

Napięciowa zależność kinetyki prądów GABAergicznych mierzonych przy różnych wartościach zewnątrzkomórkowego pH*

Maria Pytel, Katarzyna Mercik, Jerzy W. Mozrzymas

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego
Katedra Biofizyki
Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Zmiany wartości napięcia błonowego i stężenia jonów wodorowych to jedne z najbardziej powszechnych czynników modulujących układy biologiczne, szczególnie komórki nerwowe. Wiele doniesień literaturowych wskazuje, że zarówno potencjał błonowy jak i zmiana stężenia jonów wodorowych wpływają na kinetykę prądów GABAergicznych, ale zagadnienie równoczesnej modulacji przez oba te czynniki nie zostało zbadane. W niniejszej pracy dokonaliśmy opisu wpływu napięcia błonowego i zewnątrzkomórkowego pH w zakresie od 6.0 do 8.0 na kinetykę receptora GABA_A. Otrzymane wyniki wskazują na brak istotnego wpływu napięcia na kinetykę odpowiedzi prądowych mierzonych w kwaśnym pH, natomiast silna modulacja przez napięcie dotyczyła odpowiedzi prądowych rejestrowanych w pH=7.2 i 8.0.

Słowa kluczowe: receptory GABA_A, patch-clamp, napięcie błonowe, protony

Lokalne zmiany pH i napięcia błonowego są jednymi z podstawowych i uniwersalnych czynników modulujących kanały jonowe. Receptory GABA_A w warunkach fizjologicznych dobrze przepuszczają jony wodorowęglanowe, których przepływ zmienia lokalne wartości pH w bezpośrednim otoczeniu receptora [3]. Szczególnie w stanach patologicznych takich jak niedotlenienie czy udar mózgu, może dojść do wahań w pobudliwości błony komórkowej i istotnych zmian w wartości zewnątrzkomórkowego pH. Doniesienia literaturowe wskazują, że receptory GABA_A czule są zarówno na zmiany pH roztworu zewnątrzkomórkowego [3-6, 11,12, 14] i wartości potencjału

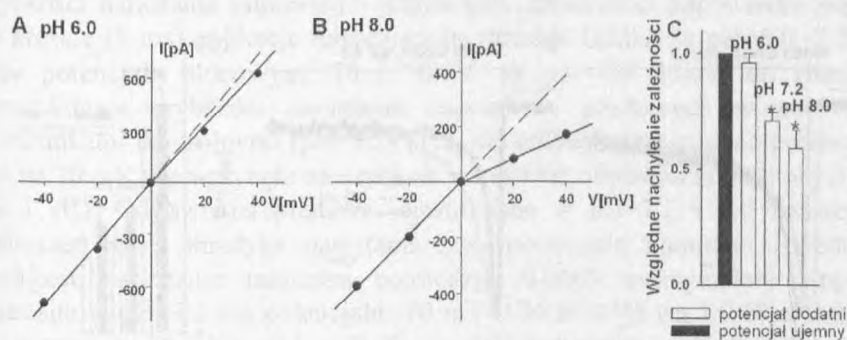
* Praca dofinansowana przez Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Science (Grant Nr 070231/Z/03/Z).

błonowego [9, 13]. Badania przeprowadzone ostatnio w naszym laboratorium wskazują, że protony [11] i napięcie błonowe modelują bramkowanie receptora GABA_A [13], przy czym w obydwu przypadkach mechanizm modulacji, związany był z wpływem na kinetykę desensytyzacji i wiązania agonisty. Zagadnienie równoczesnej modulacji kinetyki receptora GABA_A przez te czynniki jest o tyle ciekawe, że zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych dochodzi do równoczesnych zmian napięcia błonowego i stężenia jonów wodorowych, a nie jest jasne czy te efekty modulacyjne są addytywne czy też modulacja przez jeden z tych czynników jest uzależniona od działania drugiego. Żeby udzielić odpowiedzi na to pytanie, przeprowadzono badania nad równoczesnym wpływem napięcia błonowego i zmian stężenia jonów wodorowych w roztworze zewnątrzkomórkowym na kinetykę receptora GABA_A.

Wszystkie pomiary wykonane były na hodowli komórek nerwowych z hipokampa szczura przy użyciu techniki patch-clamp i systemu ultraszybkiej perfuzji. Do opisu zmian konformacyjnych zastosowano model Jonesa i Westbrooka, który zakłada istnienie dwóch identycznych i niezależnych miejsc wiążących na receptorze oraz stany konformacyjne zamknięty (A₂R), otwarty (A₂R*) i zdesensytyzowany (A₂D). Szybkość przejść pomiędzy stanami opisana jest przez odpowiednie stałe kinetyczne [2].

Jak to wykazali Pytel i wsp. [13], wielkości amplitud odpowiedzi prądowych wywołanych nasycającym stężeniem GABA (10 mM) mierzonych przy pH=7.2, wykazują silną zależność od napięcia na błonie, przy czym zależność ta ma charakter dokomórkowego prostowania (nachylenie wykresu I-V przy potencjałach dodatnich jest mniejsze niż przy potencjałach ujemnych). W celu sprawdzenia w jaki sposób zmiany w wartości pH wpływają na prostowniczy charakter zależności prądowo-napięciowej, wyznaczono zależność I-V dla odpowiedzi prądowych mierzonych przy pH=6.0, 7.2 i 8.0. Jako stężenia nasycającego dla pH=7.2 i 8.0 użyto 10mM GABA, natomiast dla pH=6.0 użyto 30 mM GABA [11]. Pomiary odpowiedzi prądowych na ultraszybkie aplikacje GABA zostały wykonane w zakresie pH od 6.0 do 8.0, przy potencjałach błonowych z przedziału od -70 do 70mV. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że zależność prądowo-napięciowa dla pH=6.0 była bliska liniowej (ryc. 1A), natomiast zarówno w pH=7.2 i 8.0 (ryc. 1B) zależność wykazywała właściwości dokomórkowego prostowania, przy czym efekt ten był silniejszy w przypadku pH=8.0. Wyznaczony potencjał odwrócenia dla całego zakresu pH był bliski 0 mV, co związane jest z faktem, że stężenie jonów chlorkowych w roztworach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym jest bardzo zbliżone. Dla każdej komórki z osobna wyliczono stosunek kąta nachylenia charakterystyki I-V otrzymanej dla potencjałów dodatnich do nachylenia zależności prądowo-

napięciowej dla potencjałów ujemnych. Średnie wartości względnego nachylenia zależności wyniosły odpowiednio: 0.96 ± 0.04 ($n=3$, $p>0.05$) dla pH=6.0, 0.71 ± 0.04 , ($n=7$, $p<0.05$) dla pH=7.2 i 0.59 ± 0.08 ($n=4$, $p<0.05$) dla pH=8.0 (rys. 1C). Wyniki te wskazują na monotoniczną zależność wielkości dokomórkowego prostowania od wartości pH (Ryc. 1C).

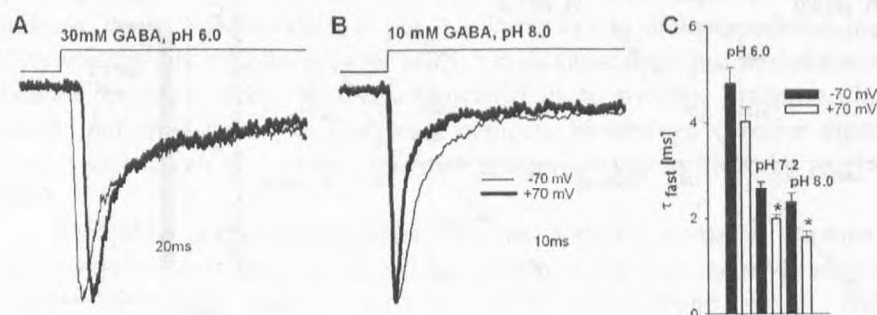


Ryc. 1. Przykładowe wykresy zależności amplitudy odpowiedzi prądowej na nasycające stężenie GABA od wartości potencjału błonowego dla pH=6.0 (A) i pH=8.0 (B). C – Średnie wartości nachylenia zależności prądowo-napięciowych mierzonych dla potencjałów dodatnich względem potencjałów ujemnych przy wartościach pH z zakresu od 6.0 do 8.0. Gwiazdki wskazują na istotną statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości otrzymanych dla potencjałów ujemnych.

Prostowniczy charakter zależności prądowo-napięciowej odpowiedzi prądowych mierzonych dla pH=7.2, według Pytel i wsp. [13] był konsekwencją modulowania procesu desensytyzacji. Ponadto Mozrzymas i wsp. [11] wskazali, że kinetyka desensytyzacji jest w dużym stopniu modulowana przez zmiany stężenia jonów wodorowych. Zatem zależność zjawiska dokomórkowego prostowania od wartości pH może być spowodowana zmianami w kinetyce desensytyzacji odpowiedzi prądowych mierzonych przy różnych wartościach pH i napięcia błonowego.

Pamiętać należy, że w stanie zdesensytyzowanym receptor jest nieprzepuszczalny dla jonów i równocześnie jest nieczuły na działanie agonisty. W warunkach doświadczalnych proces desensytyzacji ujawnia się podczas długiej (np. 100 ms) ekspozycji receptora na nasycające stężenie GABA. Odpowiedzi prądowe wywołane 100 ms aplikacją nasycającego stężenia GABA charakteryzowały się szybkim czasem narastania (aktywacja receptorów) i powolnym zanikiem (związany z desensytyzacją) aż do osiągnięcia wartości stacjonarnej (stedy-state). Kinetyka zaniku odpowiedzi prądowych miała dwufazowy charakter, co można opisać przy użyciu dwóch stałych czasowych, szybkiej (τ_{fast}) i wolnej (τ_{slow}). Dla odpowiedzi prądowych mierzonych

w warunkach kontrolnych (pH=7.2) stałe czasowe szybka i wolna wyniosły odpowiednio $\tau_{\text{fast}}=2.41\pm0.17\text{ms}$ i $\tau_{\text{slow}}=126\pm7.5\text{ms}$. W skali czasowej zdarzeń synaptycznych powolna składowa desensytyzacji (τ_{slow}) nie wpływa na kinetykę zaniku prądów synaptycznych, dlatego analizę procesu desensytyzacji ograniczono do szybkiej składowej (τ_{fast}), która jest dominująca w czasie do 50 ms po osiągnięciu przez odpowiedź prądową maksymalnej amplitudy.

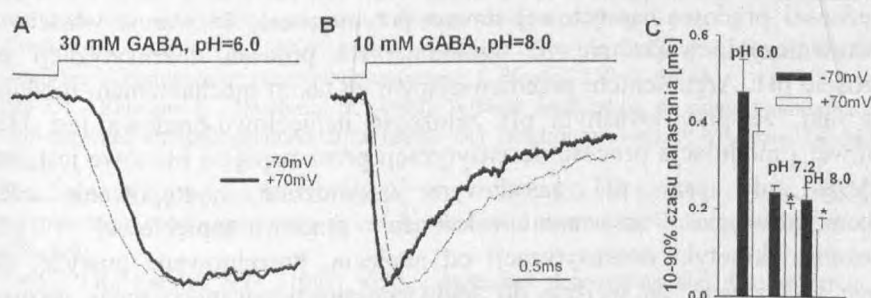


Ryc. 2. Znormalizowane odpowiedzi prądowe wywołane 100 ms aplikacją nasycającego stężenia GABA rejestrowane przy potencjale błonowym -70 i 70 mV dla pH=6.0 (A) i pH=8.0 (B). Ponieważ przebiegi prądowe mierzone dla pH=6.0 (Ryc. A) nie różnią się znacząco, dla uzyskania większej przejrzystości zostały przesunięte względem siebie. C – Porównanie średnich wartości stałych czasowych desensytyzacji odpowiedzi prądowych mierzonych przy potencjale -70 i 70 mV dla pH z zakresu od 6.0 do 8.0. Gwiazdki wskazują na istotną statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości otrzymanej dla potencjału ujemnego.

W celu zbadania równoczesnego wpływu pH i napięcia na kinetykę desensytyzacji, odpowiedzi prądowe wywołane 100 ms aplikacją nasycającego stężenia GABA w pH=6.0, 7.2 i 8.0 mierzone były przy potencjałach -70 i 70 mV. Kinetyka desensytyzacji odpowiedzi prądowych mierzonych przy potencjale błonowym -70 mV wykazywała monotoniczną zależność od pH – w kwaśnym środowisku zewnątrzkomórkowym doszło do spowolnienia stałej czasowej desensytyzacji (τ_{fast}), natomiast w środowisku zasadowym τ_{fast} została przyspieszona w porównaniu z wartością mierzoną dla warunków kontrolnych (pH=7.2, podobnie jak donosi Mozrzymas i wsp. [11]). Zmiana napięcia błonowego na dodatnie spowodowała przyspieszenie stałej czasowej desensytyzacji (τ_{fast}) w całym zakresie badanych wartości pH, ale przyspieszenie istotne było tylko dla odpowiedzi prądowych mierzonych dla pH=7.2 i 8.0 (ryc. 2C). Średnie wartości stałych czasowych desensytyzacji odpowiedzi prądowych mierzonych przy potencjale -70 i 70 mV wyniosły odpowiednio: dla pH=6.0 $\tau_{\text{fast}} = 5.1 \pm 0.3$ ms dla $V_m = -70$ i $\tau_{\text{des}} = 4.3 \pm 0.1$ ms dla $V_m = 70$ mV ($n=3$, $P>0.05$; ryc. 2C), dla pH=7.2 $\tau_{\text{fast}} = 2.6 \pm 0.1$ ms dla $V_m = -70$ i $\tau_{\text{fast}} = 1.9 \pm 0.1$ dla $V_m =$

70 mV ($n=9$, $P<0.05$) i dla $\text{pH}=8.0$ $\tau_{\text{fast}} = 2.3 \pm 0.2$ ms dla $V_m = -70$ i $\tau_{\text{fast}} = 1.6 \pm 0.1$ ms dla $V_m = 70$ mV ($n=8$, $p<0.05$; ryc. 2C).

Ponieważ proces desensytyzacji wpływa na kinetykę narastania odpowiedzi prądowych, można przypuszczać, że obserwowana przy potencjałach dodatnich zmiana kinetyki desensytyzacji odpowiedzi prądowych mierzonych w $\text{pH}=7.2$ i 8.0 , znajdzie swoje odzwierciedlenie w zmianie szybkości narastania odpowiedzi prądowych. Zmierzono odpowiedzi prądowe na krótkie (5 ms) aplikacje nasycającego stężenia GABA w $\text{pH}=6.0$, 7.2 i 8.0 przy potencjale błonowym -70 i 70 mV. W $\text{pH}=6.0$ doszło do znacznego spowolnienia szybkości narastania odpowiedzi prądowych w porównaniu z warunkami kontrolnymi ($\text{pH}=7.2$) [11], ale jednocześnie zmiana potencjału z -70 na 70 mV nie wpłynęła na szybkość narastania odpowiedzi prądowych (ryc. 3A i 3C). Odpowiedzi prądowe rejestrowane w $\text{pH}=7.2$ i 8.0 wykazywały natomiast różną kinetykę narastania przy potencjale ujemnym i dodatnim. Szybkość narastania mierzona pomiędzy 10-90% maksymalnej amplitudy wynosiła w $\text{pH}=7.2$ dla potencjału -70 mV 0.24 ± 0.015 ms i 0.20 ± 0.015 ms dla potencjału 70 mV ($n=11$, $p<0.05$; ryc. 3C), natomiast w $\text{pH}=8.0$ dla napięcia -70 mV 0.22 ± 0.013 ms i dla napięcia 70 mV 0.16 ± 0.023 ms ($n=4$, $P<0.05$; ryc. 3C).



Ryc. 3. Znormalizowane przebiegi prądowe rejestrowane w odpowiedzi na 5 ms aplikację nasycającego stężenia GABA przy potencjale błonowym -70 i 70 mV dla $\text{pH}=6.0$ (A) i $\text{pH}=8.0$ (B). Ponieważ odpowiedzi prądowe rejestrowane dla $\text{pH}=6.0$ nie różnią się znacząco, dla uzyskania większej przejrzystości zostały przesunięte względem siebie. C – Porównanie szybkości narastania odpowiedzi prądowych mierzonych dla $\text{pH}=6.0$, 7.2 i 8.0 przy potencjale błonowym -70 i 70 mV. Gwiazdki wskazują na istotną statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości otrzymanej dla potencjału ujemnego.

Zaprezentowane wyniki wskazują, że napięciowa zależność receptora GABA_A silnie zależy od wartości pH roztworu zewnątrzkomórkowego, ale efekty te nie są addytywne. Doniesienia literaturowe wskazują, że zarówno napięcie jak i pH wpływają znacząco na kinetykę desensytyzacji i wiązania

agonisty [11, 13]. Fakt ten może sugerować, że protony mogą wpływać na strukturę kanału odpowiedzialną za wrażliwość receptora GABA_A na zmiany napięcia. Wyżej przedstawione dane doświadczalne wskazują na brak istotnego wpływu napięcia na kinetykę odpowiedzi prądowych mierzonych w kwaśnym pH. Natomiast silna modulacja przez napięcie dotyczyła odpowiedzi prądowych rejestrowanych w $\text{pH}=7.2$ i 8.0 . Przy alkalizacji środowiska doszło do wzmocnienia zjawiska dokomórkowego prostowania skorelowanego z przyspieszeniem kinetyki desensytyzacji. Jak zaproponował Mozrzymas i wsp. [11] amplitudy odpowiedzi prądowych rejestrowanych w $\text{pH}=8.0$ są silnie zredukowane w porównaniu z odpowiedziami mierzonymi w $\text{pH}=7.2$ przy analogicznej wartości siły elektrycznej napędzającej. W obecności nasycających stężeń GABA stan w pełni związany zamknięty osiągany jest bardzo szybko i zgodnie z przewidywaniami modelu Jones i Westbrooka [2], kanał ze stanu związanego zamkniętego może wejść do stanu otwartego lub zdesensytyzowanego. Proporcje obsadzenia tych stanów określone są przez relacje pomiędzy stałymi kinetycznymi otwarcia (β_2) i desensytyzacji (d_2). Mozrzymas i wsp. [11] wskazali, że obserwowane w pH zasadowym zmniejszenie wielkości amplitudy odpowiedzi prądowych jest prawdopodobnie wynikiem zwiększenia szybkości wejścia do stanu zdesensytyzowanego (d_2), w którym to stanie receptor nie przewodzi jonów. Odnosząc tę obserwację do zależności prądowo-napięciowej można przypuszczać, że wzrost właściwości prostowniczych wiąże się ze wzmocnieniem procesu desensytyzacji przy wzroście pH. Argumentem przemawiającym za takim mechanizmem modulacji jest fakt, że przy kwaśnym pH zależność napięciowo-prądowa jest bliska liniowej i modulacja procesu desensytyzacji przez napięcie błonowe jest słaba, podczas gdy przy pH zasadowym stwierdzono występowanie efektu dokomórkowego prostowania zależności prądowo-napięciowej i silnej zależności kinetyki desensytyzacji od napięcia. Prezentowane powyżej dane mogą wskazywać, że wejście do stanu zdesensytyzowanego może wymagać deprotonacji makromolekuły kanału, stąd słabszy wpływ napięcia na kinetykę desensytyzacji w kwaśnym pH. Alternatywnym mechanizmem pozwalającym wytłumaczyć prezentowane obserwacje mógłby być wpływ rozważanych czynników (napięcia i pH) na przewodnictwo pojedynczych kanałów. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, ponieważ wiele badań wskazuje na brak wpływu pH [6] i napięcia błonowego [1, 7, 8, 10, 15] na przewodnictwo pojedynczych kanałów.

Fizjologiczne znaczenie zmiany napięciowej zależności kinetyki receptora GABA_A przy różnych wartościach nie jest jasne. Można przypuszczać, że mechanizm modulacji kinetyki receptora GABA_A jednocześnie przez napięcie i pH działa na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Przy kwaśnym pH

sprężenie ulega osłabieniu czyniąc transmisję GABAergiczną bardziej efektywną w dodatnich potencjałach (co może mieć korzystny wpływ w stanach patologicznych, takich jak epilepsja czy niedotlenienie, którym towarzyszy zakwaszenie środowiska zewnątrzkomórkowego [3]).

Piśmiennictwo

1. Bormann J., Hamill O.P., Sakmann B. (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol.* 385: 243-286.
2. Jones M.V., Westbrook G.L. (1995) Desensitized states prolong GABA_A channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* 15: 181-191.
3. Kaila K. (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42: 489-537.
4. Krishek B.J., Amato A., Connolly C.N., Moss S.J., Smart T.G. (1996) Proton sensitivity of the GABAA receptor is associated with the receptor subunit composition. *J. Physiol. (London)* 492: 431-443.
5. Krishek B.J., Moss S.J., Smart T.G. (1998) Interaction of H⁺ and Zn²⁺ on recombinant and native rat neuronal GABA_A receptors. *J. Physiol. (London)* 507: 639-652.
6. Krishek B.J., Smart T.G. (2001) Proton sensitivity of rat cerebellar granule cell GABAA receptors: dependence on neuronal development. *J. Physiol.* 530: 219-233.
7. Ma J.Y., Reuveny E., Narahashi T. (1994) Terbium modulation of single γ-aminobutyric acid-activated chloride channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 14: 3835-3841.
8. Macdonald R.L., Rogers C.J., Twyman R.E. (1989) Kinetic properties of the GABA_A receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture. *J. Physiol.* 410: 479-499.
9. Mellor J.R., Randall A.D. (1998) Voltage-dependent deactivation and desensitization of GABA responses in cultured murine cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 506: 377-390.
10. Mistry D.K., Hablitz J.J. (1990) Activation of subconductance states by gamma-aminobutyric acid and its analogs in chick cerebral neurons. *Pflugers. Arch.* 416: 454-461.
11. Mozrzymas J.W., Żarnowska E.D., Pytel M., Mercik K. (2003). Modulation of GABA_A receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J. Neurosci.* 23: 7981-7992.
12. Pasternack M., Smirnov S., Kaila K. (1996) Proton modulation of functionally distinct GABA_A receptors in acutely isolated pyramidal neurons of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 35: 1279-1288.
13. Pytel M., Mercik K., Mozrzymas J.W. (2005) Membrane voltage modulates the GABA_A receptor gating in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, in press.
14. Robello M., Barduzzi R., Cupello A. (2000) Modulation by extracellular pH of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Int. J. Neurosci.* 103: 41-51.

15. Weiss D.S., Barnes E.M., Hablitz J.J. (1988) Whole-cell and single-channel recordings of GABA-gated currents in cultured chick cerebral neurons. *J. Neurophysiol.* 59: 495-513.

Adres do korespondencji:

Maria Pytel

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego

Katedra Biofizyki

Akademia Medyczna we Wrocławiu

ul. Chałubińskiego 3

50-368 Wrocław

Tel.: (48 71) 784 15 51

e-mail: maja@biofiz.am.wroc.pl