

Rola oddziaływań w ortosterycznym miejscu wiążącym agonistę oraz pomiędzy podjednostkami w aktywacji i modulacji receptora GABA_A

Receptor GABA typu A (GABA_AR) to receptor jonotropowy należący do rodziny pentamerycznych kanałów jonowych bramkowanych ligandem. Złożony jest z pięciu podjednostek, w każdej z nich można wyróżnić trzy domeny: zewnątrzkomórkową (ECD), transmembranową (TMD) oraz wewnątrzkomórkową. Po związaniu cząsteczki agonisty (kwasu gamma-aminomasłowego) w miejscu wiązania zlokalizowanym w domenie ECD w obrębie receptora dochodzi do szeregu zmian konformacyjnych prowadzących do otwarcia bramki poru jonowego znajdującego się w domenie TMD. Umożliwia to przepływ jonów chlorkowych poprzez kanał receptora, a tym samym obniżenie potencjału transbłonowego komórki. Wynika stąd rola jaką pełni GABA_AR – jest on jednym z głównych białek odpowiedzialnych za transmisję hamującą w centralnym układzie nerwowym dorosłych ssaków. Zaburzenia jego funkcji związane są z chorobami takimi jak m. in. epilepsja, depresja, autyzm. Sam receptor jest również celem dla różnych leków, np. benzodiazepin, barbituranów czy neurosteroidów oraz ulega modulacji poprzez zmianę poziomu pH. Dokładny molekularny mechanizm procesu aktywacji receptora, czyli szeregu przejść zapoczątkowanych związaniem ligandu a kończący się otwarciem bramki poru nie jest znany, a jego częściowe rozszyfrowanie jest celem niniejszej rozprawy doktorskiej. W przedstawionych badaniach skupiłem się głównie na obszarze powierzchni kontaktu podjednostek tworzących miejsca wiązania agonisty w domenie ECD, szczególnie pętli C, B, D, G oraz helisy $\alpha 1$. Wykorzystując szereg narzędzi bioinformatycznych, takich jak modelowanie homologiczne, dynamika molekularna, dokowanie ligandów, estymacja pK_a a także modelowanie kinetyczne oparte na pomiarach elektrofizjologicznych, przedstawiłem szereg molekularnych mechanizmów związanych z procesem aktywacji receptora związanych z rejonem styku jego podjednostek. Wykazałem rolę pętli C w sterycznym domykaniu miejsca wiązania oraz wpływ pętli B oraz D i G na kształtowanie odpowiedniego środowiska elektrostatycznego niezbędnego do związania cząsteczki GABA. Przedstawiłem również wpływ poziomu pH na ten rejon białka oparty na zmianie stanu protonacji jednej z reszt ułożonej na pętli B, a także wykazałem rolę rejonu N-końca białka (helisa $\alpha 1$) w domykaniu powierzchni kontaktu podjednostek powyżej miejsca wiązania. Przedstawione wyniki w znaczący sposób przyczyniły się rozwoju dziedziny badań relacji struktura-funkcja GABA_AR, umożliwiając pełniejsze zrozumienie funkcji receptora, a także umożliwiając w przyszłości skuteczniejsze projektowanie nowych leków wiążących się do tego receptora.

15.06.2022 *Michal Michalowski*

Role of the interactions in the orthosteric binding site and between subunits in the activation and modulation of the GABA_A receptor.

GABA type A receptor (GABA_AR) is an ionotropic receptor belonging to the family of pentameric ligand gated ion channels. It is made of five subunits and within each of them three domains may be distinguished: extracellular (ECD), transmembrane (TMD) and intracellular one. After the agonist molecule is bound (gamma-aminobutyric acid) at the binding site located in the ECD, receptor undergoes a series of conformational changes leading to the opening of the ion channel gated which is situated in the TMD. It allows chloride ions to flow through the receptor's channel, which causes the reduction of the cell's transmembrane potential. From this series of events the role of GABA_AR arises – the receptor is one of the key proteins responsible for inhibitory transmission in the central nervous system of the adult mammals. Disorders of its function are connected with diseases like e.g. epilepsy, depression and autism. The receptor itself is also a target for various drugs, including benzodiazepines, barbiturates, neurosteroids and is modulated by pH level. Exact molecular mechanism of the receptor activation, that is of the series of conformational transitions started with ligand binding and ended with channel gate opening, is not known. Its elucidation is a target of the research showed in the dissertation. In presented research I have mainly focused on the region of the subunit interfaces forming the agonist binding sites within ECD, particularly loops C, B, D, G and $\alpha 1$ helix. With employment of numerous bioinformatics tools such as homology modeling, molecular dynamics, ligand docking, pK_a estimation and kinetic modeling based on electrophysiological recordings I have formulated the series of molecular mechanisms responsible for the receptor activation connected with the subunit interface region. I have showed the role of loop C in the steric closure of the binding site and the influence of loops B, D and G on shaping the optimal electrostatic environment necessary for the GABA molecule binding. I have also presented how the pH level influences the subunits' interface by changing the protonation state of the one of loop B residues, and how the N-terminal region ($\alpha 1$ helix) is involved in the subunit interface closure above the ligand binding site. Altogether, presented results significantly contributed to development of the research on structure-function relationship of GABA_AR enabling more thorough understanding of the receptor function and will allow more accurate design of the new drugs in the future.

15.04.2022 Mdzat Mdzatbeki