medium (SMV), werden met verschillende concentraties en combinaties agonisten gedurende drie minuten geïnduceerd, gewassen met PBS en bewaard bij -20°C. Twee verschillende concentraties dopamine werden gebruikt als specifieke D4.2R agonist (25nM en 50nM) en drie verschillende DAMGO concentraties voor de specifieke inductie van MOR (50nM, 250nM en 500nM). De ingevroren cellen werden gelyseerd, ondergingen sonificatie en denatureerd bij 95°C. De cellysaten konden dan op SDS-PAGE gel geladen worden en overgeblot worden op een membraan voor immunodetectie van gefosforyleerd ERK1/2. Deze assay werd in drie onafhankelijke experimenten herhaald in transiënt getransfecteerde HEK293S cellen (controle) en zesmaal in dubbel-stabiele cellen (experiment). De kwantificatie gebeurde door de intensiteit van de banden te meten met de ImageJ-software. De waarden werden genormaliseerd aan de hand van de bekomen tubuline-waarden (op dezelfde manier bepaald als de pERK1/2-waarden) en de resultaten van de niet geïnduceerde stalen gelijk te stellen aan één.

Voorafgaande tijdsinductie-experimenten¹⁸ toonden aan dat, zowel bij dopamine- als bij DAMGO-stimulatie, een drie-minuut durende inductie zorgt voor de hoogste graad in ERK1/2-fosforylatie, in respectievelijk D4R en MOR getransfecteerde HEK293S cellen, (figuur niet weergegeven).

Figuur 15A en B tonen aan dat de agonisten specifiek één van beide receptoren induceren. Dit blijkt uit het feit dat er geen stijging in ERK1/2-fosforylatie waargenomen wordt in afwezigheid van de receptor specifieke agonist. Na DAMGO inductie vertonen de pHA-D4.2R getransfecteerde cellen geen stijging in ERK1/2-fosforylatie (Figuur 15A). Ook omgekeerd is er geen stijging in pERK1/2 in dopamine-geïnduceerde cellen die Flag-MOR tot overexpressie brengen (Figuur 15B). pFlag-MOR getransfecteerde cellen vertonen een onverwachte daling in ERK1/2-fosforylatie bij het toedienen van een stijgende DAMGO-concentratie (in afwezigheid van dopamine) (Figuur 15B) maar dit fenomeen wordt niet meer geobserveerd in stabiel-getransfecteerde cellen (Figuur 15C). Dit kan het gevolg zijn van het feit dat dit experiment slechts driemaal herhaald werd waardoor de resultaten niet geheel representatief zijn.

¹⁷Stabiel getransfecteerde cellen aangemaakt door Béatrice Lintermans.

¹⁸Tijdsinductie-experimenten werden uitgevoerd door Jolien Duchou.



Figuur 15. Dopamine- en/of DAMGO-gestimuleerde ERK1/2-fosforylatie in HEK293S cellen. Elke grafiek vertoont de kwantificatie van de intensiteit van pERK1/2-banden waargenomen op Western blot. Voor de normalisatie van deze waarden werden ze gedeeld door de bandintensiteit van tubuline. Alle waarden werden omgezet zodat de niet-geïnduceerde stalen een waarde van één verkreeg. (A) en (B) Transiënt getransfecteerde cellen met pHA-D4.2R of pFlag-MOR, respectievelijk, werden behandeld met verschillende concentraties en combinaties dopamine (DA) en DAMGO gedurende 3'. (C) Dubbel stabiele HEK293S cellen waarin zowel HA-D4.2R als Flag-MOR tot expressie komen werden behandeld met verschillende concentraties en combinaties dopamine en DAMGO gedurende 3'.

In de eerste zes lanen werden de cellen respectievelijk niet gestimuleerd, DA-stimulatie (25nM en 50nM) of DAMGO-stimulatie (50nM, 250nM, 500nM). In de laatste zes lanen werden de verschillende agonisten gecombineerd (DA/DAMGO). De bovenste lanen representeren de fosfo-ERK1/2 (pERK1/2) die gedetecteerd werden met konijn anti-P-p44/p42 antilichaam (verdunding: 1/1000) en een secundair anti-konijn groen (verdunding: 1/15000) antilichaam. De onderste lanen representeren tubuline dat gedetecteerd werd met muis anti-tubuline (verdunding: 1/1000) en het secundair anti-muis rood antilichaam (verdunding: 1/10000). De foutenbalken representeren de standaard-error van de experimenten. DA = Dopamine; DAMGO = [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; pERK1/2 = gefosforyleerd ERK1/2 = P-p44/p42.

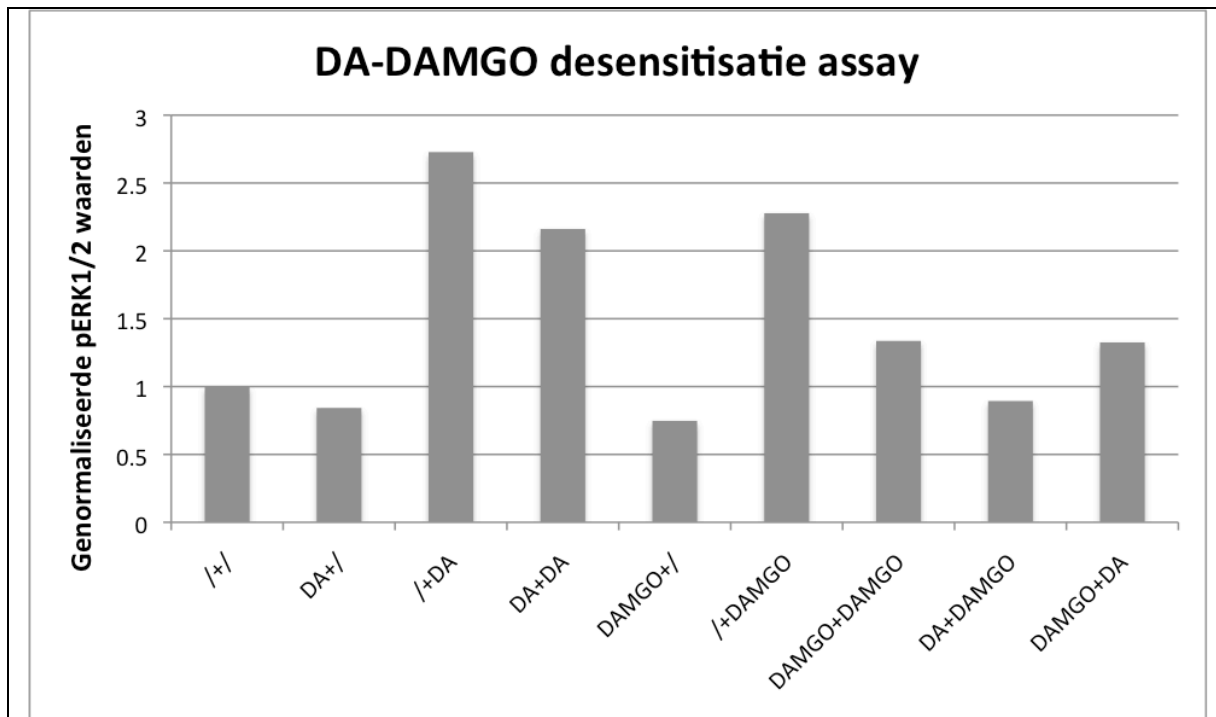
In de dubbel-stabiel getransfecteerde cellen wordt een stijging in ERK1/2-fosforylatie waargenomen indien stijgende concentratie dopamine of DAMGO gebruikt worden (Figuur 15C). Dit geeft aan dat elke receptor apart de fosforylatie van ERK1/2 kan induceren, ook in

de aanwezigheid van stimulatie van de andere receptor. Indien beide receptoren samen gestimuleerd worden is deze stijging nog steeds waarneembaar. De ERK1/2-fosforylatie is even sterk bij de cellen die enkel gestimuleerd worden met dopamine of indien dopamine en DAMGO stimulatie plaatsvindt. Indien dopamine stimulatie vergeleken wordt met de dopamine/DAMGO stimulatie wordt er zelfs een lichte daling in ERK1/2-fosforylatie waargenomen. Uit deze resultaten kan dus niet geconcludeerd worden dat de ERK1/2-signalisatieweg direct beïnvloedt wordt door interactie tussen D4.2R en MOR. De foutenbalken representeren de standaard-error van de experimenten en deze zijn zelfs na zes herhalingen, nog steeds vrij groot. Er kan geen significante verschillen waargenomen worden tussen pERK1/2 concentratie bij het stimuleren van slechts één of beide receptoren. Deze resultaten blijkt dat dopamine en DAMGO agonisten zijn voor D4.2R en MOR, respectievelijk. Dat receptorstimulatie reeds na drie minuten ERK1/2-fosforylatie induceert, zowel als de receptoren alleen of samen tot expressie gebracht worden. Indien beide receptoren samen geïnduceerd worden vindt deze ERK1/2-fosforylatie nog steeds plaats en is er noch een sinergerend-, additief-, of inhiberendeffect waarneembaar.

8.2. Desensitatieassay

De gevolgen van GPCR-activatie zijn divers. Zo zullen receptoren heel snel na activatie ontkoppelen van het G-eiwit waarmee ze interageren. Dit wordt desensitatie genoemd en is een mechanisme dat zich ontwikkeld heeft om overstimulatie van de receptoren tegen te gaan. Desensitatie wordt meestal gevolgd door internalisatie van de receptor. Er bestaan twee soorten desensitatie, homologe en heterologe desensitatie (zie INLEIDING 1.5.1). Hier werd gekeken naar de mogelijkheid op homologe en heterologe desensitatie tussen D4.2R en MOR. Hiervoor werd gebruik gemaakt van dezelfde dubbel stabiele cellijn als voor de ERK1/2 fosforylatieassay. Deze HEK293S cellen brengen zowel HA-D4.2R als Flag-MOR tot overexpressie. In deze cellen werd onderzocht indien langdurige stimulatie van één van beide receptoren het potentiaal tot receptorstimulatie van de andere receptor inhibeert. Dit potentiaal werd nagegaan door, zoals bij de ERK1/2 fosforylatie-assay, de concentratie van pERK1/2 te kwantificeren. Cellen, die de avond voor de start van het experiment in SVM werd overgebracht, werden gedurende acht uur gestimuleerd met dopamine/quinpirole of DAMGO (100nM). Hierna werden de cellen gewassen in PBS en gedurende drie minuten gestimuleerd met de andere agonist. De droogstaande cellen werden bij -20°C bewaard. Een totale-lyse protocol werd uitgevoerd op de cellen en de cellysaten werden op SDS-PAGE gel geladen. Detectie van pERK1/2 gebeurde na Western blot analyse en de kwantificatie met de ImageJ-software.

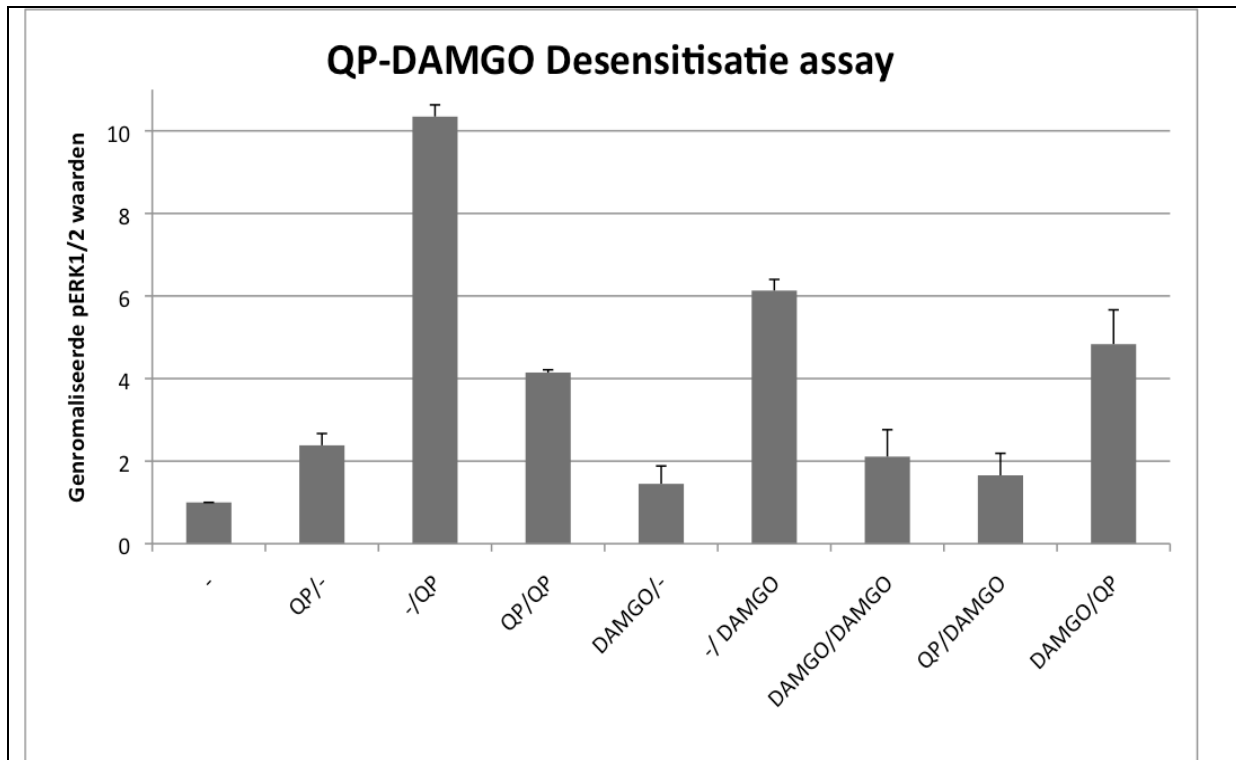
Figuur 16 toont de resultaten van het preliminair experiment aan met dopamine en DAMGO. Uit de vergelijking van de 3^e met de 4^e en ook de 6^e met de 7^e opstelling kan afgeleid worden dat zowel D4R als MOR homologe desensitatie ondergaan. Een langdurige stimulatie van de receptor zorgt namelijk voor een verlaagde receptor responsiviteit. De gevolgen van heterologe desensitatie kunnen geobserveerd worden door opstelling 3 met 9 en 6 met 8 te vergelijken. Hieruit blijkt dat langdurige stimulatie van MOR het potentiaal dat D4R heeft om ERK1/2 te fosforyleren geïnhibeerd wordt, en omgekeerd. Dopamine is een natuurlijke neurotransmitter en kan daardoor afgebroken worden in cellen. Daarom is het niet zeker dat een achtuur durende inductie met dopamine mogelijk is en kunnen de bekomen waarden niet vertrouwd worden.



Figuur 16. HEK293S cellen vertonen homologe en heterologe desensitisatie van D4R en MOR na langdurige dopamine of DAMGO behandeling. HEK293S cellen, die zowel D4.2R als MOR tot expressie brengen, werden al dan niet gedurende 8h voorbehandeld met dopamine of DAMGO (100nM). Om na te gaan indien deze voorbehandeling een invloed heeft op de D4.2R en MOR-signalisatie werden de cellen gedurende 3' gestimuleerd met DAMGO of dopamine (100nM). (8h behandeling/3' behandeling). De ERK1/2-fosforylatie geeft een beeld van receptoractivatie. pERK1/2 werd bepaald via Western blot analyse. Immunoblotting met anti-P-p44/p42 antilichaam (verdunning: 1/1000) en secundair anti-konijn groen antilichaam (verdunning: 1/15000) geeft een beeld dat gekwantificeerd kan worden. Voor de normalisatie van deze waarden werden ze gedeeld door de bandintensiteit van tubuline. Alle waarden werden omgezet zodat de niet-geïnduceerde stalen een waarde van één verkreeg. Dit experiment werd éénmaal uitgevoerd. DAMGO = [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; DA = dopamine; pERK1/2 = gefosforyleerd ERK1/2 = P-p44/p42.

Deze assay werd herhaald met quinpirole, een synthetische D2-type receptor agonist. Omdat deze stof niet voorkomt in natuurlijke cellen, zal deze niet afgebroken worden en is het mogelijk om een achtuur durende inductie uit te voeren. Deze assay werd éénmaal uitgevoerd in twee parallelle experimenten en de foutenbalken representeren de standaarderror bepaald uit deze waarden.

Figuur 17 toont aan dat zowel na langdurige inductie van D4.2R en MOR er homologe desensitatie plaatsvindt. Er wordt namelijk een daling in ERK1/2-fosforylatie waargenomen na agonist inductie, indien de cellen voorbehandeld werden voor acht uur met dezelfde agonist (vergelijking tussen kolommen 3-4 en 6-7). Er kan ook heterologe desensitatie geobserveerd worden, zowel wanneer de cellen voorbehandeld werden met quinpirole als met DAMGO (vergelijking tussen kolommen 3-9 en 6-8). Homologe en heterologe desensitatie blijken even sterk te zijn voor het D4.2R-MOR dimeer. Dit zou een aanwijzing kunnen zijn voor een interactie tussen beide receptoren en zou een van de functies van deze interactie kunnen zijn.



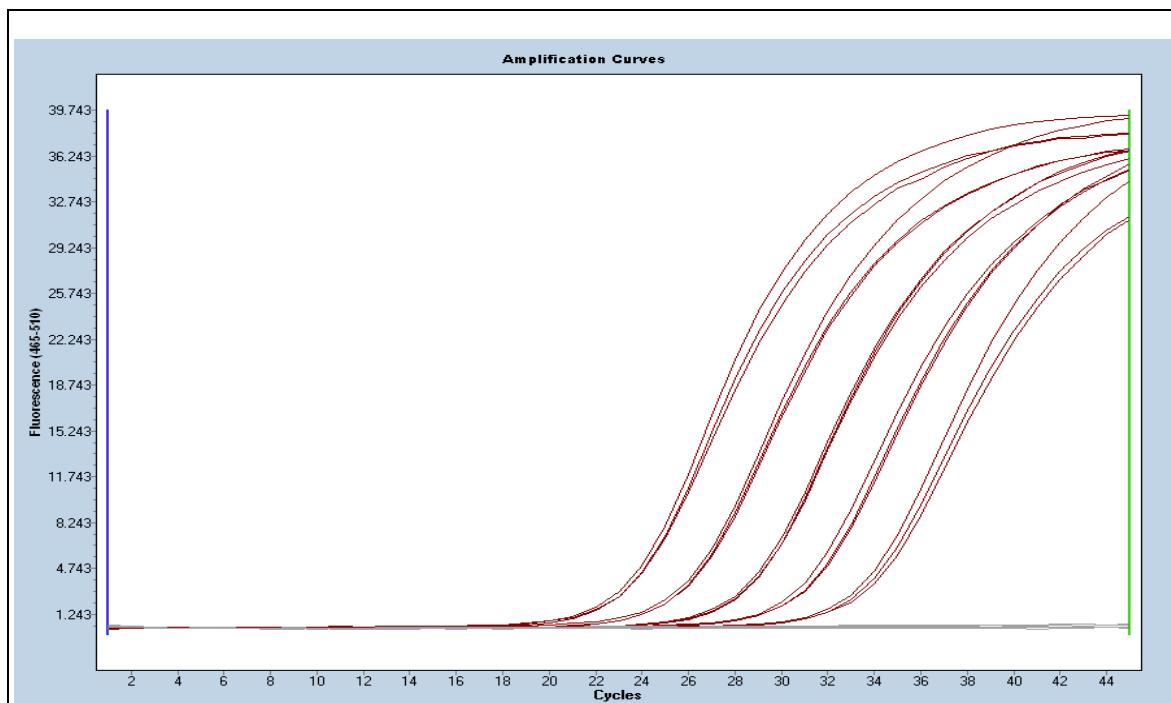
Figuur 17. HEK293S cellen vertonen homologe en heterologe desensitisatie van D4R en MOR na langdurige quinpirole of DAMGO behandeling. HEK293S cellen, die zowel D4.2R als MOR tot expressie brengen, werden al dan niet gedurende 8h voorbehandeld met DAMGO of quinpirole (100nM). Om na te gaan indien deze voorbehandeling een invloed heeft op de D4.2R en MOR-signalisatie werden de cellen gedurende 3' gestimuleerd met DAMGO of quinpirole (100nM). (8h behandeling/3' behandeling). De ERK1/2-fosforylatie geeft een beeld van receptoractivatie. pERK1/2 werd bepaald via Western blot analyse. Immunoblotting met anti-P-p44/p42 antilichaam (verdunning: 1/1000) en secundair anti-konijn groen antilichaam (verdunning: 1/15000) geeft een beeld dat gekwantificeerd kan worden. Voor de normalisatie van deze waarden werden ze gedeeld door de bandintensiteit van tubuline. Alle waarden werden omgezet zodat de niet-geïnduceerde stalen een waarde van één verkreeg. Dit experiment werd éénmaal uitgevoerd in twee parallele experimenten en de foutenbalken representeren de standaarderror bepaald uit deze waarden. DAMGO = [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin; QP = quinpirole; pERK1/2 = gefosforyleerd ERK1/2 = P-p44/p42.

Uit deze resultaten blijkt duidelijk dat zowel D4R als MOR zowel homologe als heterologe desensitisatie plaatsvindt na langdurige receptorstimulatie. Dit geeft aan dat D4R en MOR met elkaar interageren aan de plasmamembraan, en is een eerste stap naar het ophelderen van de functie van deze dimerisatie. De foutenbalken verkregen in Figuur 17 zijn erg klein. Dit komt echter omdat de uitgevoerde experimenten niet onafhankelijk uitgevoerd werden.

9. Indirecte interactie

9.1. Indirecte gevolgen van de D2-type receptor-MOR interactie

GPCR's kunnen elkaar beïnvloeden op verschillende manieren. BRET en CoIP-studies hebben aangetoond D2-type receptoren fysisch interageren met MOR wanneer deze tot overexpressie gebracht worden in HEK293 cellen. Om de gevolgen van deze interactie te onderzoeken in een meer natuurlijke setting werd onderzocht indien stimulatie van de ene receptor, de expressie van de andere beïnvloedt. Om dit na te gaan kan er gekeken worden naar MOR-expressie na inductie van D2-type receptoren in SH-SY5Y cellen. Dit is een humane neuroblastoom cellijn die beide receptoren endogeen tot expressie brengen (Kamakura et al, 1997; Yu & Sadee, 1988). MOR expressieniveaus kunnen dan bepaald worden door een kwantitatieve polymerisatie kettingreactie (QPCR) uit te voeren op cDNA geproduceerd uit RNA dat opgezuiverd wordt uit deze cellen. Door tijdsgebrek en problemen met het opstarten van de SH-SY5Y-celijn¹⁹ werden hier enkel de primers getest.



Figuur 18. Amplificatie curve van MOR-primer test na QPCR-analyse. Representatie van de vijftien amplificatiecurven (5 maal 3 parallele herhalingen) van de verdunningsreeks van MOR en negen controle stalen na QPCR analyse. De rode curven representeren van links naar rechts: de onverdunde, 5x, 25x, 125x en 625x verdunde stalen. De grijze curven representeren de controle stalen die geen MOR-cDNA bevatten. Op de x-as worden het aantal PCR-cycli die doorlopen werden en de y-as geeft een representatie van het fluorescent signaal dat vrijkomt door het SYBR-Green dat dubbelstrengig DNA bindt. Dit experiment werd uitgevoerd door Jolien Duchou en meegevolgd door Gabriëlle Van der Eecken.

Opgezuiverd MOR-RNA²⁰ werd omgezet naar cDNA via een PCR-reactie waarbij gebruik werd gemaakt van M-MLV²¹ reverse transcriptase. Om na te gaan indien de primers (sense primer 5'-CTGGGTCAACTTGCCCACT-3' en een antisense primer 5'-TGGAGTAGAGGGCCATGATC-3')

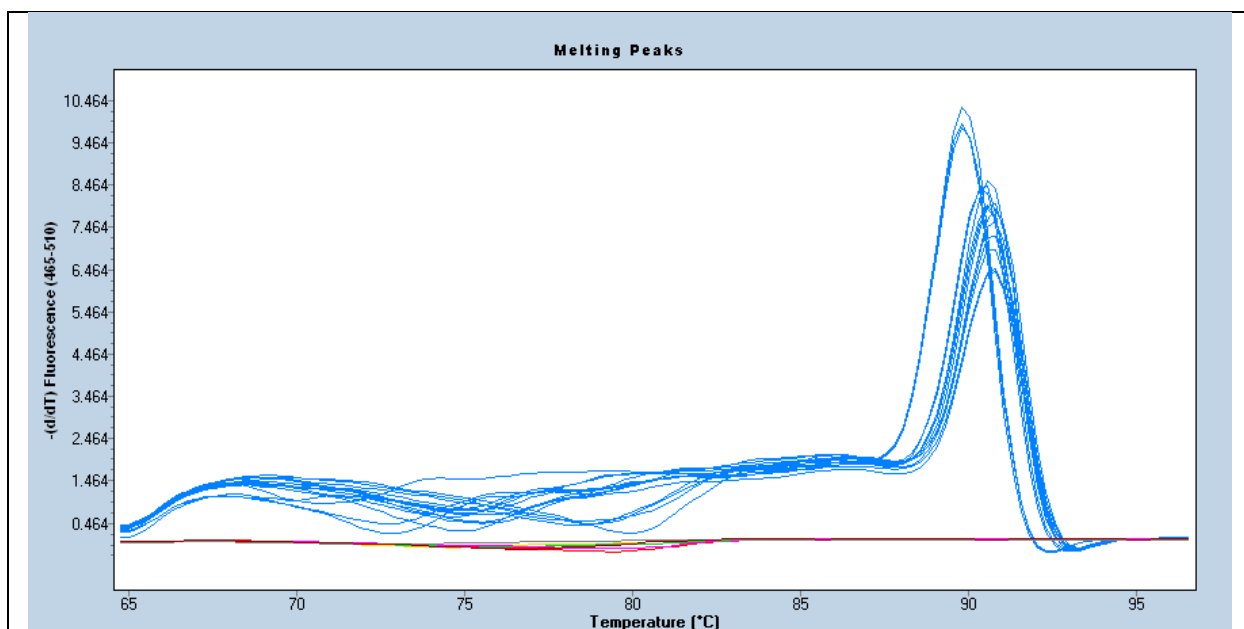
¹⁹ Het opstarten van de SH-SY5Y cellijn werd uitgevoerd door Jolien Duchou

²⁰ Opzuivering uitgevoerd door Jolien Duchou

²¹ M-MLV: Moloney murine leukemia virus

correct binden op het cDNA werd een verdunningsreeks van het bekomen cDNA gemaakt. Vijf verdunningen werden getest: onverdund, 5x, 25x, 125x en 625x. Om na te gaan indien de primers specifiek waren werden verschillende blanco controles getest waarbij geen cDNA aan de mastermix werd toegevoegd.

Op Figuur 18 kunnen de vijf verdunningen van het MOR-cDNA waargenomen worden. Hoe minder het staal verdund is hoe sneller de fluorescentie meetbaar is. De eerst, meest links gelegen, curve representeert dus de niet verdunde staal en de laatste, meest rechtse, curve de meest verdunde staal (625x). Op deze figuur kunnen ook controlestalen geobserveerd worden (grijze craven). Deze tonen aan dat er geen DNA-amplificatie plaatsvond in deze stalen. Geen enkele van de controlecurve vertoont een stijging in fluorescentie. Voor dit experiment werden de Ct-waarden niet bepaald omdat dit enkel werd uitgevoerd om de primerefficiëntie na te gaan. De smeltcurve, weergegeven in Figuur 19, toont aan dat alle geproduceerde DNA-fragmenten een vergelijkbare lengte hebben en dat er zich geen primer-dimeren hebben gevormd.



Figuur 19. Smeltcurve van QPCR voor MOR-primer test. Representatie van de vijftien smeltcurven van de verdunningsreeks van MOR na QPCR analyse. De blauwe curven representeren de onverdunde, 5x, 25x, 125x en 625x verdunde stalen, waarbij elke opstelling driemaal in parallel uitgevoerd werd. De ander curven representeren de contole stalen die geen MOR-cDNA bevatten. Dit experiment werd uitgevoerd door Jolien Duchou en meegevolgd door Gabrielle Van der Eecken.

Uit deze resultaten kan besloten worden dat de gebruikte primers specifiek genoeg zijn en dus gebruikt kunnen worden voor verder onderzoek naar de invloed van D2R-type receptor stimulatie op MOR expressie in SH-SY5Y cellen.

DISCUSSIE

1. Algemeen

In het laatste decennium zijn het aantal studies die GPCR-dimerisatie aantonen almaar toegenomen. Het is nu algemeen aanvaard dat de meerderheid van de GPCR's homodimeriseren. Sommige GPCR's zijn ook in staat om te heterodimeriseren. De meerderheid van de onderzoeken focussen zich op de heterodimerisatie van GPCR's die behoren tot dezelfde groep. Zo werd bijvoorbeeld reeds waargenomen dat D4R dimeriseert met D2R (Borrito-Escuela et al, 2011) en dat MOR dimeriseert met DOR (George et al, 2000). In het centraal zenuwstelsel is het dopamine-systeem nauw verbonden met het opioïd-systeem. Zowel de D4R als de MOR komen tot expressie in dezelfde regio's in het striatum, de eilanden of striosomen (Rivera et al, 2002). Deze overlap zou kunnen wijzen op een interactie tussen beide receptoren. Zo werd aangetoond dat beide systemen elkaar beïnvloeden in het striatum en daar de normale bewegingscapaciteit en motivatie beïnvloeden (Chen et al, 2005). Daarnaast hebben Gago en collega's beschreven dat D4R en MOR interageren in de striatum eilanden van de rat en dat deze interactie kan leiden tot neerregulatie van MOR zes uur na D4R stimulatie (Gago et al, 2007). Dit wijst op een indirect effect tussen beide receptoren. Recenter onderzoek, uitgevoerd in LEGEST in samenwerking met het Karolinska instituut, bevestigt een directe interactie tussen D4R en MOR. Dit werd bewezen door gebruik te maken van immunoprecipitatie en BRET-assays (nog ongepubliceerd).

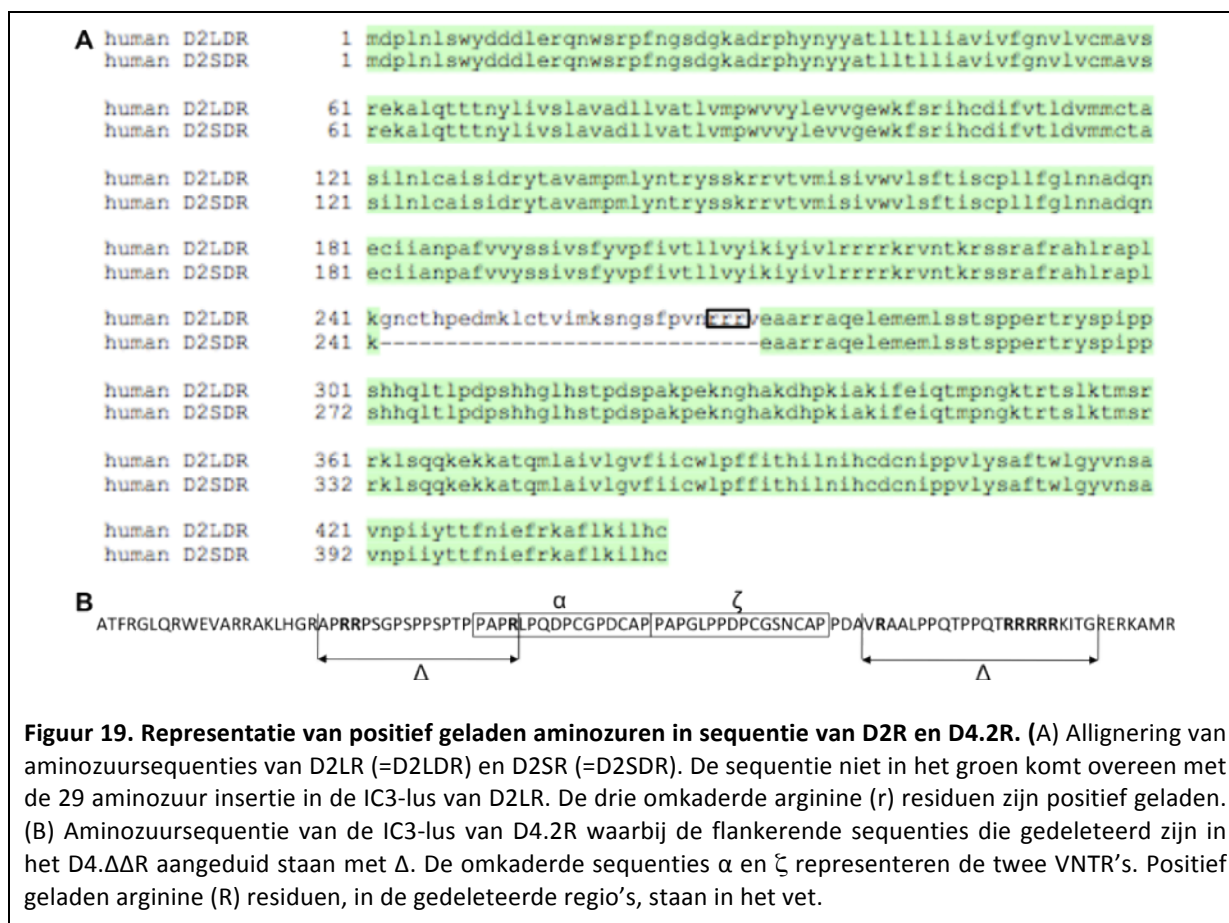
In deze thesis werden de eerste stappen gezet naar het achterhalen van de receptordomeinen betrokken in deze interactie en de mogelijke functie van deze dimerisatie. Ook de indirecte gevolgen van deze receptor-receptor interactie werden nader onderzocht. Deze studies worden uitgevoerd in artificiële omstandigheden waarbij de receptorconstructen tot overexpressie gebracht werden in bvb. HEK293 cellen. Er bestaat enige scepticisme rond deze aanpak omdat gedacht wordt dat hoge receptor-expressie de GPCR dimerisatie induceert. Hierdoor zou de geobserveerde dimerisatie mogelijks geheel of gedeeltelijk het gevolg zijn van een artefact te wijten aan de receptoroverexpressie. Er werd echter bewezen dat de dimerisatie van de β 2-adrenerge receptor onafhankelijk is van het expressieniveau van de receptor (Mercier et al, 2002). Het analyseren van de D2-type receptor interactie met MOR zal onderzocht worden via verschillende technieken (coprecipitatie, BRET) wat voor extra evidentie van de D4R-MOR dimerisatie zorgt .

2. Directe interactie

In het eerst luik van dit onderzoek werd er getracht om de receptordomeinen die betrokken zijn bij de D2-type receptor-MOR dimerisatie te achterhalen door gebruik te maken van verschillende receptorvarianten. Hiervoor werd voornamelijk gebruik gemaakt van immunoprecipitatie en GST 'pull-down' assays. Aan de hand van D4R-mutanten, D4.0R en D4. $\Delta\Delta$ R, werd achterhaald dat het deleteren van het polymorfisme in de IC3-lus of de arginine-rijke regio's die dit domein flankeren de D4R-MOR dimerisatie niet beïnvloeden (Figuur 19B). Het deleteren van de positief geladen flankerende sequenties zou wel voor een sterkere interactie tussen beide receptoren kunnen zorgen (Figuur 6A, laatste laan), al kan dit niet met zekerheid geconcludeerd worden uit immunoprecipitatieassays. Verder onderzoek naar de interagerende domeinen werd uitgevoerd met een GST 'pull-down' assay waarbij nagegaan werd als het C-terminaal domein en de IC3-lus van D4R interageren met de MOR (Figuur 7A). Deze assay werd voor het eerst en slechts éénmaal uitgevoerd door

tijdsgebrek. Hierdoor, en door het ontbreken van voldoende controles, is het niet zeker indien het ontbreken van interactie te wijten is aan de afwezigheid ervan of indien de assay niet gelukt was. Verdere studies met een betere experimentele opstelling waarbij positieve controles ingebouwd worden is dus zeker aangeraden. Naast coprecipitatieassays kunnen BRET-experimenten bijdragen tot het ophelderen van de domeinen betrokken bij dimerisatie. Zo zullen deze studies de sterkte van de interactie tussen de verschillende D4R-varianten en MOR kunnen kwantificeren. Hoewel coimmunoprecipitatieassays aanwijzingen geven over de aanwezigheid van de interactie tussen D4.ΔΔR en MOR zijn deze waarnemingen niet kwantificeerbaar. BRET saturatie-studies geven een oplossing voor dit probleem. Gewone BRET studies geven geen kwantitatieve maat voor dimerisatiepotentiaal weer, daarom is het best om saturatie-experimenten hieraan te koppelen. Voor deze assays waren de YFP-fusieconstructen reeds ter beschikking maar de Rluc-plasmiden moesten nog aangemaakt worden. De constructie van deze plasmiden werd gestart. Eerst werden de D4R-varianten, D4.0R en D4.ΔΔR in een pCR-Blunt II-TOPO vector gekloneerd. Na restrictiedigest kunnen de gewenste sequenties in frame geligeerd worden met het Renilla luciferase in de Rluc-N1 vector. De laatste ligatie-stap bleek niet door te gaan. Omdat er EcoRI restrictiesites aanwezig zijn in de pCR-Blunt II-TOPO vector zou het kunnen dat de verkeerde restrictiefragmenten gevormd werden. Door een ander restrictie-enzyme te gebruiken zou dit kunnen verhelpen. Door tijdsgebrek werd deze assay nog niet uitgevoerd. Deze studies geven een eerste indruk van de mogelijke interactiedomeinen die betrokken zijn bij de dimerisatie van D4R en MOR. Omdat er zo een hoge sequentie similariteit bestaat tussen de D4R en D2R (58%) werd ook onderzocht indien deze receptor interageert met MOR. Door gebruik te maken van de twee meest voorkomende splice varianten (D2LR en D2SR) kan achterhaald worden indien de insertie, gelegen in de IC3-lus van D2LR, deel uitmaakt van het dimerisatievlak tussen beide receptoren. Coimmunoprecipitatiestudies tonen aan dat zowel D2LR als D2SR interageren met MOR (Figuur 10 en 11). Om na te gaan indien deze interactie ook plaatsvindt aan de plasmamembraan werden membraamimmunoprecipitatieassays uitgevoerd. Hier werd echter waargenomen dat D2LR, in tegenstelling tot D2SR, niet meer interageert met MOR (Figuur 12 en 13). Beide receptoren komen voor aan de plasmamembraan van de HEK293T cellen zoals bevestigd werd met een immunofluorescentieassay (Figuur 14). Hieruit volgt dus dat beide receptoren in staat zijn om te interageren met MOR (aangetoond met CoIP) en dat ze beiden voorkomen aan de plasmamembraan waar enkel de korte isovorm (D2SR) interageert met MOR. Er kan gehypotheseerd worden dat D2LR interageert met een andere molecule aan de plasmamembraan waardoor de interactie met MOR wordt tegengegaan. Er zou dus gesteld kunnen worden dat de insertie in D2LR niet rechtstreeks betrokken is met de dimerisatie met MOR maar wel met een andere molecule. Figuur 19A toont aan dat er positief geladen arginine residuen aanwezig zijn in de IC3-lus van D2LR ter hoogte van de insertiesequentie. Als deze gegevens en deze van de IP van D4ΔΔR met MOR bij samen bekeken worden zou kunnen vermoed worden dat de aanwezigheid van extra positieve ladingen in de IC3-lus een negatieve invloed hebben op de dimerisatie met MOR. Om dit verder te onderzoeken zouden puntmutaties aangebracht kunnen worden in D2-type receptoren ter hoogte van de positief geladen residuen om na te gaan indien deze een invloed op dimerisatie zouden hebben. In de toekomst wordt gepland om een interfererend peptide aan de hand van de data die bekomen worden uit deze studies. Dit peptide zal dan gebruikt kunnen worden

voor functionele studies zodat bevestigd kan worden dat de bekomen data het gevolg zijn van de directe interactie tussen beide receptoren (Pei et al, 2010).



Figuur 19. Representatie van positief geladen aminozuren in sequentie van D2R en D4.2R. (A) Allignering van aminozuursequenties van D2LR (=D2LDR) en D2SR (=D2SDR). De sequentie niet in het groen komt overeen met de 29 aminozuur insertie in de IC3-lus van D2LR. De drie omkaderde arginine (r) residuen zijn positief geladen. (B) Aminozuursequentie van de IC3-lus van D4.2R waarbij de flankerende sequenties die gedeleteerd zijn in het D4.ΔΔR aangeduid staan met Δ. De omkaderde sequenties α en ζ representeren de twee VNTR's. Positief geladen arginine (R) residuen, in de gedeleteerde regio's, staan in het vet.

In het kader van het onderzoek naar de D2R-MOR dimerisatie bleek dat er nog onduidelijkheid bestond over de internalisatie van D2R na agonist stimulatie. Sommige artikels beweren dat er steeds internalisatie plaatsvindt (Kim et al, 2001; Spooren et al, 2010; Vickery & von Zastrow, 1999), terwijl andere beweren dat dit enkel onder specifieke omstandigheden plaatsvindt zoals na dimerisatie met de D1R of in aanwezigheid van GRK2 (Iwata et al, 1999; So et al, 2005). Deze bevindingen zijn ook afhankelijk van de D2R-splicevariant en van het celtype waarmee de studie uitgevoerd werd en extra onderzoek hieromtrent is nodig. Om dit op te klaren werd dit via immunofluorescentie onderzocht. Uit dit experiment blijkt dat zowel D2LR als D2SR voorkomen aan de membraan van de cellen die niet geïnduceerd werden (Figuur 14). De bekomen beelden konden echter geen uitsluitsel bieden voor wat betreft de internalisatie na receptorstimulatie. Sommige cellen vertoonden een lage graad van internalisatie na dopamine of quinpirole inductie maar dit fenomeen werd niet in alle cellen waargenomen. Voorgaand experimenten uitgevoerd in LEGEST, Spooren. A in 2010 en ongepubliceerde resultaten van Duchou, J, tonen aan dat er duidelijk internalisatie van de D2R plaatsvindt na receptorstimulatie. Uit al deze resultaten kunnen dus nog steeds geen definitieve conclusies getrokken worden over het gedrag van D2R na agonist stimulatie. Om dit op te klaren en de internalisatie resultaten te kwantificeren zou gebruik gemaakt kunnen worden van andere assays zoals flowcytometrie of 'on-cell western' assays.

3. Functie

In het tweede luik van deze thesis werd onderzocht wat de functie van de dimerisatie van deze receptoren is. Hierover is nog heel weinig geweten.

Verder onderzoek naar de functie van de D4R-MOR dimerisatie werd uitgevoerd door gebruik te maken van de capaciteit die beide receptoren bezitten om na activatie het ERK1/2 te fosforyleren. Om na te gaan indien agoniststimulatie van één van beide receptoren de andere beïnvloedt werd nagegaan indien er een verschil in ERK1/2-fosforylatie observeerbaar is na receptorstimulatie. Uit deze resultaten blijkt echter dat agoniststimulatie van beide receptoren noch een sinergerend-, additief-, of inhiberendeffect heeft op ERK1/2-fosforylatie (Figuur 15). Dit toont niet aan dat er een mogelijke interactie tussen beide receptoren plaatsvindt. De ERK1/2-fosforylatie is een gebeurtenis die pas enkele stappen stroomafwaarts van de receptoractivatie plaatsvindt. Hierdoor zou het kunnen dat niet enkel de directe interactie tussen beide receptoren maar ook, omdat de intracellulaire signaalwegen elkaar kruisen, de interactie van stroomafwaarts gelegen moleculen de resultaten beïnvloeden. Op vergelijkbare manier werd onderzocht indien desensitisatie plaatsvindt na langdurige receptorstimulatie. Cellen die beide receptoren tot expressie brachten werden langdurig gestimuleerd (met dopamine/quinpirole of DAMGO) en achteraf werd gekeken naar hun potentiaal om ERK1/2 te fosforyleren. Zo werd achterhaald nagegaan indien de receptoren een verlaagde signaaltransductie capaciteit vertonen. Uit deze resultaten bleek dat er zowel voor D4R als MOR homologe desensitisatie plaatsvindt (Figuur 17). Heterologe desensitisatie werd ook waargenomen voor deze receptoren. De kleine foutenbalken in Figuur 17 zijn te wijten aan het feit dat beide uitgevoerde experimenten in parallel uitgevoerd werden. Dit experiment zou nog enkele malen herhaald moeten worden om een bevestiging te krijgen van de desensitisatie. Alle waarden bekomen voor zowel de ERK1/2-fosforylatie assay als de desensitisatieassay werden genormaliseerd door gebruik te maken van het kwantificeren van tubuline. De tubuline-waarden geven een beeld van het aantal cellen die gelyseerd werden voor elke staal. In de toekomst zou het misschien interessanter zijn om deze waarden te normaliseren met het totaal ERK1/2 waarden (hiervoor bestaan ook antilichamen). Hierdoor wordt een beter beeld gekregen van het percentage gefosforyleerd ERK1/2 in vergelijking met het totaal aanwezige ERK1/2 in de cel.

4. Indirecte interactie

Het derde luik van deze thesis focust op de indirecte interactie tussen D2-type receptoren en MOR. Uit preliminaire studies, uitgevoerd door de groep van professor Rivera, blijkt dat chronische blokkering van D4R leidt tot een betere pijntolerantie in ratten (Rivera et al, 2002). Om het moleculair mechanisme van deze observaties te achterhalen kan de rol van de D4R stimulatie op de promotor van MOR onderzocht worden. De eenvoudigste techniek om dit te onderzoeken zou gebruik maken van een reporterconstruct waarbij de MOR-promotor gefuseerd wordt aan een reporter gen zoals luciferase. Preliminaire studies (uitgevoerd door Duchou J.) met zo een construct bleken echter niet te werken. Hierdoor wordt er hier gewerkt met neuroblastomen (SH-SY5Y cellijn) die beide receptoren endogeen tot expressie brengen (Kamakura et al, 1997; Yu & Sadee, 1988). Via QPCR-analyse zal dan achterhaald worden indien de stimulatie van D4R een verandering in MOR-expressie kan teweegbrengen. Problemen met het opstarten van de SH-SY5Y cellijn hebben ertoe geleid

dat enkel de primers getest konden worden. Deze resultaten geven aan dat de gekozen primers specifiek genoeg zijn en dat er geen primer-dimeren gevormd worden.

5. Conclusie

Ter conclusie kan gesteld worden dat de positief geladen domeinen in de derde intracellulaire lus van D2-type receptoren een antagonistische effect hebben op de dimerisatie van D4R met MOR. Dit werd waargenomen in twee onafhankelijke experimenten waarbij zowel D2R als D4R dimerisatie met MOR getest werd. Immunofluorescentiestudies geven geen objectieve representaties van agonist gestimuleerde internalisatie van de D2R, hiervoor zouden andere technieken een oplossing kunnen bieden. De functie van de D4R-MOR interactie is nog niet duidelijk. Uit ERK1/2-fosforylatie experimenten blijkt niet dat deze receptoren elkaars signalisatie beïnvloeden. Langdurige receptorstimulatie kan echter wel leiden tot zowel homologe als heterologe desensitisatie. Dit geeft extra evidentie voor de directe interactie tussen beide receptoren. Voor de indirecte interactie tussen D2-type receptoren en MOR werd geen tijd gevonden.

MATERIAAL EN METHODEN

1. Weefselcultuur

'Human embryonic kidney 293T' (HEK293T) (American Type Culture Collection (Manassas, VA)) en stabiele HEK293S (waarin de glycosilatie signalisatieweg onderbroken is, Reeves et al., 2002) cellen werden opgegroeid in 'dulbecco's modified eagle medium' (DMEM) verrijkt met 2mM L-glutamine, 100 units/ml penicilline/streptomycine en 10% foetaal kalf serum (FKS). Deze cellen werden in cultuur gehouden in een mycoplasma-vrije incubator bij 37°C met een vochtige atmosfeer en 5% CO₂. De cellen werden gesplitst wanneer een confluentie van 75-95% werd bekomen, ongeveer tweemaal per week.

2. Fusieproteïnen en expressievectoren

De plasmiden met epitoot gelabelde humane receptoren: pHA-D4.0R en pHA-D4.2R (voorzien door Dr. Van Tol van de universiteit van Toronto in Canada); pHA-D4.ΔΔR (D4.2R met deleties [233-253] en [283-307]) voorzien door Oldenhof; pHA-D2LR, pFLAG-D2SR en HA-MOR (hMOR1) werden reeds beschreven (Oak et al., 2001); hMOR-1: pMOR-YFP voorzien door Prof. Fuxe van het Karolinska instituut in Zweden; pFlag-MOR voorzien door Dr. von Zastrow.

3. Klonering voor productie van BRET-vector

Het open leesraam van twee receptor-mutanten van D4R; D4.0R en D4ΔΔR, werd geamplificeerd uit pcDNA3 vectoren via PCR met *Pfu* DNA polymerase (Promega, Madison WI USA). Volgende primers werden hiervoor gebruikt: sense primer (5´-GTGCTCGAGCACCATGGGTAACCGAAGCACAG-3´) en antisense primer zonder stop codon²² (5´-GCCAATTCGCAGCAAGCACGTAGAGCCTTACG-3´). In deze primers zitten unieke *XhoI* and *EcoRI* restrictiesites (onderlijnd in sequentie), respectievelijk. Het fragment werd eerst via Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) in een pCR®-Blunt II-TOPO® vector gekloneerd. Daarna werd het fragment in frame in den pRluc²³-N1 vector (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) gekloneerd in de *NheI* en de *XhoI* restrictiesite. Tussen elke kloneringsstap werd een deel van het bekomen DNA op 1,2% agarose gel in TBE buffer geladen om na te gaan indien het correcte fragment nog steeds aanwezig was. Visualisatie van de fragmenten gebeurde met ethydiumbromide en onder UV-licht. De geproduceerde vector zou dan gebruikt worden voor een BRET-assay.

4. Transiënte transfectie

De transfectie gebeurde met plasmide DNA via de calciumfosfaat methode. Hiervoor werden HEK293T cellen (behalve waar expliciet vermeld staat dat HEK293S cellen gebruikt werden) gegroeid tot subconfluentie in 10cm-platen. Voor de transfectie werd het medium ververs met 9ml DMEM met 10% FKS. Een mix van 100µl CaCl₂, 10µg DNA en 390µl 0,1% TE-buffer werd bij 500µl BS/HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethaansulfide zuur) gedruppeld. Na mengen door lucht in de epjes te blazen werd deze mix van 1ml aan de cellen toegevoegd en voor zes uur in de incubator geplaatst waarna het medium ververs werd met DMEM verrijkt met 10% FKS. In elk experiment werd telkens een extra controleplaat getransfecteerd met pE-GFP zodat er kon nagegaan worden indien de transfectie gelukt was onder de fluorescentiemicroscoop. Achtenveertig uur later konden de cellen gecollecteerd

²² Geen stopcodon zodat een fusieproteïne geproduceerd kan worden.

²³ Rluc = Renilla luciferase

worden met koude PBSA (fosfaat buffer saline), waarna ze afgedraaid en droog bewaard worden bij -70°C . Voor transfecties in 6-well platen werd hetzelfde protocol gebruikt met volgende hoeveelheden per well: $20\mu\text{l}$ CaCl_2 , $2\mu\text{g}$ DNA, $78\mu\text{l}$ 0,1% TE-buffer en $100\mu\text{l}$ BS/HEPES.

5. Immunoprecipitatie

5.1. Coimmunoprecipitatie

Cellen komende uit -70°C werden gelyseerd met radioimmunoprecipitatie (RIPA) buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS²⁴) waaraan, net voor lyseren, 0,5% natriumdeoxycholinezuur (DOC) en protease inhibitoren ($2,5\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinine, 1mM Pefabloc (4-(2-Aminoethyl)-benzeensulfonyl fluoride hydrochloride), $10\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptine (N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal), 10mM β -glycerolfosfaat) toegevoegd werd. Na 1h bij 4°C werden de cellysaten afgedraaid (8000rcf bij 4°C) voor 10' en het supernatans werd bewaard waarvan $40\mu\text{l}$ apart gehouden als controle. Een extra stap werd ingelast voor de D4R-mutanten-MOR dimerisatie waarbij de eiwitconcentratie van de stalen werd bepaald via de BCA-kit (Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Thermo scientific) zodat alle stalen een vergelijkbare concentratie eiwitten bevatten. De rest van het supernatans werd 1h bij 4°C geroteerd met $2\mu\text{g}$ antilichaam per staal. $20\mu\text{l}$ gewassen parels (Protein A UltraLink[®] Resin, Thermo scientific) werd aan elke staal toegevoegd waarna de stalen overnacht terug bij 4°C geroteerd werden. 's Anderendaags werden de stalen gecentrifugeerd bij 1000rpm voor 1', het supernatans werd afgezogen en de beads werden drie maal gewassen met RIPA met telkens een centrifugatiestap tussen elke wasbeurt. Om de eiwitten van de beads te elueren werd vervolgens 4x laemml buffer (4% SDS, 20% glycerol, 62mM Tris-HCl pH 6.8, 0,01% broomfenolblauw) aan de beads en 5x laemml buffer (5% SDS, 40% glycerol, 155mM Tris-HCl pH 6.8, 0,025% broomfenolblauw) met vers dithiothreitol (50mM DTT), aan de controlestalen toegevoegd. Om de eiwitten te denatureren werden alle stalen voor 10' bij 37°C opgewarmd waarna op een discontinue acrylamide SDS-PAGE²⁵ gel te laden.

5.2. Membraanimmunoprecipitatie

Deze assay komt overeen met een coimmunoprecipitatie van eiwitten gelegen aan de plasmamembraan. Door eerst de eiwitten te detecteren met antilichamen en pas achteraf de cellen te lyseren worden enkel eiwitten aan de membraan gedetecteerd.

Transiënt getransfecteerde HEK293T cellen ($2,5 \cdot 10^6$ cellen) werden geïncubeerd met PBSA, afgedraaid en heropgelost in D-MEM serum vrij medium (SVM) waarin primair antilichaam gericht tegen de receptorfusiepeptide (anti-HA 16B12 of anti-flag M2; 1/1000) opgelost werd. De cellen werden geïncubeerd voor 2h bij 37°C , waarna ze gewassen werden met PBS en gelyseerd in RIPA buffer voor 2h bij 4°C . De cellysaten werden afgedraaid (8000rcf bij 4°C) voor 10' en het supernatans werd bewaard. Hiervan werd $40\mu\text{l}$ apart gehouden als controle. Aan de rest van het supernatans werd $20\mu\text{l}$ gewassen Pierce Protein A trysacryl resin beads toegevoegd waarna de stalen overnacht terug bij 4°C geroteerd werden. 's Anderendaags worden de beads gewassen en volgt het protocol dit van de immunoprecipitatie.

²⁴ SDS = natriumdodecylsulfaat

²⁵ SDS-PAGE = natriumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese

6. GST 'pull-down' assay

HEK293T cellen ($2,5 \cdot 10^6$ cellen/gemiddelde plaat) werden geïncubeerd na 48h transfectie, met 10 μ g HA-MOR of pcDNA3 plasmide (controle), en bewaard bij -70°C tot de start van het experiment. De celpellets werden gelyseerd en voor 30' bij 4°C geïncubeerd in celextractiebuffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) met 1mM PMSF (fenyl methyl sulfonyl fluoride) en protease inhibitoren (zie immunoprecipitatie). De celextracten werden dan voor 10' bij 16000 rcf bij 4°C gecentrifugeerd en het bekomen supernatans werd gebruikt voor de 'pull-down' assay. Zoals bij de immunoprecipitatie assay werd ook hier 40 μ l supernatans ter controle apart gehouden. Voor de 'pull-down' werd het celextract geïncubeerd met 30 μ g GST (glutathione S-transferase), GST-IC3, GST-C peptiden²⁶ voor 2h bij 4°C waarna 30 μ l Glutathion sepharose 4B beads (GE-healthcare) aan de stalen werd toegevoegd en overnacht geroteerd bij 4°C. 's Anderendaags werden de beads drie maal gewassen in koude wasbuffer (TBS, 0.1% Triton X-100, en dezelfde protease inhibitoren gebruikt voor immunoprecipitatie). De eiwitten werden van de beads gedenateerd door ze 1h te incuberen bij 37°C met 40 μ l 4x laemmli buffer, de supernatans controlestalen in 10 μ l 5x laemmli buffer met 50mM DTT. De analyse gebeurde door de stalen op acrylamide gel te laden en via western blot analyse de eiwitten te detecteren. Immunoblotting gebeurde met anti-HA rat antilichaam (verdunding: 1/2000) gevolgd door het IRDye 800 anti-muis antilichaam (verdunding: 1/10000).

7. MAPK-fosforylatie en desensitisatie assay

HEK293S cellen (350 000 cellen/well) werden uitgezaaid in 6-well platen en één dag later getransfecteerd met de calciumfosfaatmethode. Na 48h groei werd het medium op de cellen minstens 2h voor de start van het experiment verversd met F12-SVM. Voor de desensitisatie assay werden de cellen eerst geïnduceerd door dopamine, quinpirole of DAMGO (100nM) direct aan het medium toe te voegen 8h voor de tweede inductie van 3'. Tussen beide inducties werden de cellen gewassen met PBS en nieuw F12-SVM toegevoegd. Voor de MAPK-fosforylatieassay werd slechts één inductieperiode van 3' met dopamine, DAMGO of beiden met variërende concentraties (5nM-500nM) uitgevoerd. Na de inducties werden de cellen driemaal gewassen met koude PBS en bewaard bij -20°C. 's Anderendaags werden de cellen gelyseerd met totale lysebuffer (62,5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% BFB) waaraan vers DTT werd toegevoegd (50mM), waarna ze 1' gesoniceerd werden en 10' bij 95°C gedenateerd. Hierna werden de stalen op gel geladen worden en via Western Blot analyse met een antilichaam tegen gefosforyleerd p44/p42-MAPK (verdunding: 1/1000) gedetecteerd worden.

8. Western Blot analyse

Stalen werden geladen op een discontinue polyacrylamide gel. De gel werd ingezet op 80V tot de stalen door de stackinggel (5% polyacrylamidegel) gelopen waren waarna de stroom naar 100V verhoogd werd, zodat de stalen door de scheidingsgel (10% polyacrylamide gel) zouden migreren. De gel werd overgeblot op nitrocellulose transfer membraan (Whatman® Protran®) voor 1h bij 100V waarna de membraan voor minimum 1h werd geblokkeerd in blokkeringsbuffer (1:1 verhouding LI-COR® blocking buffer:TBS). Het ontwikkelen van de

²⁶ GST-fusiepeptiden werden aangemaakt door Jolien Duchou.

membranen gebeurde met verschillende antilichamen gericht tegen de fusie-peptiden verdund in LI-COR® blocking buffer:TBS-T²⁷ oplossing (1:1 verhouding) en tussen de verschillende antilichaam inductieperiodes werden de membranen driemaal gewassen met TBS-T buffer (TBS buffer met 0,05% Tween 20). Visualisatie van de fluorofore antilichamen²⁸ gericht tegen het primair antilichaam gebeurde met de 'Odyssey infrarood scanner' (LI-COR Biosciences) en deze van de HRP (horseradish peroxidase)-gebonden antilichamen met de 'Kodak Image Station 440' en werd voorafgegaan door een 1' incubatie van de membraan in een chemiluminescentie oplossing (Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA, USA).

9. Immunofluorescentie

HEK293T cellen (200 000 cellen/well) werden gezaaid in 6-well platen met dekgelaten die behandeld werden met polylysine. De cellen werden getransfecteerd met de calciumfosfaatmethode. Voor de internalisatie experimenten werden de cellen, 48h na transfectie, voor 1h bij 4°C geïncubeerd met primair antilichaam tegen de receptorfusieproteïne (FLAG M1, HA 16B12). De antilichamen werden vooraf opgelost in D-MEM-SVM (verdunding 1/1000) met 10mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineëthaansulfonzuur). De cellen werden voorzichtig gewassen met wasbuffer (voor 1l: 8g NaCl, 3g Tris-HCl, 0,2g KCl, 0,15g CaCl₂-2H₂O, pH7,2). Internalisatie van de gelabelde receptoren werd geïnduceerd voor 30' bij 37°C met dopamine of quinpirole (10µM) in DMEM-SVM met HEPES waarna ze gewassen werden. De gewassen cellen werden gefixeerd met fixatief (150mM NaCl, 10mM natriumfosfaat pH 7.4, 3.7% formaldehyde) voor 20' bij kamertemperatuur en gepermeabiliseerd met Blotto/T-X100 (3% melkpoeder, 1mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100) ook voor 20' bij kamertemperatuur met tussenin drie wasstappen van 5'. Uiteindelijk werden de receptoren gevisualiseerd met het secundair antilichaam (anti-muis Alexa 488), dat 1/500 verdund werd in Blotto, door de cellen voor 20' te incuberen in het donker. De kernen werden gevisualiseerd door de cellen 5' te incuberen met 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI). De dekgelaten werden op draaggelaten gemonteerd met Mowiol en geanalyseerd met de Axiocam 200 microscoop (Zeiss; Thornwood, NY).

10. Kwantitatieve PCR (QPCR): primer test

MOR mRNA expressie levels werden bepaald via QPCR via een LightCycler 480 SW 1.5 instrument (Biorad). Aan 0,5µg mRNA²⁹ werd 1µl oligo(dT) primers toegevoegd en aangelengd met DEPC³⁰-water tot 16,5µl. Dit werd voor 10' bij 70°C gebracht voor primer binding. Na afkoeling werd aan dit mengsel mmlv RT buffer (Promega), 1µl M-MLV reverse transcriptase (Promega), Rnasin^{®31} (Promega), DTT (100mM), 2, dNTP's (200µM van elk) toegevoegd met een finaal volume van 30µl. De reverse transcriptase reactie vindt plaats gedurende 1h bij 42°C. Hierna wordt het reactiemengsel voor 10' bij 95°C gebracht voor het inactiveren van het RT-enzyme. Het afgekoeld reactie mengsel kan bij -20°C bewaard worden.

²⁷ TBS-T: TBS-buffer met 0,05% Tween 20.

²⁸ Een lijst met de gebruikt antilichamen kan teruggevonden worden in Tabel 2

²⁹ mRNA bekomen na totale RNA extractie uit onbehandelde SH-SY5Y cellen, uitgevoerd door Jolien Duchou.

³⁰ DEPC = RNase inhibitor.

³¹ Rnasin = zoogdier RNase inhibitor.

Voor de QPCR werd er 5µl cDNA samen met Platinum SYBR® Green QPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) gebruikt in een totaal volume van 15µl. Volgende primers werden gebruikt voor amplificatie van hMOR cDNA, een sense primer (5'-CTGGGTCAACTTGCCCACT-3') en een antisense primer (5'-TGGAGTAGAGGGCCATGATC-3'). Zo werden fragmenten van 146-bp (327–472 bp) gevormd (Bedini et al., 2008). Om de specificiteit van de primers na te gaan werd er een dilutiereeks van cDNA gemaakt (1/5; 1/25; 1/125; 1/625). Ter controle werden mastermix met bidi (zonder cDNA getest). Elke verdunning werd in drievoud op de plaat geladen. PCR werd gestart bij een préincubatie van 95°C voor 5'. 45 PCR cycli bestaat uit denaturatie bij 95°C voor 10'' en primerbinding voor 10'' bij 60°C en elongatie bij 72°C voor 10''. De smeltcurve start bij 95°C (5'') gevolgd door 1' bij 65°C waarna de temperatuur geleidelijk naar 97°C stijgt (0,11°C/seconde).

| Antilichaam | Species | Firma | Verdunning |
|---------------------------------|---------|---|---------------------|
| Anti-P-p44/p42 MAPK (T202/Y204) | Rabbit | Cell signaling technology | 1/1000 |
| Anti-tubuline (T6) | Muis | Sigma | 1/1000 |
| Anti-HA (16B12) | Muis | Covance Research products, Berkley, CA, USA | 1/5000 |
| Anti-flag (M2) | Muis | Sigma | 1/5000 |
| Anti-flag-HRP | Konijn | Sigma | 1/2000 |
| Anti-GFP | Muis | Invitrogen | 1/5000 |
| Anti-GFP-HRP | Geit | Abcam | 1/1000 |
| Anti-muis HRP (L) | Geit | Jackson Immunoresearch | 1/2000 |
| Anti-HA | Rat | Roche diagnostics | 1/2000 |
| Anti-MOR | Rabbit | Calbiochem | 1/2000 |
| Secundaire antilichamen | Geit | Secundaire infrarood (rood of groen) probe-gelabelde anti-muis LI-COR biosciences | 1/10000- 1/20000 |
| Alexa fluo® 488 anti-muis (H+L) | Geit | Invitrogen | 1/500* |

Tabel 2. Overzicht van gebruikte antilichamen (*=Immunofluorescentie)

REFERENTIES

- Adachi M, Fukuda M, Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J* **18**: 5347-5358
- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 231-236
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 409-435
- Asghari V, Schoots O, van Kats S, Ohara K, Jovanovic V, Guan HC, Bunzow JR, Petronis A, Van Tol HH (1994) Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Mol Pharmacol* **46**: 364-373
- Bare LA, Mansson E, Yang D (1994) Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* **354**: 213-216
- Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM (1990) Pre- and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Prog Clin Biol Res* **328**: 183-186
- Bondy B, de Jonge S, Pander S, Primbs J, Ackenheil M (1996) Identification of dopamine D4 receptor mRNA in circulating human lymphocytes using nested polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* **71**: 139-144
- Borroto-Escuela DO, Craenenbroeck KV, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, Haegeman G, Agnati LF, Tarakanov AO, Fuxe K (2011) Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **404**: 928-934
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**: 783-787
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**: 765-781
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* **95**: 489-502
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**: 1200
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 237-260
- Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, Muller C, Woods AS, Hope BT, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Lluís C, Goldberg SR, Moratalla R, Franco R, Ferré S (2007) Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**: 2249-2259
- Chen L, Togasaki D, Langston J, Dimonte D, Quik M (2005) Enhanced striatal opioid receptor-mediated G-protein activation in -dopa-treated dyskinetic monkeys. *Neuroscience* **132**: 409-420
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* **44**: 8-12
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**: 2449-2476
- Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, Goldberg SR, Bader M, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C, Franco R, Ferré S, Woods AS (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem* **76**: 5354-5363
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**: 281-307
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* **192**: 481-483
- Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem* **272**: 19125-19132
- Devi LA (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 532-537

- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 309-314
- Dohlman HG, Caron MG, DeBlasi A, Frielle T, Lefkowitz RJ (1990) Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* **29**: 2335-2342
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* **38**: 1236-1239
- Eppler CM, Hulmes JD, Wang JB, Johnson B, Corbett M, Luthin DR, Uhl GR, Linden J (1993) Purification and partial amino acid sequence of a mu opioid receptor from rat brain. *J Biol Chem* **268**: 26447-26451
- Fan T, Varghese G, Nguyen T, Tse R, O'Dowd BF, George SR (2005) A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *J Biol Chem* **280**: 38478-38488
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* **158**: 1052-1057
- Ferrada C, Moreno E, Casado V, Bongers G, Cortes A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferre S, Lluís C, Franco R (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol* **157**: 64-75
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**: 127-128
- Fredholm BB, Hokfelt T, Milligan G (2007) G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)* **190**: 3-7
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**: 1256-1272
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **51**: 319-351; discussion 352-313
- Gago B, Fuxe K, Agnati L, Peñafiel A, De La Calle A, Rivera A (2007) Dopamine D4 receptor activation decreases the expression of μ -opioid receptors in the rat striatum. *The Journal of Comparative Neurology* **502**: 358-366
- Gago B, Suárez-Boomgaard D, Fuxe K, Brené S, Reina-Sánchez MD, Rodríguez-Pérez LM, Agnati LF, de la Calle A, Rivera A (2011) Effect of acute and continuous morphine treatment on transcription factor expression in subregions of the rat caudate putamen. Marked modulation by D4 receptor activation. *Brain Research* **1407**: 47-61
- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* **20**: 2152-2159
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* **275**: 26128-26135
- George SR, O'Dowd BF, Lee SP (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 808-820
- Gill RS, Hsiung MS, Sum CS, Lavine N, Clark SD, Van Tol HHM (2010) The dopamine D4 receptor activates intracellular platelet-derived growth factor receptor β to stimulate ERK1/2. *Cellular Signalling* **22**: 285-290
- Girault JA, Greengard P (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* **61**: 641-644
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* **342**: 923-926
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* **126**: 51-90
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**: 3122-3142
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**: RC110
- Grunewald S, Haase W, Reilander H, Michel H (1996) Glycosylation, palmitoylation, and localization of the human D2S receptor in baculovirus-infected insect cells. *Biochemistry* **35**: 15149-15161
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 429-459
- Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H, Javitch JA (2005) Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17495-17500

- Han SK, Dong X, Hwang JI, Zylka MJ, Anderson DJ, Simon MI (2002) Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galpha q/11 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14740-14745
- Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* **5**: 688-695
- Handa BK, Land AC, Lord JA, Morgan BA, Rance MJ, Smith CF (1981) Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *Eur J Pharmacol* **70**: 531-540
- Hedin KE, Duerson K, Clapham DE (1993) Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* **5**: 505-518
- Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**: 25-44
- Herve D, Levi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin JP, Glowinski J, Girault JA (1993) G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* **13**: 2237-2248
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* **277**: 18091-18097
- Hur EM, Kim KT (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**: 397-405
- Iwata K, Ito K, Fukuzaki A, Inaki K, Haga T (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem* **263**: 596-602
- Kamakura S, Iwaki A, Matsumoto M, Fukumaki Y (1997) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine D4 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 321-326
- Karpa KD, Lin R, Kabbani N, Levenson R (2000) The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol* **58**: 677-683
- Kebabian JW, Greengard P (1971) Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* **174**: 1346-1349
- Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem* **276**: 37409-37414
- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**: 1-7
- Kosterlitz HW, Leslie FM (1978) Comparison of the receptor binding characteristics of opiate agonists interacting with mu- or kappa-receptors. *Br J Pharmacol* **64**: 607-614
- Kvam TM, Baar C, Rakvag TT, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F (2004) Genetic analysis of the murine mu opioid receptor: increased complexity of Oprm gene splicing. *J Mol Med (Berl)* **82**: 250-255
- Lajiness ME, Chio CL, Huff RM (1993) D2 dopamine receptor stimulation of mitogenesis in transfected Chinese hamster ovary cells: relationship to dopamine stimulation of tyrosine phosphorylations. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1573-1581
- Lanau F, Brockhaus M, Pink JR, Franchet C, Wildt-Perinic D, Goepfert C, Probst A, Hartman DS (1997) Development and characterization of antibodies against the N terminus of the human dopamine D4 receptor. *J Neurochem* **69**: 2169-2178
- Lane JR, Powney B, Wise A, Rees S, Milligan G (2008) G protein coupling and ligand selectivity of the D2L and D3 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **325**: 319-330
- Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **277**: 46010-46019
- Liang Y, Mestek A, Yu L, Carr LG (1995) Cloning and characterization of the promoter region of the mouse mu opioid receptor gene. *Brain Res* **679**: 82-88
- Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* **2**: 767-773
- Lindgren N, Usiello A, Gojny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G (2003) Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4305-4309
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th Revised edition edn.

- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* **267**: 8558-8564
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**: 495-499
- Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* **39**: 239-264
- Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 368-376
- Martin W, Bell J, Gilbert P, Sloan J, Thompson J (1976) The effects of naltrexone in the chronic spinal dog and acute spinal cat; possible interaction with naturally-occurring morphine-like agonists. *NIDA Res Monogr*: 27-30
- Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T (1995) Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **29**: 157-162
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**: 819-823
- Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor. *J Neurosci* **18**: 7285-7295
- Mayer P, Schulzeck S, Kraus J, Zimprich A, Holtt V (1996) Promoter region and alternatively spliced exons of the rat mu-opioid receptor gene. *J Neurochem* **66**: 2272-2278
- McPherson J, Rivero G, Baptist M, Llorente J, Al-Sabah S, Krasel C, Dewey WL, Bailey CP, Rosethorne EM, Charlton SJ, Henderson G, Kelly E (2010) mu-opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Mol Pharmacol* **78**: 756-766
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, Martinez AC (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* **20**: 2497-2507
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**: 44925-44931
- Milligan G (2007) G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 825-835
- Milligan G (2009a) A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *British Journal of Pharmacology* **153**: S216-S229
- Milligan G (2009b) G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *British Journal of Pharmacology* **158**: 5-14
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**: 189-225
- Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepulveda M, Navarro G, Casado V, Cortes A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Moratalla R, Ferre S, Ortiz J, Franco R (2011) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem* **286**: 5846-5854
- Narita M, Imai S, Ozaki S, Suzuki M, Suzuki T (2003) Reduced expression of a novel mu-opioid receptor (MOR) subtype MOR-1B in CXBK mice: implications of MOR-1B in the expression of MOR-mediated responses. *Eur J Neurosci* **18**: 3193-3198
- Narita M, Suzuki M, Niikura K, Nakamura A, Miyatake M, Yajima Y, Suzuki T (2006) μ -Opioid receptor internalization-dependent and -independent mechanisms of the development of tolerance to μ -opioid receptor agonists: Comparison between etorphine and morphine. *Neuroscience* **138**: 609-619
- Narkar VA, Hussain T, Pedemonte C, Lokhandwala MF (2001) Dopamine D(2) receptor activation causes mitogenesis via p44/42 mitogen-activated protein kinase in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* **12**: 1844-1852
- Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, Cortes A, Hoffmann H, Ortiz J, Canela EI, Lluís C, Pardo L, Franco R, Woods AS (2010) Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* **285**: 27346-27359
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**: 381-390

- Niznik HB, Van Tol HH (1992) Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* **17**: 158-180
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* **4**: 137-146
- Oak JN, Lavine N, Van Tol HH (2001) Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Mol Pharmacol* **60**: 92-103
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH (2000) The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol* **405**: 303-327
- Oldenhof J, Vickery R, Anafi M, Oak J, Ray A, Schoots O, Pawson T, von Zastrow M, Van Tol HH (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* **37**: 15726-15736
- Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 60-71
- Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW (2005) Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. *Neuroscience* **133**: 209-220
- Pan Y-X, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert A-K, Pasternak GW (2003) Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-10 and hMOR-1X. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301**: 1057-1061
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Abbadie C, Chang A, Zuckerman A, Rossi G, Pasternak GW (1999) Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms. *Mol Pharmacol* **56**: 396-403
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Chang A, Mahurter L, Rossi G, Pasternak GW (2000) Isolation and expression of a novel alternatively spliced mu opioid receptor isoform, MOR-1F. *FEBS Lett* **466**: 337-340
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M, Pasternak GW (2001) Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14084-14089
- Pangalos MN, Davies, C. H. (2002) *Understanding G Protein-coupled Receptors and their role in the CNS* Oxford University Press.
- Pasternak DA, Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pasternak GW, Pan YX (2004) Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy. *J Neurochem* **91**: 881-890
- Pasternak G, Pan Y-X (2011) Mu opioid receptors in pain management. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* **49**: 21-25
- Payne R (1992) Transdermal fentanyl: suggested recommendations for clinical use. *J Pain Symptom Manage* **7**: S40-44
- Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, Nobrega JN, Liu F (2010) Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med* **16**: 1393-1395
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 639-650
- Pillai G, Brown NA, McAllister G, Milligan G, Seabrook GR (1998) Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a Xenopus oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology* **37**: 983-987
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**: 1264-1267
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**: 1-20
- Radhika V, Dhanasekaran N (2001) Transforming G proteins. *Oncogene* **20**: 1607-1614
- Raymond JR (1995) Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *Am J Physiol* **269**: F141-158
- Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* **92**: 71-87
- Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002) Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* **80**: 219-229
- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 1971-1986

- Rondou P, Haegeman G, Vanhoenacker P, Van Craenenbroeck K (2008) BTB Protein KLHL12 Targets the Dopamine D4 Receptor for Ubiquitination by a Cul3-based E3 Ligase. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 11083-11096
- Roth BL, Willins DL, Kroeze WK (1998) G protein-coupled receptor (GPCR) trafficking in the central nervous system: relevance for drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend* **51**: 73-85
- Rozenfeld R, Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J* **21**: 2455-2465
- Savarese TM, Fraser CM (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* **283 (Pt 1)**: 1-19
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R (2001) D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* **276**: 30308-30314
- Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ (1992) Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem* **267**: 13807-13810
- Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* **74**: 1-58
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* **261**: 717-719
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Burch RM, Mahan LC (1992) Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. *Neurochem Int* **20 Suppl**: 17S-22S
- Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL (1970) The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* **127**: 199-207
- So CH, Varghese G, Curley KJ, Kong MM, Aljaniaram M, Ji X, Nguyen T, O'Dowd B F, George SR (2005) D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol* **68**: 568-578
- Sokoloff P, Martres MP, Giros B, Bouthenet ML, Schwartz JC (1992) Heterogeneity and regulation of central dopamine receptor subtypes studied by cDNA cloning methodology. *Neurochem Int* **20 Suppl**: 27S-32S
- Spooren A, Rondou P, Debowska K, Lintermans B, Vermeulen L, Samyn B, Skieterska K, Debyser G, Devreese B, Vanhoenacker P, Wojda U, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010) Resistance of the dopamine D4 receptor to agonist-induced internalization and degradation. *Cellular Signalling* **22**: 600-609
- Stoffel RH, 3rd, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *J Membr Biol* **157**: 1-8
- Sun D, Wilborn TW, Schafer JA (1998) Dopamine D4 receptor isoform mRNA and protein are expressed in the rat cortical collecting duct. *Am J Physiol* **275**: F742-751
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**: 168-184
- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX, Wadhwa PD (2007) Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* **17**: 39-59
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* **11**: 903-913
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **24**: 125-132
- Van Craenenbroeck K (2005) Folding Efficiency Is Rate-limiting in Dopamine D4 Receptor Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 19350-19357
- Van Craenenbroeck K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Skieterska K, Rondou P, Lintermans B, Vanhoenacker P, Fuxe K, Ciruela F, Haegeman G (2011) Dopamine D4 receptor oligomerization - contribution to receptor biogenesis. *FEBS Journal* **278**: 1333-1344
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**: 610-614
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* **358**: 149-152
- Vickery RG, von Zastrow M (1999) Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* **144**: 31-43
- Vohra S, Chintapalli SV, Illingworth CJ, Reeves PJ, Mullineaux PM, Clark HS, Dean MK, Upton GJ, Reynolds CA (2007) Computational studies of Family A and Family B GPCRs. *Biochem Soc Trans* **35**: 749-754

-
- Wang H-L, Hsu C-Y, Huang P-C, Kuo Y-L, Li AH, Yeh T-H, Tso A-S, Chen Y-L (2005) Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and μ -opioid receptors impairs the potency of μ receptor agonist. *Journal of Neurochemistry* **92**: 1285-1294
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR (1993) mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10230-10234
- Wedemeyer C, Goutman JD, Avale ME, Franchini LF, Rubinstein M, Calvo DJ (2007) Functional activation by central monoamines of human dopamine D(4) receptor polymorphic variants coupled to GIRK channels in *Xenopus oocytes*. *Eur J Pharmacol* **562**: 165-173
- Werner P, Hussy N, Buell G, Jones KA, North RA (1996) D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus oocytes*. *Mol Pharmacol* **49**: 656-661
- Wilcox RA, Primrose WU, Nahorski SR, Challiss RA (1998) New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 467-475
- Wolfe BL, Trejo J (2007) Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**: 462-470
- Woods AS, Ferre S (2005) Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction. *J Proteome Res* **4**: 1397-1402
- Xu J, Xu M, Hurd YL, Pasternak GW, Pan YX (2009) Isolation and characterization of new exon 11-associated N-terminal splice variants of the human mu opioid receptor gene. *J Neurochem* **108**: 962-972
- Yu VC, Sadee W (1988) Efficacy and tolerance of narcotic analgesics at the mu opioid receptor in differentiated human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **245**: 350-355
- Zawarynski P, Tallerico T, Seeman P, Lee SP, O'Dowd BF, George SR (1998) Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* **441**: 383-386
- Zimprich A, Simon T, Hollt V (1995) Cloning and expression of an isoform of the rat mu opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist induced desensitization from rMOR1. *FEBS Lett* **359**: 142-146

BIJLAGE

1. Protocols

1.1. Weefselcultuur

1.1.1. *Cellen splitsen*

- Materiaal
 - Cellen losmaken met trypsin:
 - 400ml EDTA
 - 50ml Trypsine (wordt in de -20°C bewaard)
 - Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)/F12 maken (per 1liter):
 - 10% foetaal kalfserum (FKS)
 - 10ml glutamine
 - 2ml Penicilline / Streptomycine Oplossing (1ml in gekocht medium)
 - Gebruik D-MEM medium voor HEK293T cellen en F12 voor HEK293S cellen
- Methode
 1. Medium in een warmwaterbad op 37°C voor 30'
 2. Flow 15' voor start aanzetten zodat de lucht zeker gezuiverd is
 3. Zet eerst alles klaar + spuiten met ethanol -> 3' laten inwerken
 4. Bekijk de cellen en het medium onder de microscoop om na te gaan indien er geen onzuiverheden in zitten
 5. Zuig het medium af aan de kant zonder cellen met een pasteur-pipet
 6. Pipeteer 10ml trypsin/EDTA in de reuzenfalcon, sluit goed en sla de cellen los (niet direct op cellen pipeteren)
 7. Controleer met de microscoop indien alle cellen goed los zitten
 8. Neutraliseer met 10ml medium + homogeniseren (op en neer pipeteren)
 9. Splits de cellen uit 1/10 in een nieuwe falcon met 50ml medium (+2ml "cel-oplossing": cellen liggen in 20ml medium dus 1/10 splitsen is 2ml nemen)
 10. Zorg dat de dop van de falcon een kwartslag open is voor je ze in de incubator plaatst

1.1.2. *Cellen tellen*

1. Verzamel de rest van de falcon in 50ml buis
2. Draai de cellen af (900 toeren voor 5' voor adherende cellen)
3. Zuig het medium af
4. Voeg nieuw medium toe
5. Meng het medium en uitgezakte cellen en breng 20µl over in een epje + 180µl trypan blue (GIFTIG)
6. Maak de telkamer schoon en stel op (newtonring)
7. 10µl celoplossing per raster zonder luchtballen
8. Tel de 9 vakken en vul in in formule= $[n \times (\text{verdunningsfactor}) \times 10000] / 9 = \# \text{ cellen/ml}$

1.1.3. *Uitzaaien van cellen*

1. Homogeniseer de cellen voor ze te verdunnen
2. Bereken hoeveel oplossing je nodig hebt, er moet in totaal 10ml per gemiddelde plaat; 3ml per well in 6-well plaat; 1ml in 24 well plaat; 20ml voor een reuzeplaat
3. Schrijf de platen: datum, naam, cellijn (boven+onder) en plaatnummer

4. Giet de platen en meng (cirkels + achtbeweging)
5. Bekijk onder de microscoop indien je cellen ziet
6. Platen in incubator

1.2. Plasmiden en constructen

Plasmiden: pcDNA3 met MOR-YFP, HA-D4.0R, HA-D4.2R, HA-D4.4R, HA-D4.ΔΔR, HA-D2L, flag-D2S, pE-GFP

Glutathione S-transferase (GST)-fusie proteïnen: C-terminale staart en IC3 van D4R

Pfu DNA polymerase (Promega, madison WI USA)

Pfu 10x buffer (Promega, madison WI USA)

MgCl₂ 25mM (Promega, madison WI USA)

dCTP,dGTP,dTTP,dATP 100mM (Promega, madison WI USA)

HA-tag -> Hemagglutinine peptide uit H.influenza: 5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT-3'

FLAG-tag -> Synthetisch peptide: 5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAG-3'

Klonering

1. PCR receptor uit vector (50μl)
 - Overbrengen van D4.0 en D4dd mutanten van pcDNA3 in Rluc vector voor BRET assay
 - Maak PCR mastermix:

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| ○ PCR buffer | 10x |
| ○ MgCl ₂ | 1,5mM |
| ○ dNTP mix | 200μM van elk |
| ○ primers (100μM) | 0,5μM van elk |
| ○ Bidi | aanvullen tot 48μl per reactie |
 - plasmide 200ng
 - 48μl mastermix per staal + 1μl polymerase + 1μl plasmide oplossing
 - Gebruikt primers werden overgenomen uit (Borroto-Escuela, et al., 2010)
2. Laad PCR product op agarose gel om na te gaan als primers OK
 - Maak agarose gel (200ml)

| | |
|--------------------|---------------------|
| ○ Agarose | 1,2% |
| ○ TBE buffer (10x) | 1x |
| ○ Bidi | aanvullen tot 200ml |

 - Verwarmen in microgolf tot alles opgelost is
 - Giet de gel
 - Laat stollen
 - Laad de stalen op gel (gel in TBE 1x buffer)

| |
|---|
| ○ 10μl PCR staal |
| ○ 3μl ladingsbuffer |
| ○ in 1 ^e laan 13μl lambda ladder |
| ○ loop de gel voor +/- 1h op 120V |
 - ontwikkel de gel voor 20' in EtBr
 - spoel de gel in water
 - visualiseer de bandjes onder UV licht + neem foto
3. Zuiver PCR reactie op (kit: Nucleospin)
 - Mix 2 volumes buffer NT met 1 volume staal
 - Bring mengsel op kolom
 - 1' afdraaien bij 11000g
 - wassen met 600μl NT3

-
- 2' extra afdraaien bij 11000g
 - elueer met 35µl buffer NE in nieuw epje
 - 1' laten staan
 - 1' afdraaien bij 11000g
4. Laadt 3µl opgezuiverd DNA op gel om zeker te zijn dat het correcte fragment werd opgezuiverd
 5. In pCR-Blunt II-TOPO vector kloneren
 - a. Maak mix
 - 1µl zoutoplossing
 - 4µl PCR product
 - 1µl Topo vector
 - b. voorzichtig op en neer pipeteren
 - c. 10' laten staan op kamertemperatuur
 - d. staal op ijs zetten
 6. Transformeren in MC-1061 E.coli stam
 7. Opzuiveren met Birnboim protocol
 - 1,5 ml opgegroeide cultuur naar epje brengen
 - 5 min 3000 rpm
 - Pellet resuspenden in 200 µl TEG  schuddend voor 5 min
 - 200 µl NaOH/SDS toevoegen (1ml NaOH, 1ml 10%SDS, 8ml bidi)
 - Opmengen en 5 min rusten
 - 200 µl 3M KoAc toevoegen
 - Omwentelen en 5 min op kt
 - 600 µl fenol/chloroform/isoamylalcoholoplossing toevoegen
 - Zeer goed mengen
 - 5 min 14000 rpm 4°C
 - Bovenste fase naar nieuw epje
 - 600 µl isopropanol toevoegen
 - Krachtig mengen
 - 15 min 14000 rpm 4°C
 - Pellet wassen met 500 µl 70% EtOH
 - 5 min 14000 rpm 4°C
 - Drogen aan lucht; 50 µl Bidi toevoegen
 1. Lysering overnacht bij 37°C (50µl)
 - Receptor
 - PCR-product 25µl
 - Xho I 2,5µl
 - EcoR I 2,5µl
 - Buffer 4 10x
 - BSA 100x
 - Bidi tot 50µl
 - Vector (cMyc D4.2 pRluc)
 - Vector 10µg
 - Nhe I 3µl
 - EcoR I 3µl
 - Buffer 4 10x

-
- BSA 100x
2. Bidi tot 50µl Volledige lygatiereactie op gel laden
 3. DNA-fragmenten uitsnijden
 4. Opzuiveren van DNA met kit (Nucleospin)
 - Per 100mg gel voeg 200µl NT buffer
 - 10' incuberen bij 50°C
 - over kolom brengen
 - 1' afdraaien bij 11000g
 - wassen met 600µl NT3 buffer
 - 1' afdraaien bij 11000g
 - 2' extra afdraaien bij 11000g
 - voeg 40µl NE buffer toe voor elueren van kolom
 - 1' laten staan
 - 1' afdraaien bij 11000g
 5. Laadt 3µl opgezuiverd DNA op gel om zeker te zijn dat het correcte fragment werd opgezuiverd
 6. Meet concentratie met Nanodrop
 7. Ligatie
 - 's avonds inzetten van ligatie in Rluc vector, 2 opstellingen:
 - 20µl totaal
 - 2µl 10x T4 DNA ligase buffer
 - 2µl (10µM) 10x spermidine
 - 2µl (10mM) 10x rATP
 - 2µl T4 DNA lygase
 - 2µl vector fragment
 - 8µl insert fragment
 - 2µl Bidi
 8. Vectoren transformeren in E.coli stammen op AB platen (Kanamycine)

1.3. Calciumfosfaattransfectie.

1. Cellen transfecteren die gezaaid werden in platen de dag voordien
2. Ververs het medium (10% FKS) met 1,8ml/6well; 9ml/gemiddelde plaat
3. Maak evenveel van de 2 mixen per transfectie: BS/HEPES en Mix (dit moet omdat er zich anders neerslag vormt)
4. Maak 2xBS/HEPES (0,5ml/gem.plaat of 100µl/6well)
5. Maak Mix:
 - 20µl/6well 100µl/gem.plaat CaCl₂
 - 2µg/6well 10µg/gem.plaat DNA
(zorg dat je hoeveelheid totale DNA in elk epje hetzelfde is)
 - vul aan tot gewenste hoeveelheid met 0,1% TE-buffer -> meng
6. Met gele tip voeg je druppelsgewijs de Mix een BS/HEPES toe
7. Meng hevig (lucht in blazen)
8. Voeg volledige superMix aan de cellen toe (1ml/gemiddelde plaat en 200µl/6well)
(vergeet de platen niet de schrijven en pipeteer langs de rand)
9. Meng plaat via 8-beweging
10. Incubeer de platen voor 6h in 37°C CO₂ incubator

11. Ververs het medium +10%FKS op einde van de dag en verder gegroeid in de incubator tot confluentie.

1.4. GST-tag experiment

DAG-A

1. Transformeer MC1061 stammen met GST-fusie constructen van de D4R (C-term + IC3)
2. Lyseer de stammen
3. Behoud supernatans met GST-eiwitten
WERK op ijs!!!!

DAG1

1. We starten met pellet van cellen die bewaard worden op -70°C in 15ml buisjes
2. Maak extractiebuffer afh. van het aantal stalen en hoeveel je ervan nodig hebt, vergeet de wasstappen niet.
3. Ingevroren getransformeerde HEK293T cellen met MOR of pcDNA3 worden gelyseerd met extractiebuffer

Cell extractiebuffer op 4°C bewaren(50ml):

- 100mM NaCl (stock 5M)
- 10mM Tris-HCl pH 7,4 (stock 1M)
- 25ml 1% NP40 (10x stock)
- 0,1% SDS (natriumdodecylsulfate) (stock 10%)
- 1mM EDTA
- 1mM NaF
- 2mM NaVO₃
- 1% Triton X-100
- 10% glycerol
- =>aanvullen tot 250ml met bidi (=50ml)
- 0,5% DOC
- 1mM PMSF
- protease en fosfatase inhibitoren
 - 1x Aprotine (100x)
 - 1x Pefabloc (200x)
 - 1/1000 Leupeptine (1000x)
 - 1x β-glycerolfosfaat (100x)

4. Celpellet resuspenden en lyseren in 500µl RIPA
5. Overbrengen in epjes
6. 30' bij 4°C ronddraaien
7. afdraaien bij 16000 rcf bij 4°C voor 10'
8. het supernatans bevat de proteïnen en worden verdeeld over 2 rijen epjes: 1 voor lysaat (SN = 40µl op ijs)
9. 20µl GST-fusieproteïnen aan alle stalen toegevoegd, stalen 2h bij 4°C
10. Glutathion Sepharose 4 beads voorbereiding: Per staal is 30µl beadvolume nodig. Dit volume wordt geschat door beadsuspensie te centrifugeren voor 1 minuut aan 1000 rpm bij 4°C: de pellet geeft een idee over het effectieve beadvolume.
11. De beads worden geresuspendeerd in 1ml extractie-buffer en gehomogeniseerd door goed op en neer te pipetteren. Vervolgens wordt de suspensie gecentrifugeerd voor 1' aan 1000rpm bij 4°C, waarna het supernatans wordt afgenomen. Deze stap

wordt 3x herhaald. De beads worden als laatste in (20µl/staal)+100µl geresuspendeerd.

12. Na incubatie van het primaire antilichaam wordt per staal 30µl effectief beadvolume toegevoegd aan het supernatans. (Dit is dus **45µl** beadoplossing per staal). Het supernatans wordt overnacht geroteerd bij 4°C.

DAG3

KOEL DE CENTRIFUGE

13. Maak de extractiebuffer: (3ml x #stalen)
14. De beads worden 3x gewassen met extractiebuffer (1ml/epje) met telkens een centrifugatiestap ertussen (1min bij 1000rpm) op 4°C
15. Deze beads kunnen droog in de -20°C bewaard worden

MAAK DE GELS

16. Maak leammlibuffers:

- a. Beads: 4x leammlibuffer 40µl x #stalen
SN: 5x leammlibuffer 10µl x #stalen
- b. Beads: 4x leammlibuffer + DTT (2,5µl x #stalen)
SN: 5x leammlibuffer + DTT (2,5µl x #stalen)

Van deze oplossing wordt er:

- c. Beads: 4x leammlibuffer 42,5µl/staal (start met experiment en eindig met controle!)
SN: 5x leammlibuffer 12,5µl/staal
17. Denatureer de stalen door ze 10min bij 37°C te houden (in heatblock)
18. Dit mag dan op Gel geladen worden (3µl ladder=Page Ruler™ Prestained protein ladder (lade 9 van diepvries vooraan in doosje merkers); 25µl staal (geen beads meenemen))
19. Gel lopen in elektroforesebuffer voor +/-10min bij 80V (tot de eiwitten door de stacking gel gelopen zijn) en dan tot ze door de gel zijn bij 100V, alles op 250mA

(membraan-)Coimmunoprecipitatie.

WERK op ijs!!!!

DAG1

1. HEK293T cellen worden gegroeid tot confluente in medium platen

- a. Induceer de cellen
- b. Laat de cellen 30' in incubator (tijd om te internaliseren)

2. Neem een aantal platen mee naar de bench in het labo
3. Zuig medium af +5ml PBSA (4°C) (pipeteer langs de kant zodat de cellen niet loskomen) ronddraaien, afzuigen +PBSA; afzuigen ; +PBSA (op laten)
4. Platen bewaren in koelkast (1 op bench)
5. Alle cellen losspreien met PBSA die erop ligt en overbrengen naar 15ml-buis
6. Afdraaien op 1000 rcf; 5' bij 4°C
7. PBSA afzuigen
8. Invriezen op -70°C

- a. Indien **membraan IP** -> verder werken

- b. + prim Ab (1/1000) reken 1ml per celpellet verdunnen in SVM
- c. resuspendeer cellen in 1ml Ab oplossing
- d. overbrengen naar epje
- e. roteren voor 2h bij 4°C (centrifuge op 4°C instellen)
- f. stalen afdraaien voor 10' bij 4°C, 8000 rcf
- g. medium afzuigen
- h. resuspenderen in 400µl RIPA
- i. 2h roteren op 4°C
- j. stalen afdraaien voor 10' bij 4°C, 8000 rcf
- k. beadsoplossing maken en toevoegen: (20µl beads/staal)+100µl RIPA => 35µl/staal
- l. overnacht roteren bij 4°C
- m. ga verder met DAG 3

DAG2

Koel de centrifuge, ga ijs halen

9. We starten met pellet van cellen die bewaard worden op -70°C in 15ml buisjes
10. Maak RIPA afh. Van het aantal stalen en hoeveel je ervan nodig hebt, vergeet de wastappen niet. Kan bewaard worden bij 4°C
11. Celpellet + 400µl RIPA (afhankelijk van hoe groot de pellet tussen 300-400µl)
12. Overbrengen in epjes
13. 1h bij 4°C ronddraaien
14. afdraaien bij 8000 rcf bij 4°C voor 10'
15. het supernatans bevat de proteïnen en worden verdeeld over 2 rijen epjes: 1 voor lysaat (SN = 40µl op ijs) en 1 voor de CoIP

BCA-proteïne concentratie bepaling (pierce BCA protein assay kit):

- a. Neem plaat uit weefselkamer en BCA-kit uit productenkamer en standaarden bij Béa (blauwe doos in diepvries)
 - b. Reken $100\mu\text{l reagentA}/(\#\text{staal}+\#\text{stand.}+1)$
 - c. In plaat 12,5µl standaard/staal
 - d. Aan Reagent A 1/50 Reagent B toevoegen (op het laatste)
 - e. 100µl oplossing / well toevoegen
 - f. plaat voor 30minuten op 37°C
 - g. meet
 - h. verdun naar de laagste concentratie proteïne in staal
 - i. verdeel in 2 epjes (SN en IP), ga verder met protocol
-
16. antilichamen worden bewaard bij Béa (rood bakje) en er wordt 2µl ervan aan alle CoIP stalen toegevoegd, stalen 1h bij 4°C
 17. Beads voorbereiding: Per staal is 20µl beadvolume nodig. Dit volume wordt geschat door beadsuspensie te centrifugeren voor 1' aan 1000 rpm bij 4°C: de pellet geeft een idee over het effectieve beadvolume.
 18. De beads worden geresuspendeerd in 1ml RIPA-buffer en gehomogeniseerd door goed op en neer te pipetteren. Vervolgens wordt de suspensie gecentrifugeerd voor 1' aan 1000 rpm bij 4°C, waarna het supernatans wordt afgenomen. Deze stap wordt 3x herhaald. De beads worden als laatste in (20µl/staal)+100µl geresuspendeerd
 19. Na incubatie van het primaire antilichaam wordt per staal 20µl effectief beadvolume

toegevoegd aan het supernatans. (Dit is dus 35µl beadoplossing per staal) Het supernatans wordt overnacht geroteerd bij 4°C.

DAG3

KOEL DE CENTRIFUGE

20. Maak de RIPA: (3ml x #stalen)
21. De beads worden 3x gewassen met RIPA (1ml/epje) met telkens een centrifugatiestap ertussen (1' bij 1000rpm) op 4°C
22. Deze beads kunnen droog in de -20°C bewaard worden

MAAK DE GELS

23. Maak leammli buffers:

- a. Beads: 4x leammli 40µl x #stalen
SN: 5x leammli 10µl x #stalen
- b. Beads: 4x leammli: + DTT (2,5µl x #stalen)
SN: 5x leammli: + DTT (2,5µl x #stalen)

Van deze oplossing wordt er:

- c. Beads: 4x leammli 42,5µl/staal (start met experiment en eindig met controle!)
SN: 5x leammli 12,5µl/staal

24. Denatureer de stalen door ze 10min bij 37°C te houden (in heatblock)

25. Dit mag dan op gel geladen worden (3µl ladder=Page Ruler™ Prestained protein ladder)

Gel lopen in elektroforesebuffer voor +/-10' bij 80V (tot de eiwitten door de stacking gel gelopen zijn) en dan tot ze door de gel zijn bij 100V, alles op 250mA

1.5. MAPK-fosforylatie en desensitisatie assay.

We starten met getransfecteerde cellen uitgezaaid in 6-well platen

1. Deze cellen moeten 2h voor start experiment overgezet worden in serum-vrij medium, omdat het serum zou kunnen interageren met het experiment (500µl HEPES (1M) in 50ml medium)
2. We gaan kijken naar MAPK-fosforylatie in aanwezigheid van verschillende (ant)agonisten
3. Deze moeten correct verdund worden en dopamine (DA) moet nog afgewogen worden en verdund in medium en het moet afgeschermd worden van licht via zilverpapier
4. Zorg ervoor dat alle wells even lang (3') geïnduceerd worden (alles klaarleggen voor start)
5. Pipeteer de nodige concentraties in de wells en hou rekening met het feit dat 2µl nog eens 1000x verdund wordt in 2ml serum-vrij medium dat reeds op de cellen ligt. Bij gebruik van antagonist + agonist in 1 well -> eerst toevoegen van antagonist en dan pas agonist
6. Medium opzuigen en was de cellen (voorzichtig) met 2ml PBSA (4°C), mengen, afzuigen, + PBSA
7. Ga naar bench in labo, cellen afzuigen en droog op -20°C bewaren

DAG2: WERK op ijs!

8. Cellen lyseren: maak een totaal lyse van de cellen die geïnduceerd werden

9. Hiervoor gebruikt men 200µl lysebuffer dat men aan elke well van de 6-wellplaat toevoegd, schraap de cellen goed los met de tip van je pipet tot een viskeus geheel gevormd wordt en pipeteer over in epje dat op ijs staat
10. Soniceren van de epjes voor 1' zodat alles goed afgebroken wordt (membranen breken)
11. Kook de stalen op voor 5' bij 95°C (denaturatie)
12. Draai de epjes af
13. Ze zijn klaar voor opladen op gel

1.6. Western Blot analyse.

Blotten

Er mag NIET aan de nitrocellulosemembraan gekomen worden met de handen!

1. Nadat de gel afgelopen zijn, zet je de machine uit en berijd je al je materiaal voor: watmann, spons, transferbuffer, membraan (5x8,5cm) met naam in rechterbovenhoek, pincet, houder, bak met transfer buffer
2. In de transferbuffer mogen: Membraan, 6watmann/gel, sponzen
3. Opstelling: spons, watmann, gel, membraan, watmann, spons
4. Er wordt gerold met een glazen staafje tussen elke stap; Zorg dat de gel correct opgesteld is
5. Sluit houder, zet in bak met transfervloeistof en ijsblok
6. Loop blot voor 1h op 100V

Ontwikkelen van de blots

7. Haal de blots uit opstelling
8. Zet ze een doosje (gewassen met ethanol)
9. 5ml/gel blockingsbuffer; 1h laten staan op kamer temperatuur of overnacht op 4°C op schudder
10. 3X (5' op schudder op KT) wassen met TBS-T
11. 1h, 5ml primair Ab/gel (oplossing in 50/50: TBS-T/licor=blockingbuffer)
12. 3X (5' op schudder op KT) wassen met TBS-T
13. 1h Secundair antilichaam oplossen in TBS-T-licor werk in donker!
14. 3X (5' op schudder op KT) wassen met TBS-T
15. Blots bewaren op TBS-T

Blots-strippen

Dit protocol dient om nieuw antilichaam op een reeds gebruikte blot te kunnen doen

1. Newblot -> 5x verdunnen in Bidi (maak 5ml/blot)
2. Uitvoeren protocol op frigo
3. Check onder odessey, gels in koude PBSA (extra wasvermogen)
4. Blot blockeren voor 30' + 3x wassen in TBS-T
5. Op de blot kan nu een nieuw antilichaam gedaan worden
6. Blot die je wil bewaren, kunnen in TBS op 4°C

1.7. Immunofluorescentie.

1. Werk op getransfecteerde cellen gegroeid in 6-well platen op coverslips (behandelt met polylysine zodat de cellen beter adheren)
2. Zuig serum-Medium van cellen

3. Los de prim. antilichamen (1/1000) op in serum-vrij medium met HEPES (500µl/50ml)
4. Voeg toe aan droogstaande cellen (500µl/well) voor 1h bij 4°C
5. Was cellen met wasbuffer (1ml)
6. Induceer de cellen met DA, DAMGO, QP,...(1ml/well) oplossen in SFM voor 30' bij 37°C (internalisatie)
 - a. Maak fixatief (50ml)
 - b. Draagglas wassen met ethanol
7. Was cellen met wasbuffer
8. Cellen fixeren met 1ml fixatief voor 20' in trekkast met veiligheidsbril
9. Fixatief (Formaldehyde) weg (in speciaal bakje in trekkast)
10. Cellen 3x wassen met wasbuffer voor 5'
11. + 100µl/well Blotto Triton-X100 op coverslip druppelen voor 20' (wanneer intracellulaire kleuring beoogd wordt. Analyse gebeurt met behulp van een fluorescentiemicroscop; zelf te maken want melk wordt zuur)
12. cellen 3x wassen voor 5' met wasbuffer
13. sec ab(1/500), 100µl/well verdund in Blotto oplossing op slides druppelen binding in donker voor 20'
14. 3x 5' wassen
15. DAPI maken in TREKKAST + donker: 1/1000 verdunnen in wasbuffer(1ml) -> 1µl DAPI
16. 100µl DAPI druppelen op cellen en 5' (NIET langer) in donker
17. Cellen 3x 5' wassen met wasbuffer (buffer op cellen laten)
18. Monteren: 2 druppels mowitol/draagglas (geen luchtballen) -> draagglas opdruppel laten vallen met cellen naar beneden (gebruik naald en pincet; cellen afdippen op papier)
19. Coverslip vastmaken met nagellak
20. Papier tussen boek en boek op 4°C tot droog
21. Meeting op microscoop
22. Draagglas op houder (rood op rood)
23. Start linksonder
24. Tafel steeds naar beneden
25. Objectie 36x met olie op lens
26. Vindt cellen (instellingen op dapi)
27. Kijk naar GFP voor transfectie
28. Fluorescentie uit als je niet kijkt
29. Les kuisen na gebruik

1.8. Bacteriën transformeren

Werk bij een **vlam**

1. Men mag maximaal 100ng plasmiden/100µl bacterie transformeren -> plasmiden zijn 1µg/µl opgelost dus moet er 1000x verdund worden: 1µl plasmide + 99µl Bidi
2. Hiervan 10µl bij 100µl bacteriën (op ijs houden)
3. Tik epje om te mengen en 30' laten staan op ijs
4. Heatshock: 1' bij 38°C in warmwaterbad
5. 20' op ijs
6. +900µl LB (dat gepaste antibiotica bevat)
7. 1h schudden bij 37°C

8. uitplaten (100µl en 200µl)
9. overnacht op 37°C laten groeien
10. oppikken van een kolonie en uitgroeien in 3ml LB (met gepaste antibiotica)
11. volledige dag laten uitroeien in schudder bij 37°C
12. op einde van de dag overbrengen in 150ml medium
13. overnacht groeien bij 37°C in schudder
14. overbrengen naar plastieke tubes + wegen
15. in evenwicht brengen
16. afdraaien in grote centrifuge
17. medium afgieten
18. bewaren bij -20°C tot opzuivering
19. opzuivering van plasmiden met Quiagen plasmid maxi kit

BUFFERS

Falcon

- Reuze falcon(175cm²):
 - 50ml medium
 - 10ml trypsin/EDTA
 - 10ml neutralisatie medium
 - 2ml overbrengen om te splitsen
- Gemiddelde falcon(75cm²):
 - 15ml medium
 - 5ml trypsin/EDTA
 - 5ml neutralisatie medium
 - 1ml overbrengen om te splitsen
- Kleine falcon(25cm²):
 - 5ml medium
 - 2ml trypsin/EDTA
 - 2ml neutralisatie medium
 - 0,4ml overbrengen om te splitsen

Uitzaaien

- 96-well 50 000 cellen
- 6-well + CS 200 000 cellen (CS = coverslip)
- 6-well 350 000 cellen
- gem.schaal 2 500 000 cellen

5x laemmli buffer (voor lysaten)

- 25ml 10% SDS
 - 20ml 100% glycerol
 - 1,25ml 1% broomphenolblauw
 - 7,75ml 1M TrisHCl pH 6,8
- 5x laemmli lyseren -> 2,5µl

=> 10µl DTT

4x laemmli buffer (voor beads)

- 20ml 10% SDS

- 10ml 100% glycerol
 - 0,05ml 1% broomphenolblauw
 - 3,1ml 1M TrisHCl pH 6,8
5x laemmllyseren -> 2,5µl
- => 50µl DTT

radioïmmunoprecipitatie assay buffer (RIPA-buffer) 250ml op 4°C bewaren:

- 7,5ml 150mM NaCl (stock 5M)
- 12,5ml 50mM TrisHCl pH 7,5 (stock 1M)
- 25ml 1% NP40 (10x stock)
- 2,5ml 0,1% SDS (natriumdodecylsulfaat) (stock 10%)
- =>aanvullen tot 250ml met bidi (= 202,5ml)
- 0,5% DOC (natriumdeoxycholinezuur toevoegen op dag van experiment, detergent, Acrös organics, bruin flesje in productenkamer)
- protease en fosfatase inhibitoren
 - 1x Aproteïne
 - 1x Pefabloc
 - 1/1000 Leupeptine
 - 1x β-glycerolfosfaat

De buffer wordt op ijs bewaard.

Voor 2 gels! 10% Acrylamide/Bisacrylamide (AA/BAA) SDS-PAGE scheidingsgel (5 ml/gel)

- 4,7ml Bidi
- 2,5ml 1,5M TrisHCl pH 8.8 (stock 1,5M)
- 0,1ml 0.1% SDS (stock 10%)
- 2,6ml 10% acrylamide/bisacrylamide
- 0,1ml 1/100 ammoniumpersulfaat (APS)
- 10µl 1/1000 N,N,N,N-tetramethylethyleendiamine (TEMED)

De gel begint te polymeriseren wanneer het APS wordt toegevoegd. Deze toevoeging gebeurt dus pas wanneer de gel klaar is om gegoten te worden.

Voor 2 gels! 5% AA/BAA SDS-PAGE stacking gel (2.1ml/gel)

- 3ml Bidi
- 1,2ml 1,90M TrisHCl pH 6.8 (stock 0,5M)
- 0,05ml 0.1% SDS
- 0,625ml 5% acrylamide/bisacrylamide
- 0,05ml 1/100 ammoniumpersulfaat (APS)
- 5µl 1/1000 N,N,N,N-tetramethylethyleendiamine (TEMED)

De gel begint te polymeriseren wanneer het APS wordt toegevoegd. Deze toevoeging gebeurt dus pas wanneer de gel klaar is om gegoten te worden.

1x Elektroforesebuffer voor de SDS-PAGE

- 49,53mM Tris base
- 383,64mM Glycine
- 3,47mM SDS

1x Transferbuffer voor western blotting

- 38,63mM Glycine
- 47,88mM Tris base
- 1,18mM SDS
- 20% (v/v) methanol

Blocking buffer (TBS/Licor)

- 20mM TrisHCl pH 7,5
- 137mM NaCl
- 5% melkpoeder
- +1/2 Licor blocking buffer

Wasbuffer (=TBS-T)

- 20mM TrisHCl pH 7,5
- 137mM NaCl
- 0,05% Tween20

(Ant)agonisten:

DRD4: + DA

- L745870, Haloperidol

MOR: + DAMGO

- Naloxone

Lysebuffer (totaallyse)

- 62,5mM TrisHCl pH 6,8
 - 2% SDS
 - 10% Glycerol
 - 0,1% BFB
-
- 50mM DTT (stock aan 1M moet dus 20x verdund worden) pas op laatste toevoegen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) met 10% foetaal kalfs serum (FKS)

- 900ml D-MEM
 - 100ml FKS
 - Indien de buffer ouder is dan een maand: +10ml glutamine (100x stockoplossing)
 - 2ml penicilline
- Het medium wordt gehomogeniseerd

0.1x TE-buffer

- 10mM TrisHCl pH 7,6
- 1mM EDTA

Buffer wordt ge-autoclaveerd

2x BS/HEPES buffer

- 25mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineëthaansulfonzuur)
- 273,79mM NaCl

-
- 9,93mM KCl
 - 1,61mM NaHPO₄·12H₂O
 - 11,10mM Dextrose

Op pH 7,05 brengen met NaOH en filtersteriliseren.

Fixatief (50ml) mag 1week na maken nog gebruikt worden

- 150mM NaCl
- 10mM Natriumfosfaat pH 7,4 (10x)
- 3,7%(5ml) 37% formaldehyde (werk steeds in TREKKAST met bril)
-

IF wasbuffer

- 8g NaCl
- 3g Tris
- 0,2g KCl
- 0,15g CaCl₂-2H₂O
- -> aanlengen met Bidi tot 1l

pH op 7,2 (met HCl)

Blotto

- 3% melkpoeder
- 1mM CaCl₂
- 50mM Tris HCl pH7,5

->aanlengegn tot 10ml met Bidi

Blotto-T-X100

- Blotto
- 0,1% triton X-100