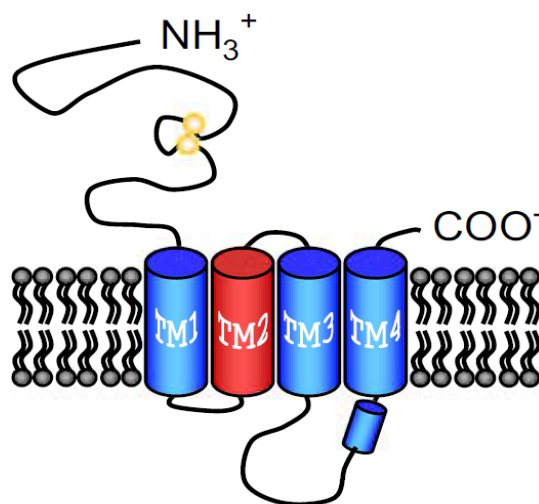


Glicin receptorok működésének farmakológiai befolyásolása

Major Katalin
ELTE-TTK Biológus MSc, V.évf.

Témavezető: Dr. Fodor László
kutató biológus
Richter Gedeon Nyrt.
Farmakológiai és Gyógyszerbiztonsági Kutatási Főosztály

XXXI. OTDK Biológia Szekció



2013. január

Tartalomjegyzék

Összefoglaló.....	3
Summary.....	4
Bevezetés.....	5
A glicin receptorok.....	5
A glicin szerepe.....	6
A glicin receptor terápiás jelentősége.....	7
A glicin receptorok farmakológiája.....	8
 Anyagok és módszer.....	 11
Sejttenyészet.....	11
Egy-sejt elektrofiziológia.....	11
 Eredmények és megvitatásuk.....	 13
Eredmények.....	13
Diskusszió.....	18
 Szerzői Hozzájárulás.....	 19
 Rövidítésjegyzék.....	 19
 Felhasznált irodalom.....	 20

Összefoglaló:

A sztrichnin-érzékeny glicin receptor (GlyR) kloridion áteresztő ligandum-vezérelt ioncsatorna, a központi idegrendszerben általánosan elterjedt, legjellemzőbben a gerincvelőben fejeződik ki, ahol a glicin a fő gátló neurotranszmitter. A receptor öt alegységét klónozták napjainkig emlős idegrendszerből: $\alpha 1$ – 4 és β , amelyekből felépül a homo-, vagy heteropentamer szerkezetű receptor-komplex (öt α vagy két α és három β alegységből). Bár a GlyR funkciót altípus-specifikus módon fokozó vegyületek hatásosak lehetnek több központi idegrendszeri kórkép terápiájában, mint például a fájdalom vagy a spaszticitás, a GlyR-ok farmakológiája kevésbé feltárt.

Kísérleteimben egysejt-elektrofiziológiai megközelítést, a patch clamp módszert alkalmaztam a különböző altípusú GlyR-ok farmakológiai érzékenységének vizsgálatára. A HEK sejtekben kifejeződő rekombináns humán $\alpha 1\beta$, $\alpha 3$ és $\alpha 3\beta$ GlyR-ok működését agonistával (glicin), pozitív (cink-klorid, oktanol, klór-propofol) és negatív modulátorokkal (sztrichnin, pikrotoxinin) befolyásoltam.

Az endogén agonista glicin eltérő hatékonysággal váltott ki bemenő áramot, ezzel ellentétben a GlyR szelektív, kompetitív antagonistá sztrichnin hatékonysága azonosnak bizonyult, már nanomólos koncentrációban kifejtve gátló hatását a különböző GlyR altípusokon. A pikrotoxinin altípus-szelektíven gátolta az áramot, az irodalmi adatoknak megfelelően jelentősen nagyobb hatást mutatva a homomer GlyR-on. Elsőként sikerült kimutatni az oktanol és a klór-propofol $\alpha 1\beta$ és $\alpha 3\beta$ GlyR működést fokozó hatását, mely a két altípuson hasonló mértékű volt. Ismert, hogy a Zn^{2+} alacsony koncentrációban ($\approx 1 \mu M$) pozitív modulátor, míg $10 \mu M$ feletti koncentrációban gátló hatása érvényesül a GlyR-okon. A kísérletek alapján a Zn^{2+} pozitív és negatív hatása alegység-specifitást mutat a vizsgált $\alpha 1\beta$ és $\alpha 3\beta$ altípusú receptorokon.

A fenti eredmények igazolják, hogy az ioncsatorna-fehérje és a gyógyszer molekulák közötti kölcsönhatások hatékonyan tanulmányozhatók az alkalmazott kísérletes felállásban. Különösen fontos lehet az agonisták és antagonisták viselkedésének altípus szelektív vizsgálata, melyek segítségével a GlyR-ok farmakológiája feltárható és hozzájárulhat új gyógyszeres terápiák kifejlesztéséhez.

Summary:

Strychnine-sensitive glycine receptors (GlyRs) are chloride permeable ligand-gated ion-channels, widely expressed in the nervous system, most abundantly in the spinal cord where glycine is the main inhibitory neurotransmitter. Five subunits ($\alpha 1$ –4 and β) have been cloned from the mammalian nervous system to date. GlyRs are homopentamers of α subunits or heteropentamers of 2 α and 3 β subunits. Agents that selectively potentiate different GlyR isoforms may be useful as therapeutic tools for nervous system disorders such as pain or spasticity; however the pharmacology of GlyRs is still poorly studied.

Whole-cell patch clamp electrophysiology was used to examine the pharmacological sensitivity of the different GlyRs. The function of human recombinant $\alpha 1\beta$, $\alpha 3$ and $\alpha 3\beta$ GlyRs (expressed in HEK cell lines) were tested by agonist (glycine) positive (zinc-chloride, octanol, chlor-propofol) and negative (strychnine, picrotoxinin) modulators.

The endogenous agonist glycine activated the receptors with slightly different potencies among various GlyR subtypes. The competitive agonist, GlyR-selective strychnine showed nanomolar inhibition at all subtypes tested. Picrotoxinin subtype specifically blocked the glycine-evoked current; it has significantly higher potency towards homomeric GlyRs. These results are very similar to the literature data. It was demonstrated for the first time, that both octanol and Cl-propofol are positive modulators of the $\alpha 1\beta$ and $\alpha 3\beta$ GlyRs subtypes and enhance the function of these receptors with similar efficacy. It is known that zinc is a positive GlyR modulator at lower ($\approx 1 \mu\text{M}$) concentrations, while it is an inhibitor at higher ($>10 \mu\text{M}$) concentrations. According to the experiments the effect of Zn^{2+} shows apparent subtype specificity at the tested GlyRs.

These results prove that the interaction of drug molecules and ion channel receptors can be feasibly studied in this experimental system. The research on the subtype specificity of agonists and antagonists could be particularly important in exploring the pharmacology of GlyRs, and could help to develop novel therapies for several central nervous system disorders.

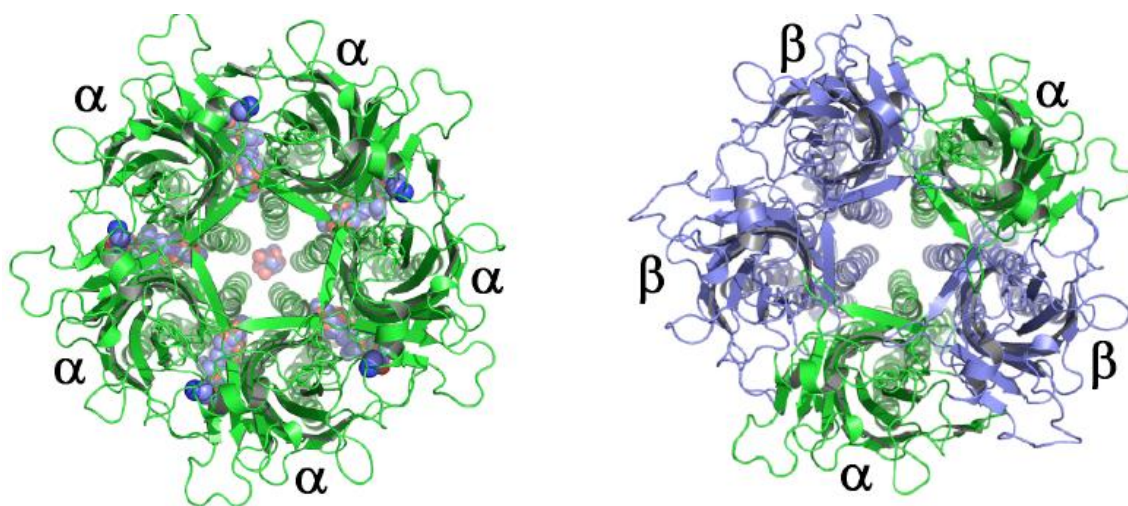
Bevezetés:

A glicin receptorok

A sztrichnin-érzékeny glicin receptor (GlyR) kloridion áteresztő ioncsatorna, a pentamer szerkezetű ligandum-vezérelt ioncsatornák (pLGIC, régebben: Cys-hurokkal rendelkező ioncsatornák) családjába tartozik. Ebbe a csoportba sorolják a nikotinos acetilkolin, a GABA_A, és az 5HT₃ receptorokat is. Ezek öt alegységből állnak, melyek átérlik a sejtmembránt, és a receptor nyitott állapotában egy kb. 0,5 nm átmérőjű, bizonyos ionok által átjárható csatornát határolnak.^{1,2} A pórus bejáratánál lévő pozitív töltésű csoportok miatt a Gly és a GABA receptorok esetében az áteresztett ionok anionok.

A GlyR a GABA receptorok után a legelterjedtebb gátló receptor az idegrendszerben. A GlyR-ok megtalálhatók az agytörzsben, a hallóközpontban, a kisagyban, a talamuszban, a hippokampuszban és a nagyagy kéregben is. Legjellemzőbben azonban a gerincvelőben fejeződnek ki, ahol a glicin a fő gátló neurotranszmitter.³

Az egyes alegységek tisztításakor három különböző molekulatömegű fehérjét izoláltak. Az α 48-50 kDa, a β 58 kDa tömegű, ezek mellett találtak még egy 98 kDa tömegű fehérjét, a gefirint, ami a β alegység IC részéhez kapcsolódva kihorgonyozza a GlyR-t a tubulin fehérjéhez.³ Összesen öt alegység ismeretes: α 1–4 és β , amelyekből felépül a pentamer szerkezetű receptor-komplex (öt α vagy két α és három β alegység- 1. ábra).



1. ábra: Az α_1 GlyR szerkezete öt glicin és ivermectin és egy pikrotoxin molekula bekötődéssel (balra) és az $\alpha_1\beta$ receptor térszerkezet GluCl modell alapján⁴

Az egyes receptorok alegység összetétele életkortól és agyterülettől függően különböző lehet, és nem is minden esetben tisztázott. Felnőtt emlősben a központi idegrendszer, és így a gerincvelő leggyakoribb alegység összetétele $\alpha 1\beta$, ahol valószínűleg 2 α és 3 β alegység alkotja a csatornát. A kisagyban az $\alpha 1$ helyett $\alpha 2$ -t találunk. A fejlődő gerincvelőben $\alpha 2$ homomer jellemző, míg az $\alpha 4$ perifériás. A különböző alegység összetétellel eltérő farmakológiai jellemzők járnak.

A β alegység a GlyR-ok sejt felszíni elrendeződéséért felelős. A β alegység M3-M4 hidrofób szekvenciákat tartalmazó láncrészlettel kapcsolja a receptort a gefirinhez, ami a poszt szinaptikus denzitásban (PSD) található. A kizárólag α alegységekből felépülő, homomer GlyR-ok nem kapcsolódnak a gefirinhez, így extraszinaptikusan is előfordulhatnak.⁵

A középső, ionáteresztő pórust az öt alegység koncentrikusan veszi körül. Minden alegység N-terminálisán egy hosszú EC domén helyezkedik el, egy-egy ligandum kötőhellyel (és a cisztin hurokkal). Az egyes alegységek 4-4 α -helikális TM doménnel rendelkeznek (M1-M4). Az M3 és M4 doméneket egy hosszú, IC láncrészlet kapcsolja össze. A C-terminálison pedig egy rövid EC láncrészlet található. Öt agonista kötőhely található a receptor-komplexen, a maximális aktiválódáshoz azonban három glicin molekula egyidejű bekötődése szükséges (homomer α receptor esetén). Az agonista kötőhely zsebszerű struktúra, az alegységek csatlakozási felszínei alakítják ki.³

A gátló, anion-szelektív Cys-loop receptorok közül eddig csak a *C. elegans* glutamát-vezérelt, homopentamer csatornájának térszerkezetét ismerjük, mely a humán pLGIC receptorok közül az $\alpha 1$ GlyR-hoz hasonlít leginkább (34%-os szekvencia-egyezés). A GlyR modellje a fenti szerkezet alapján készült, melyet a 2. ábrán láthatunk.⁶

A glicin szerepe

A glicin a központi idegrendszerben viszonylag nagy mennyiségben jelenlévő aminosav. Sok metabolikus reakció szereplője, főleg szerinből, treoninból, illetve glioxalátból keletkezik, és bizonyított a neurotranszmitter szerepe is. Az idegsejtekből proton antiporttal nonvezikulárisan, illetve Ca^{2+} -függően vezikulárisan szabadul fel. A poszt szinaptikus membránon helyezkednek el a gátló hatás kialakulásáért felelős glicin-receptorok.

Az idegszövet egy átlagos idegsejtjében a leggyakoribb anion, a klorid koncentrációja kb. 9 mM, a szövetközi térben 125 mM, az egyensúlyi potenciálja a sejtmembrán két oldala

közt pedig -70 mV, ami körülbelül megegyezik a nyugalomban levő idegsejt transzmembrán potenciálkülönbségével. Ez azt jelenti, hogy egy enyhén depolarizálódott sejt esetében a kloridcsatornák kinyitása a kloridionok beáramlását eredményezi, ezzel a sejt hiperpolarizálódik, vagyis gátlódik.

A glicin receptor terápiás jelentősége

A GlyR a gerincvelőben a legelterjedtebb gátló receptor, ezért meghatározó szerepe van minden ott játszódó idegi folyamatban. Emellett más agyi régiókban is megtalálható, de mindezidáig nem hoztak forgalomba olyan gyógyszert, mely a GlyR-on fejtené ki hatását. Pedig a gátlás fokozásának sok indikációja lehetne.

Bizonyos betegségekben a fájdalom kezelése terápiás cél, mint pl. a reumatikus fájdalmak, bizonyos hátfájások, pre,-és posztoperatív fájdalmak, fájdalmas menstruáció, és egyéb nőgyógyászati fájdalmak, daganatokat kísérő fájdalmak, zsigeri eredetű fájdalmak, mint pl. az IBS esetében. Ezekben az esetekben jellemző a megnövekedett érzékenység a fájdalmi ingerekre (hiperalgécia) és ez okoz fokozott fájdalomérzetet.

A gerincvelői glicinerg neuronok fontos szerepet töltenek be a fájdalom-szignál transzdukciójában. A neuropátiás fájdalom egér modelljén történt vizsgálata szerint antiallodiniás hatás köthető a gerincvelői $\alpha 3$ GlyR-okhoz. A neuropátiás fájdalmak kezelésében ezek alapján az egyik targetmolekula a GlyR, mely az ilyen típusú fájdalmak kialakulásában is központi szereplő lehet.⁷ Kimutatták, hogy $\alpha 3$ GlyR „knock-out” egerekben az $\alpha 3$ GlyR hiánya csökkent fájdalmi szenzitizációhoz vezet PGE₂ beinjektálásakor vagy perifériás gyulladás esetén.^{8,3}

A krónikus fájdalomhoz kapcsolódó központi szenzitizáció a csökkent glicinerg gátláshoz kapcsolható a fájdalmi pályák gerincvelő hátsó szarvi részében. Így a GlyR működés pozitív modulációja a gerincvelő hátsó szarvában csökkentheti a centrális szenzitizációt és a hiperalgéziát. Ennek a receptornak az aktiválásával helyre lehet állítani a gátló tónust és állatmodellekben csökkenteni a krónikus fájdalmat.⁸

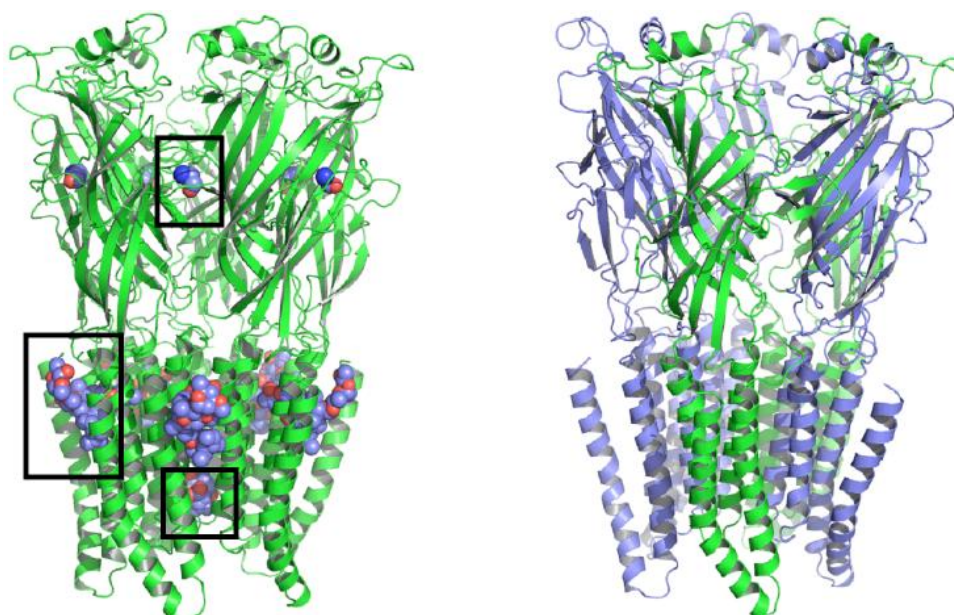
A migrén eddigi egyik legelfogadottabb magyarázata is a KIR-i szenzitizáció folyamatához köthető, mely szerint migrén során az agytörzs szenzoros bemeneteinek feldolgozása változik meg, különösen a nucleus trigeminalis caudalis.⁹ Ebben az esetben az $\alpha 3\beta$ GlyR-ok pozitív modulációja megoldást nyújthat.

Az idegi eredetű hallásromlás (SNHL) és alegezete az időskori hallásvesztés (presbycusis) kezelésekor szintén hatékony lehet a GlyR-ok pozitív modulátorainak alkalmazása.

A legkézenfekvőbb indikációja a pozitív allosztérikus GlyR modulátoroknak az $\alpha 1$ receptorok pontmutációjával kialakuló hyperekplexia.¹⁰

Amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) modellben kimutatták, hogy a GlyR-ok kiváltotta áramok csökkennek a gerincvelői motoneuronokban transzgénikus egerekben.¹¹

A GlyR-ok modulációja hozzájárulhat a fenti betegségeken kívül az autizmus, és a HIV-hez kapcsolható dementia kezeléséhez is.^{12,13}



2. ábra: Az $\alpha 1$ GlyR szerkezete öt glicin, öt ivermectin és egy pikrotoxin molekula bekötődéssel (balra) és az $\alpha 1\beta$ receptor térszerkezete GluCl modell alapján¹⁴

A glicin receptorok farmakológiája

A receptor elsődleges endogén agonistája a glicin, mely kötődésében többek közt az α alegységek 204. aminosavának van nagy szerepe. Fiatalkorban lehet nagyobb jelentősége a parciális agonista taurinnak. Szintén parciális agonista a béta-alanin is.

Bár a GlyR funkciót altípus-specifikus módon fokozó vegyületek hatásosak lehetnek több központi idegrendszeri kórképben, a GlyR-ok farmakológiája kevésbé feltárt. Kevés olyan anyagot ismerünk, ami segítene elkülöníteni és így lokalizálni az egyes altípusokat. Miután ez a receptor elterjedt a központi idegrendszerben, ígéretes gyógyszer-cel, így

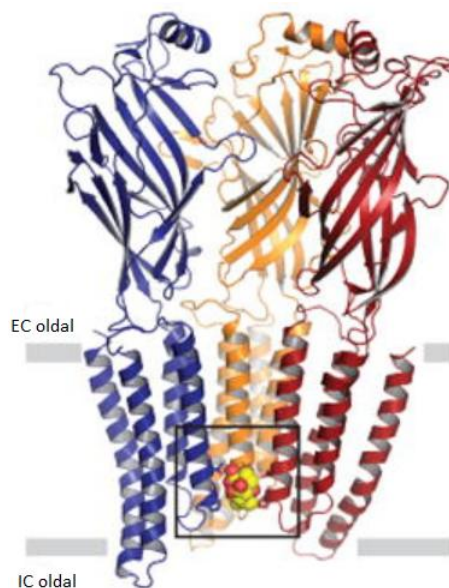
indokolt a pontosabb farmakológiai jellemzés, és az esetleges hatóanyagok vizsgálata. Az új hatásmechanizmus új hatásspektrumú gyógyszerekhez vezethet.

Az egyetlen nem-aminosav molekula, melynek (pozitív modulátoros hatása mellett) bizonyítottan agonista hatása van az ivermectin. Ennek a molekulának is- akárcsak a glicin esetében- hasonló a hatékonysága az α és az $\alpha_1\beta$ GlyR-okon, és aktiválja az α_2 és az α_3 homomereket is. Habár sok molekulát ismerünk, melyek rendelkeznek némi altípus-specifitással, eddig nem találtak olyan anyagot, amivel hatékonyan elválaszthatóak lennének az α_1 , α_2 , és α_3 alegységek, akár homomer, akár heteroponotamer formában fordulnak elő.³

Az GlyR-oknak pozitív modulátorai endocannabinoidok (pl. az anandamid) melyek alacsony koncentrációban potencírozó hatásúak, nagy koncentrációban adva gátló hatást fejtenek. A THC fájdalomcsillapító hatását az α_3 receptorok pozitív modulációjával fejt ki.¹⁵

A hosszú szénláncú alkoholok és az illékony általános érzéstelenítők között több pozitív allosztérikus modulátor található (pl. propofol), bár hatásuk pontos helye még nem ismert.²³ Pozitív modulátorok továbbá az 5HT₃-receptor antagonistá tropeinek egy része, a glutaminsav és analógjai, valamint a neuroszteroidok.⁴

A Zn^{2+} nagy koncentrációban előfordul számos agyterületen, ahol különböző funkciókat lát el. Az idegvégződésekben vezikulákba csomagoltan halmozódhat fel a Zn^{2+} és az idesejtek aktiválódásakor szabadul fel, többféle ioncsatornára is hatva befolyásolja az idesejtek ingerlékenységét.²⁰ A Zn^{2+} ionról kimutatták, hogy már nanomólos koncentrációban fokozza a GlyR-ok működését. Nagyobb koncentrációban azonban gátolja a GlyR-okat.¹⁶ A Zn^{2+} potencírozó kötőhelye az α alegység N-terminálisán található, közel a Cys-loop régióhoz. A Zn^{2+} kötőhely és a Cys-loop interakciója okozhatja a Zn^{2+} GlyR-okon tapasztalható potencírozó hatását.¹⁷



3. ábra: Pikrotoxin-kötőhely (az első két alegység eltávolításával)⁶

A pikrotoxin, amely a GABA_A receptor blokkolója nem kompetitív, és kis koncentrációban csak az α -homomereket gátolja. A β -alegységet is tartalmazó csatornát csak jóval nagyobb koncentrációban képes gátolni.⁶

Az agonista kötőhellyel átfedően kötődik, ezért látszólagos kompetitív antagonistája a sztrichnin, a régóta ismert glicin-receptor blokkoló, görcskeltő. A sztrichnin hatékonysága alegységfüggő, a legtöbb GlyR altípus esetében gátlást jóval kisebb koncentrációban kifejti, mint az $\alpha 2^*$ esetében.

A GlyR-oknak több nem kompetitív antagonistáját ismerjük, mint a pikrotoxinin (PIC), a ginkolid vagy a cianofenilborát. A pikrotoxinin a transzmembrán pórus citoszól felőli oldalán kötődik a receptorhoz, a nyitott receptort blokkolja, már nagyon alacsony koncentrációban is. Heteromér alegység-összetétel esetén kevésbé hatékony ez a gátló hatás, mint homopentamer receptornál.^{4,21}

A glicinerg gátlás fontos szerepet tölt be a fájdalom közvetítéséért felelős idegi területeken. Funkcionális down-regulációjuk hozzájárul a krónikus fájdalomra jellemző centrális szenzitizáció kialakulásához és fenntartásához. Így a GlyR-ok pozitív modulációja a gerincvelő hátsó szarvában csökkentheti a centrális szenzitizációt és a hiperalgéziát. Ennek a receptornak az aktiválásával helyre lehet állítani a gátló tónust és így csökkenteni a krónikus fájdalmat. Bár a GlyR funkciót altípus-specifikus módon fokozó vegyületek hatásosak lehetnek több központi idegrendszeri kórképben, a GlyR-ok farmakológiája kevésbé feltárt. Kevés olyan anyagot ismerünk, ami segítene elkülöníteni és így lokalizálni az egyes altípusokat. Miután ez a receptor elterjedt a központi idegrendszerben, ígéretes gyógyszercélpont. Új gyógyszerek kifejlesztésének reményében mindenképpen indokolt a receptorra ható anyagok intenzív kutatása.³

A kísérletek megtervezése során célunk a GlyR-ok farmakológiájának pontosabb megismerése volt. Ezen belül különböző pozitív és negatív modulátorok hatásának elemzését választottuk eltérő receptor altípusokon.

Anyagok és módszer:

Sejtenyészet

A méréseket Flp-in HEK (human embryonic kidney) sejteken végeztem. (Az Flp-mediálta integráció rutinszerűen használt technika, melynek segítségével számos fehérje hatékonyan kifejeztethető az adott rendszerben.) Az általam használt sejtek $\alpha_1\beta$, $\alpha_3\beta$ és α_3 GlyR-okat fejeztek ki, altípusonként különböző sejtvonalakon. A receptor-funkciókat ezeken a sejteken vizsgáltam patch-clamp technika segítségével. A sejtek felvételekor a legnagyobb passzázsszám nem érte el a 35-öt. A felhasználást megelőzően a sejtek 2-4 nappal korábban lettek kiültetve.

Egy-sejt elektrofiziológia

A manuális teljes-sejt patch-clamp technikát voltage-clamp üzemmódban használtam, ahol a tartópotenciál -80 mV-ra volt állítva. A befelé irányuló Cl⁻ áramokat ismétléses glicin-adagolás alkalmazásával váltottam ki. A pipetták ellenállása 4-7 M Ω között mozgott, melyeket egy P-87 horizontális mikropipetta húzóval készítettem (Sutter Instrument Co., USA), boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus Edenbridge) és mérés előtt IC oldattal töltöttem fel. A sejtek kiválasztását (morfológia és méret alapján) és magát a patch-clamp mérést inverz fáziskontraszt mikroszkóp segítségével végeztem (Eclipse TE2000, Nikon Instech Co. Ltd., Japan).

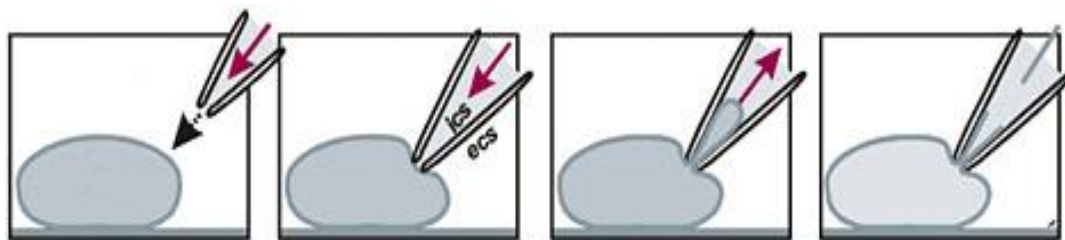


4. ábra: Egy HEK293 sejt megszúrása¹⁸

A patch-pipettát piezoelektromos mikromanipulátorral (PCS-5000, Burleigh Instrument Inc., USA) pozicionáltam és szúrtam meg vele a kiválasztott sejtet. (4. ábra)

A sejtek lyukasztása enyhe vákuum alkalmazásával, a pipetta és a sejtmembrán közötti giga seal (nagy ellenállású, szoros pipetta-sejt kapcsolat) kialakulása után történt (5. ábra). A vizsgált anyagokat tartalmazó oldatokat egy 8 csatornás mikro-gyűjtőcsövön (belső átmérő 250 μ M, World Precision Instruments) keresztül adtam a sejtekhez, változtatható túlnyomás alkalmazásával beállítva a megfelelő kifolyatási sebességet. (A glicin, ill. egyéb kis méretű

molekulák adagolása során, mint pl. a Zn^{+} előfordult, hogy a csőből kihígult az adott anyag és kifolyatásra volt szükség a mérés megkezdése előtt.)



5. ábra: Sejt megszúrása és lyukasztása patch-pipettával¹⁹

A bemenő áramokat 3 s hosszú glicin-adással 30 s periódusokban váltottam ki. A különböző anyagokat eközben a glicin adása előtt és közben is folytattam a sejtekre, a válaszok stabilizálódásáig. A mérőkamrát folyamatosan EC oldattal áramoltattam keresztül.

Az intracelluláris oldat összetétele: 105 mM CsCl, 50 mM CsF, 1 mM $GgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 4 mM ATP- Na_2 . A pH 7,3-ra, az ozmolalitás 295 és 300 mOsm közé volt állítva. Az EC oldat 140 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 2 mM $CaCl_2$ -ot, 2 mM $MgCl_2$ -ot, 10 mM HEPES-t és 20 mM glükózt tartalmazott. Az EC oldat pH-ja 7,35, ozmolalitása 305-310 mOsm értékre lett beállítva.

A farmakológiai vizsgálatra a sztrichnint (STR) és a pikrotoxinint (PIC), mint ismert inhibitorokat választottuk. A pozitív modulátorok közül az oktanol, a klór-propofol (metil-klorofenol) és a cink ion altípus-szelektív hatásának vizsgálata mellett döntöttünk.

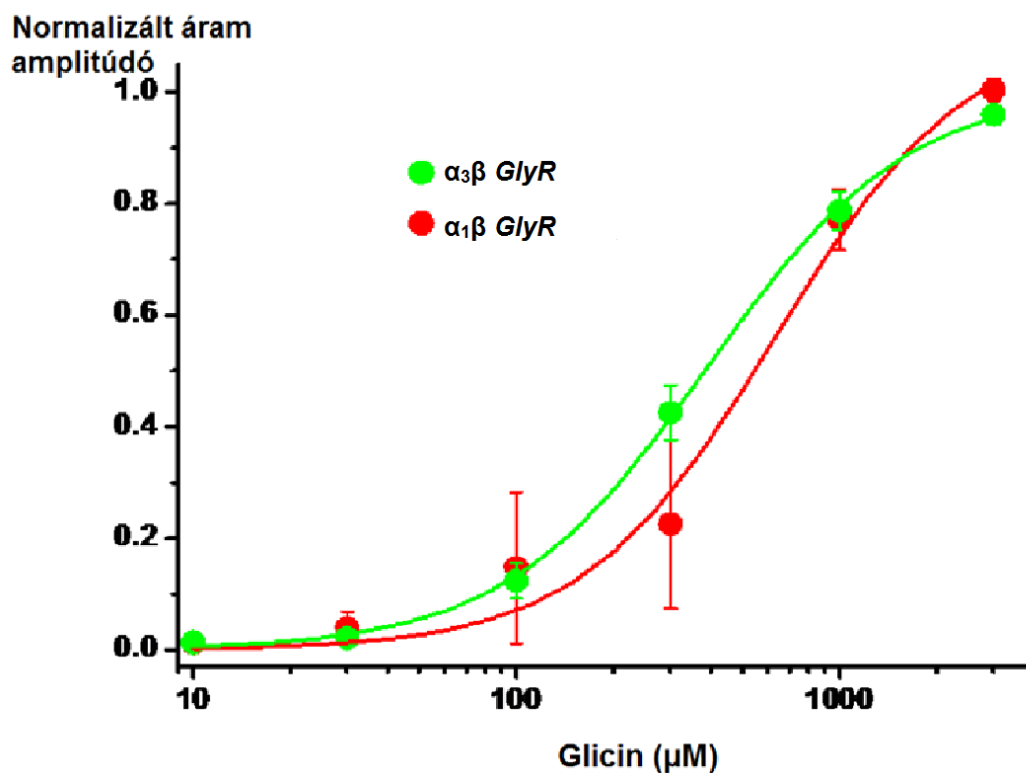
A mérési adatokat pClamp 9.0 programmal, Axopclamp 200A erősítőn (Molecular Devices Corp., USA) keresztül regisztráltam, 0,025 kHz-es alul áteresztő szűrővel, 50 Hz-es mintavételezési frekvenciával (Digidata 1320A, Molecular Devices Corp.). A glicin dózis-hatás görbék felvételéhez meghatároztam a relatív áramokat: a különböző koncentrációjú glicin által kiváltott áramokat viszonyítottam az adott sejten elérhető maximális áramhoz a különböző altípusokat kifejező sejtvonalakon. A dózis-hatás görbéket az Origin 6.0 programmal (OriginLab Corp., USA) szigmoid illesztéssel, Hill-egyenlet segítségével készítettem. (6-7-8-9. ábra)

A glicin kiváltotta áramokat és azok változásait a pozitív és negatív modulátorok hatására az áramgörbék peak (legnagyobb kitérés) értékei alapján számoltam. A modulátorok hatását mindig az ugyanabban a sejtben mért, stabilizálódott glicin áram peak értékéhez viszonyítottam, a változást százalékban kifejezve. Minden koncentrációban több párhuzamos mérést végeztem, és az eredményeket átlagolva, a szórás értékek megadásával tüntettem fel.

Eredmények és megvitatásuk:

Eredmények

Elsőként az agonista glicin koncentráció-függő hatékonyságát vizsgáltam $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ GlyR-okon. (6.ábra)



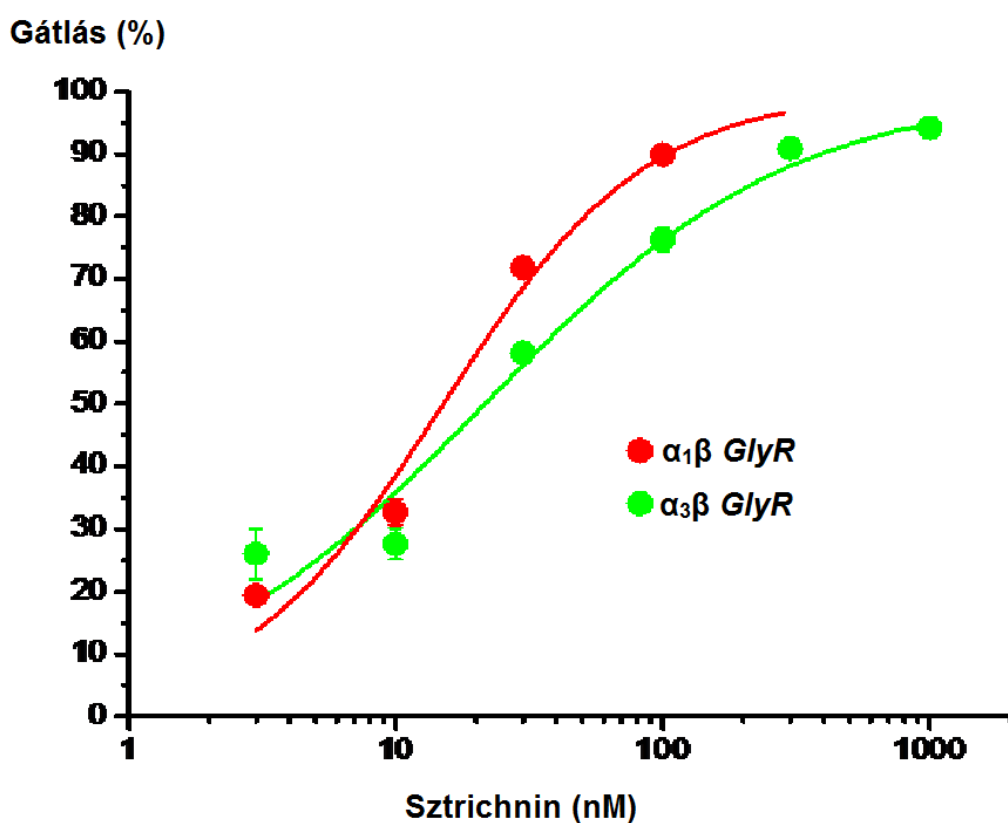
6. ábra: Glicin koncentráció-hatás görbék $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ receptorokon

I. táblázat: Az glicin EC_{50} értéke $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ receptorokon

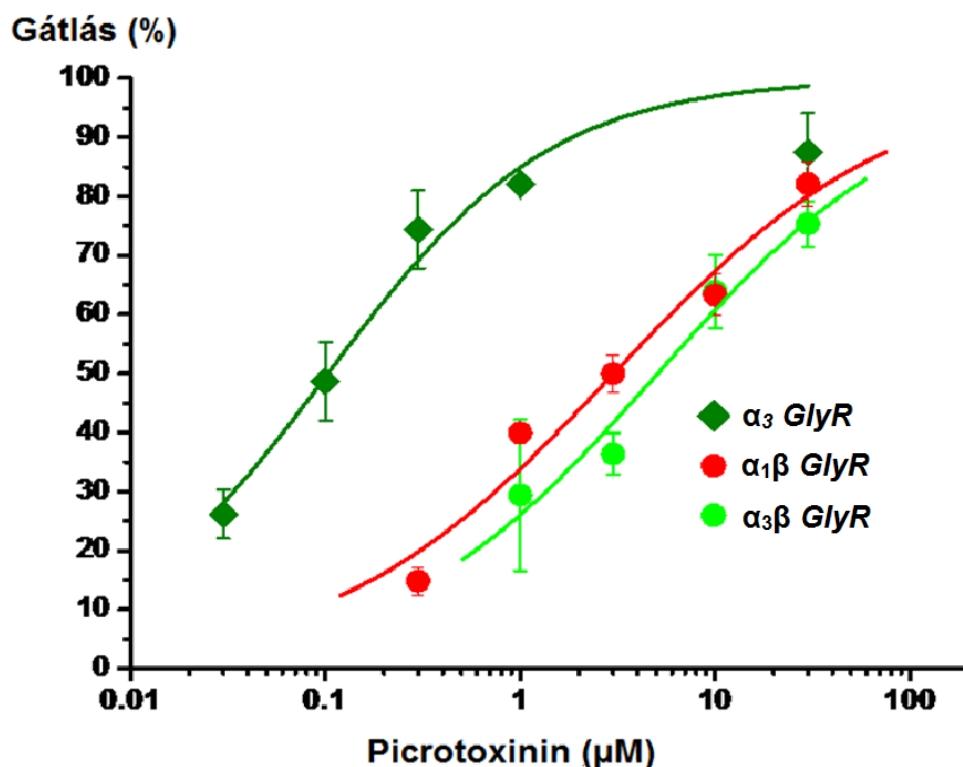
GlyR altípus	EC_{50} (μM)	n_H	Maximum amplitúdó (nA)
$\alpha_1\beta$	587 ± 134 (5)	2.5 ± 0.2	3.1 ± 0.6
$\alpha_3\beta$	413 ± 56 (10)	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.3

A glicin-aktiválta válaszok nem különböznek szignifikánsan a kétféle GlyR altípuson, habár az $\alpha_1\beta$ -t expresszáló sejtekre nagyobb maximális áramok voltak jellemzőek.

A görbe alapján kiszámoltam a glicin EC_{50} -ét az adott rendszerben, ez az $\alpha_1\beta$ estén $587 \mu M$ -nak ($587 \pm 134 \mu M$, a meredekség 2,5), míg az $\alpha_3\beta$ altípusnál $413 \mu M$ -nak ($413 \pm 56 \mu M$, a meredekség 1,6) adódott. A továbbiakban pozitív modulátorok vizsgálatához $\alpha_1\beta$ receptorokon $300 \mu M$, az $\alpha_3\beta$ altípusnál $150 \mu M$ glicint alkalmaztam. Az antagonisták hatásának méréshez $\alpha_1\beta$ receptorokon $600 \mu M$, $\alpha_3\beta$ altípusnál $400 \mu M$ glicint használtam ($\approx EC_{50}$).



7. ábra: A sztrichnin (STR) dózis-hatás görbéje $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ receptorokon



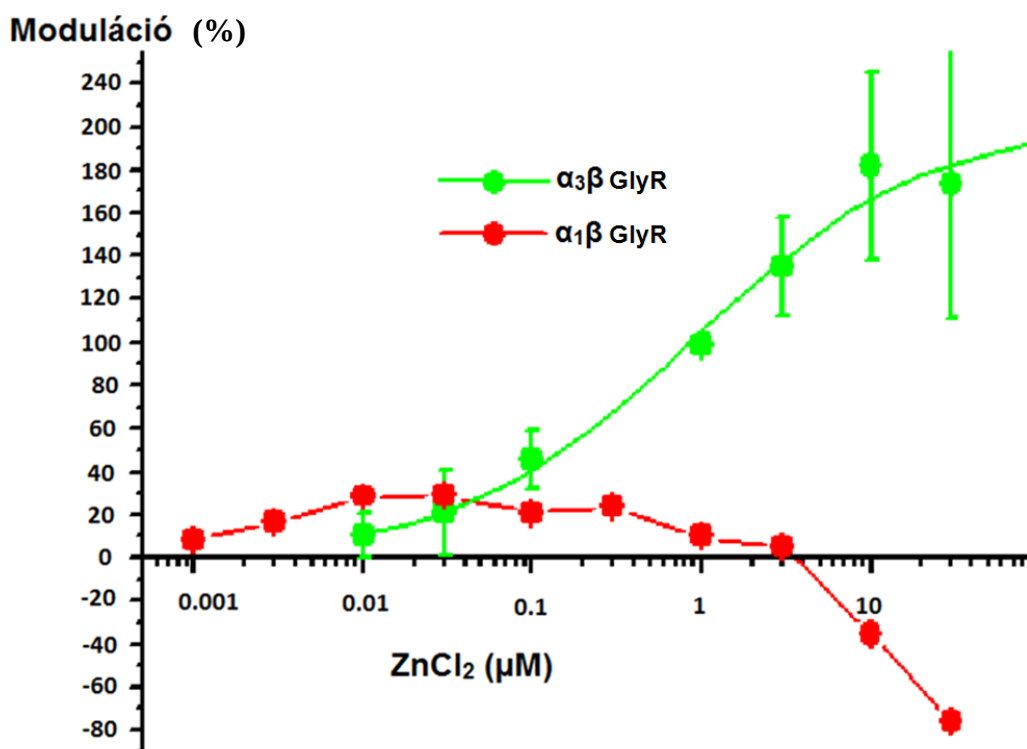
8. ábra: A pikrotoxinin (PIC) dózis-hatás görbéje α_3 , $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ receptorokon

II. táblázat: A STR és a PIC-in IC_{50} értékei a különböző altípusú GlyR-okon

		$\alpha_1\beta$	$\alpha_3\beta$	α_3
STR	IC_{50} (nM)	15 ± 3 (3)	22 ± 4 (4)	
PIC	IC_{50} (μM)	3.0 ± 0.6 (5)	5.1 ± 0.9 (6)	0.1 ± 0.03 (4)

A sztrichnin és pikrotoxinin antagonisták hatását mindhárom receptor-típuson az adott altípusra kapott EC_{50} -hez közeli agonista koncentráció mellett mértem. A mért adatok alapján a sztrichnin-gátlás nem mutatott altípus szelektivitást, mind az $\alpha_1\beta$, mind az $\alpha_3\beta$ altípusokban már nanomolos koncentrációban kifejtette gátló hatását.

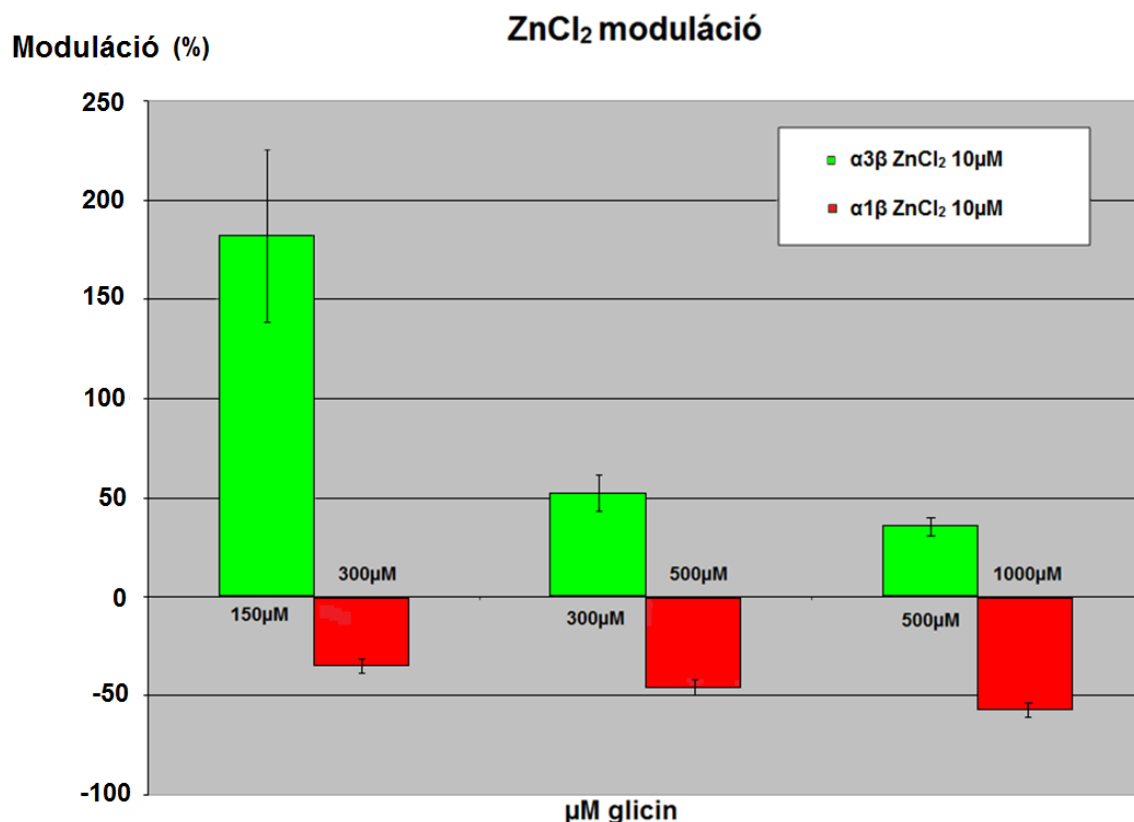
A pikrotoxinin azonban szignifikánsan nagyobb hatást fejtett ki az $\alpha_1\beta$ és az $\alpha_3\beta$ receptorokon a homomer α_3 altípushoz képest. Ez az irodalmi adatokhoz nagyon hasonló eredmény. A pikrotoxinin α_1 , α_2 , α_3 receptorokon végzett vizsgálatok alapján minden α alegység típus esetén erősebb gátló hatással rendelkezik a homomer receptorokon a heteromer típusokhoz képest.^{3, 21,22}



9. ábra: ZnCl₂ moduláló hatása α₁β és α₃β receptorokon

A ZnCl₂ potenciózó hatását EC₂₀-hoz közeli értékeken (az α₁β receptorokon 300 μM glicin, míg α₃β receptorokon 150 μM glicin koncentráció mellett) mértem. A két különböző altípusú receptoron eltérő eredményeket kaptam: a ZnCl₂ kis koncentrációban mindkét altípusban növelte a glicin-kiváltotta áramokat, az α₁β receptorokon azonban még kisebb koncentrációban (10-30 nM) is kifejtette potenciózó hatását. A nagyobb koncentrációkban még erőteljesebb az altípus-specifitás. A 0,1 μM feletti értékeknél a ZnCl₂ potenciózó hatása egyre nagyobb az α₃β receptorokon, α₁β altípus esetén azonban a ZnCl₂ gátló hatása jelenik meg.

A Zn²⁺ irodalmi adatokból ismert kettős hatását, Miller és társai α₁ és α₂ receptorokon már korábban bizonyították. A Zn²⁺ alacsony koncentrációban (1 μM körüli értéken) a receptor aktivációt potenciózó, míg nagyobb koncentrációban adva (10 μM felett) gátló hatást fejt ki a GlyR-okon.¹⁷



10. ábra: 10 µM ZnCl₂ moduláló hatása α₁β és α₃β receptorokon

Eltérő koncentrációjú glicin mellett 10µM ZnCl₂-ot adva szintén jól látható a két altípuson mérhető eltérő hatás. Az alkalmazott agonista koncentráció növekedésével az α₃β esetén csökkent a pozitív moduláció mértéke, az α₁β receptorokon egyre nagyobb gátlást lehetett megfigyelni.

III. táblázat: Az oktanol és Cl-propofol moduláló hatása GlyR-okon

Moduláció (%)	α ₁ β	α ₃ β
Oktanol (100 µM)	34±17 (6)	37±11 (5)
Cl-propofol (10 µM)	104±27 (6)	81±25 (7)

A pozitív modulátorokat az adott altípusra kapott EC₂₀ értékhez közeli koncentrációjú glicin mellett vizsgáltam. Mind az oktanol, mind a Cl-propofol hasonló mértékben növelte a glicin kiváltotta válaszokat a két különböző altípuson.

Diszkusszió:

Az endogén agonsita glicin a különböző altípusú GlyR-okon csak kevésbé eltérő aktivációt mutatott. A GlyR-szelektív sztrichnin minden vizsgált altípusban azonosan, a nM-os koncentrációtartományban kifejtette gátló hatását. Ezzel szemben a pikrotoxinin altípus-specifikus módon gátolta a glicin-kiváltotta áramokat, szignifikánsan nagyobb hatékonysággal a homomer α_3 GlyR-on, mint a vizsgált $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ heteromer típusokon. Ezek a mért adatok nagyon hasonlítanak az irodalomban már megtalálható adatokhoz.^{3,21,22}

Az oktanol és a Cl-propofol pozitív modulátor hatását a vizsgált GlyR altípusokon elsőként sikerült kimutatni.

A ZnCl_2 nagyobb koncentrációban alkalmazva gátolta az $\alpha_1\beta$ GlyR-okat, míg $\alpha_3\beta$ altípusú receptorokon csak a serkentő hatás érvényesült. Ismert, hogy a cink ion pozitív modulátor alacsony koncentrációban ($\sim 1\mu\text{M}$), nagy koncentrációban ($>10\mu\text{M}$) adva azonban gátló hatású. Ezek az adatok jól illusztrálják, hogy a cink bizonyos koncentrációkban altípus-specifitást mutat. A Zn^{2+} ismert pozitív moduláló hatása csökken az agonista koncentrációjának növelésével, ez az általános megfigyelésekkel jól egyezik.^{17,20} Méréseim során az $\alpha_3\beta$ GlyR-okon csökkent a pozitív moduláció mértéke, $\alpha_1\beta$ receptorokon viszont az agonista koncentráció növelésével növekedett a Zn^{2+} gátló hatása.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GlyR-ok altípus-szelektív modulációja megfelelően tanulmányozható rekombináns in vitro rendszerekben. Ez a megközelítés pedig hozzájárulhat újszerű terápiák kifejlesztéséhez különféle központi idegrendszeri betegségek gyógyítására.

Szerzői Hozzájárulás:

1. Patch-clamp vizsgálatokat végeztem az $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ GlyR altípusok EC_{50} értékének meghatározásához.
2. Patch-clamp vizsgálatok segítségével megmértem a STR és a PIC-in IC_{50} értékét $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$, illetve $\alpha_1\beta$, $\alpha_3\beta$ és α_3 GlyR-okon.
3. Patch-clamp módszerrel megállapítottam a $ZnCl_2$ altípus sepcifikus moduláló hatását $\alpha_1\beta$ és $\alpha_3\beta$ receptorokon.
4. Kimutattam patch-clamp módszerrel az oktanol és a Cl-propofol moduláló hatását az $\alpha_1\beta$ és az $\alpha_3\beta$ receptor altípusokon.

Rövidítésjegyzék:

5HT₃- szerotonin receptor

ALS- Amiotrófiás laterálszklerózis

EC- extracelluláris

EC₅₀- maximális hatás feléhez tartozó koncentráció érték

GABA_A- A-típusú GABA receptor

GlyR- sztrichnin szenzitív glicin receptor

HEK- human embrionic kidney

IBS- irritábilis bél szindróma

IC- intracelluláris

IC₅₀- maximális gátlás feléhez tartozó koncentráció érték

KIR- központi idegrendszer

PSD- posztzinaptikus denzitás

PIC- pikrotoxinin

pLGIC – pentamer szerkezetű ligandum-vezérelt ioncsatorna

SNHL- idegi eredetű hallásromlás

STR- sztrichnin

Kiegészítés:

A címdalalon látható ábra a Cys-loop receptor-családra általánosan jellemző felépítést mutatja. ¹

Felhasznált irodalom:

1. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):2–5.
2. Reymond J-L, van Deursen R, Bertrand D. What we have learned from crystal structures of proteins to receptor function. *Biochem. Pharmacol.* 2011;82(11):1521–1527.
3. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):303–309.
4. Dutertre S, Becker C-M, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J. Biol. Chem.* 2012.
5. Danglot L, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 2004;27(4):394–403.
6. Hibbs RE, Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011;474(7349):54–60.
7. Morita K, Motoyama N, Kitayama T, et al. Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008;326(2):633–645.
8. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 2004;304(5672):884–887.
9. Dodick D, Silberstein S. Central sensitization theory of migraine: clinical implications. *Headache*. 2006;46 Suppl 4:S182–191.
10. Rajendra S, Lynch JW, Pierce KD, et al. Startle disease mutations reduce the agonist sensitivity of the human inhibitory glycine receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;269(29):18739–18742.
11. Chang Q, Martin LJ. Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 2011;31(8):2815–2827.
12. Ramanathan S, Woodroffe A, Flodman PL, et al. A case of autism with an interstitial deletion on 4q leading to hemizygosity for genes encoding for glutamine and glycine neurotransmitter receptor sub-units (AMPA 2, GLRA3, GLRB) and neuropeptide receptors NPY1R, NPY5R. *BMC Med. Genet.* 2004;5:10.
13. Gelman BB, Soukup VM, Schuenke KW, et al. Acquired neuronal channelopathies in HIV-associated dementia. *J. Neuroimmunol.* 2004;157(1-2):111–119.
14. Dutertre S, Becker C-M, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J. Biol. Chem.* 2012.
15. Xiong W, Cheng K, Cui T, et al. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nat. Chem. Biol.* 2011;7(5):296–303.
16. Laube B. Potentiation of inhibitory glycinergic neurotransmission by Zn²⁺: a synergistic interplay between presynaptic P2X2 and postsynaptic glycine receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2002;16(6):1025–1036.
17. Miller PS, Da Silva HMA, Smart TG. Molecular basis for zinc potentiation at strychnine-sensitive glycine receptors. *J. Biol. Chem.* 2005;280(45):37877–37884.

18. Fodor L, Nagy J. Pharmacological analysis of recombinant NR1a/2A and NR1a/2B NMDA receptors using the whole-cell patch-clamp method. *Methods Mol. Biol.* 2007;403:3–13.
19. Nn. Automated Patch Clamp for Electrophysiological Research.
<http://www.cytocentrics.com/patch-clamp/automated-patch-clamp.php>.
20. Miller PS, Beato M. Molecular determinants of glycine receptor $\alpha\beta$ subunit sensitivities to Zn^{2+} -mediated inhibition *J Physiol.* 2005; 566(Pt 3): 657–670.
21. Yang Z, Lynch J W. A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore *J Neurochem.* 2007 Oct;103(2):580-9.
22. Wang DS, Mangin JM, Moonen G, Rigo JM, Legendre P. Mechanisms for picrotoxin block of $\alpha 2$ homomeric glycine receptors. *J Biol Chem.* 2006 Feb 17;281(7):3841-55.
23. O'Shea SM, Becker L, Weiher H, Betz H, Laube B. Propofol restores the function of "hyperekplexic" mutant glycine receptors in *Xenopus* oocytes and mice. *J Neurosci.* 2004 Mar 3;24(9):2322-7.