

STRESZCZENIE

Receptory GABA_A to kanały chlorkowe o pentamerycznej budowie do których wiążą się cząsteczki neuroprzekaźnika – kwasu γ -aminomasłowego (GABA) i które pełnią kluczową rolę w szybkiej synaptycznej transmisji hamującej w mózгах dorosłych ssaków. Zaburzenia transmisji GABAergicznej mogą prowadzić do poważnych schorzeń neurologicznych, m. in. padaczki, autyzmu, zaburzeń lękowych oraz schizofrenii. Ponadto, aktywność receptorów GABA_A modulowana jest przez związki farmakologiczne takie jak benzodiazepiny, anestetyki i barbiturany, powszechnie stosowane w praktyce klinicznej. Transdukcja sygnału, który prowadzi do aktywacji, obejmuje duże obszary makromolekuły i jest indukowana przez wiązanie agonisty do miejsc wiązania w domenie zewnątrzkomórkowej, skąd dociera do zlokalizowanej w domenie transbłonowej bramki kanału jonowego, powodując jej otwarcie. Co interesujące, sygnał aktywacji rozprzestrzenia się nie tylko wzdłuż osi receptora lecz również lateralnie – pomiędzy podjednostkami poprzez występowanie lokalnych oddziaływań w strukturze. Jednakże molekularne mechanizmy leżące u podstaw procesu aktywacji receptora GABA_A oraz jego modulacji przez związki farmakologiczne wciąż nie są w pełni poznane.

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy określenia funkcji wybranych aminokwasów zlokalizowanych w obrębie szczytu domeny zewnątrzkomórkowej receptora GABA_A: α_1 F14 i β_2 F31 oraz w miejscu wiązania: β_2 F200, we wspomnianym procesie aktywacji, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w etapach wiązania neuroprzekaźnika i bramkowania kanału jonowego. Zbadana została także wrażliwość receptorów GABA_A zmutowanych w pozycjach α_1 F64 i β_2 F200 na modulację przez benzodiazepinę, flurazepam. Poprzez zastosowanie punktowej mutagenyzy oraz wykorzystanie techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp*, możliwe było rejestrowanie prądów przewodzonych przez rekombinowane receptory GABA_A ekspresjonowane w komórkach linii HEK 293. Analiza oraz modelowanie kinetyczne uzyskanych przebiegów prądowych dostarczyły jednoznacznej informacji na temat roli badanych aminokwasów w wyżej opisanych procesach. Wykazano także w ten sposób występowanie dalekozasięgowych oddziaływań pomiędzy różnymi rejonami struktury receptora, ale także istnienie funkcjonalnego oddziaływania o krótkim zasięgu pomiędzy sąsiadującymi podjednostkami α_1 i β_2 . Badanie wpływu flurazepamu na proces aktywacji wskazało na mechanizm działania tego związku poprzez modulację kluczowego etapu bramkowania, zwanego preaktywacją. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji z zakresu relacji pomiędzy strukturą i funkcją receptora GABA_A, które potencjalnie mogą mieć zastosowanie w projektowaniu nowych leków oddziałujących z tym receptorem.

ABSTRACT

GABA_A receptors are pentameric chloride channels that bind the neurotransmitter molecules – γ -aminobutyric acid (GABA) and play a key role in fast synaptic inhibitory transmission in the adult mammalian brain. Dysfunction of the GABAergic drive leads to severe neurological disorders such as epilepsy, autism, anxiety and schizophrenia. Moreover, the activity of GABA_A receptors is modulated by many pharmacological compounds, such as benzodiazepines, anesthetics and barbiturates, that are commonly used in the clinical practice. The activation process is initiated with agonist binding to the binding sites located in the extracellular domain. Transduction of the activation signal comprises the whole receptor structure and eventually leads to the opening of channel gate in the transmembrane domain. Additionally, the activation signal can also spread in the lateral direction, between the adjacent receptor subunits due to some local interactions within the structure. However, molecular mechanisms of the GABA_A receptor activation process, as well as the mechanisms of its modulation by pharmacological compounds, remain elusive.

The present doctoral thesis concerns determination of the function of selected amino acid residues, localized at the top of the GABA_A receptor extracellular domain: α_1 F14 and β_2 F31, or in the binding site region: β_2 F200, in the aforementioned processes, with emphasis on their specific role in binding of the neurotransmitter and gating of the ion channel. Sensitivity to benzodiazepine, flurazepam, of GABA_A receptors mutated in the positions α_1 F64 and β_2 F200 was also investigated. Using site-directed mutagenesis and electrophysiological technique *patch clamp*, current traces mediated by recombinant GABA_A receptors expressed in HEK 293 cells were recorded. Kinetic analysis and modeling of the experimental data provided unequivocally the information about the role of the considered residues in the studied processes. Long-distance interactions between different protein regions were proved but also a short-range functional intersubunit interaction between the α_1 and β_2 subunits was also discovered. The investigation of the impact of flurazepam on the GABA_A receptor activation indicated a mechanism of action of this compound that largely modulated a crucial step of gating, known as preactivation. The results shed new light on the issue of the relationship between the structure and the function of GABA_A receptor, an insight that could potentially be relevant in designing new drugs that target the receptor.