

Wpływ β -cyklodekstryny na kinetykę zmian konformacyjnych receptora GABA_A w hodowanych neuronach hipokampalnych szczura*

Katarzyna Mercik, Maria Pytel, Jerzy W. Mozrzyms

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego
Katedra Biofizyki
Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Cyklodekstryny (CD) są szeroko stosowanymi nanostrukturami, zawierającymi w swojej budowie elementy hydrofobowe i hydrofilowe, dzięki czemu mogą silnie oddziaływać ze składnikami błon biologicznych.

W prezentowanej pracy zbadany został wpływ β CD na receptory GABA_A w hodowanych neuronach hipokampalnych szczura. W tym celu zmierzono odpowiedzi prądowe na ultraszybkie aplikacje GABA. Analiza danych pomiarowych wykazała, że β CD silnie wpływa na kinetykę zmian konformacyjnych receptora GABA_A głównie poprzez modulację procesu desensytyzacji i wiązania agonisty. Niniejsze wyniki wskazują na to, że β CD może silnie modulować białka błonowe, przez co nie powinna być uważana jako obojętny nośnik substancji hydrofobowych.

Słowa kluczowe: Receptory GABA_A, β - cyklodekstryna, ultraszybka perfuzja, patch-clamp

Cyklodekstryny (CD) (węglowodany z grupy dekstryn) są nanocząsteczkami, których pierścień ma kształt lekko stożkowatego cylindra określanego często mianem *torusa*. Wnętrze takiego stożka ma charakter hydrofobowy, natomiast zewnątrz hydrofilowy. Taka budowa cząsteczek CD nadaje im zdolności do rozpoznawania innych cząsteczek w wyniku tworzenia z nimi kompleksów inkluzyjnych (typu „gospodarz-gość”) [4, 7, 16]. Powinowactwo cząsteczek substratów do wnęki uwarunkowane jest przede wszystkim wzajemnym dopasowaniem się ich rozmiarów. W wyniku utworzenia takich kompleksów zmieniają się w bardzo istotny sposób właściwości chemiczne i fizyczne (rozpuszczalność, toksyczność, zdolność utleniania i inne)

* Praca dofinansowana przez KBN grant nr PBZ-MIN-001/P05/28

cząsteczek „zamkniętych” w CD. Zdolność tworzenia przez CD kompleksów inkluzyjnych pozwala na ich szerokie zastosowanie m. in. w przemyśle chemicznym, spożywczym, produkcji nawozów sztucznych, a co najważniejsze w przemyśle farmaceutycznym – jako nośników różnych leków.

Istnieje wiele doniesień literaturowych, w których opisany został fakt oddziaływania CD z różnymi składnikami błon komórkowych. Najczęściej badanym aspektem, przez co i najlepiej poznanym, jest wpływ oddziaływania CD na lipidy błon komórkowych. Opisano również oddziaływanie CD z białkami [9, 15]. Stwierdzono, że CD blokują koneksyny przez bezpośrednie oddziaływanie z porami kanału [11]. Stwierdzono również, że CD modulują błony komórkowe w wyniku absorpcji cholesterolu z błony [10, 19]. Wiadomo, że cholesterol zwiększa stabilność błony, poprzez kontrolowanie jej sztywności i płynności [2, 5]. Zmiana jego poziomu w błonie wpływa na funkcjonowanie białek membranowych m.in. kanałów jonowych, co wskazuje na to, że mikrośrodowisko lipidowe odgrywa znaczącą rolę w regulowaniu funkcji białek błonowych [1, 6, 17, 20].

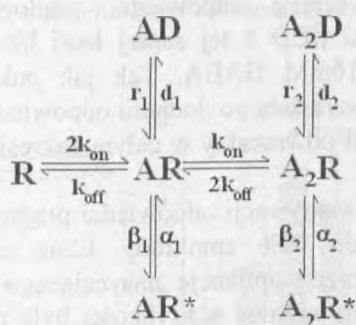
W ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych osobników podstawowym neurotransmiterem hamującym jest kwas γ -aminomasłowy (GABA), który to aktywuje jonotropowe receptory GABA_A. W obrębie kompleksu receptora GABA_A wyróżnia się wiele miejsc wiążących różne związki [12, 18]. Związki, których działanie powoduje bądź bezpośrednio aktywację receptora bądź wzmocnienie lub osłabienie jego aktywności w obecności GABA (m. in. benzodiazepiny, pochodne kwasu barbiturowego, etanol). Związki te mają działanie przeciwlękowe, przeciwdrgawkowe, uspokajające i zwiotczające mięśnie szkieletowe. Natomiast zablokowanie receptora GABA_A (np. pochodnymi β -karbolinowymi, bikukulina lub pikrotoksyna) powoduje wystąpienie lęku, drgawek, pobudzenia oraz zwiększenie napięcia mięśni szkieletowych, a przy wyższych dawkach konwulsje i kryzysy epileptyczne.

Tak jak wcześniej zostało wspomniane CD są szeroko stosowane w przemyśle farmaceutycznym. Dlatego ważne jest zbadanie wpływu tego czynnika na kinetykę receptora GABA_A, którego dysfunkcja może prowadzić do wielu groźnych patologii.

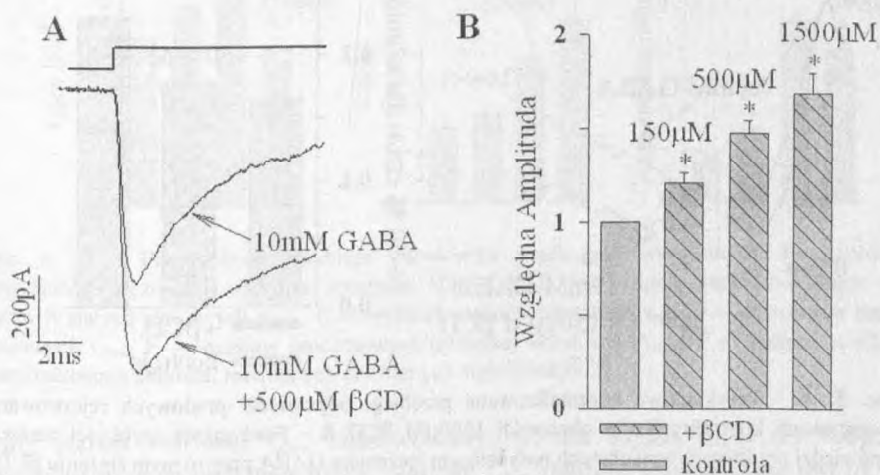
Do tej pory zagadnienie to nie było dogłębnie badane, jedynie zespół Shu [18] przy użyciu powolnych systemów perfuzji pokazał, że CD nie wpływa na odpowiedzi prądowe wywołane egzogenną aplikacją GABA, ale moduluje powolną aktywację prądów aktywowanych przez neurosteroidy.

Chcąc jednak dokładnie opisać mechanizm działania CD na kinetykę receptora GABA_A w warunkach zbliżonych do transmisji synaptycznej, należałoby przeprowadzić pomiary z rozdzielczością czasową adekwatną do zdarzeń synaptycznych [3, 12, 14]. Umożliwia to system ultraszybkiej perfuzji,

dzięki któremu czas wymiany roztworu wokół łatki błonowej wynosi od 40 do 200 μ s. Poniżej prezentowane badania przeprowadzone były przy użyciu takiego systemu, dzięki czemu możliwe było precyzyjne opisanie mechanizmu modulacji bramkowania receptora GABA_A przez β -cyklodekstrynę β CD. Doświadczenia przeprowadzono w konfiguracji łatki błonowej *outside-out*.



Ryc.1. Model kinetyczny Jonesa i Westbrooka: A – agonista, k_{on} – stała szybkości wiązania, k_{off} – stała szybkości dysocjacji, α – stała szybkości otwarcia, β – stała szybkości zamknięcia, d – stała szybkości desensytyzacji, r – stała szybkości resensytyzacji, A_2R – stan związany zamknięty, A_2R^* – stan związany otwarty, A_2D stan związany zdesensytyzowany

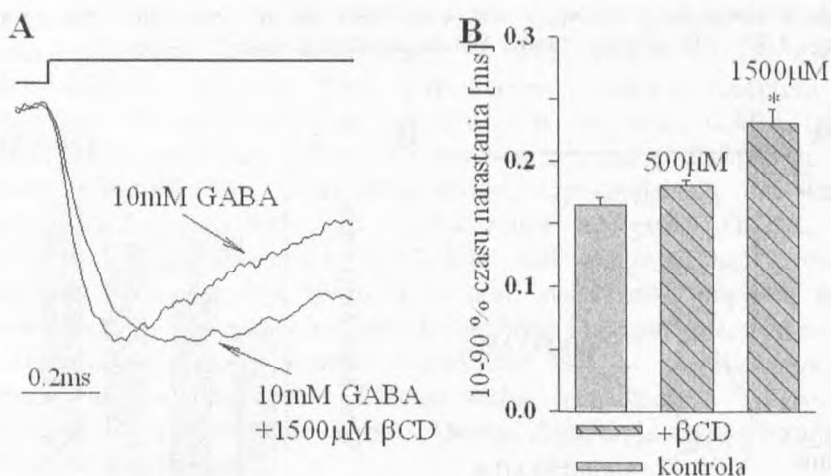


Ryc. 2. A – Przykładowe odpowiedzi prądowe (zarejestrowane na tej samej łatce błonowej) wywołane aplikacją nasycającego stężenia GABA w warunkach kontrolnych i w obecności β CD. B – Porównanie względnych wartości odpowiedzi prądowych rejestrowanych przy różnym stężeniu β CD.

Do opisu kinetyki zmian konformacyjnych receptora posłużono się modelem Jonesa i Westbrooka (Ryc. 1) [8, 13]. Model ten zakłada dwa identyczne i niezależne miejsca wiążące oraz istnienie stanu w pełni związanego otwartego (A_2R^*) i stanu zdesensytyzowanego (A_2D).

Aby precyzyjnie określić wpływ β CD na amplitudę odpowiedzi prądowych wywołanych egzogennymi aplikacjami nasycającego stężenia GABA, zarejestrowano szereg odpowiedzi prądowych w warunkach kontrolnych i w obecności β CD z tej samej łąki błonowej. Jako stężenie nasycające zastosowano 10mM GABA. Tak jak pokazano na rycinie 2, amplituda monotonicznie wzrastała po dodaniu odpowiednio większych dawek β CD. Efekt ten był w pełni odwracalny w całym zakresie stosowanych stężeń β CD.

Jako miarę szybkości aktywacji odpowiedzi prądowej zastosowano czas jej narastania od 10% do 90% amplitudy. Czas narastania odpowiedzi prądowych wywołanych przez aplikację nasycającego stężenia GABA był spowalniany przez β CD, ale różnica w szybkości była znacząca dopiero przy wysokich stężeniach β CD (1.5mM) (Ryc.3).

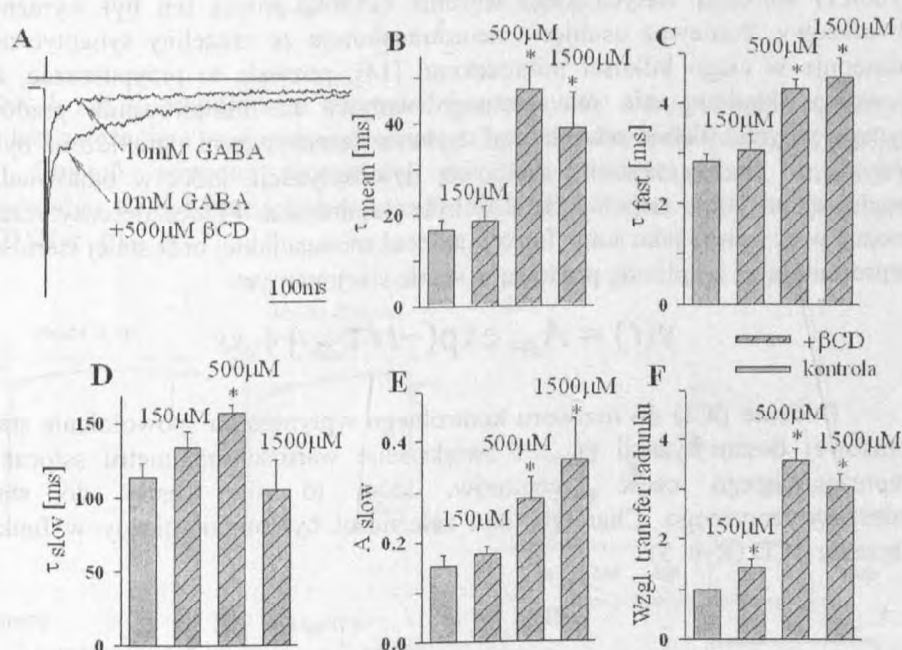


Ryc. 3. A – Przykładowe znormalizowane przebiegi odpowiedzi prądowych rejestrowanych w warunkach kontrolnych i w obecności 1500µM β CD B – Porównanie szybkości narastania odpowiedzi prądowych wywołanych nasycającym stężeniem GABA przy różnym stężeniu β CD.

Zanik GABAergicznej odpowiedzi prądowej (deaktywacja) wywołanej krótką (3ms) aplikacją nasycającego stężenia GABA (Ryc. 4A) ma charakter dwufazowy, który może być opisany za pomocą sumy dwóch funkcji eksponencjalnych o różnych stałych czasowych:

$$y(t) = A_1 \exp(-t/\tau_{fast}) + A_2 \exp(-t/\tau_{slow}),$$

Analiza fazy zaniku odpowiedzi prądowych wykazała, że odpowiedzi prądowe rejestrowane w obecności β CD, charakteryzowały się wolniejszą kinetyką zaniku w porównaniu z odpowiedziami prądowymi otrzymanymi w warunkach kontrolnych (Ryc. 4). Zależność wielkości powolnej składowej deaktywacji (τ_{slow}) od stężenia β CD miał charakter niemonotoniczny (Ryc. 4D).



Ryc. 4. A – Przykładowe przebiegi odpowiedzi prądowych wywołanych 3ms aplikacją nasycającego stężenia GABA i w obecności 500 μ M β CD. Porównanie wartości średnich: B – średnich stałych czasowych τ_{mean} , C – szybkich stałych czasowych τ_{fast} , D – powolnych stałych czasowych τ_{slow} , E – udziałów procentowych powolnej składowej A_{slow} , F – średnich wielkości przewodzonego ładunku; mierzonych przy różnych stężeniach β CD.

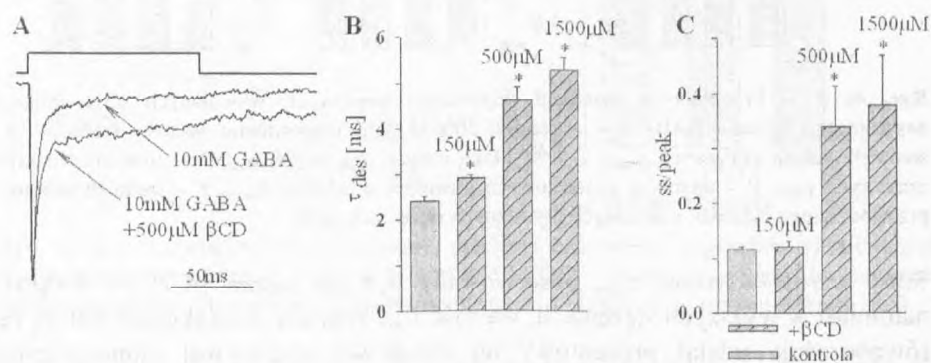
Silny wzrost wartości τ_{slow} obserwowany był dla stężeń β CD do 500 μ M, natomiast w wyższych stężeniach, wartość τ_{slow} zmalała. Zaskakujące jest to, że równocześnie udział procentowy tej składowej wykazywał monotoniczną zależność od stężenia β CD (Ryc. 4E). Zależność średniego czasu zaniku odpowiedzi prądowej (τ_{mean}) od stężenia β CD wykazywała podobny niemonotoniczny charakter jak w przypadku zależności dla τ_{slow} . Znaczący wzrost amplitudy oraz przedłużona deaktywacja odpowiedzi prądowych

rejestranych w obecności β CD wpłynęły na zwiększenie ilości ładunku przeniesionego przez prądy wywołane nasycającym stężeniem GABA w obecności β CD do 500 μ M. Przy wyższych stężeniach β CD trend wzrostu ładunku przeniesionego przez odpowiedzi prądowe na nasycające stężenie GABA uległ odwróceniu (Ryc. 4F), co jakościowo odzwierciedla zależność powolnej składowej deaktywacji od β CD (Ryc. 4E).

Kinetyka deaktywacji jest silnie kształtowana przez proces desensytyzacji. W celu zbadania procesu desensytyzacji zastosowano długie (100ms) aplikacje nasycającego stężenia GABA, proces ten był wyraźnie dwufazowy. Ponieważ usunięcie neurotransmitera ze szczeliny synaptycznej następuje w ciągu kilkuset mikrosekund [14], pozwala to przypuszczać, że powolna składowa nie ma istotnego wpływu na kształtowanie prądów synaptycznych. Wobec powyższego, badanie desensytyzacji ograniczone było jedynie do analizy szybkiej składowej desensytyzacji, która w odpowiedzi prądowej na 50ms impulsy GABA, była dominująca. Proces desensytyzacji można więc opisać jako sumę funkcji jednoeksponecjentalnej oraz stałej wartości reprezentującej amplitudę prądową w stanie stacjonarnym:

$$y(t) = A_{des} \exp(-t/\tau_{des}) + ss$$

Dodanie β CD do roztworu kontrolnego wpłynęło na spowolnienie stałej czasowej desensytyzacji (τ_{des}) i zwiększenie wartości parametru $ss/peak$ – reprezentującego część receptorów, które to nie weszły do stanu zdesensytyzowanego. Charakter obu zależności był monotoniczny w funkcji stężenia β CD (Ryc. 5).



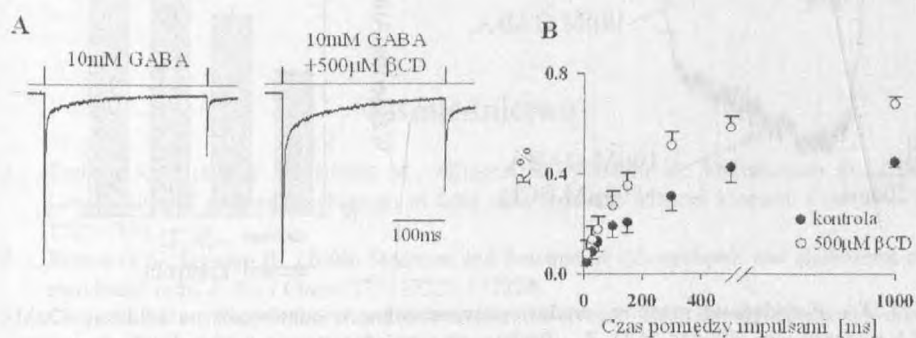
Ryc. 5 A – Przykładowe znormalizowane odpowiedzi prądowe wywołane 100ms aplikacją nasycającego stężenia GABA i w obecności 500 μ M β CD. B – porównanie średnich wartości stałych czasowych desensytyzacji dla różnych stężeń β CD. C – porównanie parametru $ss/peak$ dla różnych stężeń β CD.

W celu określenia zdolności kanału do ponownej aktywacji zastosowano krótkie (3ms) sparowane impulsy nasycającego GABA aplikowanego w różnych odstępach czasu. Na podstawie uzyskanych przebiegów prądowych wyznaczana jest wartość parametru R (ang. *recovery*) – będąca stosunkiem wzrostu natężenia prądu w odpowiedzi na drugi impuls agonisty do amplitudy pierwszej odpowiedzi

$$R = \frac{I_2 - I_3}{I_1 - I_3} \cdot 100\%$$

gdzie: I_1 i I_2 są amplitudami odpowiedzi na pierwszy i drugi impuls agonisty, a I_3 jest natężeniem prądu zarejestrowanego bezpośrednio przed drugą aplikacją.

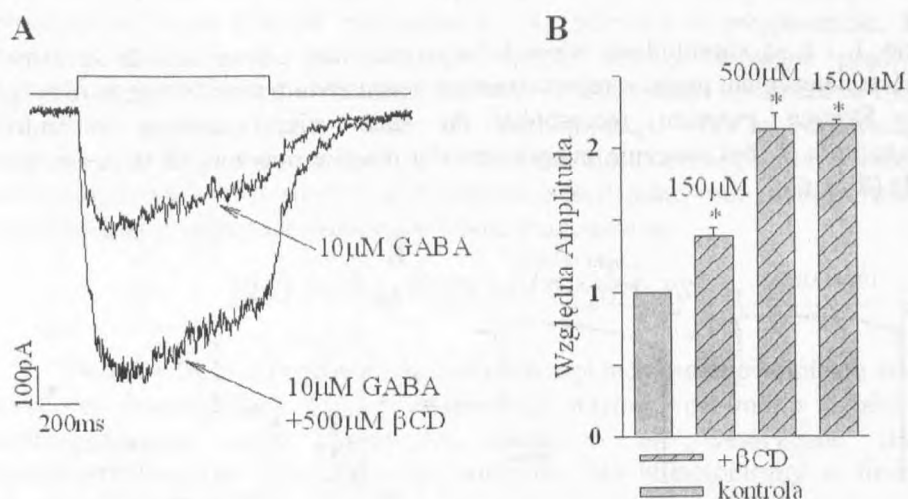
Stożenie powrotu receptorów do stanu niezwiązanego, mierzony parametrem R, był znacznie zwiększony dla prądów mierzonych w obecności β CD (Ryc. 6).



Ryc. 6. A – Przykładowe znormalizowane odpowiedzi prądowe rejestrowane w warunkach kontrolnych i w obecności 500µM β CD. B – Wykres zależności wielkości parametru recovery od długości interwału czasowego pomiędzy pulsami dla odpowiedzi prądowych rejestrowanych w warunkach kontrolnych i w obecności β CD.

W celu wyznaczenia wpływu β CD na szybkość wiązania zarejestrowano odpowiedzi prądowe wywołane niskim stężeniem GABA – 10µM. W całym zakresie badanych stężeń β CD, jej wpływ był większy niż w przypadku nasycającego stężenia GABA (Ryc. 7). Ponadto w przypadku nienasycającego [GABA] efekt wydaje się być bliski nasycenia już dla 500 µM β CD. Silniejszy wzrost amplitudy przy 10µM GABA w porównaniu z odpowiedziami na nasycające stężenia wskazuje, że β CD może wpływać na kinetykę wiązania agonisty.

Analiza odpowiedzi prądowych na długie aplikacje nasycającego [GABA] (Ryc. 5), wykazała, że β CD wyraźnie spowolniła wejście do stanu zdesensytyzowanego sugerując zmniejszenie wartości d_2 . Model Jonesa i Westbrooka wskazuje, że desensytyzacja w zasadniczym stopniu może wpływać na amplitudę i kinetykę odpowiedzi prądowych. Zatem spadek wartości stałej d_2 może objawiać się jako wzrost wartości $ss/peak$ (Ryc. 5C) oraz jako wzrost amplitudy odpowiedzi prądowych dla nasycającego stężenia agonisty (Ryc. 2).



Ryc. 7. A – Przykładowe przebiegi prądowe zarejestrowane w odpowiedzi na aplikację 10 μM GABA i koaplikację 500 μM βCD. B – Porównanie względnych wartości amplitudy odpowiedzi prądowych rejestrowanych dla różnego stężenia βCD.

Amplitudy odpowiedzi prądowych wywołane niskim stężeniem GABA (10 μM) były wzmacniane w obecności βCD w znacznie większym stopniu, niż amplitudy odpowiedzi prądowych wywołanych nasycającym [GABA] (Ryc. 2 i Ryc. 7), co może wskazywać na wzrost powinowactwa GABA do receptora przez βCD. Wzrost amplitudy odpowiedzi prądowych na 10 μM GABA osiąga maksimum nasycenia już przy 500 μM βCD, podczas gdy wpływ βCD, na kinetykę desensytyzacji był monotoniczny w całym przedziale stężeń. Taka zależność może być wytłumaczona wiązaniem βCD do różnych allosterycznych miejsc wiążących charakteryzujących się różnym powinowactwem. Nasze wyniki wskazują na to, że powinowactwo βCD do miejsca wiążącego modulującego wiązanie agonisty do receptora GABA_A jest większe niż w przypadku miejsca modulującego jego desensytyzację. Taki

mechanizm wpływu β CD na proces wiązania agonisty i desensytyzacji może tłumaczyć niemonotoniczny charakter modulacji powolnej składowej deaktywacji (τ_{slow}) przez β CD (Ryc. 4D). Jednoczesne wzmocnienie etapu wiązania i spowolnienie kinetyki desensytyzacji przy stężeniach β CD do 500 μ M, jest przyczyną zaobserwowanego wyraźnego spowolnienia wartości τ_{slow} . Natomiast obserwowalne przyśpieszenie powolnej składowej procesu deaktywacji (Ryc. 3D) przy zwiększonych stężeniach β CD, jest skutkiem dalszego spowalniania procesu desensytyzacji, podczas gdy etap wiązania agonisty nie ulega dalszym zmianom (efekt β CD na ten proces uległ wysyceniu przy niższym stężeniu). Pomimo, że prezentowane wyniki wskazują na silny wpływ β CD na bramkowanie receptora GABA_A to jednak molekularny mechanizm wpływu β CD na strukturę tego receptora pozostaje niewyjaśniony i wymagać będzie dodatkowych badań nad relacją struktura-funkcja tej makromolekuły (np. technikami ukierunkowanej mutacji).

Piśmiennictwo

1. Barbuti A., Gravante B., Riolfo M., Milanesi R., Terragni B., DiFrancesco D., (2004) Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ. Res.* 94: 1325-1331.
2. Brown D.A., London E., (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
3. Clements J.D., (1996) Transmitter time course in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19: 163-171.
4. Douhal A., (2004) Ultrafast guest dynamics in cyclodextrin nanocavities. *Chem. Rev.* 104: 1955-1976.
5. Fielding C.J., Fielding P.E., (2004) Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 65-69.
6. Hajdu P., Varga Z., Pieri C., Panyi G., Gaspar R. Jr., (2003) Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Arch.* 445: 674-682.
7. Harada A. (2001) Cyclodextrin-based molecular machines. *Acc. Chem. Res.* 34: 456-464.
8. Jones M.V., Westbrook G.L., (1995) Desensitized states prolong GABA channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* 15: 181-191.
9. Kamionka A., Dahl M.K., (2001) *Bacillus subtilis* contains a cyclodextrin-binding protein which is part of a putative ABC-transporter. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 55-60.
10. Kilsdonk E.P., Yancey P.G., Stoudt G.W., Bangerter F.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H., (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270: 17250-17256.
11. Locke D., Koreen I.V., Liu J.Y., Harris A.L., (2004) Reversible pore block of connexin channels by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 279: 22883-22892.

12. Mozrzymas J.W., (2004) Dynamism of GABA(A) receptor activation shapes the "personality" of inhibitory synapses. *Neuropharmacology* 47: 945-960.
13. Mozrzymas J.W., Barberis A., Mercik K., Zarnowska E.D., (2003a) Binding sites, singly bound states, and conformation coupling shape GABA-evoked currents. *J. Neurophysiol.* 89: 871-883.
14. Mozrzymas J.W., Żarnowska E.D., Pytel M., Mercik K., (2003b). 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.
15. Pajatsch M., Gerhart M., Peist R., Horlacher R., Boos W., Bock A., (1998) The periplasmic cyclodextrin binding protein CymE from *Klebsiella oxytoca* and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *J. Bacteriol.* 180: 2630-2635.
16. Redenti E., Szente L., Szejtli J., (2001) Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* 90: 979-986.
17. Romanenko V.G., Rothblat G.H., Levitan I., (2002) Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophys. J.* 83: 3211-3222.
18. Shu H.J., Eisenman L.N., Jinadasa D., Covey D.F., Zorumski C.F., Mennerick S., (2004) Slow actions of neuroactive steroids at GABA_A receptors. *J. Neurosci.* 24: 6667-6675.
19. Yancey P.G., Rodrigueza W.V., Kilsdonk E.P., Stoudt G.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H., (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271: 16026-16034.
20. Xia F., Gao X., Kwan E., Lam P.P., Chan L., Sy K., Sheu L., Wheeler M.B., Gaisano H.Y., Tsushima R.G., (2004) Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279: 24685-24691.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Mercik

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego

Ul. Chalubińskiego 3

50-368 Wrocław

Tel.: (48 71) 784 15 51

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