

## TYTUŁ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Allosteryczna modulacja receptorów serotoninowych 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>7</sub> przez jony cynku.**

### STRESZCZENIE

Allosteria to proces regulacji wielu protein. Mimo, że od kilkunastu lat intensywnie badana jest w grupie receptorów związanych z białkami G, to znane przykłady allosterycznej modulacji w rodzinie metabotropowych receptorów serotoninowych obejmują tylko cztery przykłady. Jednym z nich jest, wykryty w badaniach *in vitro*, hamujący wpływ jonów cynku na powinowactwo selektywnych ligandów: antagonisty (<sup>3</sup>H)WAY-100635) i agonisty (<sup>3</sup>H)8-OH-DPAT) do receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. Został on zdefiniowany jako negatywna modulacja allosteryczna w odniesieniu do obu ligandów, jednak, niejednoznaczne wyniki, na których oparto ocenę efektów cynku wobec [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-u, mogły rodzić wątpliwości, że przypisanie tego mechanizmu działania w odniesieniu do agonisty jest przedwczesne. Szczególnie, że w świetle badań prowadzonych w IF PAN, przeciwdepresyjne działanie jonów cynku obserwowane w behawioralnych modelach depresji, jest odwracane po podaniu antagonisty WAY-100635, co sugeruje odwrotny kierunek wpływu.

Zatem, pierwsza część badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej została poświęcona wyjaśnieniu mechanizmu bezpośredniego oddziaływania cynku na aktywność agonistów do receptorów 5-HT<sub>1A</sub>. W tym celu przeprowadzono szereg eksperymentów wiązania specyficznego radioliganda (<sup>3</sup>H)8-OH-DPAT): saturacji, kompetycji, testów kinetycznych asocjacji i dysocjacji, jak też funkcjonalnych (test komórkowy LANCE) do oceny efektów stymulacji receptorów. We wszystkich doświadczeniach wykorzystywano komórki linii HEK293 ze stabilną ekspresją receptorów 5-HT<sub>1A</sub>.

Na podstawie otrzymanych wyników, wykazano złożony (zależny od stężenia) mechanizm działania jonów cynku. W stężeniach sub-mikromolarnych (10 μM) obserwowano nasilenie wiązania agonisty do receptorów 5-HT<sub>1A</sub>, jak też wzrost efektów aktywacji receptora w teście funkcjonalnym. Natomiast użycie jonów cynku w stężeniu 500 μM, obniżały powinowactwo agonisty w eksperymentach wiązania radioliganda. Otrzymane dane były zgodne z agonistycznymi i antagonistycznymi efektami działania cynku obserwowanymi w badaniach *in vivo*.

Celem drugiej części badań, była ocena czy jony cynku, będąc endogennym modulatorem receptorów 5-HT<sub>1A</sub> (oraz kilku innych typów receptorów GPCR) mogą regulować allosterycznie także receptory typu 5-HT<sub>7</sub>. Przesłankami wskazującymi ten kierunek badań były: wspólna z receptorami 5-HT<sub>1A</sub>, lokalizacja w limbicznych strukturach mózgu, odpowiedzialnych m.in. za kontrolę nastroju i pamięć, oraz wykrycie regulacji allosterycznej receptora 5-HT<sub>7</sub> przez inną endogenną substancję – oleamid.

Podobnie jak w przypadku receptorów 5-HT<sub>1A</sub>, wpływ jonów cynku badano w eksperymentach wiązania znakowanych radioligandów oraz funkcjonalnych. Doświadczenia prowadzono z zastosowaniem komórek HEK293 wykazujących nadekspresję receptorów 5-HT<sub>7</sub> oraz wobec trzech różnych radioligandów: agonisty [<sup>3</sup>H]5-CT oraz antagonistów [<sup>3</sup>H]SB-269970 i [<sup>3</sup>H]mesulerginy. W testach funkcjonalnych, dodatkowo określono wpływ jonów cynku w stężeniu 10 μM na aktywność konstytutywną receptorów 5-HT<sub>7</sub>. W przeprowadzonych badaniach cynk wykazywał głównie działanie hamujące w stosunku do aktywności badanych ortosterycznych ligandów. Zatem, na podstawie wyników otrzymanych w eksperymentach wiązania specyficznych radioligandów, mechanizm działania cynku w receptorach 5-HT<sub>7</sub> można było zaklasyfikować jako negatywną modulację allosteryczną zarówno wobec agonistów jak i antagonistów. Natomiast w testach funkcjonalnych cynk, badany w stężeniu 10 μM, przejawiał cechy neutralnego antagonisty. Biorąc pod uwagę, że stężenie znajdującego się pozakomórkowo cynku jest niższe od 100 μM, efekty zaobserwowane w badaniach w obecności 10 μM cynku, przyjęto jako reprezentację jego prawdopodobnego mechanizmu działania w warunkach fizjologicznych zarówno wobec receptorów 5-HT<sub>1A</sub> jak i 5-HT<sub>7</sub>.

Co istotne, określone dla cynku typy modulacji allosterycznej były zgodne pod względem profilu funkcjonalnego z agonizmem do receptorów 5-HT<sub>1A</sub> i antagonizmem do receptorów 5-HT<sub>7</sub>, które odpowiadają za aktywność przeciwdepresyjną ligandów w różnych modelach behawioralnych. Zatem, w świetle otrzymanych wyników, można było uznać, iż pozytywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT<sub>1A</sub> oraz negatywna allosteryczna modulacja receptorów 5-HT<sub>7</sub> mogą odgrywać rolę w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania jonów cynku.