

Název práce: Studium aktivace a modulace svalových nikotinických acetylcholinových receptorů pomocí bodových mutací

Autor: Lucie Svobodová

Katedra (ústav): Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Vedoucí disertační práce: RNDr. Jan Krůšek, CSc., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

e-mail vedoucího: krusek@biomed.cas.cz

Abstrakt:

Svalový nikotinický acetylcholinový receptor (nAChR) je považován za prototyp chemicky aktivovaných iontových kanálů. Endogenním agonistou nAChR je acetylcholin. Vazebná místa jsou tvořena šesti proteinovými smyčkami. Součástí tzv. F-smyčky δ -podjednotky jsou záporně nabitě aminokyseliny Asp¹⁸⁰ a Glu¹⁸⁹. Předmětem naší práce bylo studium mechanismu působení (+)-tubokurarinu ((+)-Tc) na nAChR a role δ :Asp¹⁸⁰ a δ :Glu¹⁸⁹ v mechanismu aktivace a inhibice nAChR.

Používali jsme techniku terčíkového zámku v konfiguraci měření z celé buňky. Roli konkrétních aminokyselin jsme zkoumali pomocí bodových mutací. nAChR byly za použití přechodné transfekce exprimovány v COS liniích.

Potvrdili jsme, že v případě dospělých a embryonálních nAChR působí (+)-Tc mechanismem kompetitivní inhibice. Aminokyseliny δ :Asp¹⁸⁰ a δ :Glu¹⁸⁹ se zřejmě účastní konformační změny vazebného místa, která předchází efektivnímu otevření kanálu.

Physostigmin (Phy) a galanthamin (Gal) jsou používány v lékařství pro jejich anticholinesterázový účinek. V poslední době se pozornost obrátila k přímé interakci inhibitorů acetylcholinesterázy s nAChR, proto jsme se zaměřili na studium přímého vlivu Phy a Gal na funkci embryonálního nAChR.

Phy působí mechanismem blokády otevřeného kanálu a alostericky zvyšuje afinitu otevřeného a desenzitizovaného stavu. Gal inhibuje nAChR cestou zvyšování afinity desenzitizovaného stavu.

Klíčová slova: svalový nikotinický acetylcholinový receptor, aktivace, F-smyčka, inhibitor acetylcholinesterázy, physostigmin, galanthamin

Title: Study of activation and modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors using point mutations

Author: Lucie Svobodová

Department: Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

Supervisor: RNDr. Jan Krůšek, CSc., Institute of Physiology AS CR, v.v.i.

Supervisor's e-mail address: krusek@biomed.cas.cz

Abstract:

Muscle nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is prototypical ligand gated ion channel protein. Its endogenic agonist is acetylcholine (ACh). The binding sites are formed by six protein loops. F-loop of δ -subunit includes negatively charged δ :Asp¹⁸⁰ and δ :Glu¹⁸⁹.

The aim of our study was a determination of mechanism of interaction between (+)-tubocurarine ((+)-Tc) and nAChR and possible role of negatively charged δ :Asp¹⁸⁰ and δ :Glu¹⁸⁹ in activation and inhibition of nAChR.

We used the patch clamp technique in whole cell configuration. The role of particular aminoacids in activation was investigated using point mutations. nAChR was expressed in COS cells.

We sustained (+)-Tc acted via competitive inhibition on adult and embryonic nAChRs. We have also found δ :Asp¹⁸⁰ and δ :Glu¹⁸⁹ have been involved in conformation change of binding site after which channel opening succeeds.

Physostigmine (Phy) and galanthamine (Gal) are routinely used in treatment for their iAChE effect. Recently the direct interaction of inhibitors of acetylcholinesterase with nAChR has been studied. We targeted the direct interaction of Phy and Gal with embryonic nAChR.

Phy acts via open channel blockade and allosterically increases affinity of opened and desensitized state. Gal inhibits the nAChR function by increasing of desensitized state affinity.

Keywords: muscle nicotinic acetylcholine receptor, activation, F-loop, inhibitor of acetylcholinesterase, physostigmine, galanthamine