

UMF CAROL DAVILA

**FENOMENE ELECTRICE ASOCIATE
TRANSMISIEI SINAPTICE – STUDII
EXPERIMENTALE ȘI DE MODELARE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

DOCTORAND: Anca Popescu

COORDONATOR: Prof. Dr. Constanta Ganea

Bucuresti, 2007

FENOMENE ELECTRICE ASOCIATE TRANSMISIEI SINAPTICE – STUDII EXPERIMENTALE ȘI DE MODELARE

Doctorand: Anca Popescu

Conducator stiintific: Prof. Dr. Constanta Ganea

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Lucrarea de față prezintă un studiu asupra efectelor a trei substanțe farmacologic active (cumarina, quercetina și galantamina) asupra receptorilor nicotinici pentru acetilcolină, prin prisma ideii generale că interacțiunea unui drog cu un receptor este un proces complex care implică verigi de interferență multiple cu sistemul reprezentat de receptorul membranar și membrana lipidică a celulei. Metodele experimentale pe care le-am ales au diferit în funcție de etajul de interferență studiat. Astfel, interacțiunile substanțelor cu membranele lipidice celulare au fost studiate prin metodele BLM (*black lipid membranes*) și SSM (*solid supported membranes*), metode bazate pe măsurători electrofiziologice realizate pe bistraturi lipidice artificiale. Interacțiunea drog-membrană a indus modificări tranzitorii sau staționare ale parametrilor electrici ai membranelor-model. Modificările tranzitorii au fost mai bine puse în evidență prin metoda SSM, în timp ce metoda BLM a fost mai adecvată pentru studiul modificărilor staționare induse de interacțiunea substanță – bistrat lipidic. Efectele substanțelor studiate asupra receptorilor nicotinici propriu-ziși au fost studiate prin metoda *patch-clamp*, metodă care a permis studierea efectelor cumarinei, quercetinei și galantaminei asupra cineticii de activare și desensibilizare a proteinei-receptor. Studiile experimentale au fost completate cu studii de modelare, care au contribuit la elucidarea unor etape cinetice implicate în tranzițiile conformaționale asociate cu activarea – desensibilizarea receptorului nicotinic și au adus argumente suplimentare în sprijinul mecanismelor de acțiune propuse pe baza rezultatelor experimentale.

Efectele cumarinei asupra bistraturilor lipidice artificiale

Prima substanță studiată în cadrul acestei lucrări a fost cumarina. Efectele cumarinei asupra bistraturilor lipidice artificiale au fost studiate prin metoda SSM, prin prisma acțiunii modulatorie a cumarinei asupra modificărilor induse de anioni ai seriei Hofmeister (perclorat ClO_4^- , tiocianat SCN^- , azotat NO_3^- , acetat CH_3COO^- , sulfat SO_4^{2-} , clorură Cl^-) și de metale grele (cadmiu).

Rezultatele noastre au pus în evidență faptul că semnalele tranzitorii induse de salturi de concentrație de anioni Hofmeister la nivelul membranelor pe suport solid (SSM) nu sunt datorate exclusiv potențialelor de joncțiune lichidă (PjL) apărute la interfața dintre soluția activă și soluția inactivă, ci implică și alte efecte ale acestor anioni asupra membranelor având ca rezultat modificări ale momentului de dipol membranar. Aplicarea de cumarină la nivelul SSM a exercitat un efect protector asupra modificărilor induse de anionii seriei Hofmeister. Efectul cumarinei a fost mai evident în cazul anionilor puternic chaotropi (perclorat, tiocianat), acolo unde s-au evidențiat și cele mai mari diferențe între valoarea semnalului capacitiv măsurat și valoarea calculată a potențialelor de joncțiune lichidă. Prezența cumarinei nu a influențat semnalele obținute de aplicarea de acetat, pentru care valoarea semnalului măsurat a coincis cu valoarea PjL, ceea ce a sugerat faptul că mecanismul protector al cumarinei se manifestă în principal față de destabilizarea structurii membranei lipidice induse de interacțiunea cu anionii Hofmeister. Analiza variației amplitudinii semnalelor obținute la salturi de concentrație ale anionilor studiați, în funcție de concentrația de cumarină, a evidențiat similitudinea profilelor de dependență semnal-concentrație, indiferent de anionul aplicat. Acest aspect a reprezentat un argument pentru faptul că mecanismul protector al cumarinei se manifestă prin inserția acesteia în bistratul lipidic și a permis determinarea unei constante aparente de legare a cumarinei la membrana lipidică pe suport solid, în valoare de 2.346 μM .

Prezența cumarinei exercită un efect protector și asupra destabilizării bistratului lipidic indusă de salturi de concentrație de cadmiu, aspect pus în evidență de grupul de experimente pe care l-am efectuat în prezența acestui metal greu, care a arătat scăderea afinității aparente pentru cadmiu a membranei lipidice tratată cu cumarină. Mecanismele de acțiune propuse s-au bazat atât pe inserția cumarinei în membranele lipidice artificiale cât și pe posibila formare a unor structuri complexe cumarină-cadmiu, cu cinetică de interacțiune cu bistratul lipidic diferită.

Efectele cumarinei asupra receptorului nicotinic pentru ACh

La nivelul receptorului nicotinic propriu-zis exprimat de celule ale liniei TE 671, cumarina aplicată în baia de celule a indus atât modificări ale cineticii de închidere a receptorilor cât și ale gradului de desensibilizare a acestora la stimulări repetate cu acetilcolină într-o manieră dependentă de doză și de timpul de aplicare. Profilul de scădere a constantei de timp de închidere a receptorului nicotinic în funcție de concentrația de cumarină a sugerat o interacțiune de tip Michaelis-Menten, substrat-ligand, fără a fi însă posibilă determinarea unei constante de legare a cumarinei datorită protocolului experimental utilizat (parametrul studiat fiind un indicator indirect al interacțiunii cumarină-receptor). În ceea ce privește desensibilizarea receptorului nicotinic,

efectele cumarinei s-au manifestat doar în condițiile aplicării substanței în baia de celule și nu a aplicării în pulsuri, o dată cu acetilcolina (agonistul receptorilor nicotinici). Modificările profilului de desensibilizare au fost vizibile la expuneri pentru perioade de timp mai mari de 30 de minute, și s-a observat o grupare a curbelor de desensibilizare în prezența a concentrației de cumarină între 0 – 50 μM în două categorii. Acest lucru sugerează un mecanism modulator de tip treaptă al cumarinei asupra desensibilizării, care poate fi explicat prin existența a două situsuri de legare a cumarinei la receptor cu afinități diferite pentru cumarină, și a căror activare diferențiată este corelată cu un comportament de desensibilizare diferit al receptorului la stimulare repetitivă cu ACh.

Efectul cumarinei asupra desensibilizării receptorului nicotinic pentru acetilcolină s-a manifestat la concentrația la care constanta de timp de închidere a receptorilor a atins o valoare platou, sugerând că deși există probabil mecanisme diferite prin care cumarina afectează cele două fenomene, aceste mecanisme sunt interdependente. Putem considera că efectul cumarinei asupra constantei de închidere a receptorilor este datorat legării cumarinei de receptor / membrana celulară, platoul observat corespunzând saturației. Efectele asupra desensibilizării sunt vizibile însă doar în momentul în care procesul de legare atinge starea staționară și este posibil să fie datorate stabilizării de către cumarină a unor stări conformaționale distincte a receptorului nicotinic, diferite din punctul de vedere al desensibilizării.

Efectele quercetinei asupra bistraturilor lipidice artificiale

Quercetina a fost cea de-a doua substanță de interes pentru studiul nostru. Efectele sale asupra membranelor lipidice au fost studiate prin metoda BLM, prin prisma interferenței quercetinei cu modificările bistratului lipidic artificial induse de aplicarea a două metale grele (zincul și cadmiul) la nivelul membranei artificiale.

În absența quercetinei, zincul a indus o scădere a concentrației și o creștere a conductanței membranare la concentrații mai mari de 300 μM , probabil prin inserția metalului în membrană mai mult decât prin atașarea sa la suprafața membranei; atașarea zincului la membrană, fără inserție, nu ar determina creșteri ale conductanței, datorită păstrării intacte a stratului izolator din punct de vedere electric pe care îl constituie fosfolipidele membranare. Rezultatele noastre au arătat că prezența quercetinei interferă cu procesul de inserție a zincului în bistratul lipidic într-o manieră dependentă de concentrație. La concentrația de 10 μM QUE, principalele tipuri de mecanisme posibil implicate în modificarea parametrilor electrice ai membranei expuse la QUE + Zn^{2+} sunt inserția QUE în membrană, cu efect protector al flavonoidului împotriva inserției zincului, modificarea permitivității membranei lipidice

artificiale, și formarea unor complexe QUE-Zn²⁺, cu cinetică de inserție diferită de a QUE sau Zn²⁺ izolate. La 50 μM QUE, procesele de inserție a QUE și zincului sunt în echilibru relativ, ceea ce explică de ce capacitatea membranară rămâne constantă (în limitele fluctuațiilor statistice) indiferent de concentrația de Zn²⁺; afinitatea QUE pentru bistratul lipidic este mai mare însă decât a zincului, aspect rezultat din profilul conductanței membranare – cu o creștere inițială datorată QUE, la concentrații mici de zinc, urmată de stabilizarea la o valoare de platou, când inserția zincului devine semnificativă din punct de vedere cantitativ. Saturația bistratului lipidic din punct de vedere al legării QUE se atinge la concentrații mai mari de 50 μM, dar mai mici sau egale cu 100 μM, lucru rezultat din efectul identic al QUE 100 μM și 300 μM asupra parametrilor electrici membranari. La concentrații mari de QUE (≥ 100 μM) este posibilă formarea în soluția din cuvele BLM a unor structuri care să cuprindă mai multe molecule de flavonoid (n), structuri care să nu se poată insera în membrană datorită volumului molecular mare. Astfel, procesul de inserție a zincului redevine fenomenul dominant, explicând scăderea capacității membranare; scăderea concomitentă a conductanței membranare poate fi consecința unor fenomene la interfața lipid-soluție electrolică, induse de prezența moleculelor complexe QUE_n-Zn, cu hidrofobicitate crescută.

În ceea ce privește interacțiunea cadmiului cu membranele lipidice artificiale, datele noastre indică faptul că aceasta presupune atât inserție în bistrat, predominantă la concentrații mici de cadmiu, cât și atașare la suprafața bistratului, fenomen care intervine la concentrații mai mari ale metalului greu, datorită saturării în Cd²⁺ a interiorului membranei. Mecanismele posibile care stau la baza modificărilor induse Cd²⁺ asupra parametrilor electrici ai membranei, sunt (i) modificarea geometriei membranare și (ii) modificarea organizării interne a membranei, cu alterarea consecutivă a momentului de dipol membranar. QUE 10 μM modulează interacțiunea cadmiului cu membranele artificiale, datele noastre indicând scăderea afinității membranei pentru cadmiu în prezența QUE.

Coroborând informațiile obținute pentru ambele metale grele testate, am observat că în prezența QUE 10 μM modificarea capacității membranare este influențată predominant de inserția quercetinei și mai puțin de prezența metalelor grele, neexistând diferențe semnificative statistic între profilele de capacitate obținute la aplicarea de cadmiu și de zinc în aceste condiții. Efectele protectoare ale QUE față de acțiunea metalelor grele studiate au fost evidente la concentrații mai mici de QUE (10 – 50 μM), în timp ce la concentrații mai mari flavonoidul a exercitat el însuși efecte destabilizatoare membranare.

Efectele QUE asupra receptorilor nicotinici pentru ACh

În urma aplicării QUE la nivelul receptorilor nicotinici pentru ACh am observat mai multe efecte: (i) efecte asupra amplitudinii maxime a curenților *whole-cell* determinați de aplicarea de ACh 10 μ M, (ii) efecte asupra cineticii de închidere a receptorilor nicotinici și (iii) efecte asupra desensibilizării receptorilor nicotinici.

Aplicarea QUE a indus diferențe semnificative ale amplitudinii curenților *whole-cell* comparativ cu situația control (absența QUE, aceeași concentrație de ACh aplicată), efectul fiind mai evident la 20 de minute de expunere. Profilul de dependență al amplitudinii curenților de concentrația de QUE a fost însă similar, indiferent de timpul de aplicație al QUE. Rezultatele noastre sugerează astfel două mecanisme implicate în scăderea amplitudinii curenților: un mecanism nespecific și independent de QUE, răspunzător pentru scăderea în timp a amplitudinii curenților observată inclusiv în experimentul control (QUE absentă în baia de celule) și un mecanism care implică QUE, într-o manieră dependentă de concentrație. Scăderea nespecifică a amplitudinii curenților este probabil datorată condițiilor experimentale. Curenții induși de aplicarea de ACh, în condițiile experimentelor noastre, sunt curenți de sodiu și depind deci direct de gradientul de concentrație de sodiu existent între soluția de baie și soluția intracelulară – soluția din pipetă. Menținerea prelungită a celulelor în soluția de baie duce la scăderea gradientului de sodiu, astfel încât valoarea curenților măsurați scade în timp chiar dacă receptorii se deschid în aceeași măsură. O altă explicație posibilă este legată de existența unei componente de desensibilizare pe o scară de timp de ordinul minutelor, astfel încât chiar la 10 minute după un tren de aplicații de ACh (intervalul utilizat de noi între trenurile de aplicații) revenirea receptorilor este incompletă.

Faptul că există însă și o dependență a scăderii amplitudinii curenților nicotinici de concentrația de QUE utilizată sugerează un efect specific al QUE asupra celulelor. Metoda noastră de studiu nu permite identificarea cu certitudine a mecanismului prin care QUE intervine asupra deschiderii receptorilor; poate fi vorba atât de un efect nespecific prin modificarea proprietăților membranei celulare lipidice (mecanism sugerat și de datele obținute prin metoda BLM), dar și de un efect specific, prin legarea de receptorul nicotinic la nivelul unui situs modulator a cărui ocupare nu determină direct deschiderea receptorului, însă influențează cinetica receptorului activat de un agonist. Existența aceluiași profil de dependență a amplitudinii maxime a curenților de concentrația de QUE aplicată atât la 10 minute cât și la 20 de minute de la aplicare sugerează legarea QUE la membrana celulară / receptor în primele minute de la aplicare, astfel încât starea staționară este atinsă înainte de 10 minute de la aplicarea QUE în baia de celule.

Cinetica de închidere a receptorilor devine bi-exponențială la toate concentrațiile testate de QUE, ceea ce sugerează cel puțin două tipuri de tranziții ale proteinei receptor implicate în închiderea canalului ionic. Mai precis, în prezența QUE este posibil să existe cel puțin două stări conformaționale diferite, deschise, ale receptorului nicotinic, ambele cu probabilitate mare de existență. Metoda experimentală utilizată în studiul nostru nu permite determinarea cu exactitate a stării conformaționale stabilizate de către QUE și nici a locului precis de interacțiune, putând fi implicate atât o acțiune nespecifică a QUE asupra membranelor celulare cât și legarea directă a QUE de receptor la nivelul unui situs modulator. Stoechiometria legării QUE la receptor nu poate fi dedusă din datele pe care le avem la dispoziție; atât variația valorilor maxime ale curenților *whole-cell* cât și variația constantelor de timp de închidere a receptorilor, în funcție de concentrația de QUE, sunt indicatori indirecti ai procesului de legare a substanței de receptor.

Indiferent de concentrația aplicată și de protocolul de stimulare utilizat (5 secunde sau 20 de secunde), QUE a indus o desensibilizare mai accentuată a receptorilor nicotinici, evidențiată prin scăderea mai marcată a amplitudinii curenților în cadrul unui tren de stimulare comparativ cu situația control în care QUE este absentă din baia de celule. Între curbele de desensibilizare obținute la 10 și la 20 de minute de expunere la QUE (indiferent de concentrația testată) nu s-au observat diferențe semnificative; acest aspect sugerează stabilizarea receptorului nicotinic legat de QUE într-o stare cu profil de desensibilizare distinct, fenomen care atinge un nivel staționar într-un interval de timp mai mic decât 10 minute. Datele legate de desensibilizare confirmă astfel informațiile obținute din studiul variației în timp a amplitudinii maxime a curenților nicotinici.

Efectele QUE asupra desensibilizării receptorilor nicotinici nu depind liniar de concentrația de QUE aplicată. Viteza de desensibilizare este mai mare la expunerea la QUE 1 μM comparativ cu 4 μM , pentru aceeași perioadă de timp de expunere. Mai mult, valoarea staționară a amplitudinii curenților I_{ss} este mai mică în primul caz, ceea ce reflectă un grad mai mare de desensibilizare a receptorilor în momentul atingerii unei stări staționare. Constantele de timp ale curbelor de desensibilizare, τ_d , cresc cu concentrația de QUE în cazul expunerii la QUE 10 μM și 50 μM , însă valoarea platoului curbei de desensibilizare (I_{ss}) este mai mare la concentrația de QUE 50 μM . Diferențele există deci atât în ceea ce privește viteza de desensibilizare cât și amplitudinea desensibilizării. Neliniaritatea dependenței desensibilizării receptorilor de concentrația de QUE reprezintă un argument pentru un mecanism complex de interacțiune al QUE în neurotransmisia nicotinică, sugerând existența mai multor niveluri la care QUE interferează. Efectele QUE se manifestă probabil la nivelul sistemului membrană-receptor, și nu strict la nivelul receptorului. Mai mult, este posibil ca substanța cercetată să determine efecte simultane

antagoniste prin afectarea unor verigi de control diferite, ceea ce ar putea reprezenta o explicație pentru neliniaritatea proceselor observate.

Efectele galantaminei asupra neurotransmisiei nicotinice

Cea de-a treia substanță studiată în această lucrare a fost galantamina. Datele noastre confirmă efectul de potențare alosterică raportat pentru GAL.

Atunci când ACh este aplicată singură, fără GAL, indiferent de concentrație și de protocolul de stimulare tendința curenților este de a scădea la aplicații succesive (sau, dacă intervalul dintre aplicații este mai mare de 20-30 de secunde, de a rămâne neschimbați). Prezența GAL în coaplicație modifică tiparul de răspuns celular la stimulări repetate, indiferent de protocolul de stimulare utilizat. Am identificat patru tipuri generale de răspuns la stimulare simultană ACh + GAL, pentru diferite protocoale de stimulare, evaluate comparativ cu un traseu control obținut prin stimulare exclusiv cu ACh în aceeași concentrație. Într-un număr mic de situații, pentru concentrații mici de GAL (0.1 μM) și doar pentru anumite protocoale de stimulare testate (5 secunde între aplicații) și anumite concentrații de ACh (10 μM și 20 μM), nu se observă diferențe semnificative între traseele înregistrate în prezența și în absența GAL. În restul situațiilor se observă fie desensibilizare mai puțin accentuată (ACh 20 μM și 30 μM + GAL 0.5 μM , interval de stimulare 5 sec respectiv 2.5 sec), fie desensibilizare mai accentuată (ACh 30 μM + GAL 0.1 μM , stimulare la 5 sec), fie chiar o creștere a amplitudinii maxime a curenților *whole-cell* la costimulare ACh+GAL (20 μM + 5 μM , interval de stimulare 15 sec), după o desensibilizare inițială prin stimulare exclusiv cu ACh.

Am obținut rezultate reproductibile cu următorul protocol de stimulare: aplicații ale ACh timp de 1 secundă, urmate de un interval de *wash-out* de 5 secunde, pentru toate concentrațiile testate.

În absența GAL, ACh induce desensibilizare a receptorilor într-o manieră dependentă de concentrație. Amplitudinea maximă a curenților nicotinici scade exponențial între aplicații succesive în cadrul aceluiași tren de stimulare, observându-se diferențe la concentrații diferite de ACh atât între constanta de timp a exponențialei (τ , s) cât și între desensibilizarea staționară (reflectată de platoul exponențialei). Nu se observă diferențe statistice semnificative între curbele obținute pentru ACh 10 μM și pentru ACh 20 μM . La concentrații mai mari desensibilizarea receptorilor este mai marcată, însă nu depinde liniar de concentrația de ACh. Dacă pentru 30 μM și 40 μM gradul de desensibilizare crește progresiv cu concentrația, comparativ cu curbele obținute la 10 μM , la 50 μM ACh valoarea platoului se înscrie în intervalul dintre curbele obținute pentru 10-20 μM și 30 μM . Crescând concentrația la 100 μM ACh, gradul de

desensibilizare crește din nou comparativ cu 50 μM , fără a depăși însă valoarea maximă observată în intervalul de concentrații testat, obținută pentru 40 μM ACh.

Coaplicarea de GAL împreună cu ACh 10 μM nu induce diferențe semnificative la concentrația de 0.1 μM , pentru ca la 0.5 μM GAL să notăm cea mai scăzută desensibilizare a receptorilor nicotinici. Gradul de desensibilizare crește proporțional cu concentrația de GAL astfel încât la 5 μM desensibilizarea este mai accentuată față de situația control.

Comparativ cu rezultatele obținute la 10 μM , în cazul ACh 20 μM modelul de răspuns la creșterea concentrației de GAL este inversat, efectul GAL de diminuare a desensibilizării receptorilor nicotinici fiind mai pronunțat la concentrații mai mari de GAL; este de notat relația inversă (relativ la concentrația de GAL) între viteza de desensibilizare (reflectată de constanta de timp τ), care crește cu concentrația de GAL, și desensibilizarea staționară, care scade cu concentrația de GAL.

Asemănător rezultatelor obținute pentru 20 μM ACh, creșterea concentrațiilor de GAL duce la o desensibilizare mai puțin accentuată a receptorilor ca răspuns la stimularea cu ACh 30 μM ; viteza de desensibilizare (reflectată de τ) scade cu creșterea concentrației de GAL pentru toate concentrațiile testate.

În coaplicare cu ACh 40 μM , GAL are efecte semnificative asupra desensibilizării doar la concentrația de 5 μM în timp ce curba de desensibilizare în prezența a 1 μM GAL urmează îndeaproape răspunsul obținut la aplicarea de ACh 40 μM singură (experimentul control).

Nici în prezența ACh 50 μM , GAL 1 μM nu induce diferențe semnificative față de control. Un răspuns de diminuare a desensibilizării se observă în prezența GAL 5 μM . Este evidentă însă dependența neliniară a desensibilizării de concentrația de GAL, deoarece GAL 2.5 μM induce o desensibilizare mai accentuată comparativ cu aplicația de ACh singură. Am testat o singură concentrație de GAL, 5 μM , în combinație cu ACh 100 μM , fiind observată din nou o desensibilizare mai puțin semnificativă comparativ cu traseul control.

Prezența inhibitorului nicotinic competitiv metillicaconitina (MLA) determină, pe lângă efectul așteptat de scădere a amplitudinii curenților *whole-cell*, două rezultate interesante: (i) coaplicarea de MLA a indus modificarea curbei de desensibilizare a receptorilor stimulați cu pulsuri de ACh 20 μM și (ii) în prezența a 100 nM MLA, GAL 5 μM nu a mai exercitat efectul de prevenție a desensibilizării induse de 20 μM ACh. Presupunând că MLA acționează exclusiv ca inhibitor competitiv, prezența sa în coaplicație cu ACh ar trebui să ducă la scăderea numărului de canale ionice deschise la nivelul unei celule, deci la scăderea amplitudinii curenților *whole-cell*, fără a influența însă curba de desensibilizare a acestora. Datele noastre indică însă o diferență semnificativă între curba de desensibilizare în prezența inhibitorului comparativ cu ACh aplicată

singură. Mai mult, prezența MLA influențează și răspunsul celular la coaplicarea de ACh și GAL. Curbele de desensibilizare în prezența MLA prezintă o tendință de stabilizare la aceeași valoare platou (efect evident pentru combinația ACh + GAL + MLA, mai puțin evident pentru combinația ACh + MLA, datorită insuficienței datelor experimentale disponibile). În ipoteza acestei tendințe de stabilizare a receptorilor la același nivel de desensibilizare staționară, o explicație posibilă a acestui efect ar fi că MLA nu inhibă o anumită subpopulație de receptori nicotinici din celulele TE 671, subpopulație care prezintă un model distinct de desensibilizare. În acest caz, diferența dintre curbele de desensibilizare în prezența și în absența GAL s-ar datora acestei subpopulații de receptori neinhibați. O altă ipoteză posibilă ar fi o acțiune directă a MLA asupra fenomenului de desensibilizare prin legare la unul sau mai multe situsuri modulatorie, acționând competitiv cu GAL și cu afinitate mai mare la nivelul acestor situsuri (ceea ce ar explica diferența foarte mică între curbele de desensibilizare în prezența MLA ± GAL).

Rezultatele noastre confirmă dependența directă a desensibilizării de concentrația de agonist nicotinic până la concentrația de 40 μM de ACh, pentru ca la valori mai mari (50 μM și 100 μM) să se observe aparent surprinzător o desensibilizare mai puțin pronunțată a receptorului. Această variație poate fi explicată prin existența mai multor stări de desensibilizare diferite, determinate de existența mai multor situsuri modulatorie prin care ACh reglementează tranziția proteinei receptor între diferite stări conformaționale cu comportament diferit din punctul de vedere al desensibilizării. Tipul de protocol pe care noi l-am utilizat aduce informații suplimentare asupra cineticii de tranziție a receptorului între stările desensibilizate și afinității situsurilor modulatorie pentru ACh. Astfel, este posibil ca la concentrații mici de ACh să fie legate situsuri de legare cu afinitate mai mare, corelate cu un timp de viață mai lung al receptorului în stare desensibilizată. Desensibilizarea observată experimental ar fi deci proporțională cu concentrația, până la un anumit prag. La depășirea acestui prag de concentrație, ACh se poate lega de alte situsuri modulatorie, cu afinitate mai mică pentru ACh și posibil corelate cu un timp mai scurt de viață a receptorului în stare desensibilizată. În condițiile unei stimulări continue, variațiile datorate timpilor diferiți de existență a receptorilor în stările respective de desensibilizare nu sunt vizibile datorită existenței permanente de agonist disponibil, și efectul observat este strict proporțional cu concentrația de ACh. Dacă stimularea este secvențială, cum este cazul protocolului nostru, intervalul liber între aplicații consecutive este suficient de lung pentru a permite revenirea receptorilor aflați în stări de desensibilizare cu durata de viață mai scurtă, astfel încât efectul măsurat se datorează doar unei subpopulații de receptori desensibilizați (cei cu timp de viață mai lung) și poate sugera o desensibilizare aparent mai mică la o concentrație mai mare de ACh. Variațiile cu concentrația de ACh ale constantelor de timp

exponențiale τ , indicatori ai vitezei de desensibilizare, reprezintă un argument suplimentar pentru implicarea mai multor mecanisme moleculare în fenomenul de desensibilizare a receptorilor.

Pe baza datelor noastre experimentale propunem un mecanism de acțiune a GAL asupra desensibilizării receptorilor nicotinic care pornește de la ipoteza că efectul de potențare alosterică al GAL este probabil asociat cu stabilizarea receptorilor în stări diferite (corespunzătoare unor conformații diferite și profile conductive diferite), care probabil se comportă diferit și din punct de vedere al desensibilizării. În această ipoteză, efectele GAL pot fi explicate printr-o acțiune de modulator a GAL exercitată predominant asupra populației de receptori cu afinitate mai mică pentru ACh (care vor avea însă o afinitate crescută față de GAL). Consecutiv legării GAL și în concordanță cu efectul acesteia de potențare alosterică, această populație își va crește afinitatea pentru ACh, iar afinitatea pentru ACh a acestei populații de receptori depinde direct de concentrația de GAL. La o concentrație mică de GAL, respectiv 0.1 μM , afinitatea celei de a doua populații pentru ACh nu crește suficient de mult astfel încât să se înregistreze diferențe semnificative între desensibilizarea de stare staționară măsurată. Odată cu creșterea concentrației de GAL la 0.5 μM – 1 μM , legarea ACh la a doua populație de receptori crește prin creșterea afinității acesteia pentru ACh. Aceste efecte sunt cel mai evidente la concentrații de ACh 10 μM – 30 μM , unde cea de a doua populație de receptori nu este activată în absența GAL datorită afinității sale scăzute pentru ACh, astfel încât în prezența GAL prin protocolul nostru de stimulare se măsoară o desensibilizare aparent mai mică la aceste combinații de concentrații. La concentrații de ACh mai mari (50 μM , 100 μM) diferențele nu mai sunt evidente, deoarece această a doua populație era stimulată și în absența GAL. Creșterea și mai mult a concentrației de GAL este corelată probabil cu legarea GAL și de prima populație de receptori, cu afinitate mai mare pentru ACh și mai mică pentru GAL, crescând ușor afinitatea acesteia pentru ACh. Acest efect este însă semnificativ doar la concentrații mici de ACh (10-20-30 μM), unde se traduce printr-o desensibilizare aparentă, măsurată, mai accentuată.

Corelând observațiile asupra valorilor de desensibilizare staționară observate cu datele asupra vitezei de desensibilizare, faptul că tendința vitezei de desensibilizare este de a se stabiliza la un platou sugerează ideea că la concentrații mari se atinge un echilibru între populațiile de receptori implicate în desensibilizare, ceea ce concordă cu mecanismul propus de acțiune a GAL. Explicația noastră se bazează deci pe ideea existenței mai multor populații de receptori nicotinici, cu afinități diferite pentru agonști și modulatori și cu comportament de desensibilizare diferit, consecință a unei stări inițiale diferite, iar legarea GAL modulează contribuțiile relative ale diferitor subpopulații de receptori la fenomenul global de desensibilizare.

Studii de modelare teoretică

Studiile de modelare pe care le-am efectuat au adus informații suplimentare asupra mecanismelor implicate în activarea și desensibilizarea receptorilor nicotinic pentru acetilcolină. Astfel, într-un model de activare a receptorului nicotinic cu 5 stări distincte (3 stări închise: receptor nelegat de molecule de ACh, receptor mono- și diligat, și 2 stări deschise, corespunzătoare receptorului mono- și respectiv diligat) valorile maxime ale curentului membranar simulat reproduc valorile maxime ale curenților măsurați prin *whole-cell patch-clamp*, însă atât curentul cât și tensiunea membranară ating o valoare de stare staționară diferită de 0, situație care contravine observațiilor experimentale (după o inițială creștere, curenții experimentali *whole-cell* revin la 0 indiferent de timpul de aplicare al ACh și de persistența ACh în mediul extracelular – baia de celule). Luând în considerare o stare intermediară a tranziției de la receptor monoligat închis la receptor monoligat deschis într-un model cu 6 stări conformaționale ale proteinei receptor, curentul whole-cell indus de o aplicare unică, prelungită, a ACh este cel mai bine reprodus. Un model de activare cu 6 stări al receptorului nicotinic este în concordanță cu teorii mai noi asupra mecanismelor implicate în deschiderea și închiderea canalului ionic al acestui receptor, bazate pe existența a două porți de activare a receptorului nicotinic pentru ACh. Prin prisma acestor teorii, este posibil ca deschiderea fiecărei porți în parte să fie comandată prin legarea unei molecule de ACh. În cazul receptorului diligat, cele două porți se pot deschide simultan, astfel încât din punct de vedere cinetic nu se diferențiază decât o singură etapă de tranziție conformațională a proteinei-receptor între starea închisă și starea deschisă. În cazul receptorului monoligat este posibil ca deschiderea receptorului să fie un proces secvențial; deschiderea uneia dintre porți este comandată de legarea unei molecule de ACh și este un proces rapid, care induce apoi procesul mult mai lent de deschidere a celei de a doua porți a receptorului. Astfel, după cum se evidențiază și din modelul nostru, tranziția receptor închis monoligat – receptor deschis monoligat are loc printr-o stare intermediară distinctă, corespunzătoare unei conformații în care o singură poartă de activare este deschisă, și cu constante diferite de viteză corespunzătoare celor două etape. Teoria noastră, rezultată în urma modelării, este susținută și de studii asupra profilului energetic asociat activării receptorului nicotinic, studii care evidențiază existența unei plaje largi de energie în care au loc tranzițiile proteinei-receptor. Această plajă largă de energie sugerează existența a numeroase stări conformaționale diferite între care au loc tranziții induse de legare de agonist și justifică includerea unor stări intermediare, cu caracteristici cinetice diferite, în modelele de activare a receptorului nicotinic.

Am modelat desensibilizarea receptorului nicotinic pentru ACh pornind de la o schemă cinetică simplificată care include tranziții ciclice între starea închisă, nelegată de ACh a receptorului, starea închisă dilată, starea deschisă dilată și o stare desensibilizată, în care moleculele de agonist s-au desprins de situsurile de legare. Pentru concentrația de 10 μM ACh, tendința simulată de scădere a amplitudinii curenților coincide cu curba de desensibilizare determinată experimental. La creșterea concentrației, desensibilizarea simulată este însă mai rapidă decât valoarea determinată experimental. Simulările bazate pe modelul ciclic de desensibilizare, efectuate în ipoteza sugerată de datele experimentale a existenței a două populații diferite de receptori (din punctul de vedere al desensibilizării) au reprodus o dependență oscilatorie a gradului de desensibilizare al receptorilor nicotinici de concentrația de ACh, în concordanță de principiu cu datele experimentale. Diferențele notate între rezultatele simulării și rezultatele experimentale se pot datora pe de-o parte faptului că modelul nu ia în considerare afinități diferite ale celor două populații ci doar constante de desensibilizare diferite, dar și posibilității de existență a mai mult decât două populații de receptori și a mai mult decât două stări desensibilizate. În aceste limite putem considera modelul nostru un punct important de pornire pentru studii ulterioare referitoare la desensibilizarea receptorilor nicotinici și asupra efectelor unor substanțe farmacologice asupra activării și desensibilizării acestor receptori.

Concluzii globale ale studiilor experimentale și de modelare

Rezultatele prezentate în această lucrare oferă o perspectivă asupra complexității fenomenelor implicate în activarea și modularea activității receptorului nicotinic pentru acetilcolină. Este scos în evidență faptul că este posibil ca atât interferențe la nivelul membranei cât și activarea unor situsuri modulatorie ale proteinei-receptor să conducă la modificări funcționale importante ale neurotransmisiei nicotinic. Se diferențiază însă un element unitar și în același timp un element de noutate, susținut de toate studiile experimentale prezentate. Este vorba despre ideea că activarea receptorului nicotinic presupune nu doar tranziții între diferite stări conformaționale, ci și un echilibru dinamic între diferite populații de receptori cu comportament funcțional diferit, manifestat atât în ceea ce privește afinitatea pentru agonist și nivelul de conductanță, cât și cinetica de dezactivare – desensibilizare. Unul din mecanismele posibile de modulare a răspunsului nicotinic, sugerat de rezultatele noastre, poate fi deci afectarea echilibrului între populații diferite de receptori, prin stabilizarea conformațională a uneia sau mai multora dintre stările posibile. Efectul de stabilizare se datorează legării substanței modulatorie la situsuri specifice sau nespecifice, consecința directă fiind efecte măsurabile, neliniare, asupra comportamentului de dezactivare – desensibilizare a receptorului.

SINTEZA PRINCIPALELOR REZULTATE ALE STUDIULUI

CUMARINA:

- a prezentat acțiune protectoare asupra membranelor lipidice artificiale față de efectele destabilizatoare ale unor anioni din seria Hofmeister, iar efectul său a fost mai evident pentru anionii puternici chaotropi (tiocianat, perclorat); efectul protector al cumarinei (stabilizator al membranelor lipidice) s-a exercitat și în prezența cadmiului, a cărui legare de bistrat a fost inhibată, efect pus în evidență prin scăderea constantei aparente de legare a cadmiului de membrană, în prezența cumarinei. Mecanismul protector al cumarinei se datorează probabil inserției în bistratul lipidic cu stabilizarea consecutivă a acestuia.
- Cumarina aplicată în baia de celule a determinat modificarea cineticii de închidere (în sensul scăderii constantei de timp) a receptorului nicotinic stimulat de ACh 10 μ M, într-o manieră dependentă de concentrație și de timpul de expunere; aplicația de cumarină în pulsuri nu a determinat apariția acestor modificări. Aplicată pentru o perioadă mai mare de 30 de minute a indus modificări ale profilului de desensibilizare a receptorului nicotinic exprimat de linia celulară TE 671. La concentrații de cumarină variind între 0 și 50 μ M s-au înregistrat doar două tipuri de răspuns de desensibilizare, ceea ce sugerează un mecanism de acțiune a cumarinei tip treaptă, posibil pe baza afinității dependente de concentrație pentru unul sau altul dintre două situsuri modulatorii diferite la nivelul receptorului nicotinic a căror activare (posibil secvențială) este corelată cu un anumit comportament de desensibilizare.

QUERCETINA:

- Prezența quercetinei interferează cu procesul de inserție a metalelor grele în bistratul lipidic artificial într-o manieră dependentă de concentrație prin mai multe mecanisme posibile:
 - inserția în membrană - saturația bistratului din punctul de vedere al legării QUE se produce la valori ale concentrației sale de 50 μ M – 100 μ M
 - formarea unor structuri complexe de tip ion-flavonoid care nu se pot insera în membrană datorită volumului mare (la concentrații mari de QUE, dincolo de pragul de saturație membranar)

- Efectele protectoare ale QUE față de acțiunea metalelor grele studiate (Zn, Cu, Cd) au fost evidente la concentrații mai mici de QUE (10 – 50 μM), în timp ce la concentrații mai mari flavonoidul a exercitat el însuși efecte destabilizatoare membranare.
- La aplicarea în baie de celule studiate prin patch-clamp, QUE a indus scăderea amplitudinii maxime a curenților măsurați în configurația *whole-cell*; scăderea a fost mai accentuată la expuneri mai îndelungate la QUE, însă profilul de dependență a amplitudinii curenților de concentrația de QUE a fost același indiferent de timpul de aplicare. Acesta este un argument pentru o acțiune specifică a QUE asupra celulelor, situsul de interferență putând fi atât la nivel de membrană celulară cât și la nivel de receptor.
- În prezența QUE aplicată în soluția de baie, cinetica de închidere a receptorilor nicotinici devine biexponențială, ceea ce sugerează existența a cel puțin două populații distincte de receptori / două stări conformaționale diferite ale proteinei receptor, implicate în etapa de închidere, stabilizate de către QUE.
- QUE a indus același profil de desensibilizare a receptorilor nicotinici pentru ACh (și diferit față de control) atât la expuneri de 10 minute cât și la expuneri mai mari, iar dependența efectelor de concentrația de QUE a fost neliniară. Aceste informații conturează un tablou complex de interacțiune a QUE cu sistemul membrană-receptor, posibil prin activarea unor situsuri modulatoare cu afinități diferite și efecte antagonice.

DESENSIBILIZAREA RECEPTORILOR NICOTINICI

- Aplicarea de pulsuri de ACh în trenuri de stimulare induce desensibilizarea receptorilor nicotinici, obiectivată prin scăderea progresivă a amplitudinii curenților *whole-cell*. Utilizarea unui protocol de aplicare discontinuu induce un răspuns neliniar la creșterea concentrației de ACh. Desensibilizarea crește progresiv cu concentrația până la un prag de concentrație (40 μM , în experimentele pe care le-am efectuat), pentru ca la creșterea ulterioară a concentrației de ACh să se observe o desensibilizare mai puțin accentuată.

- Rezultatele noastre sugerează existența unor situsuri modulatorie ale desensibilizării, cu afinitate diferită la ACh. La concentrații mici de ACh este posibil să fie activate situsuri modulatorie cu afinitate mare pentru ACh, dar care induc desensibilizare mai persistentă (durata de revenire a receptorilor mai mare decât intervalul între stimulările succesive din cadrul unui tren de aplicații); la concentrații mai mari sunt activate situsuri cu afinitate mai mică, dar asociate cu revenire mai rapidă din desensibilizare, astfel încât efectul aparent la o stimulare discontinuă este de diminuare a desensibilizării.

GALANTAMINA

- Coaplicarea de pulsuri GAL + ACh induce modificări ale profilului de desensibilizare comparativ cu controlul, indiferent de combinația de concentrații. Tipul de răspuns la coaplicația GAL-ACh depinde direct de durata aplicației, intervalul între aplicații și combinația de concentrații aplicată. Gradul de desensibilizare și viteza de desensibilizare nu depind liniar nici de concentrația de GAL, nici de concentrația de ACh, și nu sunt corelate nici cu o anumită stoechiometrie a aplicării
- Rezultatele noastre pot fi explicate în ipoteza existenței a două populații de receptori cu afinități diferite pentru ACh și GAL (situsurile cu afinitate mare și asociate cu desensibilizare de durată mai lungă au afinitate mică pentru GAL, și invers). Ipoteza este susținută de profilul ciclic observat în variația parametrilor de desensibilizare (grad și viteză) raportată la concentrația de ACh sau GAL

STUDII DE MODELARE TEORETICĂ

- Sugerează existența unui intermediar conformațional între starea închisă monoligată a receptorului nicotinic pentru ACh și starea deschisă monoligată; simulările bazate pe un model de activare a receptorului care include acest intermediar conformațional se suprapun peste măsurătorile experimentale ale curenților induși de o aplicare prelungită de ACh;
- Modelele ciclice de desensibilizare a receptorului nicotinic reproduc răspunsul observat experimental la stimularea intermitentă cu pulsuri de agonist doar pentru anumite concentrații. Includerea unei a doua populații de receptori cu comportament de desensibilizare diferit în modelul de desensibilizare a receptorului induce un răspuns simulat oscilator, în concordanță generală cu observațiile experimentale.

IPOTEZĂ UNITARĂ PROPUȘĂ:

- Rezultatele prezentate, obținute prin metode diferite și referitoare la substanțe farmacologice diferite, sugerează un mecanism comun de modulare a comportamentului de activare-desensibilizare a receptorului nicotinic prin interferența (la nivele diferite, specifice sau nespecifice) în echilibrul dinamic între două sau mai multe populații de receptori aflate în stări conformaționale diferite, cu caracteristici funcționale diferite.