

**RAPORT DE FAZA 2010 – 30 noiembrie 2010**  
**Proiect PNII Idei 326/2007**  
**Sinteza**

**Obiectivele științifice ale fazei:**

**Elaborarea modelului de acțiune a GAL și continuarea cercetărilor privind efectul GKB asupra receptorului nicotinic**

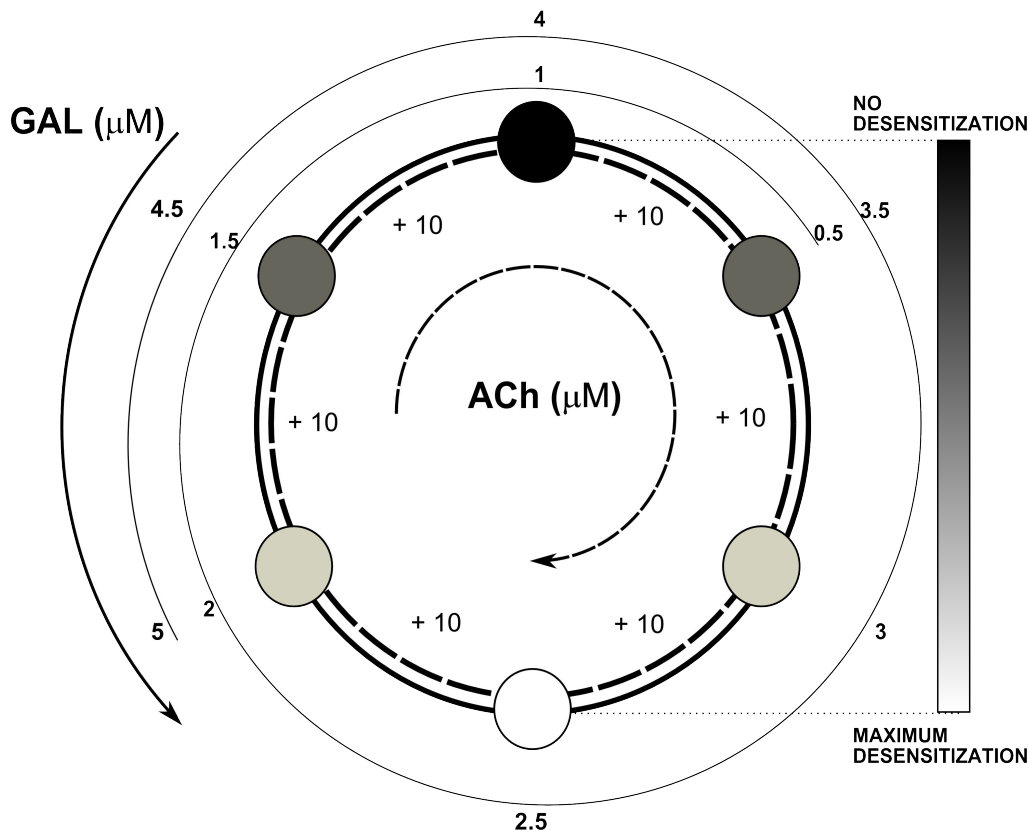
**1. Elaborarea modelului de acțiune a GAL asupra receptorului nicotinic de ACh**

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. Explicația noastră se bazează deci pe ideea existenței mai multor populații de receptori nicotinici, cu afinități diferite pentru agoniști și modulatori și cu comportament de desensibilizare diferit, consecință a unei stări inițiale diferite (a se vedea și raportul *in extenso*). Studii recente asupra cineticii de activare a receptorilor nicotinici, realizate prin metoda REFERS (analysis of the rate-equilibrium free-energy relationships) (Auerbach, 2005; Mitra *et al.*, 2005) reprezintă un argument suplimentar pentru explicația noastră, arătând că suma conformațiilor proteinei-receptor diligate implicate în deschiderea canalului ionic corespund unui interval energetic larg în care sunt posibile multiple tranziții structurale. Elenes and Auerbach (2002) au calculat de asemenea profilul de energie liberă asociat fenomenului de desensibilizare, ajungând la concluzia existenței unei regiuni de platou alcătuită din trei trepte cu amplitudine scăzută, corespunzând unor stări desensibilizate diferite dar greu de discriminat între ele. Toate aceste date susțin ideea existenței mai multor stări de desensibilizare și a tranzițiilor posibile între un număr mare de stări.

Pe baza exclusiv a datelor noastre nu se poate determina locația de legare a GAL la receptorul nicotinic, nici starea receptorului (deschis / închis / desensibilizat) unde are loc această legare. Cu toate acestea, datele noastre sugerează faptul că legarea GAL modulează contribuțiile relative ale diferitor subpopulații de receptori la fenomenul global de desensibilizare.

Aceste rezultate nu pot fi explicate doar prin ipoteza unei reglări pozitive/negative a stării conductive a receptorului prin legarea alosterică a GAL la unul sau mai multe situri de legare ale receptorului.

Legarea GAL la un sit potențiator sau inhibitor ar schimba corespunzător afinitatea receptorului pentru ACh (și posibil gradul de desensibilizarea), dar nu ar modifica faptul că pentru a atinge o desensibilizarea mai mare ar fi de așteptat concentrații mai ridicate de ACh.



### Diagrama explicativă privind co-influența ACh și GAL asupra desensibilizării receptorului nicotinic.

Presupunem că în absența GAL populația receptorilor nicotinicici este distribuită între șase stări posibile (A-F), egal probabile și cu aceeași afinitate pentru ACh. Fiecare stare are un pattern de desensibilizare diferit, de la desensibilizare maximă (cerc alb în diagramă) până la desensibilizare nulă (cerc negru în diagramă). Tonurile de gri corespund stărilor intermediare de desensibilizare. Întrucât în absența GAL toate cele 6 stări sunt egal probabile, desensibilizarea constatată experimental ar reprezenta răspunsul însumat al celor 6 stări. Între aceste stări au loc tranziții permanente într-o manieră circulară. Prezența GAL în sistem induce o stabilizare a uneia dintre stările posibile ale receptorului (GAL crește probabilitatea de apariție a unei anumite stări), într-o manieră dependentă de concentrație. Fiecare creștere de  $0.5 \mu\text{M}$  a concentrației GAL este asociată cu o tranziție în sens trigonometric spre următoarea stare posibilă a receptorului (de ex. GAL  $0.5 \mu\text{M}$  corespunde stării, GAL  $1 \mu\text{M}$  corespunde stării B, etc.). Starea stabilizată a receptorului are o afinitate mai mare pentru ACh, comparativ cu celelalte stări. Creșteri de  $10 \mu\text{M}$  ACh duc la tranziții în sens invers trigonometric spre următoarea stare a receptorului. Pattern-ul de desensibilizare pentru o combinație specifică de  $[\text{ACh}] + [\text{GAL}]$  poate fi prezis după cum urmează: starea inițială este stabilită pe baza concentrației GAL și această stare corespunde celei mai joase concentrații de ACh testate ( $10 \mu\text{M}$ ); concentrațiile mai ridicate de ACh deplasează starea inițială în sens invers trigonometric cu câte o tranziție pentru fiecare pas de  $10 \mu\text{M}$ . Exemplu: pentru combinația ACh  $20 \mu\text{M} + \text{GAL } 1 \mu\text{M}$ , starea inițială pentru GAL  $1 \mu\text{M}$  este B (corespunzând la  $10 \mu\text{M}$  ACh); starea de desensibilizare pentru ACh  $20 \mu\text{M}$  corespunde unui salt în sens invers trigonometric către starea următoare (A). Starea A va prezice deci cel mai bine comportamentul de desensibilizare pentru această combinație particulară de concentrații. Diagrama propusă poate fi utilizată numai pentru a prezice pattern-ul de desensibilizare în prezența GAL. În diagramă sunt notate și constantele de desensibilizare pentru diferite combinații  $[\text{ACh}] + [\text{GAL}]$ .

O altă caracteristică ce ar rezulta din acest tip de model ar fi aceea că pattern-ul de desensibilizare ar fi dependent de raportul dintre concentrațiile ACh și GAL. Rezultatele noastre

nu sunt în concordanță cu o asemenea caracteristică. Răspunsurile nelineare observate în cazul diferitelor concentrații de ACh și GAL pot fi explicate prin diagrama ciclică din figura de mai jos. Această diagramă explică similitudinile dintre pattern-urile de desensibilizare la diferite combinații de substanțe.

Explicația noastră privind efectul GAL asupra desensibilizării receptorului nicotinic se bazează pe ipoteza că starea inițială a receptorului influențează comportamentul de desensibilizare și că există mai multe stări posibile pentru receptorul nedesensibilizat, cu tranziție permanentă (posibil circulară) a receptorului între aceste stări. Deci, stările multiple observate pentru receptorul desensibilizat evoluează fiecare dintr-o stare inițială diferită. Studii recente (REFER; Auerbach, 2005; Mitra & all, 2005) privind mișcările de închidere/deschidere ale receptorului induse de Ach sprijină ipoteza noastră arătând că mișcările care stau la baza proceselor de închidere/deschidere ale receptorului diligit au loc într-o plajă largă de energii în care sunt accesibile multe structuri alternative ale stărilor de tranziție. Subliniem faptul că GAL stabilizează una dintre posibilele structuri ale stărilor de tranziție, influențând astfel comportamentul de desensibilizare al receptorului. Diagrama de desensibilizare propusă ar putea fi o unealtă valoroasă pentru interpretarea datelor în domeniul de concentrație utilizat în experimentele noastre (detalii in raportul *in extenso*).

## **2. Continuarea măsurătorilor prin metoda patch-clamp privind efectele GKB la nivel de receptor nicotinic de acetilcolina**

Experimentele preliminare dedicate efectelor GKB asupra receptorilor nicotinici pentru Ach, efectuate într-o etapă anterioară a proiectului, au sugerat următoarele aspecte:

- GKB afectează semnificativ conductanța receptorilor nicotinici, posibil printr-un efect de potențare allosterică
- Prezența GKB influențează cinetica de revenire din desensibilizare a receptorului nicotinic pentru ACh
- Este posibil ca legarea GKB la receptorul nicotinic să inducă modificări conformaționale asociate cu deschideri parțiale receptorului (obiectivate prin existența de niveluri subconductive în înregistrări single-channel)

Am continuat în această etapă cu studiul, în configurația whole-cell, al efectelor coaplicării de GKB și ACh (comparativ cu un control – ACh monoaplicată) și confirmarea sau infirmarea unei (sub)activări a receptorului exclusiv de către GKB.

### **Material și metodă**

*Metoda patch-clamp* (Axon Guide, 2003) permite măsurarea diferenței de potențial dintre un electrod atașat celulei în (diferite configurații) și un electrod situat în soluția din exteriorul celulei. Am efectuat măsurători în configurația *whole-cell*, care au permis măsurarea curenților ionici transmembranari, prin receptorii nicotinici activați de către acetilcolină (ACh), la nivelul unei întregi celule.

*Culturi de celule.* Celule ale liniei de rbdomiosarcom caucazian uman TE 671 (ECACC No. 89071904), care exprima nativ receptori nicotinici de tip muscular (Ostwald *et al* 1989, Schoepfer *et al* 1988), au fost cultivate în mediu DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, cu GlutaMAX<sup>TM</sup>I, concentrație crescută de glucoză 4.5 g/l, și fără piruvat de sodiu, GIBCO-Invitrogen), suplimentat cu 10 % (v/v) ser bovin fetal și antibiotice (50 I.U/ml penicilină și 50

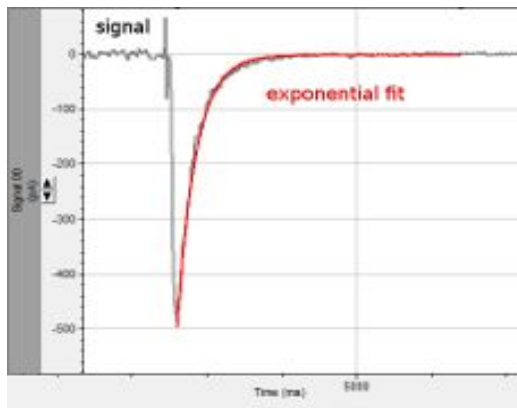
U.G/ml streptomycină). Culturile au fost menținute la 37°C în atmosferă umidificată (aer) cu un conținut de 5% CO<sub>2</sub>. La fiecare 4-5 zile au fost efectuate subculturi prin tripsinizare, în momentul în care culturile au atins ~70-80% confluență.

*Electrofiziologie.* Măsurătorile electrofiziologice, prin metoda patch-clamp, au fost efectuate la 24-72 ore după subcultură cu ajutorul unui amplificator PC-10 (HEKA), în condiții de *voltage clamp*, în configurația *whole-cell* (Hamill *et al.*, 1981). Potențialul electric al membranei a fost menținut la -70 mV în timpul măsurătorilor. Toate experimentele au fost efectuate la temperatura camerei.

*Substanțe și soluții.* Curenții celulari au fost mășurați în soluția de baie cu compoziția (în mM): 135 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 30 HEPES (pH 7.4/NaOH). Soluția de pipeta a conținut (în mM): 140 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 11 EGTA (pH 7.2/CsOH). Soluțiile de acetilcolină (ACh) și Ginkgolid B (GKB) (dizolvate în soluție de baie) au fost preparate proaspăt înaintea experimentului din soluții stoc cu concentrația 1 mM, respectiv 100mM, menținute înghețate. Toate substanțele au fost procurate de la Sigma.

*Sistemul de perfuzie.* Substanțele active (ACh singură sau în combinație cu GKB) au fost aplicate cu ajutorul unui sistem de perfuzie lent, cu presiune joasă (curgere gravitațională), vârful sistemului de perfuzie având un diametru de aprox. 500 μm. Între aplicațiile succesive de substanță activă, celula a fost spălată permanent cu soluție de baie.

*Protocol de lucru.* Am folosit un protocol de aplicare de două pulsuri succesive de substanță activă (doar ACh, sau coaplicație de ACh și GKB) la un interval de 5 minute, timp în care celula a fost spălată în permanență cu soluție de baie.

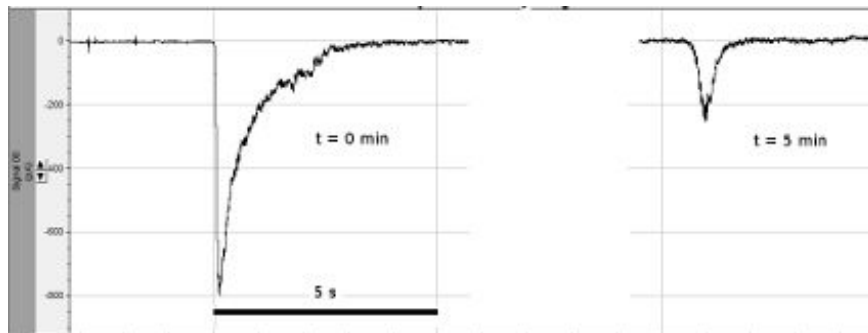


**Fig. 1.** Fitarea pantei ascendente a curenților *whole-cell* cu o funcție exponențială

*Analiza datelor.* Inregistrările au fost realizate cu programul Pulse (HEKA), filtrate la 1.33 kHz și eșantionate la 4 kHz, cu o amplificare de 100 mV/pA. Analiza datelor a fost realizată cu programul Clampfit 9.2 (Axon Instruments) și QtiPlot (Copyright 2004-2008 Ion Vasilief, licență GNU-GPL). Parametrii analizați au fost amplitudinea curenților în configurația *whole-cell* și constanta de timp de desensibilizare a receptorilor. Studiind scăderea relativă a amplitudinii curenților într-un tren de două pulsuri (prin normalizare la valoarea amplitudinii primului curent) am obținut informații referitoare la fenomenul de revenire din desensibilizare. Constanta de timp de desensibilizare am obținut-o prin fitarea pantei ascendente a curenților *whole-cell* cu o funcție exponențială (Fig. 1).

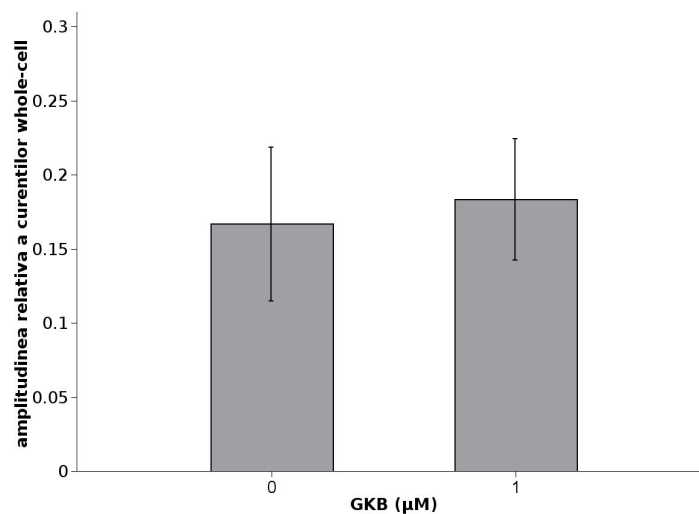
## Rezultate și discuții

GKB aplicat singur a determinat apariția de curenți *whole-cell* doar la două celule din mai mult de 20 testate în acest sens (înregistrările nu sunt prezentate aici).



**Fig. 2.** Scăderea amplitudinii curenților *whole-cell* la 5 minute după aplicarea inițială, pentru ACh 20  $\mu\text{M}$

Deși numărul este prea mic pentru a avea o semnificație statistică, nu putem exclude o posibilă acțiune de activare directă a receptorului de către GKB, în condițiile în care datele noastre precedente, obținute în configurația *single-channel*, au înregistrat o posibilă activare a receptorului la un nivel diferit de conductanță de către GKB, în absența ACh.



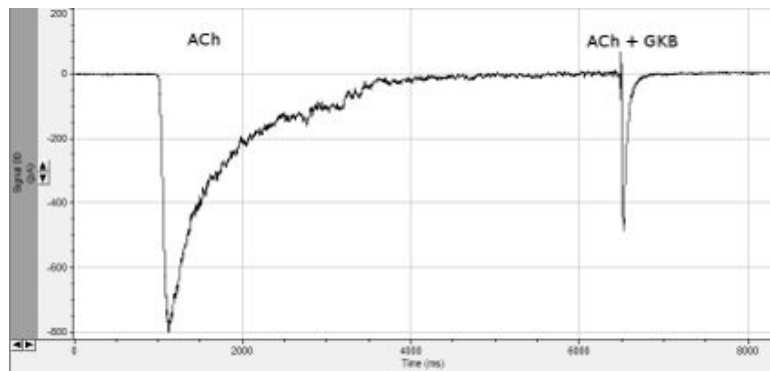
**Fig. 3.** Amplitudinea relativă a curenților *whole-cell* obținuți la 5 minute după o primă aplicație de ACh 20  $\mu\text{M}$ , în absența GKB și în prezența a 1  $\mu\text{M}$  GKB.

Amplitudinea celui de-al doilea curent din trenul de pulsuri aplicate scade la  $0.17 \pm 0.05$  ( $n=3$ ), ceea ce reflectă un proces lent de revenire din desensibilizare a receptorilor nicotiniци pentru ACh. (Fig. 2).

Rezultatele de față confirmă observațiile noastre precedente, bazate pe experimentele *single-channel*, unde nu au fost observate diferențe semnificative decât la concentrații de ACh de

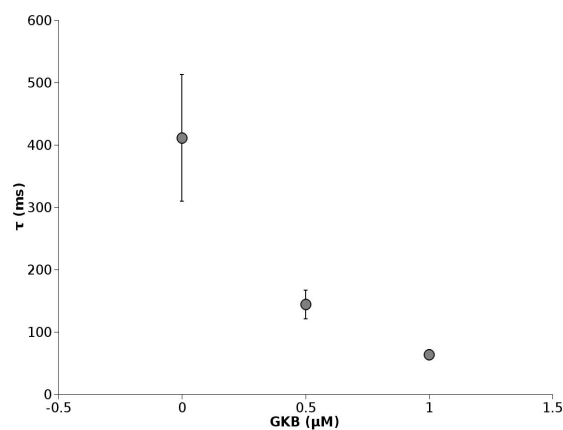
100  $\mu\text{M}$ . În ceea ce privește procesul de desensibilizare a receptorilor, reflectat de constanta de timp a exponențialei pantei ascendente a curenților whole-cell, rezultatele noastre arată că procesul de desensibilizare nu este influențat în mod semnificativ de concentrația de ACh aplicată (am obținut o constantă de timp de 280.63 ms ( $n=3$ ) pentru ACh 20  $\mu\text{M}$ , respectiv 341.16 ms ( $n=3$ ) pentru 50  $\mu\text{M}$ ).

Co-aplicarea de GKB induce însă o modificare a procesului de desensibilizare a receptorilor (Fig. 4), în sensul unei scăderi dependente de concentrație a constantei de timp a procesului (Fig. 5). Co-aplicarea de GKB 1  $\mu\text{M}$  nu induce diferențe semnificative în procesul de revenire din desensibilizare a receptorilor (amplitudinea celui de-al doilea curent din pulsul aplicat a fost de  $0.17 \pm 0.04$ ) (Fig. 3.).



**Fig. 4.** Desensibilizare mai rapidă a receptorilor nicotiniци la coaplicarea de ACh + GKB, comparativ cu aplicarea de ACh singură.

Rezultatele noastre din etapa anterioară, obținute prin măsurători *single-channel*, au arătat că GKB afectează semnificativ conductanța receptorilor nicotiniци, posibil printr-un efect de potențare allosterică.



**Fig. 5.** Constanta de timp a procesului de desensibilizare a receptorilor nicotiniци în urma aplicării de ACh, în absența GKB și în prezența a diferite concentrații de GKB.

Ținând cont de aceste informații, este posibil ca potențarea allosterică a receptorilor nicotiniici să fie însoțită, ca urmare a modificărilor conformaționale induse de interacțiunea cu GKB, și de o modificare a cineticii de desensibilizare a receptorului nicotinic. Toate aceste fenomene pledează pentru o legare directă a GKB la receptorul nicotinic pentru ACh, ipoteză susținută de apariția (chiar dacă doar în cazuri izolate) a unor curenți *whole-cell* determinați exclusiv de aplicația de GKB, și de observarea unor deschideri de canale ionice cu un nivel conductiv diferit în configurația cell-attached.

Nu putem exclude însă nici prezența, pe suprafața celulelor liniei TE 671, a unui alt receptor asupra căruia GKB să acționeze în mod direct, receptor a cărui activare să moduleze cinetica receptorului nicotinic. Pentru confirmarea sau infirmarea acestei ipoteze sunt necesare alte categorii de experimente, utilizând blocați specifici ai activării receptorului nicotinic.

### **Diseminarea rezultatelor (2010)**

#### **Articole ISI**

1. A. Iftime, A. Popescu, C. Ganea, On the mechanisms of galantamine interaction with artificial lipid bilayers, *Romanian Biotechnological Letters*, 2010, 15(6) sub tipar
2. I. Baran, A. Iftime, A. Popescu, Diffusion-convection effects on drug distribution at the cell membrane level in a patch-clamp setup, *BioSystems*, 2010, 102, pp.134-147
3. A. Popescu, A. Bicho, C. Ganea, Effects of Quercetin on Muscle-Type Nicotinic Receptor Activation and Desensitization, *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(1) acceptat

#### **Articole BDI (Index Copernicus)**

7. A. Iftime, A. Popescu, C. Ganea, On the galantamine interaction with artificial lipid membranes, *Rom. J. Biophys.* 2010 20(2): 93-100
8. A. Popescu, A. Iftime, C. Ganea, Ginkgolide B effects on artificial lipid membranes, *Rom. J. Biophys.* 2010, 20(4), p. 283-293