

Streszczenie

Receptor GABA_A (GABA_AR) odgrywa kluczową rolę hamującą w mózgu dorosłych ssaków, a jego dysfunkcje związane są z wieloma zaburzeniami (m.in. padaczka, lęk, schizofrenia). GABA_AR jest również celem dla wielu istotnych klinicznie związków (benzodiazepiny, barbiturany i środki znieczulające). Chociaż poczyniono znaczne postępy w określaniu statycznej struktury GABA_AR, molekularne mechanizmy jego funkcjonowania wciąż pozostają nie w pełni poznane. GABA_AR jest transbłonowym kanałem jonowym, a najczęściej występującą w naszym mózgu izoformą receptora jest $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. W procesie wiązania ligandu (GABA) bierze udział kilka reszt aminokwasowych. Niektóre z nich są kluczowe nie tylko dla wiązania agonisty, ale mogą być również zaangażowane w dalsze zmiany konformacyjne struktury receptora – tzw. proces bramkowania (konformacyjne zmiany strukturalne receptora w pełni związanego z ligandem). Zaliczamy do niego stan preaktywacji receptora (poprzedzający otwarcie kanału) oraz proces otwierania/zamykania i desensytyzacji receptora. Moja praca doktorska dotyczy określenia roli dwóch reszt aminokwasowych (fenyloalaniny (F) 64 zlokalizowanej na podjednostce α_1 i glutaminianu (E) 155 zlokalizowanego na podjednostce β_2) w mechanizmie aktywacji i modulacji GABA_AR. Obie reszty znajdują się w ortosterycznym miejscu wiązania (bardzo odległym od bramki - struktury otwierającej por kanału) i mogą brać udział w procesach wiązania i bramkowania. W moich badaniach określiłam wpływ mutacji reszty α_1 F64 (podstawienie reszty leucyny - α_1 F64L) na mechanizm modulacji GABA_AR przez protony (Kisiel i wsp., 2019). Wiadomo, że zmiany zewnątrzkomórkowego pH wpływają zarówno na etap wiązania, jak i bramkowania w procesie aktywacji receptora. Ponadto wykazano, że reszta α_1 F64 oddziałuje z protonami (Huang i wsp., 2004). Zbadałam wpływ zmiany zewnątrzkomórkowego pH na makroskopowe prądy płynące przez zmutowane receptory α_1 F64L $\beta_2\gamma_2$ L, stosując technikę patch-clamp z ultraszybkim systemem perfuzji i porównałam otrzymane wyniki z receptorami typu dzikiego $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ L (Kisiel i wsp., 2019). Zaobserwowałam znaczny spadek amplitudy prądu i przyspieszenie kinetyki makroskopowej desensytyzacji dla podania GABA i częściowego agonisty (P4S), przy zwiększaniu pH w zakresie od 6.0 do 8.0. Co ciekawe, zmiany pH w przypadku natywnych i zmutowanych receptorów, miały inny wpływ na kinetykę deaktywacji. Analiza danych ilościowych i symulacje w opraciu o model kinetyczny dla aktywności makroskopowej i pomiarów aktywności pojedynczych kanałów, sugerują, że mechanizm modulacji aktywacji GABA_AR przez protony, może być związany z procesem otwierania i desensytyzacji receptora (Kisiel i wsp., 2019). Dodatkowo, sprawdziłam również modulację receptorów $\alpha_1\gamma_2$ L przez

protony (Brodzki i wsp., 2016). Wcześniejsze badania wskazywały, że niektóre reszty wrażliwe na protony, zlokalizowane są w podjednostce β (Huang i wsp. 2004; Wilkins i wsp., 2005). Zaskakujące jest zatem moje odkrycie, że wpływ obniżenia pH na prądy makroskopowe płynące przez receptory $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ i $\alpha_1\gamma_{2L}$, wskazuje na podobną wrażliwość obu typów receptorów na protony z niewielkimi, ale istotnymi różnicami w kinetyce deaktywacji (Brodzki i wsp., 2016). Wyniki te mogą sugerować, że inna podjednostka - najprawdopodobniej γ_2 , przejmuje rolę podjednostki β , imitując miejsce wiązania dla GABA i miejsce oddziaływania z protonami. Oprócz modulacji przez protony, jak wspomniano powyżej, $GABA_{AAR}$ może być modulowany także przez benzodiazepiny (BDZ). Niestety mechanizm leżący u podstaw tej modulacji pozostaje nadal niejasny. W swoich badaniach skupiłam się na wpływie BDZ - flurazepamu (FLU) na aktywację $GABA_{AAR}$ związanego z ligandem, a także na spontaniczną aktywność receptora (Jatczak-Śliwa i wsp., 2018). Ponownie zastosowałam technikę patch-clamp do rejestrowania makroskopowych i mikroskopowych prądów płynących przez receptory $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ i zmutowane receptory (podstawienie reszty cysteinowej α_1F64C). Zaobserwowałam, że mutacja zwiększa spontaniczną aktywność receptora, a FLU powoduje jej wzmocnienie w pomiarach makroskopowych i aktywności pojedynczych kanałów, w takim samym stopniu, jak w przypadku receptorów natywnych ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$), wpływając na proces otwierania i zamykania kanału (Jatczak-Śliwa i wsp., 2018). Ponadto po raz pierwszy wykazaliśmy, że niezwiązane z ligandem $GABA_{AAR}$ mogą ulegać procesowi makroskopowej desensytyzacji, która dodatkowo jest modulowana przez BDZ. Co ciekawe, odkryłam, że spontaniczna aktywność może wpływać na przebieg makroskopowego prądu wywołanego podaniem agonisty, a objawia się to w postaci tzw. przebiecia prądu (overshoot), obserwowanego po zakończeniu podania agonisty. W przypadku aktywności $GABA_{AAR}$ wywołanej podaniem agonisty, FLU wpływa zarówno na amplitudę, jak i kinetykę prądów makroskopowych płynących przez zmutowane receptory. Nasze symulacje z zastosowaniem modelu kinetycznego wskazują, że mechanizm modulacji FLU receptorów aktywowanych ligandem, dotyczy przede wszystkim etapu preaktywacji i desensytyzacji (Jatczak-Śliwa i wsp., 2018). W kolejnych badaniach podjęłam się określenia roli reszty β_2E155 w mechanizmie aktywacji $GABA_{AAR}$. Podstawienie β_2E155 resztą cysteinową spowodowało przesunięcie w prawo zależności dawka-odpowiedź dla prądów wywołanych przez podanie GABA, spowolnienie makroskopowej desensytyzacji, przyspieszenie kinetyki deaktywacji i zwiększenie spontanicznej aktywności receptora. Mutacja spowodowała również, że inny agonista $GABA_{AAR}$ – muscimol (MSC), działa jako superagonista. Z kolei, analiza aktywności pojedynczych kanałów wskazuje na zmiany w rozkładach czasów zamknięcia dla

zmutowanych receptorów zarówno dla podania GABA, jak i MSC. Ponadto odkryłam, że FLU zwiększa spontaniczną aktywność zmutowanych receptorów w takim samym stopniu jak dla receptorów natywnych $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ i zmutowanych $\alpha_1F64C\beta_2\gamma_{2L}$. Podobnie, mechanizm modulacji FLU receptorów $\alpha_1\beta_2E155C\gamma_2$ wydaje się być zgodny z tym, co obserwowałam wcześniej dla receptorów $\alpha_1F64C\beta_2\gamma_2$. Symulacje modelu kinetycznego pokazują, że mutacja β_2E155C wpływa głównie na proces wiązania i preaktywacji w mechanizmie aktywacji $GABA_{AR}$. Podsumowując, wyniki moich badań rzucają nowe światło na funkcjonowanie $GABA_{AR}$, w którym elementy jego struktury odległe od poru kanału mogą kształtować jego bramkowanie. Należy uwzględnić ten aspekt podczas projektowania nowych leków mających wpływać na określone cechy receptora.

6.08.2021

Magdalena Jotnick-Sliwa

Abstract

The GABA_A receptor (GABA_AR) plays an essential inhibitory role in the adult mammalian brain and its dysfunctions were implicated in many disorders e.g. epilepsy, anxiety, schizophrenia and autistic disorders. GABA_AR is also a target for many clinically relevant compounds such as benzodiazepines, barbiturates and several anesthetics. Although a marked progress has been made in determining the static structure of this receptor, the molecular mechanisms of its functioning remain elusive. An extended view on the structure-function relationship for GABA_ARs is needed not only to better understand their functioning but also to design new drugs of medical use. GABA_AR is a heteropentameric transmembrane ion channel and the most common isoform in the brain is $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. The receptor agonist (GABA) binds to the receptor at the interface of α and β subunits. Several amino acid residues take part in the process of ligand binding. It was previously shown that some of them are crucial not only for agonist binding but also can be involved in further conformational changes of receptor structure in so called gating process (conformational transitions of a fully bound receptor) which includes the preactivation transition (that precedes channel opening) as well as opening/closing and desensitization processes. My PhD thesis addresses the role of two amino acid residues (phenylalanine (F) 64 located in α_1 subunit and glutamate (E) 155 located in β_2 subunit) in the mechanism of GABA_AR activation and modulation. Both residues are located at the orthosteric binding site (which is very distant from the gate – the structure which opens the channel pore) and may be involved in binding and gating processes, which make them particularly interesting for studying the relationship between receptor structure and its function. I investigated the impact of the α_1 F64 residue mutation on GABA_AR mechanism of modulation by protons (Kisiel et al., 2019). Acidosis of the extracellular fluid in the brain may occur during some pathological states such as hypoxia, hypoglycemia, or ischemia. GABA_AR is highly sensitive to changes in extracellular pH. It is known that alterations of pH affect both binding and gating step of receptor activation. Moreover, it has been shown that the α_1 F64 residue interacts with protons (Huang et al., 2004). I examined the impact of extracellular pH changes on macroscopic currents mediated by α_1 F64 leucine mutants using the patch-clamp technique with ultrafast perfusion system and compared the results to wild type $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ receptors (Kisiel et al., 2019). I observed a significant decrease in current amplitudes as well as acceleration of desensitization kinetics for GABA and partial agonist (P4S) when increasing pH within the range of 6.0 to 8.0. Interestingly, deactivation kinetics was affected differently by pH in non-mutated and mutated receptors. Our quantitative data analysis and model simulations of macroscopic and single-

channel activity suggests that the pH modulation of the activation mechanism in the GABA_AR may be related to the opening and desensitization transitions (Kisiel et al., 2019). Additionally, I verified a proton modulation of $\alpha_1\gamma_2L$ receptors (Brodzki et al., 2016). Previous studies indicated that some residues involved in pH sensing are located on the β subunit (Huang et al. 2004; Wilkins et al., 2005). Surprisingly, I found that the effect of acidosis on macroscopic currents mediated by $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ and $\alpha_1\gamma_2L$ receptors showed a similar sensitivity of both receptor types to protons with small but significant differences in the deactivation kinetics (Brodzki et al., 2016). These results may indicate that another subunit – most probably γ_2 - takes over the role of the β subunit by mimicking the binding site and sensing extracellular pH. In addition to proton modulation, as mentioned above, GABA_ARs can be modulated by several clinically used drugs such as benzodiazepines (BDZs). Nonetheless, the mechanism underlying this modulation still remains obscure. In my study, I focused on BDZ – flurazepam (FLU) effect on ligand-evoked GABA_AR activation and on receptor spontaneous activity (Jatczak-Śliwa et al., 2018). Similarly, I used the patch-clamp technique to record both macroscopic and microscopic currents mediated by wild-type $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ or mutated receptors (cysteine substitution of α_1F64). I have found that the mutation increases spontaneous activity and FLU upregulated it at the macroscopic and single-channel level to the same extent as the wild-type $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ receptors by affecting the opening/closing transitions (Jatczak-Śliwa et al., 2018). Moreover, we have demonstrated for the first time that unliganded GABA_ARs may undergo desensitization which depend on the BDZ modulation. Interestingly, I found that spontaneous activity may affect the time course of agonist-induced current in the form of an “overshoot” after agonist removal which represents cross-desensitization of bound and unbound receptors. In the case of GABA-evoked activity, FLU affects both amplitudes and kinetics of currents mediated by mutated receptors. Our model simulations indicate that FLU modulation of ligand-activated receptors concerned primarily the preactivation and desensitization step (Jatczak-Śliwa et al., 2018). My further studies concerned the role of another mentioned residue - β_2E155 in the GABA_AR activation. Cysteine substitution of β_2E155 right-shifted the dose-response curve for GABA-elicited currents, slowed down macroscopic desensitization, accelerated deactivation kinetics, and enhanced receptor spontaneous activity. Moreover, muscimol (MSC) acts as a superagonist on mutated receptors. Single-channel analysis revealed changes in shut time distributions for mutated receptors in both GABA and MSC application. Additionally, I have found that FLU upregulated spontaneous activity of mutated receptors to the same extent as in case of WT and α_1F64C mutants. Similarly, FLU modulation mechanism of $\alpha_1\beta_2E155C\gamma_2$ receptors seems to be congruent with what I observed previously for $\alpha_1F64C\beta_2\gamma_2$ receptors. Based on macroscopic

and single-channel analysis, my model simulations reveals that β_2 E155C mutation affects mostly binding and preactivation transitions. Summarizing, my results shed a new light on the functioning of the GABA_AR in which structural elements that are particularly distant from the channel pore may shape this receptor's gating. This aspect should be considered when designing new drugs expected to affect specific receptor's features.

6.08.2021

Meghaleena Jitendra Shinde