



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Mgr Magdalena Kisiel**

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego, Katedra Biofizyki

**Tytuł pracy doktorskiej: "Rola procesu preaktywacji w funkcjonowaniu receptora GABA<sub>A</sub> oraz jego modulacji przez wybrane czynniki"**

**Promotor:** Prof. dr hab. Jerzy W. Mozrzymas

### Streszczenie pracy doktorskiej

Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy jest najważniejszym neuroprzebieźnikiem hamującym ośrodkowego układu nerwowego dojrzałych ssaków. W warunkach fizjologicznych aktywuje on m. in. heteropentameryczne receptory jonotropowe GABA typu A (GABA<sub>A</sub>Rs). Receptory GABA<sub>A</sub> w części zewnątrzkomórkowej wiążą agonistę, przy czym dwa miejsca wiążące znajdują się na styku podjednostek  $\beta(+)/\alpha(-)$ . Por przewodzący aniony Cl<sup>-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup> znajduje się w części transbłonowej receptora. Związanie agonisty wywołuje szereg zmian konformacyjnych postępujących z miejsca wiązania do poru kanału jonowego. Receptor GABA<sub>A</sub> jest wrażliwy na szereg modulatorów w różny sposób wpływających na poszczególne etapy aktywacji receptora. Wiele z nich pełni ważną rolę w farmakologii bezsenności, epilepsji, nerwic, a także w anestezji.

Kluczem to projektowania substancji o określonym profilu działania w stosunku do receptorów GABA<sub>A</sub> jest poznanie mechanizmów aktywacji tych receptorów oraz strukturalnych determinantów poszczególnych jej etapów. Przeprowadzone doświadczenia i analiza miały na celu możliwie pełne scharakteryzowanie kinetyki procesów związanych z aktywnością receptora. Szczególne zainteresowanie kierowano w stronę procesu preaktywacji, a więc szeregu zmian konformacyjnych następujących po związaniu agonisty i poprzedzających bramkowanie kanału jonowego. Poprzednio postulowano, że w przypadku pokrewnych receptorów nAChR i GlyR preaktywacja (ang. *priming*, *flipping*) wiąże się transferem energii do poru kanału (Lape i wsp., 2008; Mukhtasimova i wsp., 2009; Jaley i Auerbach, 2012). Dotychczas preaktywacja w receptorach GABA<sub>A</sub> była słabo poznana.

Niniejsza rozprawa doktorska oparta została na pomiarach elektrofizjologicznych z użyciem techniki *patch-clamp* w konfiguracji ustalonego napięcia, przy czym pomiary dotyczyły 1) makroskopowych prądów wywołanych z użyciem systemu do ultraszybkiej wymiany roztworów oraz 2) prądów płynących przez pojedyncze kanały (*single-channel*). Pomiary dotyczyły rekombinowanych receptorów także zmutowanych ( $\alpha_1$ /F64L/F64C $\beta_{1/2}\gamma_2$ ,  $\alpha_1\beta_2$ /E155C) ekspresjonowanych w komórkach linii HEK293. Uzupełnieniem pomiarów były symulacje kinetyczne z zastosowaniem programów ChannelLab i HJCFIT.

Zaobserwowano, że wysycające stężenia częściowego agonisty P4S wywoływały prądy makroskopowe o mniejszej amplitudzie, szybszej deaktywacji oraz wolniejszej makroskopowej desensytyzacji niż prądy wywołane przez wysycające [GABA]. Analogiczne obserwacje dotyczyły porównania prądów wywołanych przez GABA w odniesieniu do receptorów  $\alpha_1\beta_2$ /E155C do tych wywołanych w  $\alpha_1\beta_2$ . Ponadto mutacje  $\alpha_1$ F64L/C i  $\beta_2$ E155C sprawiały, że muscimol, który w receptorach typu dzikiego (odpowiednio  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$  i  $\alpha_1\beta_2$ ) różnił się od GABA jedynie kinetyką deaktywacji, stał się superagonistą, wywołując prądy o wyższej amplitudzie niż GABA. Rejestracje aktywności pojedynczych kanałów

wykazywały bardzo silną zależność stężeniową kinetyki receptorów  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , która była zdecydowanie słabsza w przypadku mutantów  $\alpha_1F64C\beta_2\gamma_2$ . W szczególności, w przypadku stężeń wysycających GABA w receptorach niezmutowanych dominowały otwarcia w długich seriach, których w tym mutancie nie obserwowano. Dodatkowo w przypadku receptorów  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  protony powodowały wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanału, spowolnienie makroskopowej desensytyzacji, narostu i deaktywacji. Jednocześnie, mutacja  $\alpha_1F64C$  przesuwała wrażliwość receptora w kierunku pH zasadowego. Następowo również odwrócenie kierunku zmian kinetyki deaktywacji w stosunku do tego, co obserwowano w receptorach kontrolnych.

W niniejszej rozprawie badano różne aspekty funkcjonowania  $GABA_A$ Rs – zjawisko częściowego agonizmu, rolę wybranych reszt aminokwasowych –  $\alpha_1F64$  i  $\beta_2E155$ , aktywację receptora pojedynczo- i niezwiązanego, kooperatywność miejsc wiążących oraz mechanizm modulacji receptora przez protony. Ponadto przedstawiono aktywację receptora  $GABA_A$  w różnych warunkach – pod wpływem agonistów o różnej efektywności działania i pozornym powinowactwie, a także po jej spowolnieniu bądź upośledzeniu za pomocą mutacji  $\alpha_1F64L$ ,  $\alpha_1F64C$  oraz  $\beta_2E155C$ . Takie połączenie doświadczeń elektrofizjologicznych, mutagenezy oraz symulacji *in silico* pozwoliło dostarczyć mocnych dowodów wskazujących na to, że receptor po związaniu agonisty nie otwiera się od razu, a przechodzi szereg zmian konformacyjnych, które dopiero przygotowują kanał do otwarcia. Nasze doświadczenia z użyciem częściowego agonisty P4S sugerują, że różnice między nim a GABA da się wytłumaczyć różną szybkością tych przejściowych zmian konformacyjnych stanowiących proces nazywany preaktywacją.

Te wnioski zostały wzmocnione dodatkowo przez wyniki eksperymentów z użyciem mutacji w pozycjach  $\alpha_1F64$  oraz  $\beta_2E155$  położonych w miejscu wiążącym agonistę. Udało nam się pokazać, że pozycje te kształtują preaktywację. W ten sposób leżąc tak daleko od poru kanału jonowego (około 5 nm), mogą one wpływać na jego bramkowanie. Co ciekawe, doświadczenia z mutantami w wymienionych pozycjach pokazały również, że preaktywacja decyduje nie tylko o tym, czy mamy do czynienia z pełnym czy częściowym agonistą, ale tłumaczy również różnice między agonistami pozornie różniącymi się powinowactwem do receptora – GABA i muscymolu.

Uwzględnienie preaktywacji w opisie kinetycznym aktywacji receptora  $GABA_A$  (także z mutacją  $\alpha_1F64C$ ) pozwoliło także na zweryfikowanie dotychczasowych hipotez na temat modulacji przez protony i zaproponowanie dwóch prawdopodobnych mechanizmów, zgodnie z którymi ta modulacja może zachodzić. Mechanizmy te oprócz procesu preaktywacji (a w zasadzie wyjścia ze stanu preaktywowanego) miałyby obejmować komponenty bramkowania poru kanału jonowego – jego otwieranie i zamykanie lub desensytyzację. W tym kontekście wydaje się być ciekawym stwierdzenie, że protony wpływają na każdy etap aktywacji receptora.

Mocną stroną niniejszej rozprawy jest fakt, że wnioski płynące z pomiarów makroskopowych, które dostarczają jedynie pośrednich informacji na temat kinetyki receptora, zostały zweryfikowane w oparciu o wyniki pomiarów prądów z pojedynczych kanałów. To pozwoliło na szersze spojrzenie na aktywację receptora  $GABA_A$ . Symulacje kinetyczne oparte na wynikach tych pomiarów wskazują na to, że aktywacja receptora pojedynczo związanego podobnie jak receptora podwójnie związanego zachodzi z udziałem preaktywacji. Natomiast w opisie spontanicznej aktywności receptora  $GABA_A$  uwzględnienie tego procesu nie było konieczne. Udało nam się również potwierdzić rolę reszty  $\alpha_1F64$  w preaktywacji receptora podwójnie, ale już nie pojedynczo związanego, co sugeruje, że reszta ta może pełnić pewną rolę w kontaktowaniu się podjednostek receptora. Dodatkowo, całościowe podejście do procesu aktywacji  $GABA_A$ R pozwoliło nam wykluczyć kooperatywność miejsc wiążących.

Połączenie pomiarów makro- i mikroskopowych umożliwiło nam skonstruowanie najpełniejszego modelu aktywacji receptora  $GABA_A$ , jaki dotychczas opublikowano.