

Az affinitás és akcesszibilitás szerepe az ioncsatornákon ható gyógyszerek hatásmechanizmusában

Doktori tézisek

Szabó Anett

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mike Árpád, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kozsurek Márk, Ph.D.,
egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Török Tamás, D.Sc.,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Köles László, Ph.D.,
egyetemi docens
Dr. Világi Ildikó, Ph.D.,
egyetemi docens

Budapest
2016

1. Bevezetés

A matematikai modellezés célja az elektrofiziológia területén a működés mechanizmusának megértése az ioncsatornák, egész sejtek, illetve sejthálózatok szintjén. Az egyedi ioncsatornák viselkedését, illetve a csatorna-populáció viselkedését tükröző ionáramok kialakulásának háttérben álló mechanizmusok tisztázására Markov-típusú kinetikai modelleket hívhatunk segítségül. Disszertációmban ezen kinetikai modellek alkalmazásait tárgyalom az ioncsatornák farmakológiájában.

Az ioncsatornák különböző konformációs állapotokban létezhetnek (pl. zárt, nyitott, deszenzitizált, illetve inaktivált). Az ioncsatornákra ható gyógyszerek hatásmechanizmusának egyik legfontosabb eleme az állapotfüggés: a ligandum-fehérje kölcsönhatás más és más a különböző konformációk esetén. A kölcsönhatás különbözőségét általában affinitás-különbséggel jellemzik. Disszertációm egyik legfontosabb üzenete, hogy sokszor a pusztán affinitás-különbség nem magyarázza meg kielégítően a hatásmechanizmust, az affinitás és az akcesszibilitás különbségeit egyszerre

szükséges tanulmányozni. Két példát mutatok be erre az általános elvre, az $\alpha 7$ -es altípusú nikotinos acetilkolin receptor ($\alpha 7nAChR$) pozitív allosztérikus modulátorainak és agonistáinak interakcióját, illetve a nátriumcsatornát gátló gyógyszerek hatásmechanizmusának sokféleségét. Elektrofiziológiai mérési eredményeinket mindkét esetben kinetikai modellezés segítségével értelmeztük.

A kognitív funkciókat javító hatóanyagok az utóbbi években egyre inkább a gyógyszerkutatók fókuszába kerülnek. Az egyik legígéretesebb célpontnak a kolinerg rendszer $\alpha 7$ -es altípusú nikotinos acetilkolin receptora bizonyult. Az ezeken a receptorokon ható pozitív allosztérikus modulátorok (PAM-ok) nagy előnye az agonistákkal szemben, hogy nem aktiválják és deszenzitizálják válogatás nélkül a receptorokat a teljes központi idegrendszerben, mivel önmagukban nem képesek aktiválni a receptort, csupán az agonista hatását modulálják. Ennek következtében a fiziológiás neurális aktivitás térbeli és időbeli mintázata megőrződik, csupán a válaszok mérete nő meg. Ezek a vegyületek ígéretes gyógyszer-jelölt molekulák a kognitív funkciók romlásával járó kórképekben, elsősorban Alzheimer-kórban és skizofréniában. A legtöbb PAM vegyületet

csak nemrégiben fedezték fel. Keveset tudunk arról, hogy ezek a vegyületek milyen módon hatnak az $\alpha 7nAChR$ -ra. Az egyik legkiterjedtebben tanulmányozott II-es típusú PAM a *PNU-120596* vegyület. Az utóbbi évek szolgáltak néhány fontos eredménnyel ezen vegyület hatásmechanizmusára vonatkozóan, így többek között a vegyületnek a *single-channel* viselkedésre kifejtett hatására, a hatás sztöchiometriájára és hőmérsékletfüggésére vonatkozóan. Mindemellert azonban a *PNU-120596* vegyület hatásmechanizmusának néhány alapvető aspektusa, mint például az állapotfüggés, vagy az agonistával való kölcsönhatás természete még nem tisztázottak, ezért ezek felderítését tűztük ki célul munkánk egyik részében.

A feszültségfüggő nátriumcsatornák hibás működésének következményeként kialakuló túlzott ingerelhetőség számos kórképben jellemző, a csatornák változatos elhelyezkedésüknek és funkciójuknak köszönhetően számos kórképben válnak gyógyszercélpontrá (pl. epilepszia, neurodegeneratív kórképek, izomgörcsök, fájdalom, szívritmuszavarok stb.). A kilenc nátriumcsatorna altípus gyógyszerkötőhelyei közötti magas szerkezeti- és

szekvenciahomológia miatt a gátlószerek altípus-szelektivitása elhanyagolható. Ezért nem teljesen tisztázott, hogy a lényegében ugyanazon a célponton ható vegyületek terápiás hatása hogyan mutathat ilyen diverzitást. Azt gondoljuk, hogy a terápiás diverzitás legfontosabb eleme az eltérő hatásmechanizmus lehet. Ez azonban egy nagyon kevésbé kutatott kérdés a szakirodalomban, mivel a tudományos közvélemény a nátriumcsatorna gátlók hatásmechanizmusát lényegében azonosnak tekinti (kevés kivétellel). A jellegzetes gátlási tulajdonságok (feszültség-függés, használat-függés, frekvencia-függés, stb.) magyarázatára két alternatív magyarázatot javasoltak: a „modulált receptor hipotézis” az affinitásbeli különbségeket hangsúlyozza, míg a „rejtett receptor hipotézis” az akcesszibilitásbeli különbségekkel magyarázza az állapotfüggést. Munkánk másik részének az volt az alapgondolata, hogy a két hipotézis nem egymást kizáró, hanem valószínűleg együtt létező mechanizmusokat ír le. Olyan módszer kidolgozását tűztük ki célul, amellyel a két hipotézist közös elméleti rendszerbe foglalhatjuk, és amelynek segítségével az egyes gátlószerek hatásmechanizmusához való hozzájárulásukat kvantifikálhatjuk.

2. Célkitűzések

Munkám során a PNU-120596 vegyület $\alpha 7nAChR$ -on kifejtett hatásának mechanizmusát, illetve öt nátriumcsatorna gátló vegyület hatásmechanizmusát kívántam megvizsgálni kinetikai modellezés segítségével. A hatásmechanizmus-vizsgálatokban jellemzően nem vizsgálják, hogy a kötőhely affinitásának, vagy akcesszibilitásának megváltozása áll-e a hatás kialakulásának hátterében. A két folyamat elkülönítése a gyógyszerfejlesztés szempontjából is igen fontos lehet. Mindkét problémát ebből az aspektusból közelítettem meg.

2.1. Az affinitás és akcesszibilitás szerepe a PNU-120596 vegyület és az agonisták kölcsönhatásában

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen mechanizmus áll a kolin és a PNU-120596 vegyület együttes perfúziója során megfigyelhető bifázikus áram kialakulásának hátterében?
- Rendelkezik a modulátor állapotpreferenciával: van különbség a PNU-120596 vegyület különböző receptor-konformációkhoz való affinitásában?

Vitatott, hogy a PAM növeli-e az agonista affinitását. Látszólagos növekedés megfigyelhető, de ez nem feltétlen jelent valódi affinitás-növekedést. A csatorna kapuzási kinetikája ugyanis olyan gyors, hogy a leggyorsabb oldatcserélő rendszerrel sem lehetett még időben feloldani. Ezért az agonistával kiváltott áramokból előállított koncentráció-válasz görbe torzított; mégpedig minél nagyobb a koncentráció, annál nagyobb a torzítás. Mivel a PAM lelassítja a kinetikát, a nagyobb koncentrációk hatása is torzítatlanul mérhető. Így lehetséges, hogy a modulátor nem az affinitást növeli, csupán felfedi a valós koncentráció-válasz görbét. Ezért a következő kérdéseket is tisztázni kívántuk:

- Van kooperativitás az agonista és a modulátor között?
- Ha van kooperativitás, akkor kölcsönös az? (Megnöveli a PNU-120596 vegyület a kolin affinitását vagy csökkenti annak akcesszibilitását? Hatással van az agonista a PAM kötőhelyére?)

2.2. Az affinitás és akcesszibilitás szerepe a nátriumcsatornát gátló vegyületek hatásának állapotfüggésében

Öt különböző nátriumcsatorna gátló vegyület (*lidocaine, bupivacaine, phenytoin, riluzole* és *flecainide*) hatásának állapotfüggését vizsgáltuk. A következő kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan tudnánk a kérdést módszertanilag megközelíteni? Lehetséges a „moduláltság” (vagyis állapotfüggő affinitás) és a „rejtettség” (vagyis állapotfüggő akcesszibilitás) mértékét kvantifikálni egy adott gátlószer esetében?
- Különböznek az ismert nátriumcsatorna gátló gyógyszerek abban, hogy az affinitás változásának vagy az akcesszibilitás változásának van nagyobb szerepe hatásmechanizmusukban?
- Meg tudjuk határozni a csatorna egyes konformációs állapotaihoz tartozó affinitást és akcesszibilitást? Ez a hatásmechanizmus teljes leírásával lenne egyenértékű.

3. Módszerek

A kísérleteket a patch-clamp technika egészsejtes ("whole-cell") illetve kitépelt membránfolt ("outside-out patch") konfigurációiban végeztük patkány $\alpha 7$ nAChR-t kifejező GH4C1 sejtekben, illetve rNav1.2 nátriumcsatornákat kifejező HEK-293 sejtekben. Az áramok regisztrálásához Axopatch 200B erősítőt és a pClamp szoftvert használtuk. Az áramokat 20 kHz-el mintavételeztük és 10 kHz-es aluláteresző szűrővel szűrtük. Az $\alpha 7$ nAChR-ok esetében a tartófszültség -70 mV volt. A nátriumcsatornák esetében -150 mV tartófszültségről 0 mV-ra történő depolarizációkkal váltottuk ki az áramokat. A depolarizációt minden 55 ms-ban megismételtük, összesen 600-szor, a 200-adiktól a 400-adik depolarizációig történt a gyógyszerek perfúziója. Öt különböző protokollt használtunk, amelyek csak a depolarizációk részarányában tértek el egymástól; ezek a teljes ciklus 5, 19, 50, 81, és 95%-át tették ki.

Az oldatcserét az $\alpha 7$ nAChR-ok esetében „*liquid filament switch*” módszerrel, ún. theta csövek segítségével oldottuk meg, amelyeket piezoelektromos egység (Burleigh LSS-3200 system) mozgatott. Ez a

módszer rendkívül gyors anyagadást tesz lehetővé. Az oldat kicserélődési időket minden sejtnél junkciós potenciál alapú kalibrációval határoztuk meg, tipikusan 0,5 – 2 ms 10-90 % os kicserélődési időket használtunk. A nátriumcsatornák esetében nyomásvezérelt (DAD-12 rendszer) kettős U-cső rendszerrel történt az oldatcsere. A 10 – 90 % oldatkicserélődési idők a kalibrációk alapján 10 – 50 ms között voltak.

A gyógyszereket a Sigma-tól (*choline, lidocaine, bupivacaine, phenytoin, riluzole*) illetve a Tocris-tól (*PNU-120596, flecainide*) szereztük be.

Munkám során a differenciál-egyenlet-rendszereket a *Berkeley Madonna v8.0.1.* és a *Mathematica 9.0* nevű programok segítségével oldottam meg. Mindkét program negyedrendű Runge-Kutta módszert használt a megoldás során. A számítógépes optimalizációt a *Mathematica* nevű programmal végeztem.

4. Eredmények

4.1. Az affinitás és akcesszibilitás szerepe a PNU-120596 vegyület és az agonisták kölcsönhatásában

Az $\alpha 7$ nAChR esetében a kísérletek során 10 mM kolin és 10 μ M PNU-120596 együttes perfúziója esetén bifázikus áram kialakulását figyeltük meg, melyet egy kezdeti gyors áramcsúcs és egy azt követő hosszabb, elnyúlt aktiváció jellemezett. A bifázikus áram két komponense még viszonylag magas modulátor koncentráció esetén is (10 μ M PNU-120596) jól elkülönült egymástól.

Az első áramkomponens lefutása pontosan megegyezett a csak kolin által kiváltott áraméval, vagyis ezt a komponenst a PNU-120596 jelenléte nem befolyásolta, még hosszabb elő-inkubáció esetén sem. Ez arra utal, hogy a modulátor csak a deszenzitizált állapotban lévő receptorhoz képes asszociálni, a nyugalmi állapotban lévő receptorhoz nem. Az előinkubáció hatása ugyanakkor jól látszott a második komponens gyorsabb felfutásán, amit feltételezésünk szerint az okozott, hogy a vegyületnek volt ideje

partícionálódni a membránba, illetve eljutni a kötőhely közelébe. Kinetikai szimulációkban teszteltük, milyen mértékű preferenciával szükséges a modulátornak rendelkeznie a deszenzitizált állapot irányában. Ahhoz, hogy a kísérletben tapasztalhoz hasonló mintázatot kapjunk, legalább 44-szeres preferenciát kellett definiálnunk.

A különböző deszenzitizált állapotokra gyakorolt hatást agonista előkezeléssel vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy több különböző deszenzitizált állapotnak kell léteznie és a PNU-120596 vegyület főleg a mélyebb deszenzitizált állapotból már nem képes a receptorokat újra aktiválni.

Az áram lecsengését 10 mM kolin és 10 μ M PNU-120596 együttes perfúzióját követően három különböző esetben vizsgáltuk: i.) az agonistát és a modulátort is eltávolítottuk, ii.) a modulátort eltávolítottuk, az agonista perfúzióját folytattuk, iii.) az agonistát eltávolítottuk, a modulátor perfúzióját folytattuk. Azt tapasztaltuk, hogy a PNU-120596 vegyület radikálisan csökkentette a kolin disszociációjának sebességét.

Az áram lecsengésének modellezése során enyhe (1,25 - 2,1-szeres) affinitás-növekedés mellett határozott (100 - 1000-szeres) akcesszibilitás-csökkenést kellett feltételeznünk a kísérleti görbék reprodukálásához.

Az affinitás látszólagos növekedését szimulációkban reprodukáltuk a mikroszkopikus affinitásra gyakorolt hatás teljes hiányában is.

4.2. Az affinitás és akcesszibilitás szerepe a nátriumcsatornát gátló vegyületek hatásának állapotfüggésében

A nátriumcsatorna gátlók hatásának megértése érdekében olyan modellt dolgoztunk ki, amelyben a paraméterek közvetlenül jellemezték az egyes állapotokhoz tartozó affinitást és akcesszibilitást. Így a "modulált-" és "rejtett receptor hipotézisek" kontribúcióját számszerűen értékelni tudtuk.

A *lidocaine* és *bupivacaine* esetében elég volt egyszerű inaktivált állapot preferenciát feltételezni olyan módon, hogy az affinitás-növekedést az asszociáció felgyorsulása okozza, míg a disszociáció sebessége nem változik. Az irodalmi adatok ismeretében és a kinetikai

modellézés eredményei alapján ezt úgy interpretáltuk, hogy a disszociáció valószínűleg lelassul, de ezt egy vele azonos mértékű akcesszibilitás-növekedés kompenzálja.

A *phenytoin* és a *riluzole* esetében jellegzetes mintázatot figyeltünk meg: az öt protokoll közül az első háromban nagyjából azonos, kismértékű gátlást mutattak, majd a gátlás hirtelen megnőtt a 4. és 5. protokollokban. Ezt a mintázatot legjobban úgy lehetett reprodukálni, ha feltételeztünk egy alacsony affinitással, akcesszibilitással és állapotfüggéssel rendelkező kötőhelyet, amely az 1. – 3. protokollokban látott gátlásért volt felelős és feltételeztünk egy ettől eltérő, nagy állapotfüggéssel jellemezhető kötőhelyet, amely azonban nem járt csatorna blokk mechanizmusú gátlással, a gátlást tisztán modulációval okozta.

A két vegyület által okozott gátlás ugyanakkor markánsan különbözött; a *phenytoin* esetében az affinitás változása volt a legszembetűnőbb, míg a *riluzole* esetében a kinetika gyökeres átalakulása.

A *flecainide* által okozott gátlás szinte teljesen reprodukálható volt a nyitott állapothoz való akcesszibilitás nagymértékű (~1000-szeres) megnövelésével.

5. Következtetések

A PNU-120596 vegyület $\alpha 7nAChR$ működésére kifejett moduláló hatásának vizsgálta során a következő legfőbb következtetésekre jutottunk:

- i. A PNU-120596 affinitása a nyugalmi állapotú receptorokhoz alacsony, a vegyület elsősorban a deszenzitizált receptorokhoz asszociál.
- ii. A PNU-120596 drasztikusan lelassítja a kolin disszociációját, ennek hátterében valószínűleg az akcesszibilitás csökkenése áll.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a fiziológiához hasonló körülmények között, amikor a modulátor folyamatos jelenlétében az agonista pulzusokban érkezik, a következő eseménysor játszódik le: az agonista-pulzus érkezése előtt a PNU-120596 a nyugalmi állapothoz való alacsony affinitása miatt nem tud kötődni az agonsitától mentes, nyugalmi állapotú receptorhoz. Amint az agonista megérkezik, az könnyen tud asszociálni a modulátortól mentes receptorhoz és deszenzitizálja azt, ezzel hozzáférést biztosítva a modulátor számára annak kötőhelyéhez. A modulátor kötése konformáció-változások sorozatát indítja be, melynek során a nyitott

állapot energetikailag kedvezőbb és melynek következtében az agonista disszociációja radikálisan lelassul: a modulátor „csapdába ejti” az agonistát a kötőhelyén. Ez a receptor elnyújtott aktivitását eredményezi, az agonista hatását felerősíti és elnyújtja. Miután az agonista végül disszociál, a modulátor is disszociál és a receptor újra felveheti kezdeti nyugalmi konformációját, a kör bezárul. Fiziológias körülmények között ez a mechanizmus különösen hatékony módját jelenti a jel felerősítésének.

A kooperativitás tehát létezik, de nem szimmetrikus, és a két kötőhely nem elsősorban egymás affinitására hat. Az akcesszibilitásra gyakorolt hatás, és a kötési és kapuzási folyamatok interakciójának speciális dinamikája felelős a funkcionális kooperativitásért.

A nátriumcsatorna gátlókkal végzett kísérleteink legfontosabb következtetése, hogy a látszólagos hasonlóság ellenére az egyes nátriumcsatorna gátló szerek hatásmechanizmusa alapvetően és gyökeresen különbözhet mind az affinitás vs akcesszibilitás állapotfüggésben betöltött szerepében, mind pedig a különböző konformációs állapotoknak a molekulák hatásában való közreműködésében, sőt még magában a

kötőhely helyzetében is. A nátriumcsatornát gátló vegyületek hatásmechanizmusában megfigyelhető diverzitás jelentősége az, hogy a hatásmechanizmusuk meghatározhatja a terápiás alkalmazhatóságukat. Terápiás szempontból különleges jelentősége van az általunk talált "csatorna-blokk-mentes-modulátor-kötőhelynek". A különböző gátlószerek hatásmechanizmusainak feltérképezésével megtudhatjuk, hogy egy adott terápiás indikációra milyen hatásmechanizmusú gátlószert érdemes fejleszteni, ami lényegesen növelheti a gyógyszerfejlesztés hatékonyságát.

6. Saját publikációk

- [1] Szabo AK , Pesti K , Mike A , Vizi ES Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. NEUROPHARMACOLOGY 81C: pp. 42-54. (2014)
- [2] Pesti K , Szabo AK , Mike A , Vizi ES Kinetic properties and open probability of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. NEUROPHARMACOLOGY 81C: pp. 101-115. (2014)