

## Streszczenie

Receptory GABA<sub>A</sub> są anionoselektywnymi kanałami jonowymi aktywowanymi kwasem  $\gamma$ -aminomasłowym (GABA). Są to heteropentameryczne białka, powszechnie występujące w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie pełnią wiodącą rolę w inhibicji neuronalnej. Z uwagi na ogromną ilość różnorodnych procesów zachodzących w mózgu, dopasowanie siły hamowania do konkretnych potrzeb jest kluczową kwestią dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu. Dysfunkcje inhibicji mogą skutkować występowaniem takich schorzeń jak epilepsja, stany lękowe lub bezsenność. Regulacja aktywności receptorów GABA<sub>A</sub> w mózgu odbywa się na drodze ekspresji różnych podjednostek tworzących pentamery w zależności od potrzeb lokalnej sieci neuronalnej. Znanych jest również wiele endogennych modulatorów aktywności tych białek, takich jak podjednostki pomocnicze, lub modulatorów egzogennych, w tym środków stosowanych klinicznie, jak benzodiazepiny czy barbiturany. Związanie neuroprzekaźnika przez receptor w miejscu wiązania, znajdującym się w domenie zewnątrzkomórkowej prowadzi do otwarcia oddalonej o ok. 50 Å bramki kanału w domenie transbłonowej, lecz dokładne mechanizmy aktywacji receptora oraz jego modulacji przez egzogenne czynniki nie zostały dostatecznie poznane. Celem poniższej rozprawy doktorskiej jest zbadanie regulacji aktywności receptorów GABA<sub>A</sub> na drodze istotnej zmiany stechiometrii podjednostkowej w postaci braku kluczowej podjednostki  $\beta$  oraz wpływu benzodiazepiny flurazepamu na spontaniczną aktywność receptorów GABA<sub>A</sub>. Ponadto, w rozprawie podjęto się wyjaśnienia roli elementu strukturalnego domeny zewnątrzkomórkowej - pętli G, w procesie aktywacji. Dzięki zastosowaniu metody *patch-clamp* do pomiaru prądów przewodzonych przez receptory ekspresjonowane w linii komórkowej HEK-293 udało się opisać właściwości kinetyczne i farmakologiczne kanałów składających się wyłącznie z podjednostek  $\alpha$  i  $\gamma$  i ukazać zaskakujący poziom podobieństwa między receptorami typu dzikiego i tymi pozbawionymi podjednostki  $\beta$ . Analiza przebiegów prądowych z pojedynczych kanałów pozwoliła na wyjaśnienie natury wpływu flurazepamu na spontaniczną aktywność, który znacznie wydłuża otwarcia kanału przy nieobecności agonisty. Pomiaru mikro- i makroskopowe na receptorach zmutowanych w kluczowym *locus* pętli G ukazały istotne zmiany w kinetyce mierzonych prądów, zaś modelowanie kinetyczne ujawniło efekty mutacji w przejściach konformacyjnych zawiadujących otwieraniem bramki kanału. Wskazuje to na istotną rolę pętli G w końcowych fazach procesu aktywacji. Wyniki ukazane w niniejszej rozprawie istotnie poszerzyły wiedzę dotyczącą regulacji i relacji struktura-funkcja receptorów GABA<sub>A</sub> i w przyszłości mogą przyczynić się do projektowania nowych terapii schorzeń związanych z inhibicją neuronalną.

## Abstract

GABA<sub>A</sub> receptors are anion-selective ion channels activated by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). They are heteropentameric proteins, ubiquitously expressed in the central nervous system where they have a major role in neuronal inhibition. Due to the enormous amount of various processes occurring in the brain, fine-tuning of inhibitory strength to the specific needs is of utmost importance for proper development and functioning of the organism. Inhibitory deficiencies may result in the development of such illnesses as epilepsy, anxiety or insomnia. Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor activity in the brain occurs by means of regulation of expression of subunits forming pentamers according to the needs of the local neural network. Additionally, there are multiple known endogenous modulators of GABA<sub>A</sub> receptor activity such as auxiliary subunits, as well as exogenous modulators, including those used clinically such as benzodiazepines or barbiturates. Binding of the neurotransmitter by the receptor in the binding site, located in the extracellular domain leads to opening of the channel gate, situated ca. 50 Å away in the transmembrane domain, but precise mechanisms governing receptor activation and modulation by exogenous factors have not been fully elucidated. The aim of this dissertation was to examine the regulation of GABA<sub>A</sub> receptor activity through a significant alteration of subunit stoichiometry, namely the absence of crucial  $\beta$  subunit as well as the influence of the benzodiazepine flurazepam on spontaneous activity of GABA<sub>A</sub> receptors. Additionally, it has been undertaken to explain the role of a structural element of the extracellular domain – loop G in the activation process. The use of the *patch-clamp* method enabled measuring of currents mediated by channels expressed in HEK-293 cell line and allowed for a description of kinetic and pharmacological properties of receptors assembled only from  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits which showed a surprising level of similarity between wild-type receptors and those lacking the  $\beta$  subunit. The analysis of single-channel currents enabled the elucidation of influence of flurazepam on spontaneous activity, which significantly prolongs channel openings in the absence of the agonist. Micro- and macroscopic current measurements of receptors mutated in a crucial *locus* of loop G showed significant changes in receptor kinetics, while kinetic modelling revealed effects of mutations on conformational transitions governing opening of the channel gate. This indicates an important role of loop G in final stages of the activation process. Results presented in this dissertation have broadened the existing knowledge on regulation and structure-function relationship of GABA<sub>A</sub> receptors and may contribute to the design of new therapies against illnesses related to neuronal inhibition in the future.