

Poznanie mechanizmów funkcjonowania białek to jedno z najwiskszych wyzwa współczesnej biologii. Białka spełniają swoje funkcje zmieniając pod wpływem różnych czynników swoją strukturę i właściwości funkcjonalne, przy czym określone makromolekuły, w zależności od warunków, mogą przyjmować ograniczoną liczbę precyzyjnie określonych stanów zwanych konformacjami. O ile występowanie stanów konformacyjnych poszczególnych białek jest rzeczą znaną i mocno ugruntowaną, to opis molekularnych zmian jakie towarzyszą określonym przejściom konformacyjnym pozostaje ciemny, dla bardzo wielu białek, bardzo niepełny. Niezwykle interesującą grupę białek stanowią kanały jonowe, których zadaniem jest przewodzenie poszczególnych jonów w celu kontroli napięcia elektrycznego na błonie komórkowej. Dzięki zastosowaniu techniki patch-clamp możemy precyzyjnie mierzyć prądy przepływające przez pojedyncze kanały w żywych komórkach. Co ciekawe, prądy te w sposób dosłowny odzwierciedlają zmiany konformacji kanału, gdy funkcjonują najczęściej w formie zero-jedynkowej (stan zamknięty i otwarty), przy czym w stanie otwartym przewodnictwo charakteryzuje się stałą wartością. Warto zaznaczyć, że wysoka precyzja pomiarów z zastosowaniem tej techniki dostarcza bardzo szczegółowych informacji na temat zmian konformacyjnych tych makromolekuł. O ile obserwacja i opis konsekwencji zmian konformacyjnych w postaci otwartych i zamkniętych kanałów należy już do klasyki neurofizjologii komórkowej, to zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw zmian konformacyjnych tych białek jest bardzo niepełne. Poznanie tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie, gdyż nie tylko pozwala na pełniejszy opis funkcjonowania białek, ale również może ułatwić projektowanie i syntezę leków, których efekty terapeutyczne wiążą się z oddziaływaniem na receptory. Niniejszy projekt stawia sobie za cel pełniejsze zrozumienie mechanizmów molekularnych zmian konformacyjnych jonotropowego receptora $GABA_A$, który w dojrzłym mózgu pełni kluczową rolę w procesach hamowania. Aktywacja (otwarcie) tego receptora jest konsekwencją związania dwóch molekuł agonisty ($GABA$) w miejscach wiązających. Co ciekawe, miejsca wiązające w tym receptorze zlokalizowane są na styku podjednostki głównej i uzupełniającej w dużej odległości od poru kanału (ok. 5 nm), gdzie ostatecznie dokonuje się zmiana konformacji z zamkniętej do otwartej. Oznacza to, że zaindukowane przez wiązanie agonisty zmiany mechaniczne w makromolekule tego receptora dotyczą dużych fragmentów tego białka i że proces ten jest najprawdopodobniej niezwykle złożony. Aby sprostać ambitnemu zadaniu opisanego tych mechanizmów, proponujemy interdyscyplinarne podejście bazujące na zaawansowanych badaniach elektrofizjologicznych (zarówno na poziomie makroskopowym jak i pojedynczych kanałów), na wykorzystaniu technik biologii molekularnej w celu wprowadzania określonych mutacji (mutageneza) oraz na modelowaniu strukturalnym opartym o modele homologii i dynamiki molekularnej. W praktyce, pozwoli to na, przykładowo, wprowadzenie mutacji w określonym miejscu białka i stwierdzenie przy pomocy technik elektrofizjologicznych jaki efekt wywarła ta mutacja na kinetykę zmian konformacyjnych tego kanału. Modelowanie z zastosowaniem dynamiki molekularnej pozwoli nam na wskazanie najbardziej prawdopodobnych scenariuszy zmian molekularnych towarzyszących poszczególnym przejściom konformacyjnym w różnych fragmentach tego białka. Nasze niedawno przeprowadzone badania z zastosowaniem tej metodologii pozwoliły na wskazanie, iż proces przejścia z konformacji zamkniętej do otwartej odbywa się za pośrednictwem stanu pośredniego zwanego preaktywowanym (Szczot et al. 2014, Journal of Neuroscience). Odkrycie to pozwoliło na pełniejsze zrozumienie funkcjonowania receptora $GABA_A$, jak również na dokładniejszy opis mechanizmów jego modulacji przez różne czynniki farmakologiczne. Niniejszy projekt badawczy składa się z szeregu szczegółowych zadań badawczych, które jednak sprowadzają się do weryfikacji centralnej hipotezy, że oddziaływanie molekularne cząsteczek agonisty z poszczególnymi elementami strukturalnymi w miejscach wiązających prowadzi do przesunięcia sztywnych elementów o strukturze beta-kartek w segmencie zewnętrznym makromolekuły prowadząc do kooperatywnego ruchu tych elementów zarówno w podjednostce głównej jak i uzupełniającej, co z kolei, za pośrednictwem oddziaływań z odpowiednimi partiami miedzysieciowymi helisami transmembranowymi prowadzi do kolektywnej reorganizacji struktury poru kanału skutkującej jego otwarciem. Postulujemy, że zainicjowany przez wiązanie agonisty w miejscu wiązającym ruch mechaniczny elementów makromolekuły ulega rozdzieleniu na dwa "strumienie" w podjednostce głównej i uzupełniającej. Ze względu na asymetrię strukturalną tych dwóch podjednostek, zmiany molekularne towarzyszące tym "strumieniom" najprawdopodobniej wykazują różnice. Z drugiej strony, wspomniane wyżej oddziaływania za pośrednictwem długich i sztywnych beta-kartek sprawiają, że "strumienie" te są ze sobą silnie funkcjonalnie sprzężone. W celu uzyskania informacji o sekwencyjnym ruchu poszczególnych elementów strukturalnych białka zastosujemy tzw. analizę REFER (od strony technicznej wymaga ona precyzyjnych pomiarów aktywności pojedynczych kanałów), która została już z sukcesem zastosowana dla innego receptora jonotropowego (AChR) oraz dynamiki molekularnej. Spodziewamy się, że wyniki realizacji tego projektu w sposób znaczący poszerzą nasz wiedzę na temat molekularnych mechanizmów aktywacji receptora $GABA_A$. Wiedza ta będzie bardzo pomocna przy opisie modulacji funkcji tego receptora pod wpływem szeregu endogennych i egzogennych czynników (w tym wspomnianych już leków).