

# Alfa7 altípusú nikotinos acetilkolin receptorok pozitív alloszterikus modulátorainak hatásmechanizmus vizsgálata

Doktori értekezés

**Pesti Krisztina**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

A bíráló bizottság elnöke: Dr. Csanády László Ph.D egyetemi tanár

Opponensek: Dr. Bartók Ádám Ph.D tudományos főmunkatárs

Dr. Némethy Zsolt Ph.D, tudományos főmunkatárs

Tagok: Dr. Varró Petra Ph.D, tanársegéd

Dr. Zelles Tibor Ph.D egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Köles László Ph.D, egyetemi docens

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

Dr. Iring András Ph.D, tudományos főmunkatárs

Martonvásár

2020

## Tartalomjegyzék

	Rövidítések jegyzéke.....	3
1	Bevezetés.....	8
1.1	A kognitív hanyatlás gyógyszeres kezelése.....	8
1.2	Rövid tudománytörténeti áttekintés.....	11
1.2.1	Az elektrofiziológia fejlődése.....	12
1.3	Farmakológiai bevezető.....	15
1.4	Az acetilkolin receptorok.....	17
1.4.1	Metabotróp receptorok .....	18
1.4.2	Ionotróp receptorok .....	19
1.4.3	A $\alpha 7$ nAChR-ra ható anyagok, fontosabb ligandok .....	29
2	Célkitűzések .....	40
3	Módszerek .....	42
3.1	A sejtes elektrofiziológiai módszerek és műszerek általános ismertetése	42
3.1.1	A patch clamp technika .....	42
3.1.2	A manuális patch clamp rendszer felépítése.....	45
3.1.3	Az oldatcserélő rendszer felépítése .....	46
3.1.4	Nagy áteresztő képességű rendszerek: Automata patch clamp (APC).....	48
3.1.5	Ionflux Mercury HT .....	51
3.2	A dolgozatban használt módszerek részletes ismertetése.....	53
3.2.1	Manuális patch clamp.....	53
3.2.2	Automata patch clamp .....	54
3.2.3	Hatóanyagok.....	54
3.2.4	Sejtkultúra.....	55
4	Eredmények.....	56
4.1.1	Kísérleti előzmények .....	56
4.1.2	Manuális patch clamp kísérletek .....	60
4.1.3	Automata patch clamp előkísérletek.....	82
5	Megbeszélés .....	90
6	Következtetések .....	95
7	Összefoglalás.....	98
8	Summary .....	99

9	Irodalomjegyzék.....	100
10	Saját publikációk jegyzéke.....	126
11	Köszönetnyilvánítás .....	127
12	Függelék.....	128

**Rövidítések jegyzéke**

[ <sup>3</sup> H]A-585539	[(3)H](1S,4S)-2,2-dimetil-5-(6-fenilpiridazin-3-il)-5-aza-2-azoniabicyklo[2.2.1]heptán
2,3,5,6MP-TQS	cisz-transz-4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciklopenta[c]quinolin-8-szulfonamid
2NDEP	1,1-dietil-4(naftalén-2-il)piperazin-1-ium
4BP-TQS	4-(4-Bromofenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciklopenta[c]quinoline-8-szulfonamid
5-HI	5-hidroxi-indol
5HT-3R	szerootonin receptor
A-867744	4-(5-(4-klorofenil)-2-metil-3-propionil-1H-pirrol-1-yl)benzénszulfonamid
AA	alloszterikus aktivátor (Ago-PAM)
ABT-107	[5-(6-[(3R)-1-azabicyklo[2.2.2]okt-3-iloxi] piridazin-3-il)-1H-indol]
AC	adenilát-cikláz enzim
ACh	acetilkolin
AchBP	acetilkolin kötő fehérje
AchEI	Acetilkolinészteráz gátló
ALV-3288	(=CCMI, XY4083) (Z)-3-(4-kloroanilino)-N-(4-klorofenil)-2-(3-metilisoxazol-5-il)prop-2-enamid
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionsav receptor
APC	automata patch clamp
ATP	adenozin-trifoszfát

AZD0328	3'H-4-Azaspiro[biciklo[2.2.2]oktán-2,2'-furo[2,3-b]piridin]
B-973	3-(3,4-difluorofenil)-N-(1-(6-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)pirazin-2-il)etil)propanamid
B-973B	[(S)-3-(3,4-difluorofenil)-N-(1-(6-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)pirazin-2-il)etil)propanamid]
BNC375	4-[(1R,3R)-3-[(5-kloro-2-metoxianilino)metil]-2,2-dimetil-ciklopropil]benzén-szulfonamid
BSA	borjú szérum albumin
CA1	hipokampusz, Ammon szarv ( <i>Cornu Ammonis</i> ) 1 régió
cAMP	ciklikus-adenozin-monofoszfát
CCMI (=XY4083)	[N-(4-klorofenil)]- $\alpha$ -[(4-klorofenil)-aminometilén]-3-metil-5-isoxazolaketamid
CICR	kálcium-indukálta-kálcium-felszabadulás
DAG	diacil-glicerol
DM498	(E)-3-(Furán-2-il)-1-(indolin-1-il)prop-2-an-1-on
DMXB-A (=GTS-21)	3-(2,4-dimetoxi-benzilidén)anabazein
ECD	extracelluláris domén
ELIC	( <i>Erwinia chrysanthemi</i> ) ligand-függő ioncsatorna
EVP-6124	N-[(3R)-1-Azabiciklo[2.2.2]okt-3-il]-7-kloro-1-benzotiofene-2-karboxamid
GABAAR	$\gamma$ -aminovajsav receptor A
GAT107	4-(4-bromofenil)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciklopenta[c]quinolin-8-szulfonamid
GLIC	bakteriális ( <i>Gloeobacter sp.</i> ) ligand-függő ioncsatorna
GluC	( <i>Caenorhabditis elegans</i> ) glutamát-függő klorid csatorna
GlyR	glicin receptor
GlyT1	glicin-transzporter1
HDAC	hiszton deaciláz

HTS	high througput system (nagyáteresztőképességű rendszer)
IBS	irritábilis-bél szindróma
ICD	intracelluláris domén
IICR	IP <sub>3</sub> -indukálta kalcium felszabadulás
IP <sub>3</sub>	inozitol-trifoszfát
JAK/STAT	Janus kináz/szignál-transzdukciós és aktivátor transzkripciós fehérje
JNJ-1930942	2-[[4-fluoro-3-(trifluorometil)fenil]amino]-4-(4-piridinil)-5-tiazolmetanol
JWX-A0108	6-(2-kloro-6-metilfenil)-2-((3-fluoro-4-metilfenil)amino)tiazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-one
KAR	kainát receptor
Lu AF58801	(1S,2S)-2-fenil-ciklopropán-karboxilsav-[alfa(R)-(4-etoxi-fenil)-2-hidroxi-etil]-amid
LY-2087101	[2-[(4-Fluorofenil)amino]-4-metil-5-tiazolil]-3-tienilmetanon
mAChR	muszkarinos acetilkolin receptor
MLA	metillicakonitin
MPC	manuális patch clamp
nAChR	nikotinos acetilkolin receptor
NAL/SAM	neutrális alloszterikus ligand/"silent" alloszterikus modulátormodulátor
NAM	negatív alloszterikus modulátor
NMDAR	N-metil-D-aszpartát receptor
NS1738	N-(5-kloro-2-hidroxifenil)-N'-[2-kloro-5-(trifluorometil)-fenil]urea

NS6740	1,4-Diazabicyclo[3.2.2]non-4-il[5-[3-(trifluorometil)phenil]-2-furanil]metanon hidroklorid
PAM	pozitív alloszterikus modulátor
PAM-2	3-furán-2-il-N-p-tolil-acrilamide
p-CF <sub>3</sub> diEPP	para-trifluorometil N,N-dietil-N'-fenilpiperazin jodid
P <sub>f</sub>	Frakcionális permeabilitás
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
pLGIC	pentamer ligand-vezérelt ioncsatornák
PMP-072	(R)-N-(4-metoxifenil)-2-((piridin-3-iloxi)metil) piperazin-1-karboxamid
PMP-311	(S)-2-(2-((Piridin-3-iloxi)metil) piperazin-1il)oxazolo[4,5-b]piridin
PNU-120596	N-(5-kloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea
RO5126946	(5-kloro-N-[(1S,3R)-2,2-dimetil-3-(4-szulfamoil-phenil)-ciklopropil]-2-metoxi-benzamid),
SB-206553	Benzo(1,2-b:4,5-b')dipirrol-1(2H)-karboxamid,3,5-dihidro-5-metil-N-3-piridinil
SLURP1	Szekretált Ly-6/uPAR-kapcsolt fehérje 1
SR	szarkoplazmás retikulumretikulum
ST-101	(=ZSET1446) spiro[1,3-dihidroindén-2,3'-imidazo[1,2-a]piridin]-2'-on
TBS-516	4-(5-benzil-3-(4-bromopfenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)benzén szulfonamid
TC-1698	2-piridin-3-il-1-azabicyclo[3.2.2]nonán
TMD	transzmembrán domén

TQS	<i>cisz-cisz-4-(naptalén-1-il)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-</i> ciklopenta[ <i>c</i> ]quinolin-8-szulfonamid
VGCaC	feszültség függő kalcium csatorna
ZAC	Cink aktivált csatorna



# 1 Bevezetés

## 1.1 A kognitív hanyatlás gyógyszeres kezelése

Az öregedés természetes folyamata, betegség vagy agysérülés az értelmi képességek csökkenéséhez vezethet. A kialakult kórképet mentális cselekvésképtelenség, memóriazavarok, személyiségváltozás jellemzik, melynek háttérben az idegsejtek funkcióvesztése, vagy rosszabb esetben előrehaladott állapotú sejtpusztulás állhat. A neurodegeneratív- és pszichiátriai betegségeket kísérő demencia, szerte a világon komoly egészségügyi problémát okoz, amelynek mérséklésére az utóbbi években számos kísérlet történt. Sajnos a mentális leépülési folyamatok egyelőre nem visszafordíthatóak. A korai szakaszban diagnosztizált, illetve időben elkezdett gyógyszeres kezelés lelassíthatja a betegség előrehaladását, valamint mérsékelheti az értelmi hanyatlás tüneteit. Azokat a hatóanyagokat amelyek pozitívan befolyásolják az emlékezőképességet, elősegítik az éberséget, a fókuszált figyelmet, serkentik tanulási és memória folyamatokat nootróp vagy szellemi kapacitást fokozó vegyületeknek nevezzük. Gyógyszer-célpontként olyan receptorokat, enzimeket érdemes keresni, amelyeknek ismert a kognitív funkciókban betöltött szerepe. A következő fejezék kerültek a “célkeresztbe”: az **acetilkolin receptor**(Elise Demeter, 2013) (muszkarinos receptor agonistái(Spencer, Middleton, & Davies, 2010) (Croy et al., 2014), muszkarinos receptor gátló antikolinerg anyagok, valamint a nikotinos receptor agonistái, szelektív pozitív modulátorai, acetilkolin prekursorok, acetilkolin észteráz blokkolók, – hatásuk: finom motoros mozgások javulása, figyelem, memória javulása). A **dopamin receptor** (katekolaminok, és prekursoraik, dopamin receptor parciális agonistái, amfetaminok - pozitívan hatnak a fókuszált figyelmre, és munkamemóriára). A **glutamát receptorok** (AMPA: ampakinek, AMPA PAM-ok – pl. aniracetám, piracetám; NMDA receptor illetve GluN2B antagonisták; NMDA receptor ko-agonista kötőhelyére ható anyagok: D-serine, D-cycloserine; ill. az endogén glicin mennyiségének növelése<sup>a</sup> GlyT1 típusú transzporter

---

<sup>a</sup> Az NMDA receptor komplex alulműködése összekapcsolható a skizofrénia kialakulásával. A receptor működési zavara hatással van a dopaminerg rendszerre is amely magyarázza a betegség pozitív (pszichózis, hallucinációk) és negatív (demencia) tüneteit. Egy elmélet szerint a skizofréniaiban szenvedők esetében az NMDA receptor aktivitás fokozásával javulás érhető el a kognitív funkciók terén. A kezelés egy lehetséges módszere a glutamáterg tónus modulálása az NMDA receptor ko-agonista kötőhelyén keresztül. A glicin NMDA komplexen történő kötődése serkenti az excitátoros neurotranszmissziót kognitív funkciókban fontos szerepet játszó agyterületeken pl. kérgi és hippokampális régiókban. (mivel a glicin nem jut át a vér-agy-gáton, a hasonlóan kötődő NR1 ko-agonista D-serint, D-cikloszerint alkalmazzák antipszichotikumok mellé kiegészítő terápiaként a klinikumban (Tsai et al., 1998)). Ugyanez a hatás megvalósítható egy másik indirekt módszerrel: a glicin koncentráció növelése a szinaptikus térben, nagy affinitású 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) gátlásával (Shimazaki et al., 2010).

gátlással(Tsai, Yang, Chung, Lange, & Coyle, 1998) (Shimazaki, Kaku, & Chaki, 2010) (Guercio & Panizzutti, 2018) – hatásuk: szinaptikus plaszticitás fokozása, öregedés okozta kognitív funkcióvesztés visszaállítása), **szero-tonin receptor** (antidepresszánsok, monoamin oxidáz gátlók – a szerotonerg transzmisszió modulálása pozitívan befolyásolja a tanulást és memóriát, negatívan az éberséget)(Wallace, Ballard, Pouzet, Riedel, & Wettstein, 2011), a **hisztaminreceptorok** (neurotranszmitter felszabadulást serkentő, áttételesen éberséget, figyelmet fokozó H1 antagonisták), **neuropeptidek** (melatonin, agomelatin –alvás közbeni memória konszolidációban van szerepe). A nem specifikus hatású de máig nem tisztázott módon kognitív folyamatokat befolyásoló receptorok: az **adenozin receptor** (antagonista: a koffein - noradrenalin és dopamin felszabaduláson keresztül csökkenti a neuron tüzelés gátlását) (Micoulaud et al., 2015), a **GABAR** (GABA  $\alpha 5$  blokkoló inverz agonisták, NAM-ok – görcs- és szorongásoldás nélküli nootróp hatással bírnak (Rudolph & Knoflach, 2011), a glukokortikoidok GABA receptort modulálják) (Micoulaud et al., 2015). A neuroprotekción egy újabb eszköze lehet a specifikus hiszton deaciláz (HDAC) inhibitorok kifejlesztése. Az I osztályba tartozó HDAC-ok megfelelő agyterületen történő, izoforma szelektív gátlása terápiás szempontból előnyös folyamatokat indukálhat. Például csökkent amiloid-béta (A $\beta$ ) szintet eredményez, elősegíti a szinaptogenezist valamint a dendritikus tüskék fejlődését és a denzitás növekedést, ezáltal enyhítheti a kognitív károsodás mértékét (S. Yang, Zhang, Wang, & Zhang, 2017).

A dolgozatomban később részletesen ismertetett homopentamer felépítésű  $\alpha 7$  típusú nikotinos acetilkolin receptor ( $\alpha 7$ nAChR) szintén potenciális terápiás célpont lehet kognitív tüneteket okozó neurológiai betegségben. Szelektív agonistái és pozitív alloszterikus modulátorai (PAM) prokognitív hatással bírnak. E receptor alulműködése agyi érkatasztrófát követően és más központi idegrendszeret érintő megbetegedésekben mint például Alzheimer-, Parkinson-kórban, skizofréniában valamint a nikotin függőségben szenvedők körében figyelhető meg(Taly, Corringer, Guedin, Lestage, & Changeux, 2009) (Arneric, Holladay, & Williams, 2007). Az  $\alpha 7$ nAChR fontos szerepet játszik a memória- és tanulási folyamatokban, ezért a demencia elleni gyógyszerek kutatásának egyik fő célpontjává vált (Uteshev, 2014). Az  $\alpha 7$ nAChR-al kapcsolatba hozható betegségeket az 1. Táblázat foglalja össze. A PAM -ok előnye az agonistákkal szemben, a normális idegsejt aktivitási mintázat megőrzése, mivel egy meglévő endogén

jeleterősítenek fel, illetve az, hogy nem kell számolni az agonisták esetében fellépő deszenzitizációval valamint a hatást kompenzáló receptor felszabályozódással (John Malysz et al., 2009).

1. Táblázat Nikotinos acetilkolin receptorokat érintő központi idegrendszeri betegségek okai, tünetei, és kezelése

Betegség	Okai	Tünetek	Kezelése
<i>Skizofrénia</i>	CHRNA7, CHRFA7A parciális duplikációja	értelmi hanyatlás (érzékelési-észlelési zavar, a munka memória romlása)	non-szelektív nAChR agonisták, nikotin
<i>Alzheimer kór</i>	$\beta$ amyloid plakkok deszenzitizációt okozva gátolják $\alpha$ 7nAChR aktivációt	emlékezet kiesés, tájékozódási zavar, hangulatingadozások, viselkedési problémák	AchE gátlók: tacrine, donepezil rivastigmine galanthamine eptastigmine, huperzine A
<i>Parkinson kór</i>	$\alpha$ 7nAChR működés kiesése	demencia	$\alpha$ 7nAChR aktiválása enyhítheti a PD tüneteit (PAM-ok)
<i>Fájdalom</i>	gyulladás	fájdalom	PAM-ok
<i>Függőség</i>	dohányzás	Nikotin függőség	Opioid antagonisták naltrexone

The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha$  7 nAChR for CNS indications in clinical trials Taoyi Yang, Ting Xiao, Qi Sun, Kewei Wang (T. Yang, Xiao, Sun, & Wang, 2017) cikkének szövege alapján készült.

## 1.2 Rövid tudománytörténeti áttekintés

A szinaptikus működés és a ligand-függő receptorok kutatása az 1900-as években kezdődött. 1905-ben John Newport Langley angol fiziológus ideg-izom preparátumon végzett kísérleteket. Feltevése szerint kell, hogy legyen az izomszövetben egy "receptív anyag", amely érzékeli és továbbítja a nikotin vagy kuraré hatását(Changeux, 2012). Később Otto Loewi és Henry H. Dale felfedezték az acetilkolint, mint neurotranszmittert. "Az idegi ingerület kémiai átvitelével kapcsolatos kutatásaikért" 1936-ban Nobel-díjjal jutalmazták őket. John C. Eccles ausztrál neurofiziológus akkoriban az ingerület szinaptikus neurotranszmisszióját és annak gátlását kutatta. Eccles, Hodgkin és Huxley megosztott Orvostudományi Nobel-díjat nyert 1963-ban az "idegsejt-membránok működésének ionos természetét illető felfedezéseikért" (Schwiening, 2012).

Bernard Katz az ötvenes évektől kezdve a szinapszisokban lejátszódó ingerületátviteli folyamatokat, az acetilkolin biokémiáját és hatásmechanizmusát vizsgálta. Ulf von Euler a katekolaminok családjába tartozó noradrenalin biológiai hatásait tanulmányozta. Julius Axelrod radioaktívan jelölt neurotranszmitterek kutatásával foglalkozott. Kísérletei során megállapította, hogy a szinapszisokban a noradrenalin kémiai jelátvivőként funkcionál, és az ingerület elhaladása után az idegsejtek felveszik, majd újrahasznosítják a szinaptikus transzmisszió során felszabadult molekulákat. Katz, von Euler és Axelrod az idegingerület működésének kutatásáért és a neurotranszmitterek felfedezéséért 1970-ben kapott Nobel-díjat(Alexei Verkhatsky, 2014).

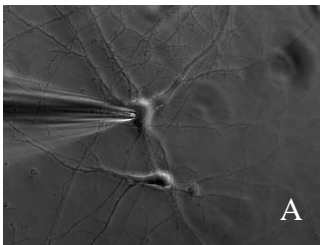
### 1.2.1 Az elektrofiziológia fejlődése

A második világháború után Alan L. Hodgkin és Andrew F. Huxley az akciós potenciál idegrostokban történő terjedését vizsgálta. Üvegkapillárisból készült intracelluláris mikroelektróda segítségével, akciós potenciálokat regisztráltak a tintahal (*Loligo forbesii*) óriásaxon preparátumából. A Kenneth Cole és George Marmont által néhány évvel korábban kifejlesztett két elektródos "voltage clamp" technika<sup>b</sup> segítségével az akciós potenciált létrehozó ionszelektív csatornák létezését sikerült bizonyítani, és működésüket matematikai modellel leírni (Schwiening, 2012). 1963-ban Orvostudományi Nobel-díjat nyertek az "idegsejt-membránok működésének ionos természetét illető felfedezéseikért" (Schwiening, 2012). Az első ioncsatornán történő méréseket Paul Mueller és Donald Rudin a hatvanas években mesterséges kettős lipidrétegen végezték. Ionok számára nem átjárható, stabil, 10 nm<sup>2</sup>-es átmérőjű kétrétegű foszfolipid membrán válaszfalat hoztak létre két sóoldat között (Mueller, Rudin, Tien, & Wescott, 1962). A sóoldathoz adott antibiotikum, a Gramicidin, egy 15 aminosavból álló peptid, amely a lipidrétegben csatornaszerű pórusokat alakít ki. Magas membrán potenciálok regisztrálni tudták egyedi gramicidin molekulák nyitását és zárását, amely az ioncsatornák "single channel" aktivitáshoz hasonló (O. S. Andersen, 1983). Az 1980-as években Neher és Sakmann forradalmasították a modern sejt szintű elektrofiziológiát. Az egysejtes elvezetés korai szakaszában megindult a mikropipetták fejlődése. Erwin Neher és Hans D. Lux egy speciális, "fire-polishing" nevű technikát alkalmaztak, amellyel a pipetta szájának törésfelületét láng segítségével egyenletesre olvasztották. Az így készült mikroelektróda minimális sértést okozott a membránon. A pipetta belsejében 2-10 Hgmm-es nyomáscsökkentést alkalmazva erősebb kapcsolatot tudtak kialakítani a sejthártya és az üvegkapilláris között, amely jelentősen javított az elvezetés minőségén. Bert Sakmann és Erwin Neher a patch clamp technika kifejlesztéséért és ioncsatornák működésének kutatásáért 1991-ben Nobel-díjat vehettek át (Neher & Sakmann, 1976) (Alexei Verkhratsky, 2014).

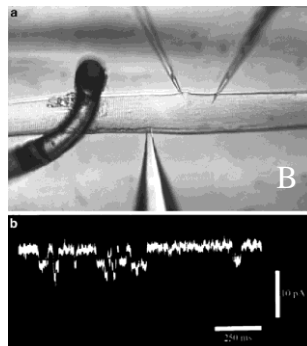
---

<sup>b</sup> Lényege, hogy a membránpotenciál értékét az elektronika segítségével a kísérletező állíthatja be tetszés szerinti értékre. Mivel a feszültségfüggő csatornák a membránpotenciálra reagálnak, működésük megértéséhez elengedhetetlen volt ez a módszer. Magyar elnevezése "feszültség-zár módszer", csak úgy, mint a "patch clamp" módszer magyar "folt-zár" megfelelője, nem terjedt el még a magyar nyelvű szakirodalomban sem, ezért dolgozatomban az angol elnevezéseket használom

A 2000-es évek elején egy újabb fejezet nyílt a patch clamp technika fejlődésében. Az ioncsatornákra ható gyógyszerek kutatásában – fejlesztésében kiéleződő verseny egyik égető kérdése volt a nagyobb áteresztőképesség elérésére. A manuális patch clampen kívül számos lehetőség állt a kutatók rendelkezésére (pl. fluorescens indikátorok, kötési tesztek, radioaktív ion flux vizsgálatok (Xu et al., 2001) (Denyer, Worley, Cox, & Allenby, 1998)) hatóanyagok ioncsatornákon történő tesztelésére. Mégis az elektrofiziológia a legmegbízhatóbb, és legsokoldalúbb vizsgálati módszer, amellyel közvetlenül mérhetők a csatorna konformáció változásai (nyitása és csukódása, ill. inaktiválódása vagy deszenzitizációja). Az extra- és intracelluláris oldatok ionösszetételének változtatásával, a különböző feszültség protokollok, és oldatperfúziós protokollok segítségével sok oldalról körül lehet járni a feszültségfüggés, kinetika, szelektivitás, moduláció, stb. kérdéseit, és pontosan meg lehet állapítani a potenciális gyógyszerek hatásmechanizmusát (nem csupán hatékonyságát detektálni). Emellett az adatok minősége is egyedülálló: ms alatti időbeli felbontással az egyedi csatornák nyitásával járó akár 1-2 pA méretű áramok is detektálhatók. (1A. Ábra) Hátránya viszont, az idő-, és munkaerő igényesség valamint a relatíve kis hatásfok. Az automata rendszerek kifejlesztésének célja a hosszadalmas procedúra lerövidítése, valamint a nagy áteresztő képesség elérése adatminőség romlás nélkül. Ennek kivitelezése számos technikai nehézségbe ütközött. Az utóbbi húsz évben több (szám szerint 7: Nanion, Molecular Devices, Sophion, Fluxion, Celectricon, Cytocentrics, Flyion) cég különböző megközelítésekkel próbálta az elektrofiziológia automatizálását megvalósítani. Az első automata patch clamp-ek (APC) 2003-tól váltak elérhetővé. Néhány fényképen mutatok példákat a kifejlesztett APC rendszerekre (2. A-H Ábra).



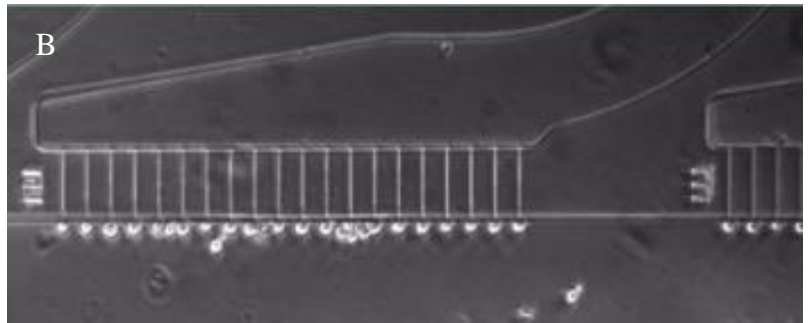
1A. Ábra Fáziskontraszt mikroszkópos kép egy egér hippocampális neuronból patch clamp elektródával történő mérésről, fénykép: Dr. Ainhara Aguado, Ruhr Egyetem Bochum, Németország)



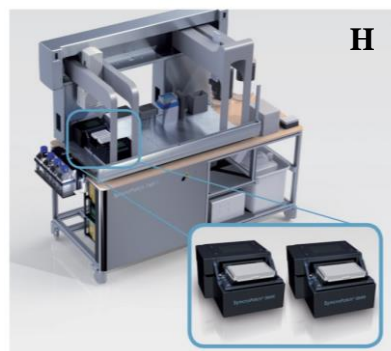
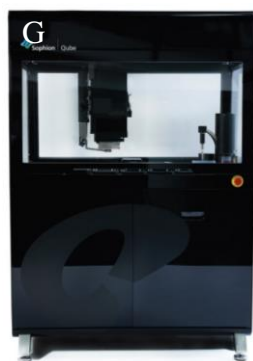
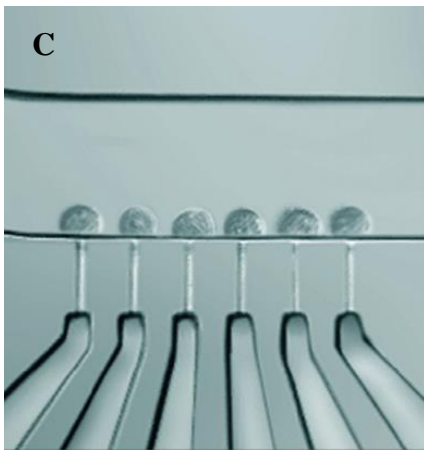
1B. Ábra Az első acetilkolin *single-channel* regisztrátum béka izomból izolált preparátumon

A két éles elektróddal végezték a "voltage clamp-et", miközben a tompa "patch" elektróddal regisztrálták az egyedi csatornanyitásokat. (Neher & Sakmann, 1976)

## Nagy áteresztő képességű patch clamp rendszerek



Fluxion HT nagyáteresztőképességű patch clamp rendsze: a mérés alatt álló sejtek mikroszkópos képe a gyártó honlapjáról



2. Ábra **A-B)** Fluxion IonfluxHT

C) Celectricron Dynaflow HT, D) Molecular Devices HTS, E) Cytocentrics APC

F) Sophion Qpatch, G) Sophion Qube, H) Nanion Syncropatch HTS mérőállomások, a gyártók honlapjairól

### 1.3 Farmakológiai bevezető

A gyógyszerek hatóanyagai és az élő szervezet közötti interakciókkal foglalkozó tudományágat gyógyszerhatástannak, más néven farmakológiának nevezzük. A kölcsönhatásokat két nézőpontból vizsgálhatjuk: A *farmakodinámia* a gyógyszer hatásmechanizmusát, míg a *farmakokinetika* a biológiai rendszer hatását írja le adott hatóanyagra eltelt idő függvényében. (felszívódás, disztribúció, metabolizálódás, kiürülés). Az agy működését befolyásoló kémiai anyagok hatásmechanizmusainak vizsgálatával a *neurofarmakológia* foglalkozik. Az idegrendszerre jellemző, kémiai jelátvitelért felelős, hasonló neuron csoportokban termelődő, azonos funkciót ellátó endogén neurotranszmitterek alapján megkülönböztethetünk glutamáterg, GABAerg, noradrenerg-, dopaminerg-, szerotonerg-, hisztaminerg-, kolinerg-, stb. rendszereket. A jelátvivő anyagok tulajdonságaik szerint két nagy kategóriára bonthatók: serkentő és gátló neurotranszmitterek. Az átvivő anyagok megkötését és a jel továbbítását az adott ligandumra érzékeny jel felfogó fehérje vagy más néven a receptor végzi. A köztudatban az *ortosztatikus kötőhelyen* kötődő aktiváló anyagokat *agonistának*, az ugyanott kötődő, de agonistára adott választ csökkentő vagy gátló hatású anyagokat pedig *antagonistának* nevezik. Az összkép viszont nem ilyen fekete-fehér. Ezt a jól bevált két állapotú modellel lehet könnyen ismertetni (a valóságban természetesen sok konformációs állapot van). Ligandum hiányában a receptorok aktív (R\*) és nyugalmi (R) konformációs állapota között egyensúly áll fenn. A ligand kötődésével az az állapotot stabilizálódik, amelyhez energetikailag kedvezőbb kötődnie. Ebből a szemszögből nézve, az agonista, vagy parciális agonista olyan ligandum, amely receptor konformációs egyensúlyát nyugalmi állapot felől (R) aktivált állapot (R\*) felé tolja el, ezért az agonista-kötött aktív illetve az agonista-kötött nyugalmi (AR\*/AR) állapot aránya nagyobb lesz mint a ligand nélküli aktivált és nyugalmi (R\*/R) állapotok aránya. Egy agonista, ill. parciális agonista hatékonysága az aktív konformációhoz (R\*) való szelektivitásán múlik. Minél szelektívebb a ligand az aktív (R\*) konformáció irányában, annál hatékonyabb. Az agonista és parciális agonista között tehát abban van különbség, hogy milyen mértékben



tudja eltolni a nyugalmi/aktivált receptorok arányát. Ezzel ellentétben a kompetitív antagonistá vagy közel egyforma affinitással köt mindkét konformációhoz, és így elfoglalja a receptorokat anélkül, hogy eltolná az egyensúlyt, vagy pedig kifejezetten a nyugalmi állapothoz köt nagyobb affinitással, így azt stabilizálja.

Sok receptor rendelkezik az ortoszerikustól térbelileg elkülönülő, de a konformációs változások szintjén kapcsolatban álló, *alloszerikus kötőhellyel*, amelyhez *modulátor* ligandumok köthetnek. Az alloszerikus kötőhelyen keresztül ugyancsak többféle hatás váltható ki. Legtipikusabb esetben az alloszerikus modulátorok önmagukban nem képesek a receptor aktiválására. A moduláló hatás kiváltódásához elengedhetetlen az agonista kötődése is, és a két nem átfedő kötőhely betöltöttsége idéz elő egy egyedi, visszafordítható, átmeneti fehérjeszerkezetbeli változást (Changeux & Christopoulos, 2016). Farmakológiai hatásuk alapján megkülönböztetünk pozitív alloszerikus modulátorokat (PAM) (Chatzidaki & Millar, 2015), amelyek növelik az agonista által kiváltott aktivitást, a negatívak (NAM) pedig csökkentik, míg a neutrális alloszerikus ligandok (NAL/SAM) (Corradi & Bouzat, 2016) kötődésükkel nem befolyásolják az ortoszerikus ligand választ de elfoglalják az alloszerikus kötőhelyet és így blokkolják a modulációt. Léteznek olyan PAM vegyületek is, amelyek képesek agonista nélkül is aktiválni, ezeket alloszerikus aktivátornak vagy Ago-PAM-oknak nevezik (Horenstein, Papke, Kulkarni, & Ganesh, n.d.) (Changeux & Christopoulos, 2016) (Gill-Thind, Dhankher, D'Oyley, Sheppard, & Millar, 2014) (Jaskiran K Gill et al., 2011). A pozitív alloszerikus modulátor hatásmechanizmusnak terápiás szempontból megvan az az előnye, hogy az anyag csak ott és csak akkor fejt ki hatását, ahol és amikor a természetes ideghálózatban is aktivitás mutatkozik. Például neurodegeneratív betegségek kezelésében is előnyös lehet az a hatásmechanizmus, amely egy alacsony szinten kifejeződő vagy alulműködő receptor jeleit csak endogén ligandja jelenlétében képes felerősíteni.

Bizonyos receptorok esetében, amilyen a dolgozatomban tárgyalt  $\alpha 7$  típusú nikotinos acetilkolin receptor ( $\alpha 7nAChR$ ) is, léteznek úgynevezett "*csendes agonisták*" (silent agonist) is (Rang, 2006) (Papke, Chojnacka, & Horenstein, 2014), amelyek olyan ortoszerikus ligandumok, amelyek önmagukban nem idéznek elő csatornanyitást. Múltán gondolhatnánk, hogy vajon miben különbözik akkor egy közönséges antagonistától? Abban, hogy olyan állapotot stabilizálnak, amely különösen érzékeny a pozitív alloszerikus modulátorokra (PAM) (Quadri et al., 2018). Az eltérés az alloszerikus ligand

bekötéséig nem is mutatkozik. Viszont PAM jelenlétében a csendes agonisták is “megszólalásra” bírják a receptorokat(Chojnacka, Papke, & Horenstein, 2013). Ezzel ellentétben, antagonisták kötött receptor esetén az alloszerikus modulátor nem tudja kifejteni hatását.

#### 1.4 Az acetilkolin receptorok

Az acetilkolin (ACh) receptorok ligand függő, integrált membránfehérjék. Két fő típusba sorolhatjuk őket: a G-fehérjékhez kapcsolt muszkarinos receptorok (mAChR), és a pentamer ligand-vezérelt ioncsatornák (pLGIC) szerkezeti családjába tartozó (korábbi nevén "cys-loop" <sup>c</sup> azaz cisztein párt tartalmazó hurokkal rendelkező) nikotinos acetilkolin receptorok (nAChR). Mindkét receptor neurotranszmittere az ACh, amelynek szerepe a perifériás idegrendszerben régóta ismert: a neuromuszkuláris junctionó átvivőanyaga, az autonóm idegrendszerben az összes preganglionáris ideg, illetve a postganglionáris paraszimpatikus idegek transzmittere. A központi idegrendszerben elsősorban a neuronok ingerlékenységét szabályozó szerepe van, amely többek között a figyelmet, éberségi állapotot és a memória kialakítását és fenntartását határozza meg. Az acetilkolin receptorok a szabályozást a citoplazmatikus kalciumszint befolyásolásán, és intracelluláris jelátviteli kaszkádokon keresztül valósítják meg, melynek hatására módosulhat neurotranszmitterek felszabadulása, szinaptikus plaszticitás, apoptózis, vagy génátíródás. Mind a mAChR mind a nAChR előfordul a tanulás és a memória szempontjából fontos agyterületen, a hippocampusban, amelynek elsődleges kolinerg bemenetét a mediális septum és a Broca féle diagonális köteg adja. A hippocampus fontos szerepet játszik a kognitív folyamatokban, ezért összefüggésbe hozható számos olyan betegséggel, amelyek a kognitív funkciók romlásával járnak, mint például Alzheimer-kór és skizofrénia(Albuquerque, Pereira, Alkondon, & Rogers, 2009) (Yakel, 2015).

---

<sup>c</sup> A ligandum által aktivált ioncsatornák egyik nagy szerkezeti családjá. Jellemző rájuk hogy öt alegységből állnak, amelyek egy központi pórust vesznek körül. A "cys-loop" egy jellegzetes, diszulfid hídral stabilizált, 13 konzervált aminosavból álló szerkezeti elem, amely az N-terminális közelében, extracellulárisan helyezkedik el. A pentamer ligandfüggő receptorok közé tartoznak a nikotinos acetilkolin-, a GABA<sub>A</sub>-, az 5-HT<sub>3</sub> típusú szerotonin-, a glicin-, és a Cink-aktivált (ZAC) receptorok.

### 1.4.1 Metabotróp receptorok

A metabotróp acetilkolin receptorok (mAChR) közé muszkarinnal aktiválható, és atropinnal gátolható, hét transzmembrán doménből felépülő, G-protein kapcsolt receptorok tartoznak (Albuquerque et al., 2009). Öt altípusuk ismeretes (M1-M5), amelyek két különböző jelátviteli útvonalat használnak (2. Táblázat). Az M1, M3 és M5 receptor altípus főként a Gq fehérjékkel hat kölcsön, amely a foszfolipáz C-t (PLC) aktiválva másodlagos hírvő útvonalakon keresztül intracelluláris kalciumszint növekedést okoz. A másik két altípus az M2 és az M4 kölcsönható partnere az ATP-ciklikus-AMP átalakulást gátló Gi fehérje(Albuquerque et al., 2009). A mAChR típus tagjai nagy számban kifejeződnek a központi és a perifériás idegrendszerben. Fontos szerepet játszanak különböző élettani folyamatokban, mint például a tanulás, figyelem, alvás-ébrenlét ciklus, motoros működések szabályozása, szív és érrendszer, vese, emésztő szervek működésében(Verma, Kumar, Tripathi, & Kumar, 2018).

2. Táblázat a mAChR csoportosítása jelátviteli útvonalai, kifejeződése, altípusokkal kapcsolatos betegségei

**Muszkarinos acetilkolin receptorok: jelátviteli útvonalai, kifejeződése az idegrendszerben, altípussal kapcsolatos betegségek**

	M1	M2	M3	M4	M5
<b>G protein</b>	Gq/11	Gi/o	Gq/11	Gi/o	Gq/11
<b>Jelátviteli útvonal</b>	PLC IP3/DAG Ca2+/PKC	AC (gátlás)	PLC IP3/DAG Ca2+/PKC	AC (gátlás)	PLC IP3/DAG Ca2+/PKC
<b>Kifejeződés</b>	Agykéreg, hipokampusz, striátum, talamusz, szimpatikus ganglion, mirigyszövetek	Hátsóagy, talamusz, agykéreg, hipokampusz, striátum, simaizom, szív, tüdő	Agykéreg, hipokampusz, simaizom, mirigyszövetek	Striátum, agykéreg, hipokampusz	Substantia nigra
<b>Betegségek</b>	Alzheimer-kór, kognitív diszfunkció, skizofrénia	Alzheimer-kór, kognitív diszfunkció, fájdalom	Krónikus tüdőbetegség, IBS, vizelettartási nehézségek	Parkinson-kór, skizofrénia, neuropátiás fájdalom	gyógyszerfüggőség, Parkinson-kór, skizofrénia

A hipokampuszban és az agykéregben főként extraszinaptikusan előforduló M1 típusú mAChR részt vesz a glutamáterg neurotranszmisszó kolinerg modulálásában ezért kulcsfontosságú a tanulási- és memória folyamatokban. A receptor alulműködése

összefüggésbe hozható az Alzheimer-kórral, agonistái prokognitív hatással bírnak(Jiang et al., 2014).

Klinikai tesztek igazolják, hogy az M4/M2 mAChR-ok is megfelelő célpontok lehetnek a skizofrénia illetve a demencia kezelésében, szelektív ligandok, pozitív modulátorok tervezésével maximalizálható a terápiás hatás(Croy et al., 2014). A muszkarinos receptorra ható vegyületek összefoglaló táblázata a függelékben található.

### 1.4.2 Ionotróp receptorok

A nAChR-oknak két nagy csoportja ismert. Az idegsejteken előforduló neuronális-, valamint a harántcsíktolt izomzatban funkcionáló muszkuális típus(Albuquerque et al., 2009). Az *izom típusú nAChR*-ok a neuromuszkuális junkció posztszinaptikus oldalán, a véglemezen “üldögélnek” nagy sűrűségben. A motoros idegek mentén végigfutó akciós potenciál a preszinaptikus oldalon acetilkolin (Ach) felszabadulást indukál. Az exocitózissal ürülő acetilkolin molekulák átdiffundálnak a szinapszis átellenes oldalára, ahol megkötődnek a receptorokon. Agonista kötés hatására a receptorok kinyílnak, a Na<sup>+</sup> ionok szabadon áramlanak az izomsejtekbe, depolarizációt okozva a membránban. Megfelelő mértékű depolarizációt követően akciós potenciál generálódik és tovaterjed az izom felületén, amely végül több lépésen keresztül izomösszehúzásban nyilvánul meg. Az izom típusú nAChR szerkezete 2 $\alpha_1$ :1 $\beta_1$ :1 $\delta$ :1 $\epsilon$  alegységekből épül fel, az embrionális forma ettől eltérő (2 $\alpha_1$ :1 $\beta_1$ :1 $\delta$ :1 $\gamma$ ). Az ortoszterikus kötőhely a  $\alpha\delta$  és  $\alpha\epsilon$  alegységek határán helyezkedik el. A fejlődő szinapszisokban a kolinhoz való nagy affinitásban szerepet játszó gamma alegység epszilontra cserélődik (Nayak et al., 2014).

3. Táblázat a nAChR-ok csoportosítása(Z. Wu, Cheng, Jiang, Melcher, & Xu, 2015).

A nikotinos acetilkolin receptorok csoportosítása					
Neuronális típusú alegységek			Izom típusú alegységek		
I	II	III			IV
$\alpha_9, \alpha_{10}$	$\alpha_7, \alpha_8$	1	2	3	$\alpha_1, \beta_1, \gamma, \delta, \epsilon$
		$\alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_6$	$\beta_2, \beta_4$	$\beta_3, \alpha_5$	
Homopentamer		Heteropentamer			

Az *idegi típusú nAChR*-ok többféle alegység kombinációban léteznek (3. Táblázat), az egyes variációk különböző farmakológiai és elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, szerepük elsősorban a gyors szinaptikus transzmisszió modulációja(Zoli,

Pistillo, & Gotti, 2015). 12 féle idegi alegység típus különíthető el. A heteromer szerkezetű nAChR receptorok  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ), és béta ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) alegységtípusok kombinálódásával, a homomerek pedig alpha ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ) alegységekből épülnek fel. A kötőhelyek száma itt is a pentamert alakító  $\alpha$  alegységek számától függ ( 4. Ábra D). Az  $\alpha 9$  nAChR homo és heteropentamerként ( $\alpha 10$  alegységekkel kombinálódva) a hallás szabályozásában vesz részt, a belsőfül cochleáris szőrsejteken található. (Gotti & Clementi, 2004) (Lykhmus, Voytenko, Lips, & Bergen, 2017) (Corradi & Bouzat, 2016)

Az alegységösszetétel befolyásolja a receptor biofizikai tulajdonságait. Például a  $\alpha 4\beta 2$  két funkcionális alegység sztöchiometriával fordul elő az idegrendszerben: a  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  illetve a  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  amelyek közül az utóbbi két nagyságrenddel nagyobb agonistához való affinitással rendelkezik, viszont kisebb a single-channel konduktanciája (Nelson, Kuryatov, Choi, Zhou, & Lindstrom, 2003).

Az idegi nAChR-ok kifejeződése régió specifikus eloszlást mutat (4. E Ábra, 8. Ábra)(Zoli et al., 2015). Az egyes idegsejteken szinaptikusan (pre- és posztzinaptikusan) illetve extraszinaptikusan is előfordulnak(Dani & Bertrand, 2007). Az emlős agyban túlnyomórészt az  $\alpha 4\beta 2$  és az  $\alpha 7$  alegységekből álló variációk dominálnak (5. Ábra). Az  $\alpha 7$  a második leggyakoribb típus, homomer formában preszinaptikusan a GABAerg terminálisokon, a posztzinaptikus dendrit tüskéken periszinaptikusan valamint a hippocampusz CA1 régióban a sztrátum radiátumban szinaptikusan fejeződik ki(Z. Liu, 2006). Előfordul még az agykéregben, a limbikus rendszerben, valamint a bazális ganglionban.  $\beta 2$  alegységgel alkotott heteromerje nagyobb mennyiségben szintén a bazális előagyban(Moretti et al., 2014), illetve a agykéregben található(Morten Skøtt Thomsen et al., 2015) (J. Wu et al., 2016).

Az  **$\alpha 7$ nAChR** fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésének korai szakaszában(Z. Liu, 2006). Elsődlegesen kognitív folyamatokban tölt be jelentős funkciót, alulműködése neurológiai és pszichiátriai kórképek kialakulását okozhatja(Lendvai, Kassai, Szájli, & Némethy, 2013) (Wallace & Porter, 2011). Másodlagosan a kórokozók elleni védelemben, daganatos megbetegedésekben(Pepper et al., 2017) (Zhang et al., 2017) (Fei, Zhang, Wang, Xiang, & Chen, 2017), valamint a kolinerg gyulladáscsökkentő folyamatok szabályozásában vesz részt(Hoover, 2018). A receptor M3/M4 TM szegmensek közötti hurkon keresztül számos fehérjével kerül kapcsolatba, amelyek

intracelluláris jelátvitel, membránba való kihelyeződés, citoskeletonhoz való kapcsolódás, klasztereződés folyamatait irányítják (King, Nordman, Bridges, Lin, & Kabbani, 2015) (Schuller, 2009) (Kalkman & Feuerbach, 2016). Az asztrocitákon is kifejeződő  $\alpha 7$ nAChR-ok a szinaptikusan felszabaduló ACh-ra aktiválódhatnak<sup>d</sup>, aminek következtében kialakul egy preszinaptikus moduláló hatás<sup>e</sup>. Ez megváltoztatja a gátló és ingerlő posztzinaptikus potenciálok mintázatát. Ezért egyes kutatócsoportok azt feltételezik, hogy a nAChR aktiváció hatására az asztrocita által felszabadított glutamát globálisan<sup>f</sup> befolyásolja a szinaptikus hatékonyságot a központi idegrendszerben (Sharma & Vijayaraghavan, 2001). Az  $\alpha 7$ nAChR nem kizárólag idegsejteken fordul elő, hanem a szervezet legkülönbözőbb részein megtalálható, nem ingerelhető sejteken is. Például asztrocitákon, mikroglia sejteken (Sharma & Vijayaraghavan, 2001) (Shytle et al., 2004), vérésejteken (limfocita, monocita, granulocita) immunsejteken (makrofágok) (Skok, 2009), endotheliális sejteken, keratinocitákon (Macpherson et al., 2014), epitheliális sejteken a tüdőben (Gahring, Myers, Dunn, Weiss, & Rogers, 2017) (Maouche et al., 2009), fibroblasztokon (X. J. Wang et al., 2010), az emésztőszervrendszer sejtjein valamint hímvarsejteken (Zoli, Pucci, Vilella, & Gotti, 2018) (Wessler & Kirkpatrick,

<sup>d</sup> ACh által kiváltott CICR asztrocitákban?

Sejtkultúrában tartott asztrocitákon végzett kísérletek alapján az asztrociták kifejeznek gyorsan deszenzitizálódó, pici kalcium áramokat közvetítő, funkcionális alpha bungarotoxin szenzitív, nAChR-okat amik MLA-val gátlhatók. Ezek ACh-ra aktiválódnak, kalciumot engednek be (VGCaC híján ezek csinálják), részt vesznek intracelluláris jelátviteli folyamatokban, intracelluláris kalcium raktárak ürítését triggerelik azáltal hogy a beáramló kalcium ionok a ryanodin receptorokon keresztül kiváltják az ún. kalcium-indukált kalcium felszabadulást (CICR). Az asztrociták ezen kívül kifejeznek glutamát, GABA, glicin, és ATP receptorokat is, (ezekből az ionotróp glutamát receptort igazolták hippokampális szelet preparátumon is). A glutamát felszabadulást intracelluláris kalciumszint emelkedés szabályozza. Az asztrocitákon kifejeződő receptorok illetve az asztrocitákból felszabaduló neurotranszmitterek befolyásolják a hippokampális neuronok működését. Hippokampális neuronok dendritjein kimutatták, hogy a szinaptikus stimuláció által kiváltott CICR-ben a triggerelő kalcium jel nem detektálható. Ez arra utal, hogy az NMDAR és az intracell kalcium raktárak között térbeli kapcsoltság lehet. Ebből arra következtettek hogy, a kis beáramló kalcium komponens nem különálló időben elkülönített esemény, (legalábbis a jelenlegi időbeli felbontással vizsgálva), hanem lehet hogy az asztrocitákon kifejeződő  $\alpha 7$ nAChR-k és a intracell kalcium raktárakon lévő CICR-ben résztvevő koffein-érzékeny csatornák között is térbeli kapcsoltság van. A magas kalcium-permeabilitással rendelkező ligand-függő ionszűrő csatornák CICR-zel való funkcionális kapcsoltsága a valószínűleg szélesebb körben elterjedt.

<sup>e</sup> Az asztrociták mint a szinaptikus transzmisszió aktív modulátorai?

A asztrociták szoros kapcsolatban vannak az egyes szinapszisokkal (az asztrocitákban végbemenő folyamatok hatással vannak a szinapszisokra), a szinaptikusan felszabadult neurotranszmitterek pedig eljutnak az asztrocitiák membránjában lévő receptorokhoz. Egyetlen szinapszist körülvevő asztrocitikus receptorok aktiválása lokális kalciumszint-növekedéshez vezet. A lokális jelek továbbítását a CICR-t magában foglaló és az IP<sub>3</sub>, a raktárakból felszabaduló komplex kalcium kaszkádok teszik lehetővé az asztrocita egyik részéből a másikba. Mivel egy asztrocita sok szinapszissal érintkezik, a jelek így továbbíthatók több szinapszis felé is. A kalcium-tranziensek ezeknél az asztrocitikus folyamatoknál a vezikuláris glutamát felszabadulást is eredményeznek, ami viszont növeli a glutamaterg és a GABAerg spontán posztzinaptikus áramok gyakoriságát.

<sup>f</sup> Globális nikotin moduláció?

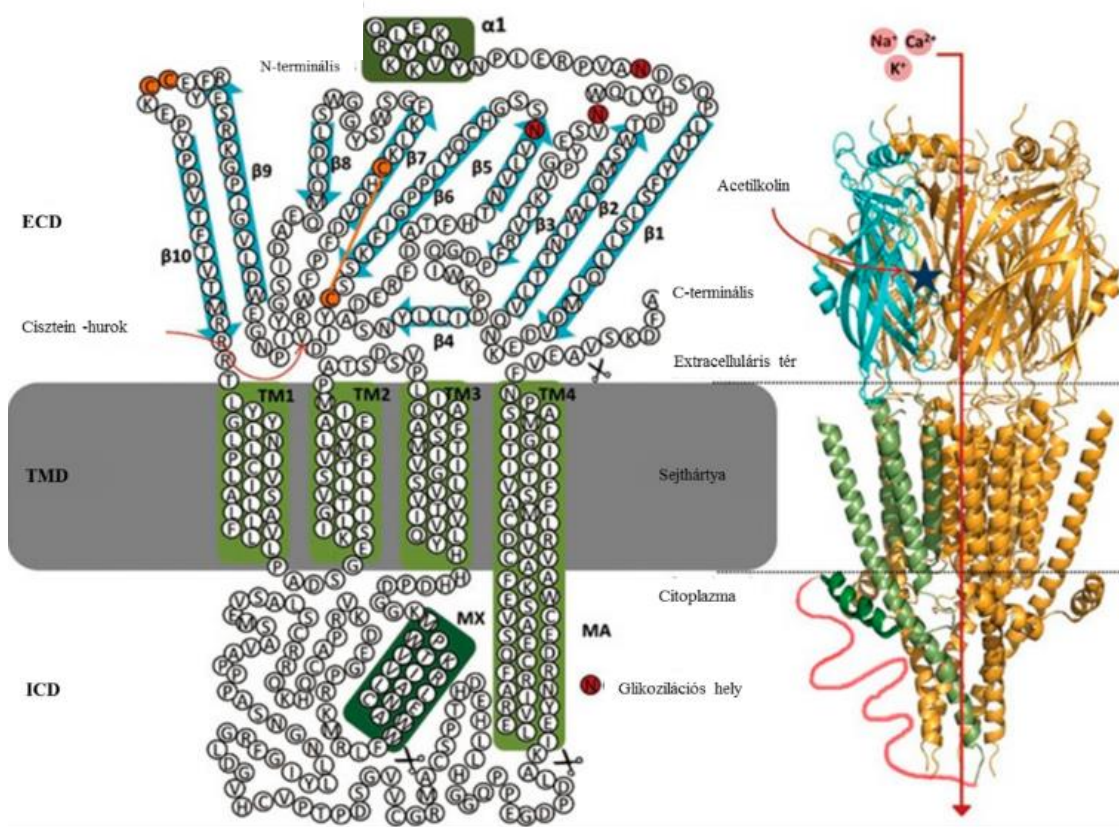
A szinaptikusan felszabaduló ACh aktiválja az asztrocitákon kifejeződő  $\alpha 7$ nAChR-okat, amelyek lokálisan megváltoztatják az ingerlő és gátló miniatűr posztzinaptikus potenciál gyakoriságát számos szinapszisonál. (ezt értik a transzmitter felszabadulást preszinaptikus nikotin modulációja alatt, ez egyes esetekben asztrocita-közvetített glutamát-felszabadulást jelenthet, amely globálisan befolyásolhatja a szinaptikus hatékonyságot a központi idegrendszerben)

2008) (Corradi & Bouzat, 2016). Az  $\alpha 7$ nAChR szerepét még mindig intenzíven vizsgálják, szerteágazó szerepe visszavezethető a sokféle jelátviteli fehérjével való kapcsolódásához. A ligand kötést kísérő tranziens kalcium jel közvetetten számos térben és időben elkülönülő intracelluláris kalcium dinamikával összefüggésbe hozható G fehérje-mediált jelátviteli folyamatot idéthet el, amelyek hatása tovább is fennállhat mint maga a  $\alpha 7$ nAChR csatorna aktiváció (King et al., 2015). A receptor efféle “metabotróp természete” kalcium- valamint G-protein-asszociált inozitol-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) által indukált kalcium felszabadulás (CICR ill. IICR) esetében is megmutatkozik (Kabbani & Nichols, 2018). Az ACh felszabadulás nem szinaptikus, nem-neurális célpontokon, például immunsejteken is kifejti moduláló hatását (Ben-David et al., 2016). Az aktivált receptor, JAK/STAT foszforiláción keresztül gyulladásgátló, immunmoduláló szereppel is rendelkezik (Fei et al., 2017) (Kabbani & Nichols, 2018). Limfocitákon ligand kötés hatására tranziens áram nélküli intracelluláris kalciumszint emelkedést is okozhat (Razani-Boroujerdi et al., 2007) (Skok, 2009). E mechanizmus mögött az  $\alpha 7$ nAChR-nak egy ioncsatorna aktivitást nem mutató változatát vélték felfedezni, amely T- és B-sejteken fejeződik ki (Razani-Boroujerdi et al., 2007). Feltételezhető, hogy ebben az esetben az ion permeabilitás háttérbe szorul az intracelluláris folyamatok elindításában, és ezek depolarizáció nélkül mennek végbe. Az egyik lehetséges magyarázat erre, hogy a vér alacsony koncentrációjú ACh tartalma miatt a receptor konstans deszenzitizált állapotba kerül, ezért a csatorna folyamatosan zárt állapotban marad, nem vezet ionokat. Ennek ellenére agonista kötés hatására a receptor különféle alloszerikus átalakulásokon megy keresztül, a citoplazmatikus doménon foszforilálódás útján többszörösen deszenzitizált állapotba kerülve. Eközben a csatorna zárva marad, de ez nem akadályozza az intracelluláris folyamatok aktiválódását (Skok, 2009). Összefoglalásképpen elmondható, hogy az  $\alpha 7$ nAChR fontos terápiás célponttá válhat számos betegség esetében, amelyek összefüggésbe hozhatók különböző eredetű gyulladási folyamatokkal (Corradi & Bouzat, 2016).

#### **1.4.2.1 A nAChR szerkezete**

A nAChR a pentamer ligand-vezérelt ioncsatornák (pLGIC) családjába tartozik, a fehérjére jellemző ötös szimmetriájú struktúrával rendelkezik (4. Ábra B, D) (Jaiteh, Taly, & Hémin, 2016) (Ortells & Lunt, 1995) (Cheng et al., 2015). A nAChR-ok a gyors

szinaptikus jelátvitel közvetítésében játszanak legfontosabb szerepet. Az agonista kötésben diszulfid hidat alkotó N-terminális közeli ciszteinek vesznek részt. (Albuquerque et al., 2009). Szintén a pLGIC csoportba sorolható még az anion szelektív Glycin, a GABA<sub>A</sub>, és GABA<sub>C</sub>, valamint a kationokra permeábilis 5-HT<sub>3</sub> szerotonin receptor, és a cinkre aktiválódó (ZAC) receptorok. Felépítésükben közös, hogy egy-egy alegység három, szerkezetileg jól elkülönülő részre bontható: 1) A nagy  $\beta$  redőkből álló extracelluláris domén (ECD), amely helyet ad az ortoszterikus kötőhelynek is, 2) hidrofób transzmembrán szegmensek (TMD), amelyek alegységenként 4, a sejthártyát átívelő  $\alpha$  hélixből állnak (M1-M4), valamint a nagy intracelluláris domén (ICD) (3. Ábra) (Cheng et al., 2015).



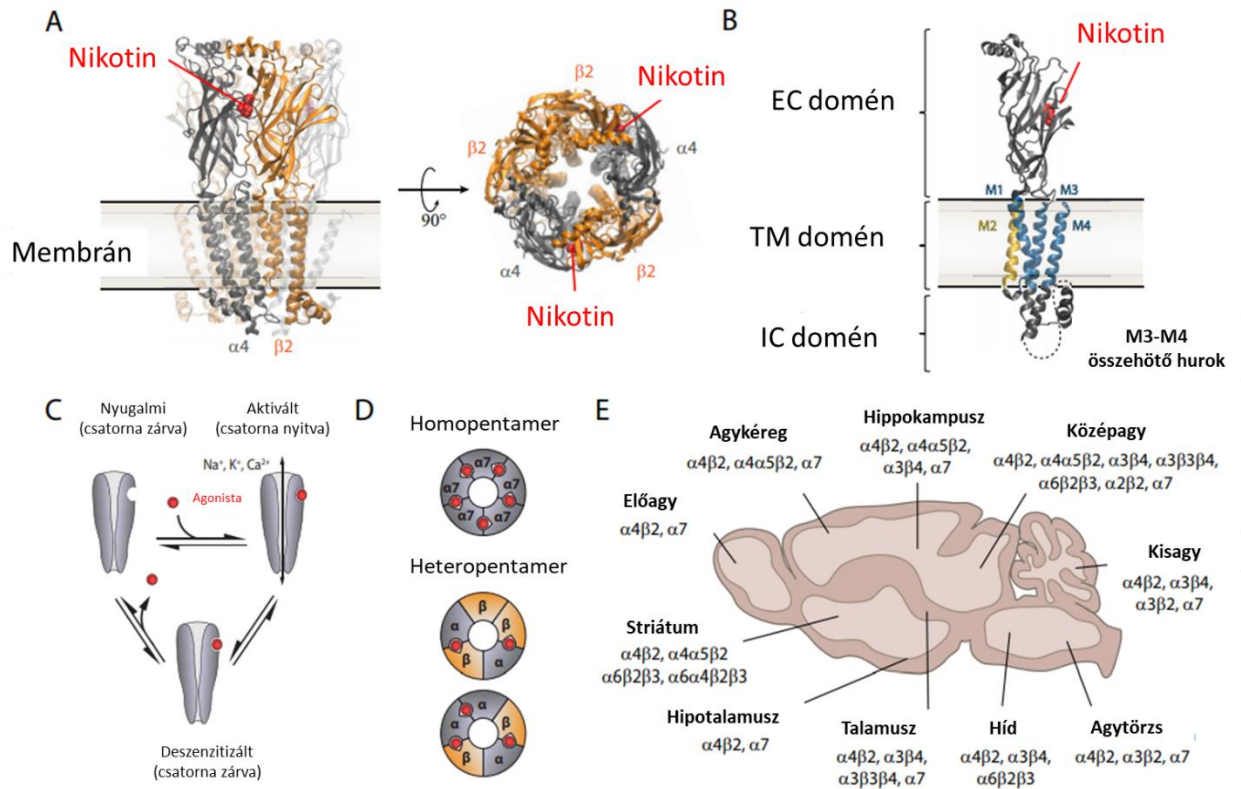
3. Ábra nAChR szerkezete

A receptor topológiája három jól elkülönülő funkcionális szerkezeti részből épül fel: A nagy  $\beta$ -struktúrából álló extracelluláris domén (ECD) amely helyet ad az ortoszterikus ligand kötőhelynek, a hidrofób transzmembrán domének (TMD, TM1–TM3), végül a nagy intracelluláris domén (ICD) és a negyedik hidrofób TM domén. Pirossal jelölték a glikozilációs helyeket (Receptor pdb code: 4pir). A receptor szerkezete az 5HT-3 szerotonin receptor röntgenkristallográfiás szerkezete alapján készült (Cheng et al. 2015).

A pLGIC receptorok esetében, a feszültségfüggő ioncsatornák többségével ellentétben, az ionszelektivitásért nem egy specifikus régió felelős, hanem a pórus több különböző régiója. Azt, hogy a receptor kationokra vagy anionokra lesz szelektív, 5-6 töltéssel

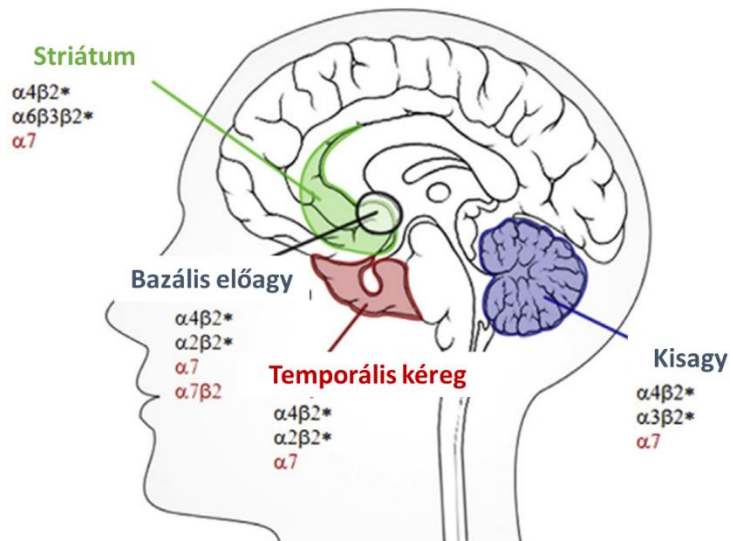


rendelkező oldalláncokból (anion csatornáknál Arg vagy Lys, kation csatornáknál Glu vagy Asp) felépülő gyűrű határozza meg (Hansen, Wang, Taylor, & Sine, 2008) (X. Liu et al., 2008). Ezek a gyűrűk nem csupán a transzmembrán régióban találhatóak, hanem az ECD-ben ill ICD-ben is körülveszik a pórust. Akármilyen konzerváltak azonban, mutációjuk csak a konduktanciát változtatta meg, a kationszelektivitást nem tudta anionszelektivitásra fordítani, csak más mutációkkal együtt (P. J. Corringer et al., 1999). Nagy mértékben meghatározzák azonban a  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitást. A nAChR-ok esetében a fiziológias mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  ion permeabilitás kulcsfontosságú szerephez jut a neurotranszmitter felszabadulásban, valamint az izomösszehúzóds folyamatában. A  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitást "frakcionális permeabilitás"-ban ( $Pf$ ) lehet kifejezni, amely megmutatja a teljes áramhoz viszonyítva,  $\text{Ca}^{2+}$  ionok által hordozott áram százalékos arányát. Összehasonlítva a különböző alegység kombinációk  $Pf$  értékét, azt tapasztaljuk, hogy az  $\alpha$  alegységekből álló homomereknek jóval magasabb a  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitása (P. J. Corringer et al., 1999). Feltehetőleg ezért evolválódtak úgy ezek a magas  $Pf$  értékű alegységkombinációk hogy nagyon alacsony nyitvatartási valószínűséggel (kb. 1%) rendelkezzenek (Fucile, 2017). A pórustól legtávolabb eső szegmens, a sejthártya összetételére érzékeny M4-es hélix, amely a receptor-membránlipid kölcsönhatásokért felelős (Carswell et al., 2015) (Hénault et al., 2015).



## 4. Ábra A nAChR receptorok

A. receptor szerkezete oldalnézetből és felülnézetből nikotin kötőhelyekkel, B. egy alegység sematikus ábrája, C. a receptor állapotainak sematikus rajza D. az agonista kötőhelyek homo és heteropentamer receptorok esetén, E. a nikotinos receptorok előfordulása emlős központi idegrendszerében (Biologie Aujourd'hui 211 (2), 171-186 (2017) Société de Biologie, 2017 <https://doi.org/10.1051/jbio/2017022>)

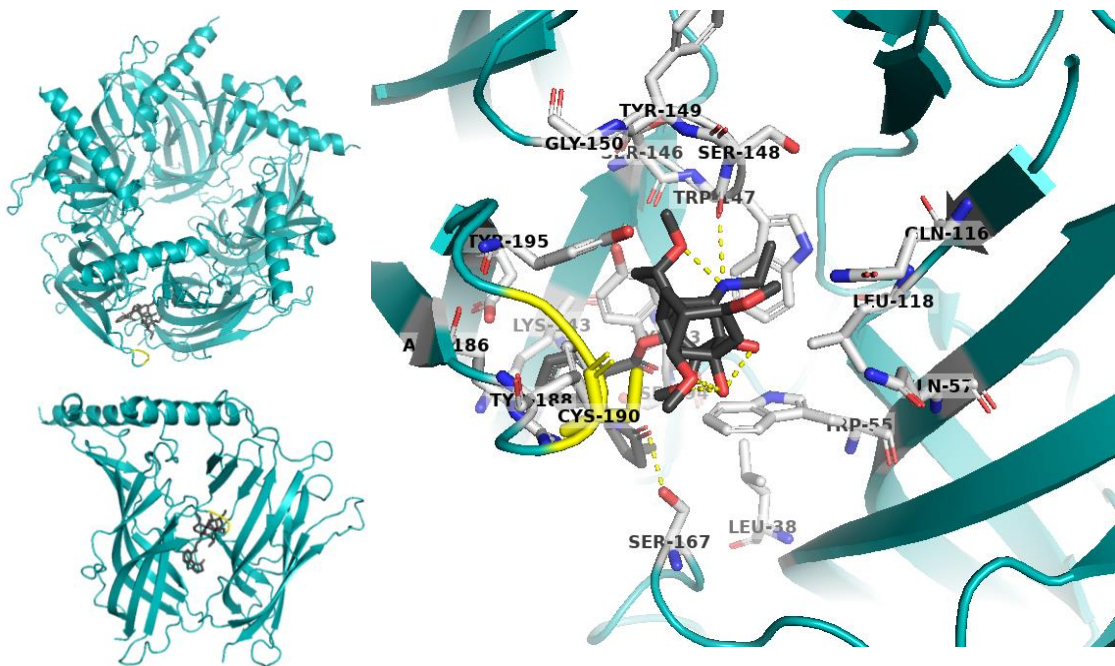


A sematikus ábra egy 2015-ben publikált emlős idegsejteken előforduló natív nAChR-okról szóló cikk 2. ábrája alapján készült (Zoli et al., 2015).

### 1.4.2.2 A nAChR kötőhelyei

Az ortoszterikus kötőhelyéhez kapcsolódik az endogén aktiváló hatású neurotranszmitter: az acetilkolin. Az szinaptikus jelátvitelt követően az acetilkolinészteráz enzim hasítja, azaz lebontja. Az így kapott hidrolizátum a kolin, amely az  $\alpha 7$ nAChR-t szelektíven aktiválja, amíg a többi altípusnál csak gyenge parciális agonista (Alkondon, Pereira, Cartes 2006).

Az  $\alpha 7$ -es nAChR esetében sajnos még nem készült el, viszont a  $\alpha 4\beta 2$ -nek már ismert nagyfelbontású szerkezete (Morales-Perez, Noviello, & Hibbs, 2016). A puhatestűek által termelt, kolinerg transzmissziót szabályozó acetilkolin kötő fehérje (AChBP) azonban nagyfokú szekvenciális homológiát mutat a receptor ECD-jével, továbbá szintén pentamer szerkezetű, a nAChR-hoz hasonló affinitással köti annak ortoszterikus ligandjait, és a kötőhely konzervált aminosavai is ugyanazok. Felépítésében és



6. Ábra A nAChR extracelluláris doménen elhelyezkedő ortoszterikus kötőhely

Az ortosztatikus kötőhely az  $\alpha 7$ nAChR AChBP alapján létrehozott homológia modelljén, kötött metillicakonitin (MLA) jelenlétében (PBD kód 3SH1) Bal felső ábra, összefoglaló nézet  $\alpha 7$ nAChR-AChBP felülről, Bal alsó ábra két  $\alpha$  alegység oldalról, Jobb oldali ábra: A kötőhely kialakításában fontos szerepet játszó aminosavakat világos szürkével a ligandot fekete színnel jelöltem. Az ábra a Pymol program segítségével készült.

szerkezetében nagyon hasonlít továbbá a már ismert Cys-loop receptor szerkezetek: a GLIC és ELIC bakteriális csatornák valamint a GluCl gerinctelen glutamát aktiválta klorid

csatornák ortoszterikus kötőhelyét magában foglaló extracelluláris doménjéhez (9. Ábra) (Cecchini & Changeux, 2014). A pLGIC családra jellemző, hogy az extracelluláris odalon elhelyezkedő N terminálison 13 erősen konzervált aminosavból álló hurok található, amely diszulfid-híddal kapcsolódó ciszteineket tartalmaz. Rendszerint az  $\alpha$  alegységek rejtik az acetilkolin kötő hidrofób “zsebecskét” (agonista: nikotin kötődése 4. Ábra B, 6. Ábra). A cisztein-hurok ligandkötés során ráhajlik az agonistára amelyet a cisztein-pár rögzít a megfelelő pozícióban. (A kötőhely kialakításában a következő aminosavak vesznek részt. Az aktivációhoz a kulcsfontosságú oldalláncok félkövér betűtípussal kiemelve: **C141, W149, G153, Y188, Y185, C190, C191, Y195, F135, P136, F137, E45, V44, W53, W55, Y93, L112, M114, L121, R209, S269 és P272**)(Albuquerque et al., 2009) (Bartos, Corradi, & Bouzat, 2009) (N. Andersen, Corradi, Bartos, Sine, & Bouzat, 2011) (Morales-Perez et al., 2016) (Horenstein et al., n.d.) (Nemecz, 2011) (Hibbs et al., 2009). Mutációs kísérletek igazolták, hogy az  $\alpha 7$ -es típusnál a S36, L38, W55, és L119 oldallánc fontos szerepet játszik a receptor kapuzásban és a deszenzitizációban, amely gyógyszer tervezés szempontjából kiaknázatlan terápiás lehetőségeket rejthet magában(Gay, Giniatullin, Skorinkin, & Yakel, 2008) (J. Wang, Horenstein, Stokes, & Papke, 2010). A 6. Ábra jobb oldali kép a metillicakonitin (MLA) nevű antagonistá  $\alpha 7$ nAChR AChBP kötőzsebben való elhelyezkedését, a baloldali ugyanezt ábrázolja felül és oldalnézetből.

Az alloszterikus kötőhelyek: Az ortoszterikusuktól eltérő, modulátor kötésében részt vevő specifikus régiókat alloszterikus kötőhelyeknek nevezzük. Az ide kötő, diverz szerkezetű molekulákat farmakológiai hatásaik alapján különítették el (pozitív-, negatív- és neutrális alloszterikus modulátorok, ill. alloszterikus agonisták, vagy ago-PAM-ok). A kognitív zavarok kezelésének egyik lehetséges alternatívája a  $\alpha 7$  altípus szelektív PAM-ok klinikai alkalmazása. A receptor agonista által indukált deszenzitizált állapotra gyakorolt hatás alapján a hatóanyagokat két fő csoportra osztották. I-es típusba sorolják azokat a PAM-okat, amelyek nem befolyásolják a deszenzitizáció folyamatát. Tehát az agonistával kiváltott válasz a modulátor jelenlétében megnövekedett, de az agoista válaszhoz hasonlóan tranziens jellegű marad. A II. típus a csúcsamplitúdó megnövelésén túl csökkenti a deszenzitizáció mértékét, ezáltal megváltoztatja a áram kinetikát is (pl. deszenzitizáció hiányában hosszú, elnyúlt válaszokat kapunk)(Grønlien et al., 2007) (Bertrand & Gopalakrishnan, 2007).

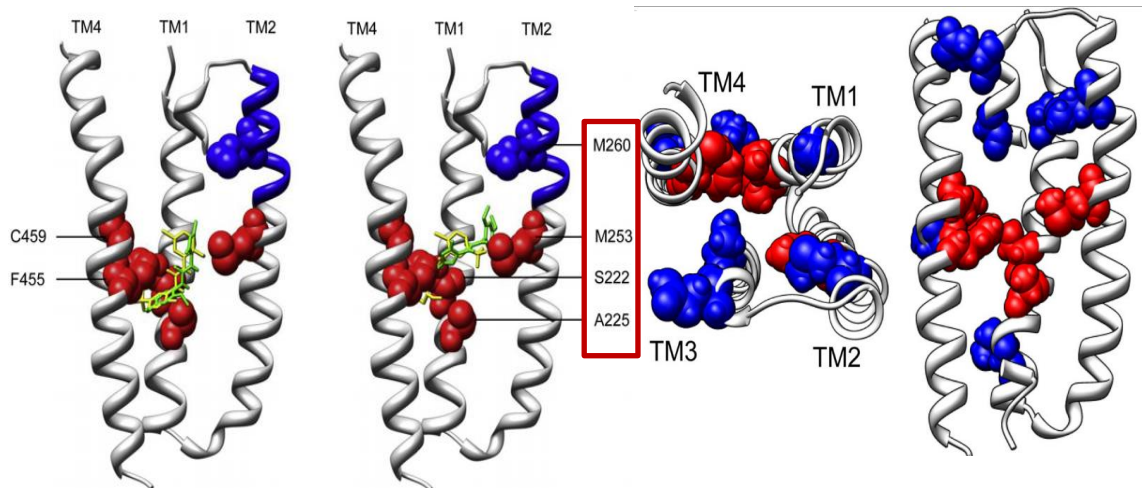
Az alloszterikus kötőhelyek feltérképezése napjainkban is folyik. Az agonista kötőhely közelében három lehetséges alloszterikus kötőhelyekre bukkantak. Az első az extracelluláris domén felszínén az N terminális domén környékén helyezkedik el, az izom típusú  $\alpha 1$  receptor immunogén régiójával mutat hasonlóságot. A második pedig ELIC-ek benzodiazepin kötőhelyével homológ, az ortoszterikus kötőhellyel szemben lévő üregben található. Végül a harmadik, a bakteriális GLIC ketamin kötőhelyével azonosítható, amely az acetilkolin kötőhely alatti zsebben lokaizálódik (Spurny et al., 2015).

Alloszterikus kötőhelyek nemcsak az extracelluláris doménon fordulnak elő. Az irodalom szerint a transzmembrán régióban (TM) az egyes alegységeken belül az  $\alpha$  hélixek közötti rések (*inter subunit cavities*) modulátor kötőhelyül szolgálhatnak. Mutációs kísérletek és *in silico* dokkolásos tesztek segítségével felderítették a PAM-ok kötésében és a moduláló hatás kialakításában fontos szerepet játszó aminosavakat: az extracelluláris doménon az ortoszterikus kötőhely melletti W54, a TM1 régióban S222, A225, valamint a TM2 régióban a M253, M247, M260 végül a TM4 régióból a F455, C459, V288 és az I281 (Corrie J. B. daCosta, Free, Corradi, Bouzat, & Sine, 2011). További mutációs kísérletekből kiderült, hogy TM1-TM4 domének között a NS1738 és a PNU-120596 kötésében szerepet játszó aminosav oldalláncok kötőhelyei között feltételezhető átfedés (S222, A225, M253, F455 és C459). A 7. Ábra a Millar labor egy dokkolási szimulációját ábrázolja az  $\alpha 7$ nAChR TM domén homológia modelljén (2MAW) (Collins, Young, & Millar, 2011). A pirossal jelölt oldalláncok mutációja a PNU-120596 és NS1738 kötésre jelentős hatást gyakoroltak. A kézzel jelölt oldalláncok mutációja csökkentette a deszenzitizációt. A sárga molekula jelöli az NS1738-ot, a zöld pedig a PNU-120596-ot lehetséges pozíciókban dokkolva. A PNU-120596, az A-867744-t valamint az NS1738 kötésében átfedő oldalláncok az S222, a M253, és a M260 (Collins & Millar, 2010) (Corrie J. B. daCosta et al., 2011) (Corrie J B daCosta & Sine, 2013) (Young, Zwart, Walker, Sher, & Millar, 2008) (Newcombe, Chatzidaki, Sheppard, Topf, & Millar, 2018) (H R Arias et al., 2011; Targowska-duda, Kaczor, Jozwiak, & Arias, 2018). Az NS1738 és a PNU-120596 nagyon hasonló szerkezetűek. A szakirodalomból kigyűjtött egyedi kötésekben szereplő oldalláncok a függelékben található táblázatban szerepelnek.

### 1.4.3 A $\alpha 7$ nAChR-ra ható anyagok, fontosabb ligandok

A kognitív hanyatlás, neuropszichiátriai-, gyulladásszerű neurológiai betegségek gyógyszeres kezelésének egyik célpontja az acetilkolin receptorokon keresztül történő kolinerg transzmisszió fokozása, amelyre több lehetséges megoldást is találtak. Az egyik lehetőség az ortosztatikus kötőhelyhez kapcsolódó acetilkolin koncentráció növelése.

#### 1.4.3.1 Közvetetten ható anyagok



7. Ábra A transzmembrán doménen elhelyezkedő allosztatikus modulátor kötőhelyek

A *ST-101* (*ZSET1446* Sonexa Therapeutics FII) egy vér-agy gáton is átjutó T-típusú feszültség-függő kalcium csatornákat aktiváló hatóanyag, amely a fokozott preszinaptikus acetilkolin felszabadulással javítja a kognitív funkciókat (Sofi & Barrantes, 2014). Az acetilkolinészteráz gátlók (AChEI) *tacrine*, *donepezil*, és *rivastigmine*, nem engedik lebontani az acetilkolint, amely ezáltal feldúsul a szinaptikus résben (Sofi & Barrantes, 2014) (T. Yang et al., 2017) (Bouzat, Nielsen, & Esandi, 2017). A *galanthamine* a gyengébb AchE gátlás mellett nAChR-okon allosztatikus moduláló hatással is rendelkezik (Samochocki et al., 2003). A Parkinson és Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél alkalmazott nem-kompetitív, alacsony-affinitású NMDA receptor antagonistával a memantinnal együtt adva a *galanthamine* kognitív funkciókra kifejtett hatása tovább fokozható (Nikiforuk, Potasiewicz, Kos, & Popik, 2016).

#### 1.4.3.2 Agonisták, parciális agonisták

A skizofréniát, Alzheimer-kórt kísérő kognitív tünetekre ható molekulák közül kiemelnék néhányat: a klinikai vizsgálatok alatt álló  $\alpha 7$ nAChR parciális agonista a *tropisterson* (Fázis

IV), a mikrogliaokban  $\beta$ -amiloid fagocitózist indukáló, és  $\gamma$ -szekretint gátló *GTS-21/DMXB-A*(Fázis III)(Takata et al., 2018), az  $\alpha 7$ nAChR-on keresztül közepagyi dopaminerg neuronokat moduláló *AZD0328* (Fázis II)(Sydserff et al., 2009) (Zhou et al., 2011), és a nikotin függőség kezelésére is alkalmas *Encenicline* vagy más néven *EVP-6124*(Huang et al., 2014; Prickaerts et al., 2012) (Weed et al., 2017)(Fázis III)-ban a klinikai tesztek sajnos leállították. A legújabb kutatások szerint, felfedezésre került néhány EVP-6124-nél szignifikánsan nagyobb potenciózó hatással rendelkező indolizin vázas  $\alpha 7$ nAChR agonista az *ABT-107*(J Malysz et al., 2010), amelyekkel a skizofrénia lehetséges terápiás kezelése valósulhat meg. Egy másik kutatási irány a “csendes agonisták” (silent agonists) tanulmányozása az  $\alpha 7$ nAChR által közvetített metabotróp jelátviteli folyamatokban, amelyek közelebb vihetik a gyógyszerkutatást a gyulladási folyamatokkal kapcsolatos betegségek gyógyításához. A silent agonisták csatornanyitással nélkül deszenzitizálják a receptort, ezzel egy PAM-ra érzékeny állapotot stabilizálva.(Papke et al., 2014) Ezzel lehetővé teszik a pozitív allosterikus modulátor (PAM) kötését, amely hatására destabilizálódhat a deszenzitizált állapot, így a csatorna kinyílik, az egyensúly pedig a vezető állapot felé billen. Terápiás hatásuk a receptor metabotróp hatásának aktiválásán keresztül valósul meg. Ezzel ellentétben, a kompetitív antagonisták egyszerűen csak megakadályozzák az agonista bekötését, nem okoznak metabotróp úton aktivációt, és PAM jelenlétében sem váltják ki a receptor nyitását. "Csendes agonista" vegyületek például az *NS6740*(Briggs et al., 2009) (Blunt & Dougherty, 2019), a *PMP-072*, a *PMP-311*(Van Maanen et al., 2015) és a *p-CF<sub>3</sub> diEPP* (para-trifluorometil N,N-dietil-N'-fenilpiperazin jodid)(Quadri et al., 2018). Az apró konformációváltozások jelentőségét mutatja, hogy az *NS6740* egyetlen hidrogénkötés megszüntetésével (a kötőzseb tirozin 115 oldalláncának metil-tirozinná cserélésével) parciális agonistává tehető. A csendes agonisták terápiás profiljára nem a prokognitív, hanem a gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatás jellemző, amint azt a *PMP-072*, a *PMP-311* és a *p-CF<sub>3</sub> diEPP* esetében kimutatták.

### **1.4.3.3 Allosterikus modulátorok**

A PAM-ok az endogén ligand által közvetített jeleket erősítik fel, az ortoszteikus kötéshely elfoglalása nélkül(Bertrand & Gopalakrishnan, 2007). Alkalmazásuk a

klinikumban már bevált terápiás módszer. A benzodiazepinek például a szintén cisz-loop családba tartozó pentamer felépítésű GABA<sub>A</sub> receptor pozitív modulátorai; altató, szorongásoldó, nyugtató, izomlazító és görcsoldó hatásúak; használatuk széles körben elterjedt(Sieghart, 2015) (P. Corringer, 2012).

Az ivermectin, és az 5 hidrox-indol (5-HI) voltak első leírt  $\alpha 7$ nAChR-on is ható PAM-ok (Krause & Changeaux, 1998) (Zwart et al., 2002). Az ezekhez hasonló nem altípus szelektív, magas koncentrációkat igénylő, gyengébb hatású vegyületeket *első generációs PAM-ok*nak is nevezik(Williams, Wang, et al., 2011). Ide tartoznak még az alloszterikusan ható fehérjék is mint például a BSA (Bovine serum albumin) amelyről leírták a moduláló hatást(Conroy, Liu, Nai, Margiotta, & Berg, 2003). Szintén megemlítendő az emberi keratinocitákban termelődő SLURP-1 (secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein 1) nevezetű fehérje, amelyről az irodalomban egymásnak ellentmondó információk találhatóak(Kryukova et al., 2019) (Chimienti et al., 2003).

A *második generációs PAM-ok* közé soroljuk az utóbbi 10-15 évben vizsgált in vitro környezetben biológiai aktivitást mutató, alacsony koncentrációban alkalmazható, altípus szelektív hatóanyagokat(Bertrand & Gopalakrishnan, 2007).

A nAChR-ok modulátorait farmakológiai profiljuk alapján eredetileg két csoportba sorolták: az I. (mint pl. az NS1738 vagy a CCMI) és a II. típusba (mint pl. a PNU-120596) (Grønlien et al., 2007). Az I. típusúak a csúcs amplitúdót növelik meg, de az áram lefutásának kinetikáját nem változtatják meg, míg a II. típusúak az áramalakot elnyújtják, mivel a deszenzitizáció folyamatát is módosítják(Bertrand & Gopalakrishnan, 2007) (D B Timmermann et al., 2007). Mindkét kategóriára jellemző, hogy növeli a receptor érzékenységét, de a hatásmechanizmusbeli eltérések lassú oldatkicserélődés mellett (jó időbeli felbontás hiányában) rejtve maradtak. Ez a tény a hatóanyagok kategorizálásának kezdetén még nem volt egyértelmű. Az újabb vegyületekkel végzett kísérletek eredményei nem illettek egyik csoportba sem, ezért egy új, átmeneti kategóriát is be kellett vezetni (Dunlop et al., 2009) (Dinklo et al., 2011) (Williams, Wang, et al., 2011). Tisztán I. típusú PAM-ot kísérletben egyenlőre nem sikerült kimutatni. Az I. típusba sorolt anyagok esetében is megfigyelhető az áram kinetikájának átalakulása: ALV-3288 ((Ng et al., 2007)– Fig. 1), NS-1738 ((Friis, Mathes, Sunesen, Bowlby, & Dunlop, 2009)– Fig. 6, (D B Timmermann et al., 2007) – Fig. 5), 5-HI ill. genistein ((Grønlien et al.,



2007)– Fig. 2c és d), LY-2087101 ((Broad et al., 2006)– Fig.3), ivermectin ((Collins & Millar, 2010)– Fig. 2), JWX-A0108 ((Sun et al., 2019) – Fig. 1), a "3ea" jelű anyag ((X. Li et al., 2019) – Fig. 5), a "8ai" jelű anyag ((Y. Li et al., 2019)– Fig. 5).

Egyelőre vitatott, hogy terápiás alkalmazás szempontjából melyik altípus lehetne előnyösebb. Egyes feltevések szerint, az I. típusba tartozó PAM-ok prokognitív hatása kedvezőbb a II. típussal szemben, mert megmarad a gyors receptor kinetika, valamint kisebb mértékű a beáramló kalcium által indukált citotoxicitás (Ng et al., 2007) (D B Timmermann et al., 2007). A prokognitív hatásban szerepet játszhat a receptorok felszabályozódása. Az egyik tanulmány szerint ezt a II. típusú PAM-ok kivédhetik, míg az I. típusúaknál nem találtak ilyen hatást (M. S. Thomsen, J. D. Mikkelsen 2012). Az  $\alpha 7$ nAChR-ok modulátorai hatékonyak bizonyultak öregedéssel, kognitív károsodásokkal, skizofréniával- és Alzheimer-kórral kapcsolatos állatmodellekkel folytatott preklinikai vizsgálatokban (Bertrand & Jr, 2017). Az általunk vizsgált molekulákról a következő ismeretekkel találkozhatunk az irodalomban:

#### 1.4.3.3.1 I. típusú PAM-ok

Az I. típusú pozitív alloszterikus modulátorokhoz tartozik például az *NS-1738*, amelyről radioligand kötési tesztekben bebizonyosult, hogy nem az ortoszterikus kötőhelyen kötődik. Az elektrofiziológiai kísérletekkel ( $\alpha 7$  receptorral transzfektált oocitában valamint emlős sejteken, illetve hippokampális neuron tenyészeteken) is vizsgált modulátor, a receptor deszenzitizációt kevésbé befolyásolta, viszont az agonista által kiváltott válaszok amplitúdóját jelentősen megnövelte (Daniel B Timmermann et al., 2009). A szkopolamin indukált memóriavesztés állatmodellben végzett tanulási és memória folyamatokat tesztelő kísérletekben is hatékonyak bizonyultak (Daniel B Timmermann et al., 2009). Skizofrénia modellen végzett állatkísérletekben önmagában hatástalan volt, alacsony dózisú antipszichotikummal együtt adva viszont jeletős javulás érték el. Klinikai alkalmazásban előnyt jelenthetne, hogy (a kisebb dózis miatt) csökkent mellékhatások mellett, fokozódik az antipszichotikum hatás, javulnak a kognitív funkciók valamint jótékonyan befolyásolta a depressziót (Marcus et al., 2016). A  $\alpha 7$ nAChR szelektív Lu AF58801 vegyület patányoknál PCP indukált kognitív hiányos állatmodellben, új tárgy felismerési tesztek során valamint egérben skizofrénia és epilepszia asszociált mikrodeléciók hatásának visszafordításában bizonyult

hatékonyak.(Eskildsen et al., 2014) (Gass et al., 2016)Az ALV-3288 (más néven CCMI vagy XY4083) állatkísérletekben visszafordította ketamin indukált skizofrénia-szerű viselkedést(M S Thomsen, El-Sayed, & Mikkelsen, 2011) (Nikiforuk et al., 2015; Nikiforuk et al., 2016). Ugyanez a munkacsoport, számos más PAM tulajdonságú molekulát kifejlesztett, amelyek közül két I. típusú (-nak mondott) vegyület kiemelkedő eredményeket mutatott szkopolamin által indukált memóriavesztés állatmodellben új tárgy felismerés tesztben (Hogenkamp et al., 2013) (Vázquez-Gómez et al., 2014). Az Eli Lilly gyógyszergyár által szintetizált LY-2087101 jelű molekulát szintén I. típusúnak mondták, de ez az  $\alpha 7$ nAChR-ra kevésbé szelektív PAM-ok közé sorolható.(Broad et al., 2006) (Young et al., 2008) Az  $\alpha 7$ nAChR szelektív JWX-A0108 állatkísérletekben csökkentette az MK-801 indukált hallással kapcsolatos érzékelési zavarokat, javította a térbeli tájékozódáshoz szükséges memóriát, jótékony kognitív hatásai miatt skizofrénia és Alzheimer-kór lehetséges terápiás kezelésekként említik(Sun et al., 2019). Li és munkatársai kiterjedt szerkezet-aktivitás összefüggés analízist végeztek, amelyben több  $\alpha 7$ nAChR-on ható I. típusúnak nevezett PAM-ot is felfedeztek. Egyik ígéretes vegyületüket, a "3ea" jelűt, amelyet sikeresen teszteltek *in vivo* és *in vitro* kísérletekben, skizofrénia negatív tüneteinek kezelésére gondolják alkalmasnak(Y. Li et al., 2019). Egy másik szerkezeti csoportban hasonló hatékonyságú I. típusú PAM-ra jellemző jegyeket mutató anyagokat szintetizáltak, a legjobb tulajdonságúnak a "8ai" jelűt találták. Ebben az esetben még csak az *in vitro* kísérletek eredményei ismertek(X. Li et al., 2019).

#### 1.4.3.3.2 II. típusú PAM-ok

A II. típusú *PNU-120596*-ra egy nagy áteresztőképességű kalcium fluoreszcencia mérőszorozat alkalmazásával bukkantak rá (Hurst et al., 2005). In vitro elektrofiziológiai vizsgálatok során megerősítették, hogy a hatóanyag  $\alpha 7$  altípus-szelektív, és megnyújtja az agonista válasz lecsengését. Akut hippokampális agyszelet kísérletekben a principális sejteken *PNU-120596* hatására az ACh által indukált GABA-erg posztszinaptikus válaszok frekvenciája megnőtt (Hurst et al., 2005). Különböző neurodegeneratív betegségek állatmodelljeiben is sikeresen teljesített (Nikiforuk et al., 2015). Hatékonyan gátolta a  $\alpha 7$ nAChR deszenzitizációját, valamint pozitív töltésű molekulák jelenlétében (kolin, bikukullin), felerősítette a feszültség függő természetű, nyitott állapotban kialakuló csatorna blokkot (Kalappa & Uteshev, 2013). A vizsgálatok kiterjedtek a hőmérséklet függésre is, 21 és 37 fok között tesztelve megállapították, hogy fiziológias körülmények között kevésbé hat mint szobahőmérsékleten (Sitzia, Brown, Randall, & Dunlop, 2011) (Williams, Peng, Kimbrell, & Papke, 2012). Részletes kinetikai vizsgálatok szerint a *PNU-120596* a deszenzitizált állapotú receptorokhoz köt (Szabo, Pesti, Mike, & Vizi, 2014). Éppen ez a tulajdonsága teszi lehetővé, hogy a sérült szövetben lévő deszenzitizált receptorokat agonista jelenlétében képes legyen reaktiválni. A szívizom károsodásban döntő szerepet játszó miokardiális infarktus, vagy az agyi ér katasztrófát követő reperfüzió hatása így csökkenthető a kolinerg anti-inflammatórikus útvonal aktiválásán keresztül. A centrális és perifériás citoprotektív mechanizmus a neuronokon, glia- és immunsejteken kifejeződő, gyulladásgátló folyamatok szabályozásában részt vevő  $\alpha 7$ nAChR-okon keresztül valósul meg, amelyek aktivitása a *PNU-120596*-tal fokozható (H. Li, Zhang, Zhan, He, & Song, 2012) (Gaidhani & Uteshev, 2018). A mikroglia által termelt proinflammatorikus mediátorok neuronális gyulladási folyamatokat indítanak be, amely depresszióhoz vezethet. Viselkedési tesztekben is bebizonyosodott, hogy *PNU-120596* alkalmazásával az LPS által indukált depresszió visszafordítható. A deszenzitizációt elimináló II. típusú PAM-ok használata antidepresszáns szerek kiegészítő kezelésekként fokozhatná a terápiás hatást (Alzarea & Rahman, 2018).

Az A-867744 a *PNU-120596*-hoz hasonlóan, II. típusba tartozó PAM, amely képes visszahozni a receptorokat az agonista által előidézett deszenzitizált állapotból (John Malysz et al., 2009). Az A-867744 30  $\mu$ M-os koncentrációig (ez a maximális

oldhatóságot jelenti), hatástalan volt más altípusú nAChR-on ( $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ), valamint  $\alpha 7/5$ -HT<sub>3</sub> kimérán is, ahol N terminális domén humán  $\alpha 7$ nAChR, míg a receptor többi része 5-HT<sub>3</sub>R eredetű volt (Anderson et al., 2008; Bertrand et al., 2008 cikkekben használt kimérák alapján)(John Malysz et al., 2009). Ez megerősíti azt a feltételezést hogy az A-867744 kötésében az N-terminális régióknak és az extracelluláris domén M2-M3 huroknak nincs kiemelt szerepe. Leszorításos kísérletekkel is tesztelték, hogy az ortoszerikus kötőhelyet szabadon hagyja-e. Az  $\alpha 7$ nAChR-hoz nagy affinitással kötő agonista [<sup>3</sup>H]A-585539 segítségével meggyőződtek róla, hogy az A-887744 vad típusú  $\alpha 7$ nAChR esetében nem az agonista kötőhelyén kötődik. A modulátorral ellentétben, a nikotin és az MLA sikeresen leszorította az izotóppal jelölt agonistát a vad típusú receptor ortoszerikus kötőhelyéről. Ebből arra következtethetünk hogy az alloszerikus kötőhely a TM domének között valószínűsíthető(John Malysz et al., 2009). Mutációs kísérletekkel igazolták, hogy a kötőhelye valóban a TM2-TM3 membrán hélixek között lehet, amelyben néhány oldallánc különösen fontos szerepet tölthet be (S222, L247, és M253). Az  $\alpha 7$  247-es pozícióban lévő lizin aminosav oldallánc tirozinná való mutálásával a TQS és TBS-516 10  $\mu$ M-ban alloszerikus agonistaként hatottak. Az így kiváltott az áramokat A-867744 molekula 1  $\mu$ M-os koncentrációban gátolta, mert elfoglalta az TQS/TBS-516 kötőhelyét(Newcombe et al., 2018). In vitro elektrofiziológiai mérésekben patkányból izolált akut hippokampális agyszeleten alkalmazott A-867744 megnövelte az acetilkolin által kiváltott válaszokat, amelyek az altípus szelektív antagonistával (MLA) teljesen gátolhatóak voltak. Az  $\alpha 7$ nAChR továbbá részt vesz a GABAerg spontán aktivitás szabályozásában(Frazier et al., 2019). A gyrus dentatus szemcsesejteken 1 mM kolinnal kismértékben nőtt az IPSC (gátló szinaptikus áram) aktivitás, amelyet A-867744 tovább fokozott(John Malysz et al., 2009) (Faghieh et al., 2009). A TQS(Grønlien et al., 2007) egy  $\alpha 7$ nAChR szelektív II. típusú PAM, nem, úgy mint annak származékai, például a 4BP-TQS amely az anyavegyülettel ellentétben alloszerikus úton képes aktiválni is a receptort, viszont az ortoszerikusán kötődő MLA nem kompetitíven gátolja(Jaskiran K Gill et al., 2011).A JNJ-1930942 jelű vegyület (2-[[4-Fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol), fejlesztői szerint az I-es és II-es típusú PAM-ok közötti átmeneti csoport tagja amely hipokampális szelet preparátumon fokozta a neurotranszmissziót, és elősegítette az LTP kialakulását. Hatása MLA-val gátolható volt, genetikailag előállított skizofrénia modellben visszafordította a

halláshoz kapcsolódó érzékelési zavarokat, ezért a központi idegrendszer megbetegedéseinek tanulmányozásában vagy akár kezelésében hasznos lehet(Dinklo et al., 2011). Az 5-HT<sub>2B/C</sub> receptor antagonistá SB-206553 alacsony koncentrációkban alkalmazva, in vitro sejttenyészetben és szelet preparátumon végzett vizsgálatok alapján  $\alpha 7$ nAChR-ra ható, szintén I. és II. típusú tulajdonságokat ötvöző PAM-ként működött, és az állatkísérletek eredményei alapján alkalmas lehet skizofrénia kezelésére(Dunlop et al., 2009). A RO5126946 a vér-agyagáton penetráló, orálisan adható PAM vegyület amely hatékonyan bizonyult in vivo félelmi reakciókat, asszociatív tanulást vizsgáló kísérletekben, nikotinnal együtt adva alloszterikus serkentő hatást figyeltek meg(Sahdeo et al., 2014). A BNC375 egy nagyon ígéretesnek tűnő pozitív modulátor, melynek (R,R)-13 sztereoizomerje I típusú, míg (S,S) izomerje II típusú PAM-hatást mutat(Harvey et al., 2019). A prokognitív hatásáról ismert PAM-2(Potasiewicz et al., 2015) származékaként bemutatott DM489 nAChR pozitív modulátor streptozocin indukált neuropátiás fájdalom állatmodellben hatékonyan bizonyult. Az acetilkolin kiváltotta válaszok amplitúdóját megnövelte, kimosódott, és hatása MLA-val gátolható volt(Hugo R. Arias et al., 2020).

#### 1.4.3.3.3 Ago-PAMok

Az  $\alpha 7$ nAChR Ago-PAMok, olyan alloszterikus aktiváló agyagok (AA) amelyek az ortoszterikus kötőhelytől eltérő helyen közvetlenül aktiválják a receptorokat, valamint pozitívan modulálják az ortoszterikus elindított kolinerg jelátvitelt. Klinikai kísérletekben bizonyították, hogy az Ago-PAM-ok hatékonyabbak, mint a parciális agonisták, és a PAM-ok. Ide tartozik például a 4BP-TQS(Thakur, Kulkarni, Deschamps, & Papke, 2013) (J K Gill, Chatzidaki, Ursu, Sher, & Millar, 2013) (Pałczyn et al., 2012) és aktív izomerje a tetrahidrokinolin származék GAT107, amely hatékony fájdalomcsillapító valamint alkalmas gyulladáscsökkentő és neuropátiás eredetű fájdalmak kezelésére állatmodelleken(Bagdas et al., 2016). A B-973 aktív enantiomerjeként ismert, mecamlamine gátló hatására érzéketlen B-973B szintén a TM-régióban kötődő  $\alpha 7$  szelektív alloszterikus aktivátor, amely endogén agonista hatására alloszterikus modulátorként viselkedik(Quadri et al., 2019). Horenstein és munkatársai terápiás felhasználási lehetőségek szempontjából mutációs kísérletekkel vizsgálták meg az alloszterikus aktivátor hatás szerkezeti alapjait. Megállapították, hogy az AA hatás egy másik alloszterikus kötőhelyen keresztül valósul meg, amely nem a TMD-ben, hanem az ECD pórus felőli részén helyezkedik el, és meghatározó aminosava az Asp101.

Kimutatták hogy a GAT107 mind a TMD PAM kötőhelyéhez, mind az ECD AA kötőhelyéhez képes kötni, ezzel egy új gyógyszer célpontot azonosítottak az  $\alpha 7$ nAChR-on. (Horenstein et al., 2016). A 2NDEP nevű anyag parciális agonista egyben AA, amely szintén képes kötődni az ECD AA kötőhelyéhez. Ezt a következő mutációval igazolták: az  $\alpha 7$ C190A-es oldallánc elmutálásával ortoszterikus agonista kötésre nem, viszont az AA kötőhelyen (GAT107) aktiválható a receptor. Ezen a mutánsan a 2NDEP PNU-120596-val koapplikálva AA kötőhelyen ható agonistaként viselkedett, a hatás AA kötőhely szelektív antagonistával gátolható volt (2,3,5,6MP-TQS).(Gulsevin et al., 2019)

A klinikai fázisba jutott agonisták, valamint a pozitív alloszterikus modulátorok és alloszterikus agonisták összefoglaló táblázatai a függelékben található.

#### 1.4.3.3.4 NAM-ok

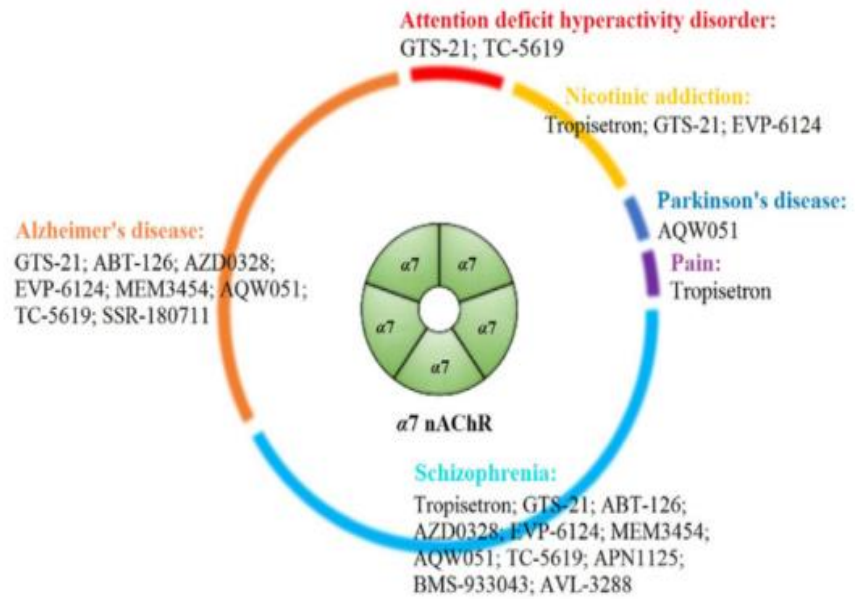
Negatív alloszterikus modulátoroknak nevezzük azokat a hatóanyagokat, amelyek csökkentik az agonista által kiváltott válaszokat, de nem az ortoszterikus kötőhelyen kötődnek. Endogén vegyületek közül ide sorolható a KYNA (kinurénsav), amely kompetitíven gátolja a receptor válaszkészségét alloszterikus ligandokkal szemben (Albuquerque & Schwarcz, 2013)(Pereira et al., 2002)(Lopes et al., 2007). Receptor működést negatívan befolyásoló anyagok lehetnek még az ösztrogén típusú vegyületek, és a  $\beta$ -amiloidok(Lasala, Fabiani, Corradi, Antollini, & Bouzat, 2019)(Albuquerque & Schwarcz, 2013). Ide tartoznak még az alloszterikusan ható peptidek illetve fehérjék; a SLURP-1 (secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein 1), és Lynx1. Továbbá a ketaminról is kimutatták, hogy a TM-régióban van a kötőhelye és non-kompetitív gátló hatással rendelkezik(Bondarenko & Xu, 2014). A ketamin származék benzethonium chloride (BCI) szintén gátolja az  $\alpha 7$  receptorokat de a ketaminnal ellentétben kompetitív módon(Vázquez-Gómez et al., 2014). Néhány antihisztamin típusú vegyületről (Triprolidine, Pyrilamine, Orphenadrine, Promethazine, Diphenhydramine, Chlorpheniramine, Cetirizine) is leírták az  $\alpha 7$ -re kifejtett gátló hatásukat(Sadek et al., 2015). Az antidepresszánsok közül, a fluoxetine, paroxetine, szertralin, venlafaxine, nefazodone in vitro sejtenyészeteken tesztelve non-kompetitív gátló szerkként viselkedtek(Fryer & Lukas, 1999). Ezen kívül a dohányzásról való leszokás elősegítésére alkalmazott antidepresszánsról a bupropionról is megjelent egy közlemény amelyben

dokkolási kísérletek alapján a kötőhelyét a csatorna lumenében lokalizálták, emellett gátló hatásáról is beszámoltak (Vázquez-Gómez et al., 2014). Az orvosi kannabisz növény gyulladásgátló nem pszichoaktív hatóanyagáról a kannabidiolról is kimutatták, hogy a szelektív agonistával (kolinnal) kiváltott válaszokat gátolja (Vázquez-Gómez et al., 2014) (Al Rawashdah et al., 2019) (Mahgoub et al., 2013).

#### **1.4.3.4 Klinikai vizsgálatok**

Az első és egyetlen embereken is vizsgált  $\alpha 7$ nAChR pozitív alloszterikus modulátor az I. típusba sorolt AVL-3288 melyet egészséges nem dohányzó önkéntesekkel végeztek (Fázis 1) (Gee et al., 2017). A hatóanyag biztonságosnak bizonyult, de statisztikailag nem volt szignifikáns hatása az alapvető kognitív funkciókra. Az utóbbi harminc évben a gyógyszergyárak a nAChR alulműködéssel összefüggésbe hozható neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmas, altípus szelektív, hatékony, nagy affinitású ligandok tervezésére fókuszáltak (8. Ábra). Figyelemre méltó erőfeszítéseik eredményeként agonisták, antagonisták, és modulátorok sokasága jött létre, amelyek szigorú szabályozások miatt klinikai vizsgálatokon megbuktak. A tesztek sikertelensége következő okokra vezethető vissza: 1) különbségek a állatmodell és a kísérletben résztvevő betegek állapota között, 2) a tesztelt hatóanyag koncentráció tartományok nem megegyezők, 3) egy hatékonyabb, specifikus molekulára lenne szükség, amit a már meglévő kezelés kiegészítéseként lehetne alkalmazni.

A sikeres hatóanyag fejlesztéseknek gátat szabó, felhasználási hibából származó akadályozó tényezők nemcsak a kognitív szerekre korlátozódnak, hanem minden gyógyszerkutató területre érvényesek.



8. Ábra Klinikai fázisban lévő hatóanyagok neurodegeneratív betegségek kezelésére

The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$  nAChR for CNS indications in clinical trials  
(T. Yang et al., 2017)



## 2 Célkitűzések

A gyógyszergyárak a kognitív betegségek terápiás kezelésére alkalmas szerek kutatására jelenleg azt a stratégiát követik, hogy nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatokban ("high throughput screening, HTS") tesztelik, hogy melyik molekulák lehetnek hatékonyak az adott célponton (esetünkben az  $\alpha 7nAChR$ -on). A talált molekulákról állatmodellekben döntenek el, hogy terápiás szempontból is hatékonyak lehetnek-e. Azt gondoljuk, jobb stratégia lenne, ha még a viszonylag olcsó szűrővizsgálaton választ keresnének nem csak arra, hogy az adott anyag *hat-e* az adott célfehérjére, hanem arra is hogy *hogyan* hat rá. Terápiás potenciál szempontjából ugyanis nem mindegy hogy az adott anyag agonista, parciális agonista, "csendes" agonista, I-es ill. II. típusú pozitív modulátor, alloszterikus aktivátor, stb., vagy ezeknek valamilyen kombinációja. Ráadásul az I-es ill. II. típusú PAM csoportokon belül is rendkívül sokféle hatásmechanizmus létezhet, ahogy azt később tárgyalni fogom. Mindezeket a kérdéseket lehetséges nagy áteresztőképességű elektrofiziológiai szűrővizsgálaton is tanulmányozni. Természetesen a nagy áteresztőképességű rendszerek használata előtt meg kell tudni, pontosan milyen kérdésekre akarunk választ kapni, és azt milyen tesztekkel lehet megtudni. Ehhez a manuális rendszeren kivitelezett előkísérletek szükségesek. Dolgozatomban elsősorban az  $\alpha 7nAChR$  két szelektív alloszterikus modulátorának, a PNU-120596 és az A-867744 anyagoknak hatásmechanizmusával foglalkozom. Mindkét hatóanyag a II. típusú pozitív alloszterikus modulátorok csoportjába sorolható, vagyis az agonistára adott válasz méretére és kinetikájára is hatással vannak. A transzmembrán domének között elhelyezkedő kötőhelyük valószínűleg részben átfedő, de az erre vonatkozó irodalmi adatok ellentmondóak. (Az irodalmi adatokról összehasonlító táblázat is készült, amely a függelékben található.) Meg akartuk vizsgálni, valóban egy kötőhelyen osztoznak-e, illetve valóban hasonló-e a hatásmechanizmusuk, és ebből fakadóan valóban hasonló terápiás hatásra számíthatunk-e esetükben. Be fogom mutatni, hogyan állítottuk be a hatásmechanizmus tanulmányozásához szükséges anyagadó rendszereket és eszközöket, és hogy milyen speciális kihívásokat jelentett az  $\alpha 7nAChR$  különösen gyors kapuzási kinetikája. A modulátorok hatásmechanizmusának megértését a receptor működésének megértésével kell kezdeni. Nem volt ismert, hogy milyen gyors a receptor aktivációja és deszenzitizációja (mivel sokkal gyorsabb, mint a kísérletekben használt oldatcserélő rendszerek, ezért a kísérletesen regisztrált áram felfutás és lecsengés nem a receptor,

hanem az oldatcserélő rendszer sebességét tükrözte). A hagyományos gondolkodás szerint az áram felfutása az aktiváció sebességét, lecsengése pedig a deszenzitizáció sebességét tükrözi. Mint kiderült, az  $\alpha 7nAChR$  esetében ez nem ilyen egyszerű. Szintén nem volt ismert, hogy a receptor populáció hány százaléka aktiválódik (nyílik ki) egyáltalán egy-egy agonista pulzus során, és ezen belől hány százalék van egyidejűleg nyitva. Végül a modulátorok hatásmechanizmusa kapcsán azt a gyógyszerfejlesztés szempontjából fontos kérdést vizsgáltuk meg, hogy a kidolgozott módszerek és protokollok milyen módon és milyen mértékben adaptálhatók a nagy áteresztőképességű automata patch clamp rendszereke.

**Dolgozatomban tehát a következő kérdésekre kerestem a választ:**

- 1) Milyen gyors a receptorok saját (intrinsic) kinetikája?
- 2) A receptor populáció hány százaléka nyílik ki egyszerre? Hány százaléka nyílik ki egyáltalán?
- 3) Milyen folyamatokat tükröz az áramok felfutása, lecsengése?
- 4) Valóban azonos-e a két azonos kategóriába (II. típus) sorolt modulátor hatásmechanizmusa? Ha nem, miben különböznek? Pl. állapot-preferencia, asszociációs és disszociációs sebesség, a modulált receptor viselkedése: nyitások hossza, deaktiváció sebessége, sztöchiometria, stb
- 5) Azonos kötőhelyen osztoznak-e?
- 6) Hogyan alkalmazhatók a manuálisan fejlesztett protokollok nagy áteresztő képességű rendszereken, hogyan hasznosíthatnák ezt a gyógyszergyárak?
- 7) Milyen terápiás jelentősége lehet a hatóanyagok hatásmechanizmus alapján történő megválasztásának?

### 3 Módszerek

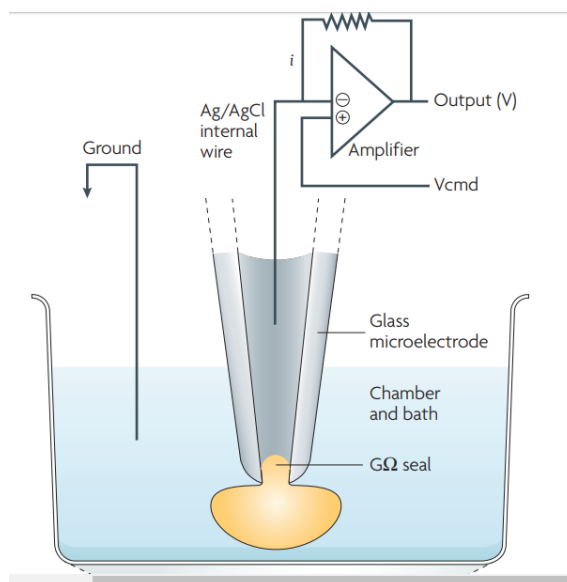
#### 3.1 A sejt elektrofiziológiai módszerek és műszerek általános ismertetése

##### 3.1.1 A patch clamp technika

A patch clamp technika lehetővé teszi, hogy a sejtmembránban lévő ioncsatornákon át folyó áramokat detektálni tudjunk. A módszer lényege, hogy egy tiszta, hővel simára olvasztott felületű, elektrolit oldatot tartalmazó üveg mikroelektrodát nyomunk a sejt membránjához, ezáltal kialakul egy körülbelül 50 M $\Omega$  ellenállású elektromos kapcsolat a pipetta és a biológiai membrán között. Ezt a jelenséget "seal"-nek nevezzük.

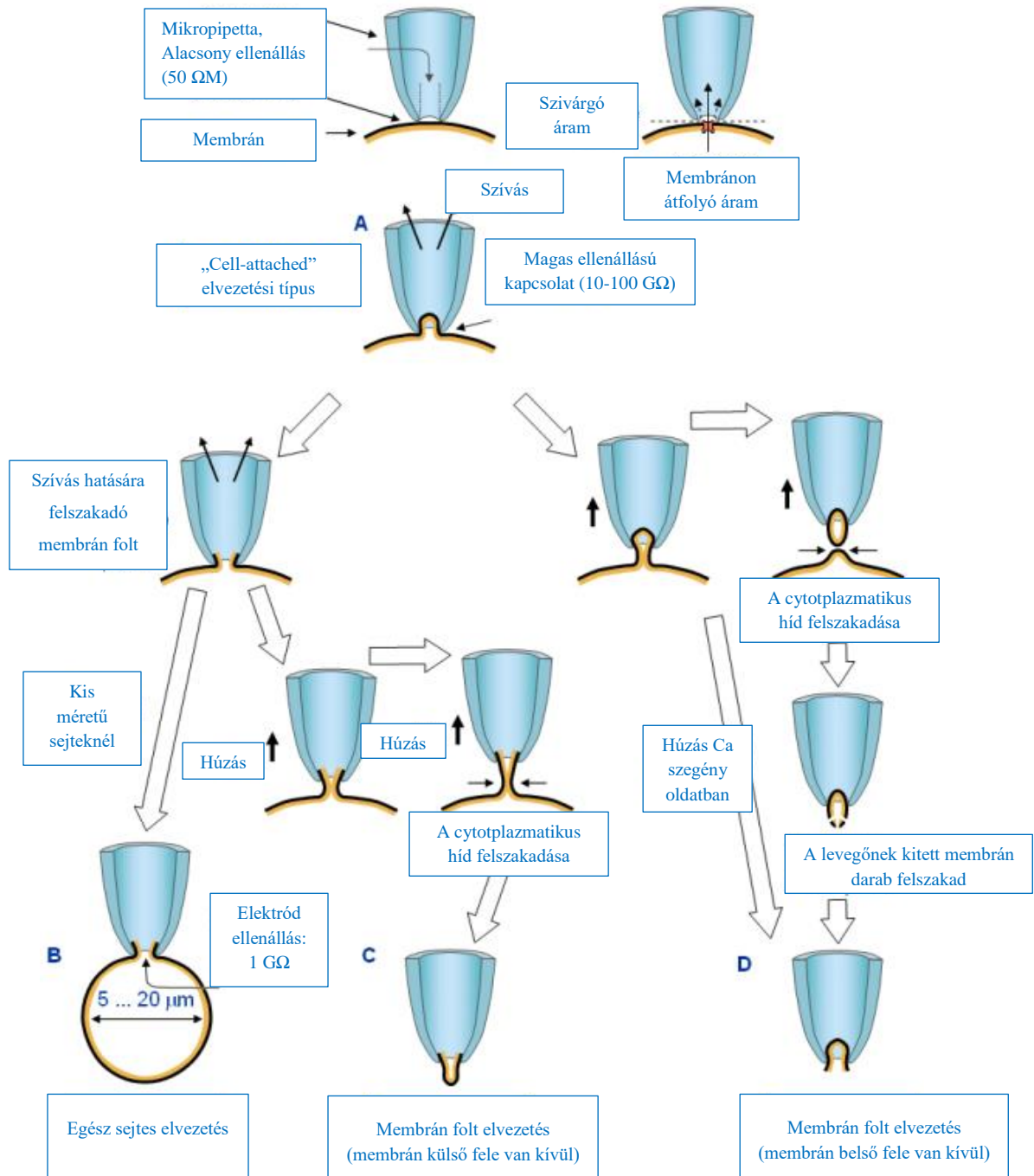
A magasabb seal ellenállás előnyösebb mérési körülményeket biztosít, mert

drasztikusan lecsökken a háttér zaj szint, illetve kisebb lesz a szivárgó áram. Az ellenállás értéke tovább növelhető amennyiben a pipetta belsejére szívó hatást gyakorlunk. A nyomás csökkenés hatására a membrán omega alakban beboltosul a pipettába. Az így kialakult nagyon erős, mechanikailag stabil kapcsolatot már "gigaohm seal"-nek vagy röviden "gigaseal"-nek hívják, elvezetés szempontjából pedig a "cell-attached" konformációhoz jutunk (9. Ábra). Ez a legegyszerűbb elvezetési módszer, amely során a sejteket a legkevesebb külső behatás éri, és a membrán sem sérül. Regisztrálhatunk így spontán aktivitást, szinaptikus áramokat valamint stimulálhatjuk is a sejtet. A pipetta belsejében lévő nyomás csökkentésével elérhető hogy az üvegpipetta belsejében lévő membrándarab felszakadjon, így egész-sejtes "whole-cell" konfigurációt kapunk. "Whole-cell" konfigurációban kisebb méretű sejtek ( $d=5-10\mu\text{m}$ ) esetében a membrán teljes felületén lévő, összes csatorna aktivitását mérhetjük (10. Ábra). A módszer hátránya, hogy a sejt belsejéből kimosódnak a sejtalkotók. A kihígulás megakadályozására kínálózó alternatíva, a perforált membrán "perforated patch" konfiguráció, amely során a felnyitáshoz speciális antibiotikumokkal vagy fungicid anyagokkal kiegészített pipettaoldatot használnak, amelyek (a fentebb említett



9. Ábra manuális patch clamp (Dunlop et al., 2008)

gramicidinhez hasonlóan) képesek a membránba beépülve abban pórusokat alkotni. Ebben az esetben a sejthártya ionok számára átjárható lesz, de nagyobb molekulák, és fehérjék számára átjárhatatlan marad.



Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membranes. Pflüger Arch. ges. Physiol. 391: 85-100. és Jaakko Malmivuo & Robert Plonsey átdolgozott ábrája alapján

10. Ábra A patch calamp konfigurációk sematikus ábrája

Amennyiben csak egy kisebb membránfolton szeretnénk mérni, a sejtmembrán “felnyitását” követően, a pipettát visszahúzva egy kitépelt sejthártya darabból az az “*excised patch*”-ből, vagy, ha a membránfolt a sejtmaggal együtt szakadt ki, “*nucleated patch*”-ből regisztrálhatunk. A kitépelt membrándarab ugyanis ilyenkor magától összezáródik. Ha a sejtmembrán felnyitása nélkül tépjük ki a membrán foltot, a membrán spontán összezáródásával egy kis vezikula alakul ki a pipetta hegyében. Ha olyan kísérletet akarunk végezni ahol a csatorna intracelluláris oldalára ható anyagokat tanulmányozzuk, akkor fel lehet nyitni a kis vezikula magától összezáródott külső membrán részét, úgy hogy a kihúzott membrán darabot egy pillanatra kiemeljük a levegőre. Ekkor olyan konfigurációt kapunk, ahol a membrán intracelluláris oldala van kívül, ezt hívják “*inside-out*” konfigurációnak. Az oldatok lecserélését követően, ebben a konfigurációban például a citoplazmatikus ionkoncentráció változás hatását vizsgálhatjuk az ioncsatornákon. A “külső-oldallal-kifelé-néző” vagyis “*outside-out patch*”-ből pedig az extracelluláris oldalról ható anyagokat tanulmányozhatjuk. A kitépelt membrán-folt (“*excised patch*”) előnye, hogy a kis méret miatt sokkal pontosabban kontrollálható a membránpotenciál, és az oldatcsere is gyorsabb a kis membránfolt körül, mint egy teljes sejt körül. Ezen kívül lehetséges egyedi csatornák aktivitását vizsgálni, vagyis úgynevezett “*single-channel*” méréseket végezni. Ebben az esetben egyetlen fehérje molekula konformációváltozása követhető valós időben. A konfigurációkat a 10. Ábra mutatja be.

A sejt szintű elektrofiziológiának két alapvető megközelítése létezik. Amennyiben a membránon átfolyó áramot szeretnénk regisztrálni, a választ feszültség protokollokkal váltjuk ki, azaz a membránpotenciált rögzítjük, ilyenkor “*voltage clampben*” mérünk. Egyedi ioncsatornák tanulmányozására ezt a módszert szokták használni, és jelen dolgozatban is ilyen méréseket fogok bemutatni. Ha pedig a teljes sejt membránpotenciál változását szeretnénk megfigyelni, akkor konstans áramot injektálunk a sejtbe, azaz “*current-clamp*”-et alkalmazunk (Hamill, Marty, Neher, Sakmann, & Sigworth, 1981). Ebben az esetben a membránpotenciál változás több különböző típusú ioncsatorna populáció összehangolt működésének eredménye, tehát ez a módszer nem az ioncsatorna szintű, hanem sejt- vagy hálózat-szintű kérdések tanulmányozására alkalmazható (Hamill et al., 1981).

### 3.1.2 A manuális patch clamp rendszer felépítése

A manuális elektrofiziológiai műszeregyüttes építésénél a következő irányelveket vettük figyelembe: 1) A hosszabb fenntarthatóság érdekében a vizsgálatra szánt minta körülményeinek optimalizálása, stabilizálása. 2) A minta megjelenítéséhez a preparátum típusának megfelelően megválasztott optika. 3) Mechanikus és elektromos zajtól elszigetelten, a mikroelektróda stabilan pozicionálható legyen. 4) Megfelelő elektronikai felszereltség a biológiai jelek regisztrálásához, felerősítéséhez, feldolgozásához (Finkel & Bookman, 2001).

A műszert egy rezgésmentes asztalon álló Faraday-ketrecben helyeztük el, amelynek segítségével próbáltuk minimálisra csökkenteni a vibrációt és az elektromos zajt. A perisztaltikus pumpák segítségével működtetett oldat perfúziós rendszerbe csepegtetőt szereltünk be, így a pumpák által generált elektromos zaj nem jutott be a Faraday-kalitkába a folyamatos folyadékoszlopon keresztül. Az 50 Hz kiküszöbölését az épület műszerföldjéhez való csatlakozással oldottuk meg. A kísérletek kivitelezéséhez egy Nikon T2E Eclipse típusú, 4x, 10x és 20x nagyítású objektívekkel rendelkező inverz fáziskontraszt mikroszkópot használtunk. A manipulátorokat és a gyors anyagadó rendszer “állványzatát” a mikroszkóp tárgyasztala köré épített feltéten rögzítettük. A kísérletre szánt sejteket petricsészéstül, egy folyamatosan átáramló, extracelluláris oldatot tartalmazó perfúziós kamrában helyeztük el. A 35 mm-es petricsészét, amelyben a sejteket tenyésztettük, egy speciális alakú teflon betéttel beszűkítettük, hogy az oldatáramlás folyamatos és egyirányú legyen (11. Ábra).

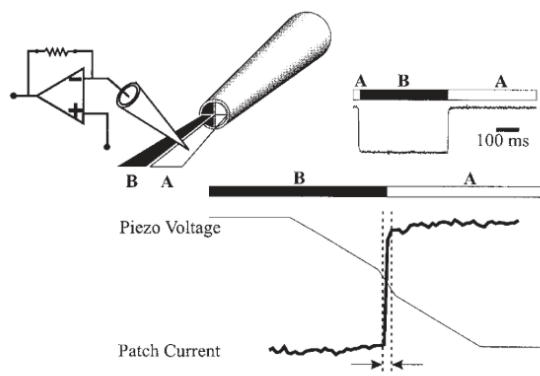


11. Ábra A műszeregyüttes és a perfúziós karma felépítése

### 3.1.3 Az oldatcserélő rendszer felépítése

A nyomás-vezérelt, gyors anyagadó rendszer végpontjaként kettős U-, illetve theta csövet használtunk (ábra). A theta csövek nevüket arról kapták, hogy keresztmetszetük a görög  $\theta$  betűre emlékeztet, mivel középen egy vékony üvegfal két részre osztja a kapillárist. Az 1,5 mm átmérőjű boroszilikát kapillárisok végét, Sutter P-2000-es lézeres pipettahúzóval elvékonyítottuk. A kihúzott üvegcső „száját” körülbelül 100-150  $\mu\text{m}$  átmérőjűre törtük. A rövidebb ideig tartó hatóanyag kicserélődés érdekében a theta-cső holt térfogatát lecsökkentettük. Ehhez a kapilláris hegyébe 1-1 Microfil™ (WPI) üvegapilláris (epoxigyantával bevont nagyon hajlékony 350  $\mu\text{m}$  átmérőjű üvegapilláris) helyeztünk, amelyet kétkomponensű ragasztóval rögzítettünk. A Microfil™ szabad végeire 0.38 mm belső átmérőjű csövek kerültek, amelyekkel az anyagadó rendszer szelepeihez illetve a piezoelektromos vezérlő rendszerhez csatlakoztattuk a theta csövet (Sachs, 1999) (12. Ábra).

A rendszer bemenete oldatperfúzió szempontából egy nyomás alá helyezett 50 ml-es térfogatú centrifugacső, amelyből a beáramló levegő a csövekbe nyomja az extracelluláris oldatban oldott hatóanyagot. Közvetlenül a végpont előtt (mielőtt a drog elérné a theta csövet) szelepek állják a folyadék útját. A

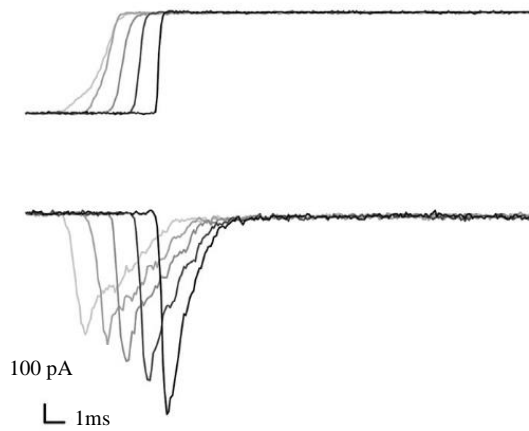


12. Ábra A theta cső működése

Trexler, E Brady, Verselis, Vytas K konnexinek vizsgálata című munkájukból

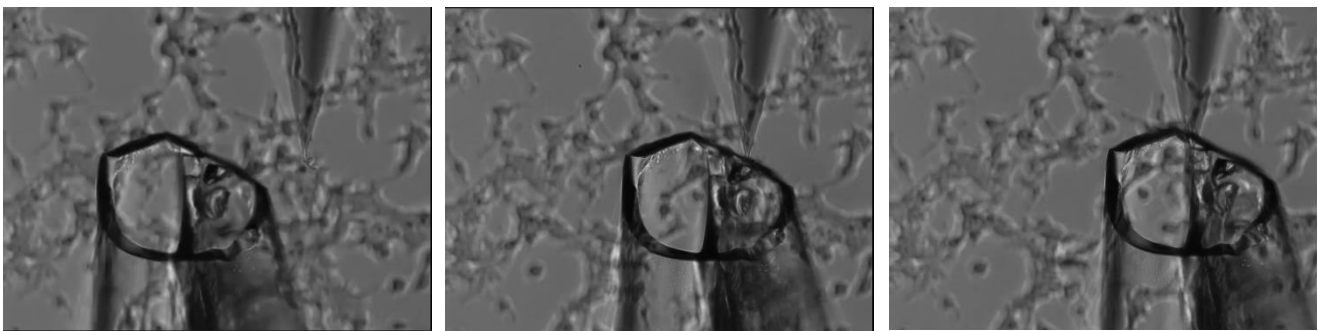
szelepek működtetése történhet manuális úton, vagy bonyolultabb protokollok esetén lehet számítógépes vezérlésű. Alap esetben nyomás alá helyezett rendszerben a szelepeknek két állása van, vagy a sejtek irányába folyik az oldat vagy pedig (pl. atmosáskor) a szemetes felé. A pClamp szoftver az anyagadás szelepeinek számítógépes vezérlésén kívül a theta csövet horizontális irányban mozgó piezoelektromos manipulátort is irányítja a programba írt feszültség protokollok alapján (Y. Kabakov, Ph.D. and R.L. Papke, 1997) (Trexler & Verselis, n.d.) (Y. Kabakov, Ph.D. and R.L. Papke, 1997). A theta csöves anyagadás előnye az ultragyors (ms alatti) az oldatcsere és kevésbé körülményes a sejt megközelítése. Hátránya, hogy nagyon törékeny, nincs elszívás, és fel kell emelni hozzá a sejteket.

Mivel az oldatkicserélődés sebessége nagyon sok tényezőtől függ (a theta cső átmérője, geometriája, az alkalmazott nyomás, a sejt pontos helyzete a theta csőhöz képest) minden kísérlet után a mérő pipetta elmozdítása nélkül elvégeztük a theta cső kalibrálását (12.,és 13. Ábra). Ez sejt nélküli pipettával, higított extracelluláris oldattal történt, ilyenkor az



13. Ábra Theta cső kalibráció

ionkoncentrációk különbsége miatt oldatcsere során megváltozik az intra-és extracelluláris oldat közötti junctionos potenciál, amit áram változásként érzékelünk "voltage-clamp" módban. Az áram változás időbeli lefutása elsősorban a theta cső mozgási sebességétől függ. A 13. Ábra különböző sebességű mozgások esetén mutatja a 10 mM kolinnal kiváltott áramokat  $\alpha 7nAChR$ -okon (alsó görbék), illetve ugyanazon sebességeknél a kalibrációs görbéket (felső görbék). A görbék között 1 ms-os elcsúsztatást alkalmaztunk, hogy jobban kivehetőek legyenek. A mért oldatkicserélődési idők (10-90%-os kicserélődést mértünk, mivel a görbék eleje és vége néha nem volt egyértelműen meghatározható) ebben az esetben a szürke görbétől a feketéig a következők voltak: 2.3, 1.3, 1.0, 0.6, 0.35 ms. A méretarányt jelző vonalak 100 pA-t és 1 ms-ot mutatnak. A 14. Ábrán mérés közben készült mikroszkópos felvételeket láthatunk.



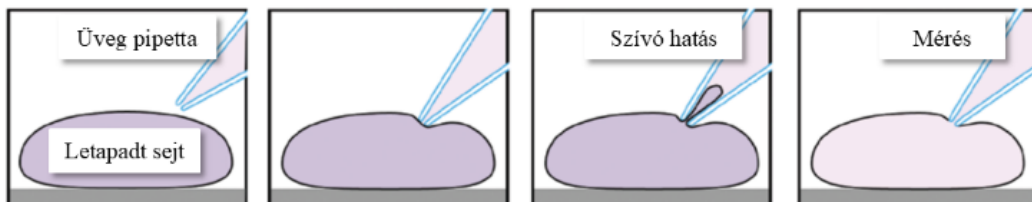
14. Ábra A theta anyagadás



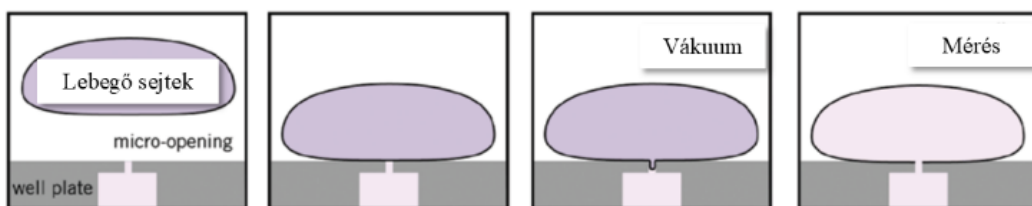
### 3.1.4 Nagy áteresztő képességű rendszerek: Automata patch clamp (APC)

Nagy áteresztőképességű (HTS) szűrési módszerek már korábban is elérhetőek voltak (radioaktív ligand kötési tesztek, ion flux alapú tesztek, fluoreszcens jelzőanyagok, feszültség-érzékeny fluoreszcens festékek, ion specifikus fluoreszcens próbák)(Yu, Li, Wang, & Wang, 2016) (Denyer et al., 1998) (Xu et al., 2001). Ezek a közvetett mérési módszerek nem adnak pontos információt az ioncsatorna működési mechanizmusáról. A technológia fejlődése felgyorsította a gyógyszerkutatást. Ionkoncentráció változások detektálására alkalmas fluoreszcens képalkotó lemezolvasó készülékek (FLiPR-FLuorescence-Imaging Plate Reader) lehetővé tették nagy mennyiségű adat kinyerését viszonylag alacsony költségek mellett. Sajnos ennek a vizsgálati módszernek az időbeli felbontása és információ tartalma alacsony. A hagyományos patch clamp-pel kivitelezhető valós idejű mérések magas információ tartalommal rendelkeznek, megbízható adatminőséget szolgáltatnak. Hátrányként számolható el idő-, és munkaerő igényessége, valamint a HTS-hez képest alacsonyabb hatásfoka (10-30 sejt/nap). Az automata rendszerek kifejlesztésének célja a hosszadalmas procedúrák lerövidítése, valamint a nagy áteresztő képesség elérése adat minőség romlás nélkül(Yu et al., 2016).

#### Hagyományos patch clamp



#### Planáris patch clamp



15. Ábra A hagyományos és a planáris patch clamp összehasonlítása ( eredeti kép: High-throughput Ion Channel Screening: A “Patch”-work Solution, Jeffrey M. Perkel, Future Sciences Biotechniques 2018)

Az elmúlt húsz évben a HTS technológiában a planáris patch clamp (planar patch clamp) hozta meg az áttörő eredményt. Ennek lényege, hogy a hagyományostól eltérő irányból, azaz aluról közelíti meg a sejtet. Pipetta helyett egy lyukas lap (anyagát tekintve gyártási eljárástól függően lehet üveg, szilikon vagy hőre keményedő műanyag) szolgál, amelyre

vákuummal szívják rá az extracelluláris oldatban lebegő sejteket. A membrán másik oldalán intracelluláris oldat és egy mikroelektród található. A módszer forradalmasította az elektrofiziológiát, segítségével adatminőség veszélyeztetése nélkül elérhetővé vált a nagy áteresztőképesség (Yu et al., 2016). A hagyományos és az automata patch clamp összehasonlítását a 15. Ábra mutatja be.

Három különböző megközelítéssel próbálták megvalósítani az automatizált patch-clamp méréseket. Egyrészt megpróbálták a hagyományos manuális rendszereket automatizálni. Ilyen volt az első kereskedelmi forgalomban kapható automatizált elektrofiziológiai szűrésre alkalmas rendszer, a Sophion Biosciences fél-automata Apatchi 1 modellje. A második megközelítés még üveg pipettát, de már sejtszuspenziót használt; a pipetta belsejébe juttatott sejtszuspenziót pozitív nyomással juttatták a pipetta hegyébe, majd kívülről felnyitva a membránt "inside-out whole-cell" konfigurációban mértek. Ilyen rendszerek voltak a Flyion által fejlesztett Flyscreen (Asmild et al., 2011), és más, kereskedelmi forgalomba nem került pipetta alapú rendszerek, mint az AutoPatch, és RoboPatch (Dunlop, Bowlby, Peri, Vasilyev, & Arias, 2008) (Vasilyev, Merrill, & Bowlby, 2005). Végül a harmadik megközelítés, a planáris patch clamp bizonyult messze a legsikeresebbnek. Az első négy rendszer (2003 és 2006 között) az IonWorks (Essen Instruments, később Molecular Devices), a PatchXpress (Axon Instruments, később Molecular Devices), a QPatch (Sophion), és a Patchliner (Nanion), különböző prioritásokat tartott szem előtt, és ennek megfelelően különböző megoldásokat alkalmazott a sejt-plate kapcsolat kialakítására ill. az oldatcsereére. Az IonWorks, és utódai a második generációs IonWorks HT Quattro™ valamint az IonWorks Barracuda™ perforált patch elven működnek, emiatt giga-ohmos ellenállású kapcsolat kialakítása nehézkes. Mivel oldatcsere közben nem lehet regisztrálni, ligand-függő ioncsatornák tesztelésre, valamint feszültség-függő csatornák esetében hatóanyag kötési kinetika mérésére sem a legalkalmasabbak. Az újabb modellekkel 95% fölötti siker aránnyal és nagy áteresztőképességgel (egyszerre 384 csatornán) lehet mérni (Comley, 2014). A másik három rendszerben valódi giga-ohmos kapcsolat érhető el (bár ez a siker arány csökkenésével jár). A PatchXpress esetén az oldatáramlás nem folyamatos, a Qpatch és a Patchliner esetében azonban az oldatcsere a mérő chip-ekbe beépített csövön keresztül folyik, tehát teljes oldatcsere lehetséges folyamatos regisztrálás közben.

A következő szakaszban (2008-2010) piacra kerül a QPatch 48 csatornás változata, a Nanion által gyártott 96 csatornás SyncroPatch, a Fluxion által kifejlesztett IonFlux (előbb 16, majd 64 csatornás változatban), és a Celectricon terméke, a Dynaflo HT. A hatékony oldatperfúziós rendszeréről ismert cég új fejlesztése 16 kísérleti moduljában egységenként 6 sejtből lehet párhuzamosan mérni nyomás-vezérelt mikrofluidikai elven történő oldatcserével. A műszer nem terjedt el széles körben magas ára miatt (Perkel, 2010). Az IonFlux ugyanezen az elven működő oldatcserét valósított meg jóval olcsóbb plate-reader-szerű kivitelben. A jó minőségű mérést biztosító, de alacsony áteresztő képességű CytoPatch rendszert a Cytocentrics AG fejlesztette ki. Magasabb áteresztőképességű változata nem került forgalomba. Az új generációs HTS APC rendszerekkel már gyorsan deszenzitizálódó ligand-függő receptoron is lehetett sikeres méréseket kivitelezni (Kirton, Pettinger, & Gamper, 2013), megvalósítható a nagy áteresztőképesség és a megfelelő adatminőséggel együtt. Ma a második generációs (2013-2016), legkorszerűbb eszközök közé sorolható a Sophion Qube (384), a Nanion SyncroPatch 384PE és 768PE, valamint a Fluxion Ionflux Mercury HT (64) mérőállomások, amelyeket voltage és current-clamp módban is használhatunk, szabályozható hőmérséklettel, nyomással rendelkeznek, gyors oldatcserét (50–100 ms) tesznek lehetővé, ezért feszültség- valamint ligand-függő csatornák tesztelésére is alkalmasak (Yu et al., 2016). A Qube és SyncroPatch egyaránt 384 digitális erősítővel valamint pipettázó robottal ellátott csatornát használ, boroszilikát alapú üveg egy-sejtes és populációs méréshez is alkalmas soklyukú chippel, amelyben programozható a pozitív és a negatív nyomás. Viszont a műszerek oldatcserélő rendszere több ponton különbözik. A Qube mikrofluidikai elven működő chipbe integrált oldatcserélő rendszerrel dolgozik, a SyncroPatch ezzel ellentétben sajátos oldatkezelő robot technikát alkalmaz (Biomek FX) amellyel még egy 384-es modul válik integrálhatóvá lehetővé téve a 768 párhuzamos mérést (T. Li et al., 2017). További előnyei, az intracelluláris oldatcsere lehetősége mérés közben, a beépített dynamic-clamp, amely ioncsatornák modellezését teszi lehetővé valós idejű mérés közben, valamint a programozható LED világítás amely optogenetikai kísérletek elvégzésére is alkalmassá teszi a műszert (Rizzetto et al., 2018) (Obergrussberger et al., 2018).

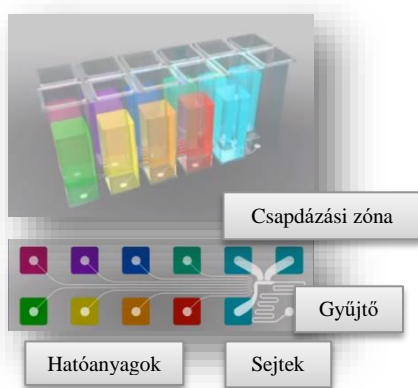
### 3.1.5 Ionflux Mercury HT

A IonFlux Mercury (Fluxion Biosciences) (16. Ábra) egy nagy áteresztőképességű automatizált patch clamp berendezés, amelynek a „lelke” egy standard 384 lyukú platehez hasonlatos. Az oldatcserélő rendszer plate-en belül megoldott mikrofluidikai



16. Ábra IonFlux automata patch clamp mérőállomás (az eredeti kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

elven alapul, edényei a plate alját képező műanyag lemezbe integrálva helyezkednek el

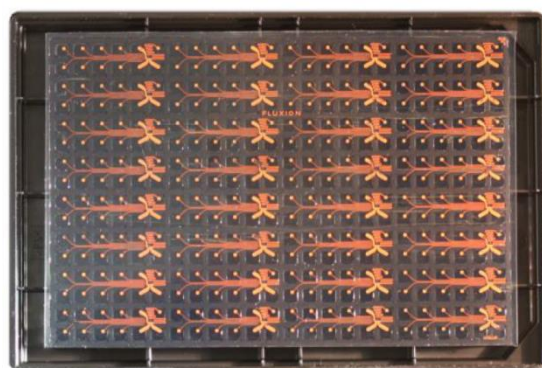


17. Ábra a kísérleti egység felépítése (kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

elhasznált oldatok. A mellette lévő mélyedésbe az extracelluláris oldatban felfuszpendált, ligandfüggő fehérjét expresszáló sejtek kerülnek. Fölöttük (kék színnel jelölve) a két egymástól független „csapdázási zóna” amelyeket intracelluláris oldattal kell feltölteni (17. Ábra). Ezekből jobbra sorakoznak azok a mélyedések, amelyekbe a vizsgálandó anyagokat pipetázhatjuk. Egy kísérletben nyolc különböző oldat vizsgálatára van mód,

(17. Ábra). A plate 4 zónában egyenként 8 kísérleti egységet tartalmaz, és minden kísérleti egység két független mérésre alkalmas, tehát egy plate összesen 64 párhuzamos elektrofiziológiai mérést tesz lehetővé (18. Ábra). A plate-ek feltöltése egyszerűen megoldható nyolccsatornás pipettával. Minden kísérleti egység 12 mélyedésből áll, amelyek külön funkcióval bírnak; A jobb alsó rendszerint gyűjtőként funkcionáló lyuk, amelyet üresen kell hagyni. Ide áramlanak a kísérlet során

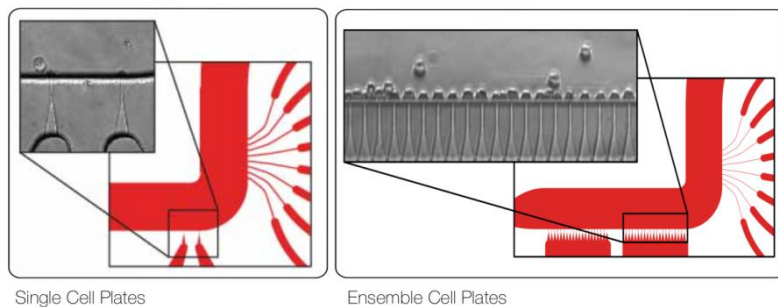
tehát lehetőség nyílik koncentráció-válasz görbék felvételére vagy akár 8 különböző hatóanyag tesztelésére (ha azok jól kimoshatóak). Kísérlet során az összes mélyedés légmentesen lezáródik, és az oldatok áramlását nyomás adagoló szelepek szabályozzák.



18. Ábra FluxIon plate integrált mikrofluidikai rendszere (kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

A nyolc vizsgálandó oldatot áramoltató nyomás, a sejteket tartalmazó oldatot áramoltató nyomás, és a csapdázási zónák nyomása külön szabályozható. Utóbbiak esetében a légköri alá csökkentett nyomás adására (vagyis szívásra) is mód van, ez teszi lehetővé a sejtek elfogását, és a membrán felszakítását. A hőmérséklet is állítható 25 és 50 fok között, valamint a gyártó szerint a szabályozó egység helyére később programozható LED világítás is kerülhet.

A műszerhez kétféle plate típus kapható: az egyik a „*single-cell*” változat, amely 64 egyedi sejt tesztelésére alkalmas. A másik az „*ensemble*” másnéven populációs patch változat, ahol a csapdázási mezők egyetlen sejt helyett 20 különböző sejtet képesek fogadni (19. Ábra). Ebben a konfigurációban a regisztrált áramok csapdánként additívan összegződnek, tehát a kimenet végül ebben az esetben is 64 párhuzamos lesz.



19. Ábra A csapdázási mezők felépítése (eredeti kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

A mikrofluidikai rendszerre jellemző folyamatos oldatáramlás, és a rendszer által biztosított rugalmasság (bármilyen bonyolult oldatperfúziós protokoll tervezhető) különösen alkalmassá teszi ezt a műszert ligand-vezérelt ioncsatornák kutatására. Az  $\alpha 7nAChR$  tanulmányozása azonban két szempontból is kihívást jelentett. Egyrészt a receptor rendkívül könnyen deszenzitizálódik. Ha nem elegendően gyors az oldatcsere, vagy ha az agonista szivárgás vagy diffúzió révén akár kisebb koncentrációban is a sejtek közelébe jut még az agonista adás megkezdése előtt, akkor az agonistára semmiféle választ nem látunk. (Ezért is van szükség a manuális patch clamp kísérletekben olyan kifinomult oldatcserélő módszerekre.) Másrészt a receptor pozitív modulátorai nagyon erősen adszorbeálódnak a szilikon és műanyag felületekhez, illetve nagyon könnyen particionálódnak a sejt membránjába, ahonnan lehetetlen teljes mértékben eltávolítani őket. Erre a problémára is megoldást kellett találnunk az automata méréseknél.

## 3.2 A dolgozatban használt módszerek részletes ismertetése

### 3.2.1 Manuális patch clamp

A sejteken kifejeződő  $\alpha 7$ nAChR-kat standard patch clamp módszerrel vizsgáltuk “whole cell” és “outside-out” konfigurációkban. A mérések során a tartófeszültséget  $-70$  mV-on rögzítettük. Az áramokat az  $\alpha 7$ nAChR szelektív endogén agonistájával (Alkondon, Pereira, Cortes, Maelicke, & Albuquerque, 1997),  $10$  mM kolinnal váltottuk ki. Az így kapott válaszokat  $100$  vagy  $20$  kHz-en digitalizáltuk, és  $10$  kHz-en szűrtük. A kísérleteket szobahőmérsékleten ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) végeztük. A méréshez használt mikropipettákat P-87-es típusú Sutter mikropipettahúzóval (Sutter Instruments) készítettük  $1.2$  mm-es átmérőjű,  $120$  mm hosszúságú, normál falvastagságú, filamentummal rendelkező, boroszilikát üvegapillárisokból (World Precision Instruments). A pipettákat CsOH-dal pH  $7.2$ -re állított intracelluláris oldattal ( $50$  mM CsCl,  $60$  mM CsF,  $10$  mM NaCl,  $10$  mM HEPES, és  $20$  mM EGTA) töltöttük meg. A feltöltéshez  $1$  ml-es fecskendőre szerelhető luer átalakítóval (WPI) és  $0.2$   $\mu\text{m}$ -es porúsátmérőjű fecskendőszűrővel összekapcsolt  $20$   $\mu\text{l}$ -es gélzseb töltő pipettahegyet (Eppendorf™) használtunk, amelyet láng fölött megfelelő átmérőjűre húztunk. Az üvegpipetták ellenállása  $1.7$  és  $4$   $\text{M}\Omega$  között mozgott. A kísérletre kiválasztott petri csészén a tápfolyadékot  $37^\circ\text{C}$ -ra előmelegített HEPES puffer tartalmú, NaOH-dal  $7.3$ -ra pH-zott extracelluláris oldatra ( $140$  mM NaCl,  $5$  mM KCl,  $2$  mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $1$  mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $5$  mM HEPES-Na,  $10$  mM D-glükóz) cseréltük. A perfúziós kamrában a folyamatos oldatáramlást ( $\sim 1.66$  ml/perc) perfúziós pumpák biztosították. A mérőoldatok ozomolaritását további D-glükóz hozzáadásával azonos értékűre ( $\sim 330$  mOsm) állítottuk be. A gyors anyagadáshoz piezoelektromos vezérlésű (PZ-150M Driver, Burleigh) theta csövet használtunk. Az anyagadó rendszerben a gyors oldatcserét nyomás szabályozott vezérlőegység (DAD-12, ALA Scientific Instruments Inc., Farmingdale, NY) tette lehetővé. Az oldatperfúzió mérés közben alkalmazott, optimalizált áramlási sebessége  $\sim 0.2$ - $0.3$  ml/perc, a rendszer gyors átmosása eseténben  $1$  ml/perc. Az adatok rögzítéséhez Axopatch 200 B (Molecular Devices) típusú erősítőt, Digidata 1322A analóg – digitális átalakítót és pClamp programot használtunk.

### 3.2.2 Automata patch clamp

Az  $\alpha 7$ nAChR-receptorokat expresszáló GH4C1 sejt vonalat a későbbekben ismertetett módon tartottuk fenn poli-L-lizin felületkezeléssel ellátott T175-ös steril műanyag flasksokban. A kísérlethez a megfelelő sejt koncentráció eléréséhez 80 %-os konfluenciával rendelkező flasksokat használtuk. A kísérlet előtti napon, a tenyészedényeket expresszió hatékonyság fokozás céljából 30°C-os inkubátorba helyeztük. A sejt felvétel során először flasksánként 18 ml kalcium- és magnézium mentes PBS-t (Lonza), majd 18 ml Accutase-t (Corning) használtunk az emésztéshez (37°C 25 perc). Miután a sejtek felváltak az aljzattól lecentrifugáltuk őket, majd 15 ml szérumban fészuszpendálva folyamatos billegtetés mellett egy órán át pihentettük. Közvetlenül a kísérlet előtt ismételt centrifugálás után extracelluláris oldatban 3 ml-es térfogatban vettük fel őket (végkoncentráció 3-5 millió sejt/ml). Az automata patch clamp kísérletekhez használt plate-ek valamint a munkaoldatok előkészítését, mosását, az inkubációs időben végeztük. A plate-ek feltöltéséhez nyolc-csatornás pipettát használtunk. Az oldatok összeszennyeződésének elkerülésére érdekében minden munkaoldat betöltése után hegyet cseréltünk. A kísérletekben a sejteket -70 mV-os tartófeszültségen tartottuk. A protokollok tervezéséhez, méréshez és az előértékeléséhez, valamint az adatok exportálásához a műszer beépített számítógépének szoftverét használtuk.

Az extra- és intracelluláris oldatok összetétele megegyezett a manuális kísérletekben használt oldatokéval. Az oldatok ozmolaritásának (~330 mOsm) beállítása ebben a kísérletben is elengedhetetlen volt. Az áramok kiváltásához 1-10 mM kolint, vagy 0,1-10 mM Acetilkolint használtunk, a kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük.

### 3.2.3 Hatóanyagok

A 4-(5-(4-klorofenil)-2-metil-3-propionil-1H-pirrol-1-yl) benzénszulfonamid (A-867744), N-(5-kloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea (PNU-120596), N-(5-kloro-2-hidroxifenil)-N'-[2-kloro-5-(trifluoromethyl)fenil]urea (NS 1738) nevű  $\alpha 7$ nAChR modulátorokat a Tocris Bioscience-től rendeltük. A kolint, acetilkolint és az egyéb, extracelluláris oldathoz szükséges összetevőket a Sigma Aldrich-től szereztük be. A modulátorokat DMSO-ban oldottuk fel, 10, illetve 100 mM-os törzsoldatokat

készítettünk, amelyeket közvetlenül a kísérlet előtt a megfelelő koncentrációra hígítottunk.

### **3.2.4 Sejtkultúra**

A kísérleteket egy patkány hipofízis tumor eredetű immortalizált GH4C1 nevű sejtvonalon végeztük, amely stabilan expresszálta az általunk vizsgált patkány,  $\alpha 7$  típusú nikotinos acetilkolin receptort. A stabil sejtvonal létrehozását nem munkacsoportunk végezte. A sejteket a Sienna Biotech cég jóvoltából már transzfektált állapotban kaptuk. Fenntartásukhoz Ham's F10 tápoldatot használtunk, amelyet 15% lószérummal, 2.5% borjú szérummal, 1 mM L-alanin-L-glutamin dipeptiddel (GlutaMAX Gibco), 1% penicillin-sztreptomocinnel (antibiotikum) és 1% hygromicin B-vel (szelekciós ágens) egészítettük ki. A sejteket a kedvezőbb letapadási feltételek végett poli-L-lizinezett tenyészedényekben növesztettük. A petricsészéket 75-80%-os konfluencia elérését követően a hagyományos módon, kétszeres Mg-, Ca-mentes foszfát pufferes DPBS (Lonza) mosást követően 0.05%-os Trypsin-EDTA (Lonza) emésztést alkalmazva passzáltuk, majd kis koncentrációban perfúziós kamránkba illő, 35 mm átmérőjű csészékbe oltottuk át. A sejteket felhasználásig 5%-os szén-dioxid szint mellett, párasított levegőjű 37°C-os termosztátban tartottuk.



## 4 Eredmények

### 4.1.1 Kísérleti előzmények

Munkacsoportunk már régóta foglalkozik az  $\alpha 7$  típusú nAChR receptor működésnek vizsgálatával. Dolgozatom az  $\alpha 7$ nAChR két pozitív modulátorának hatásmechanizmusára fog fókuszálni. A háttér ismeretéhez azonban szükséges néhány, a témában született, munkacsoportunkhoz köthető publikáció egyes eredményeinek ismertetése, amelyek dolgozatom “kerettörténetül” szolgálhatnak.

Az idegrendszerben nagy mennyiségben előforduló  $\alpha 7$  típusú nAChR egyedülálló tulajdonságokkal rendelkezik: 1) Rendkívül alacsony a nyitvatartási valószínűsége, még a nagy koncentrációjú agonistával kiváltott áram csúcsán is csak a sejt receptorkészletének töredéke van egyszerre nyitva. 2) Magas a kalcium permeabilitása, ráadásul, az ugyancsak nagy kalcium permeabilitással rendelkező NMDA receptoroktól és a feszültségfüggő kalcium csatornáktól eltérő módon negatív membránpotenciálon (vagyis olyan körülmények között, ahol a hajtóerő a legnagyobb) is képes kalcium ionokat vezetni. 3) Rendkívül gyors kapuzási kinetika: aktiváció illetve deszenzitizáció jellemzi. Az átlagos csatorna mindössze  $\sim 50 \mu\text{s}$ -ig tart nyitva.

A receptor kinetikáját boncolgató munkák közül elsőként egy összehasonlító elemzéséről szóló tanulmányt szeretnék bemutatni, amely két agonista receptorra gyakorolt hatását ismerteti. A patkány hipokampális neurontenyészetben, gyors oldatcserélő rendszerrel (U-cső) végzett kísérletek igazolták, hogy a kolin az acetilkolinhoz hasonlóan a receptor teljes értékű agonistája. Az aktivált receptorok átlagos nyitvatartási ideje és a vezetőképessége mindkét agonista esetében megegyezett. Különbség a kiváltott válaszok elhalásában mutatkozott: az agonista adás befejeztével a kolin hatása gyorsabban csengett le és a receptorpopuláció hamarabb tért vissza a deszenzitizált állapotból (Mike, Castro, & Albuquerque, 2000). Dolgozatommal kapcsolatos kísérletek tervezésénél, ezt figyelembe véve az agonista válasz kiváltására nagy koncentrációjú (10 mM) kolinat használtunk (ez körülbelül 1 mM-os acetilkolin koncentrációnak felel meg).

Az irodalomban fellelhető acetilkolin receptorral foglalkozó cikkek kísérletes adatait áttekintve észre vehetjük, hogy a receptor kinetikájának “gyorsasága” nagy mértékben

függ a kísérletben használt anyagadó rendszerek oldatkicserélődési sebességétől és az alkalmazott agonista koncentrációtól (Fig 2 (Pesti, Szabo, Mike, & Vizi, 2014)). Megállapítottuk, hogy az aktivációs és deszenzitizációs kinetika illetve az oldatcsere sebessége között lineáris kapcsolat van, vagyis a mért kinetika nem magára a receptorra, hanem csupán a használt oldatcsereelő rendszerre vonatkozó információt ad. Az hogy a gyorsabb oldatkicserélődés gyorsabb receptor kinetikát eredményez, önmagában nem meglepő tény, az viszont annál inkább, hogy az irodalomban ezt figyelmen kívül hagyva, téves következtetéseket vonnak le a receptor kinetikáját illetően (Fig 1 (Pesti et al., 2014)).

Felmerülhet a kérdés, hogy akkor milyen gyors a receptor valójában, és vajon milyen gyors oldat cserére lenne szükség a receptor valós kinetikájának feloldásához? Munkacsoportunk megkísérelte megválaszolni ezeket a fogós kérdéseket. Gyors (szubmilliszekundumos oldatkicserélődést biztosító) anyagadó rendszerrel (theta-cső) végeztünk kísérleteket úgy, hogy különböző oldatkicserélődési sebességek mellett néztük, hogyan változik az áram felfutási, lecsengési ideje, illetve csúcs amplitúdója. Ezután az adatok alapján extrapoláltunk a pillanatszerű oldatcsere esetén várható értékekre (Fig 4 (Pesti et al., 2014)). Másik megközelítéssel, munkacsoportunk megalkotott a receptorról egy kinetikai modellt, amely reprodukálni tudta a receptor kísérletekben tapasztalt “viselkedésének” összes fontos jellemzőjét (pl. a felfutás, lecsengés és az amplitúdó koncentrációfüggése, ill. függése az oldatkicserélődés sebességétől; az alacsony nyitvatartási valószínűség; a majdnem teljes deszenzitizáció; a gyors visszatérés deszenzitizált állapotból, stb.). Mivel a modell viselkedése a valós receptorokhoz hasonló módon függött az oldatkicserélődés sebességétől, a modellen el lehetett végezni a pillanatszerű anyagadás hatásainak vizsgálatát (Fig.8(Pesti et al., 2014)). Az extrapoláció és a modellezés alapján a 10 mM kolin pillanatszerű adása által kiváltott áram 0.1 – 0.3 ms alatt érne el csúcs amplitúdóját, 0.25 – 0.5 ms-os időállandóval csengene le, és amplitúdója körülbelül kétszerese lenne az 1 ms-os oldatkicserélődéssel kiváltott áraménak. A modellezés alapján mintegy 80  $\mu$ s-os oldatkicserélődési sebességet kellene elérni ahhoz hogy a receptor valós kinetikájára tudjunk következtetni az áramalakból, ennél gyorsabb oldatcsere már nem változtatná tovább az áramalakot.

Vizsgáltuk a receptor különböző deszenzitizált konformációt is. Megállapítottuk, hogy a hosszabb agonista applikációnak kitett receptor “mélyebb” deszenzitizált állapotokba

került, amelyekből egyre lassabb volt a visszatérés, és ez a jelenség agonista függő volt (Fig 5(Pesti et al., 2014)).

Következő kérdés az volt, hogyan lehet összeegyeztetni az alacsony nyitvatartási valószínűséget a gyors kinetikával. Nagy koncentrációjú PNU-120596 jelenlétében olyan mértékű áramnövekedést figyeltünk meg, amelyből egyértelmű, hogy modulátor nélkül a kiváltott áram csúcsán is csak a receptorok 2-3 %-a van nyitva (Fig 6 (Pesti et al., 2014)). A tükreszerű (1-5 ms széles – ld. Fig 3 (Pesti et al., 2014)) áramalak további kérdéseket vet fel:

A felfutó, majd lecsengő áramalakot általában úgy interpretálják, hogy a felfutás azt tükrözi, ahogy a receptorok aktiválódnak, a lecsengés pedig, ahogy utána deszenzitizálódnak. Az  $\alpha 7$ nAChR azonban, nem egy szokványos receptor, és ez az egyértelműnek látszó feltevés sem igaz. Elképzelhető, hogy a receptorok többsége ki sem nyílik egyáltalán? Mire lehet következtetni a felfutás, ill. a lecsengés sebességéből? Kinetikai modellek segítségével bizonyítottuk, hogy valóban, a receptorok többsége nyitás nélkül "csendben" deszenzitizálódik; az alacsony nyitási valószínűség és a gyors kinetika kizárja azt hogy a receptorok többsége a nyugalmi – nyitott – deszenzitizált útvonalat járja be (Fig 7(Pesti et al., 2014)). Azonban az hogy egyszerre 2-3 % van csak nyitva, nem jelenti azt hogy a receptorok kb. 97-98 %-a rögtön, nyitás nélkül deszenzitizálódik, és mindössze 2-3 % aktiválódik egyáltalán. Ha 100 receptor aktivitását néznénk, akkor az hogy 1 ms hosszan fenntartsanak egy átlag 2 %-os nyitvatartási valószínűséget, pontosan 40 receptor nyitásba "kerülne", mivel 50  $\mu$ s-os átlagos nyitvatartási idővel kell számolnunk. Tehát akkor a 100-ból összesen 40 receptor nyitna ki egy agonista pulzus hatására? Nem, a helyzetet tovább bonyolítja, hogy az  $\alpha 7$ nAChR hajlamos többször, gyors egymásutánban kinyitni – ezt a jelenséget nevezik "burst"-nek.(Corrie J. B. daCosta et al., 2011) (Mike et al., 2000) Tehát pl átlagosan két nyitásból álló burst-tel számolva már csak 20 aktív és 80 csendes receptorral számolhatnánk. A pontos arányt kísérletesen még nem tudtuk meghatározni, de a szimulációk (a burst-ölést is figyelembe véve) azt mutatták, hogy ilyen gyors kinetikájú áram esetén amely ilyen alacsony nyitvatartási valószínűséggel valósul meg, a receptorok legfeljebb 20-25 %-a nyílik ki egyáltalán egy agonista pulzus hatására. Az aktiválódó receptorok többsége nem deszenzitizált állapotba megy tovább a nyitott állapotból, hanem visszazáródik, majd "csendben" deszenzitizálódik, tehát tipikusan a nyugalmi – nyitott – nyugalmi – deszenzitizált

útvonalat járja be. A felfutás és lecsengés sebességét alapvetően a záródás és a deszenzitizáció sebességi állandói határozzák meg. A nyitás sebességi állandója (pontosabban annak aránya a deszenzitizációéhoz) természetesen meghatározza az aktiválódó receptorok arányát, de a felfutás sebességére elhanyagolható hatással bír, a lecsengés sebességét pedig furcsa módon a gyorsabb nyitás csak késleltetné (ekkor ugyanis a receptor populáció nagyobb része kezdene burst-ölni), ami késleltetné a deszenzitizált állapotba jutást.

Szintén a kinetikai modellezés módszerével megpróbáltuk megérteni a II. típusba sorolt modulátor, ismert nevén PNU-120596 hatásmechanizmusát. Ez a projekt egy korábbi doktori dolgozat alapjául szolgált (Szabó Anett & Mike Árpád, 2016). A lehetséges hipotetikus hatásmechanizmusok tesztelése érdekében munkacsoportunk olyan modellt hozott létre, amely reprodukálni tudta a PNU-120596 jelenlétében tapasztalt jellegzetes bifázikus válaszokat, a modulátor csökkent érzékenységét a mélyebb deszenzitizált állapotok iránt, és a lecsengés időállandójának függését a modulátor jelenlététől. Ennek segítségével tudtuk tesztelni, milyen természetű kölcsönhatások lehetnek az ortoszterikus és alloszterikus ligandumok között. Megállapítottuk hogy a PNU-120596 a nyugalmi receptorhoz nem, csak a deszenzitizált állapotú receptorhoz képes asszociálni, viszont a “mélyebb” deszenzitizált állapotokra már nincs akkora hatással (Fig 5 (Szabo et al., 2014)). A modulátor kötődése az aktivált receptoron lelassítja az agonista disszociációját (Fig 2 (Szabo et al., 2014)), valamint nagy mértékben megnöveli a receptor átlagos nyitvatartási valószínűségét (Fig 7 (Szabo et al., 2014)). A két kötőhely között tehát sajátos kölcsönhatás van, az ortoszterikus kötőhelyhez kötődő agonista hozza létre azt a receptor konformációt amelyhez az alloszterikus modulátor kötni tud, utóbbi kötése viszont stabilizálja az ortoszterikus ligandumot kötőhelyén.

#### 4.1.2 Manuális patch clamp kísérletek

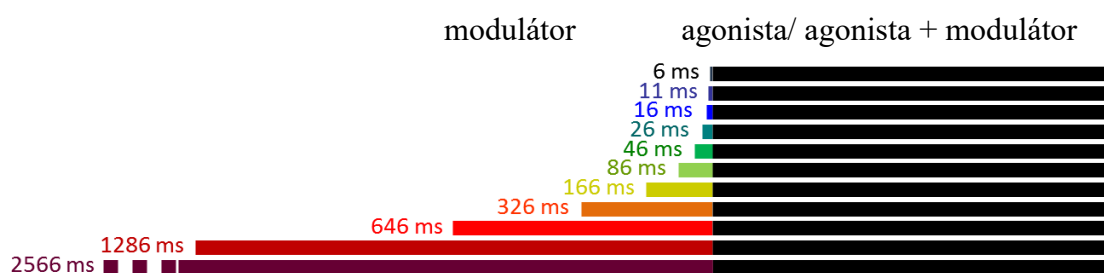
Dolgozatomban két ismert molekulának, a PNU-120596-nak és az A-867744-nek receptor kinetikára gyakorolt hatását írom le. Feltételezhető, de nem bizonyított, hogy a két modulátor azonos helyen, a transzmembrán hélixek közötti üregben kötődik. A közös kötőhely meglétét leszorításos kísérletekkel terveztük megvizsgálni. A modulátorok vizsgálatára több különböző protokollt fejlesztettünk ki, melyek egyszerű felépítésűek, 2 vagy 3 fő részből állnak: egy agonistával kiváltott válaszból/válaszokból illetve modulátor pulzusból, ezeknek hossza és sorrendje protokollonként eltérő.

##### 4.1.2.1 Perfúziós protokollok

Az *előinkubációs protokoll* célja, hogy megvizsgálja az alkalmazott modulátorok a nyugalmi állapotú receptorhoz való kötődését.

A kísérlet lényegében ismétlődő pulzus sorozatokból áll: 1000 ms agonista pulzusok és az azokat megelőző, fokozatosan növekvő (6, 11, 16, 26, 46, 86, 166, 326, 646, 1286, és 2566 ms) hosszúságú modulátor pulzusokból tevődik össze. A protokollokat ábrázoló sematikus ábrákon a jobb megértés elősegítése érdekében a változó hosszúságú pulzusokat színes vonalakkal jelöltük (20. Ábra).

Technikai okokból a legrövidebb preinkubációs pulzus 6 ms lett. Kontroll esetekben a modulátorok helyett extracelluláris oldatot perfundáltunk.

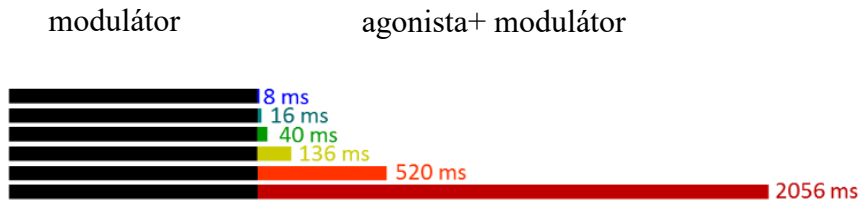


20. Ábra Manuális patch clamp: A preinkubációs protokoll sematikus rajza

A *koapplikációs protokoll* célja, hogy megvizsgáljuk az alkalmazott modulátorok aktivált ill. deszenzitizált állapotban lévő receptorokhoz való kötődését.

Ebben a protokollban azonos hosszúságú modulátor előinkubációt (1000 ms) követően növekvő hosszúságú (8, 16, 40, 136, 520, és 2056 ms) agonista + modulátor pulzusokat

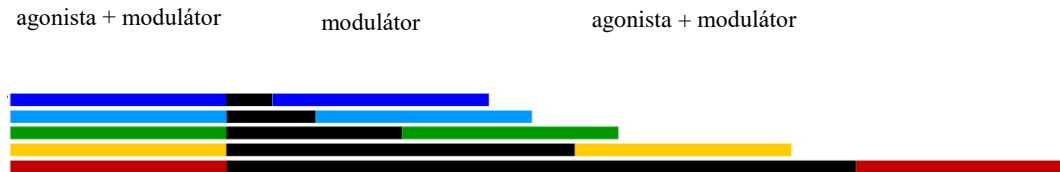
alkalmaztunk (21. Ábra). Mivel itt a második pulzusban a kolin és a modulátort minden esetben együtt alkalmazzuk ezért a neve koapplikációs protokoll lett.



21. Ábra Manuális patch clamp: A koapplikációs protokoll sematikus rajza

A *posztapplikációs protokoll* célja, hogy megvizsgáljuk a két modulátor esetleges kölcsönhatásait vagy versengését a kötőhelyért.

A kompetitív leszorítás dinamikáját tovább vizsgálva egy harmadik protokollt is használtunk (22. Ábra), amelyben az első két protokolltól eltérően az agonista és modulátor koapplikációjával kezdünk, és ez után perfundáljuk különböző időtartamokig (210, 410, 810, 1610, és 2910 ms) a modulátort. A protokoll neve ebből fakadóan posztapplikáció lett. A modulátor applikáció után újabb agonista + modulátor pulzus segítségével teszteljük a receptorok állapotát.

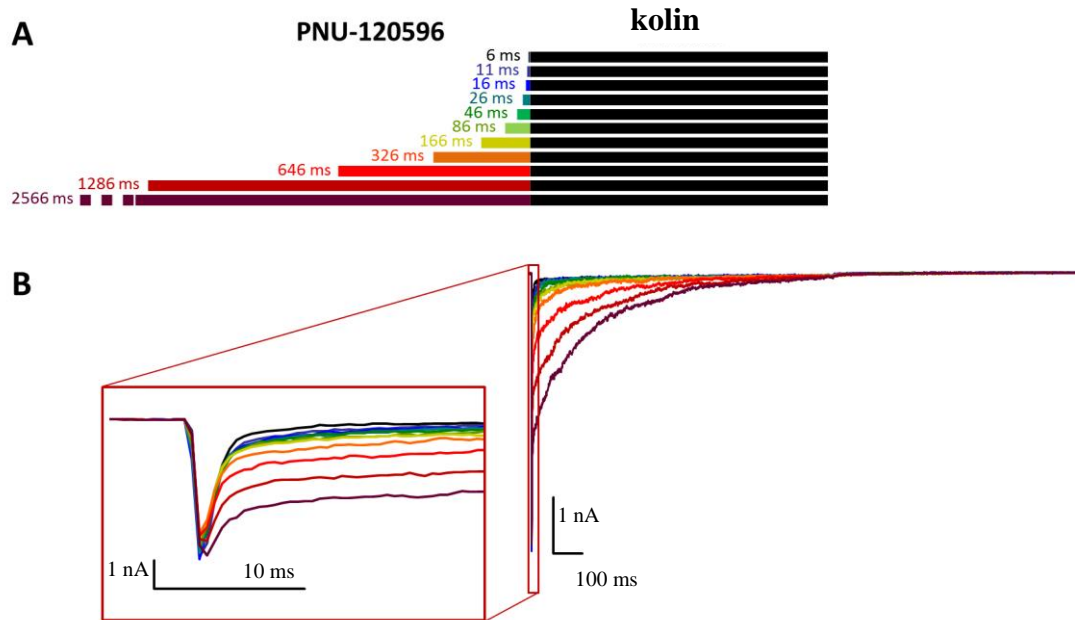


22. Ábra Manuális patch clamp: A posztapplikációs protokoll sematikus rajza

#### 4.1.2.2 Az 1 $\mu\text{M}$ PNU-120596 preinkubálás hatása

A fent említett preinkubációs protokoll a modulátor nyugalmi receptorhoz való kötődésének vizsgálatára alkalmas. Az egyes kezelések hatását egy-egy jellegzetes regisztrátumon mutatom be. A 10 mM-os kolin pulzusra adott válasz a gyors aktiváció és gyors deszenzitizáció következtében tüske-szerű, mindössze 2-5 ms széles volt. A gyors deszenzitizáció mellett azonban az agonista kimosása után gyorsan vissza is tudott térni a deszenzitizációból, ezért a 30 másodpercenként ismételt tesztekben a csúcsamplitúdók és a lecsengési idők elhanyagolható mértékben csökkentek. A kontroll

agonista válasz valamint az 1  $\mu\text{M}$ -os PNU-120596 preinkubációt követően kiváltott válaszok amplitúdójában és meredekségében nem volt különbség, de hosszabb preinkubációk esetén megjelent egy lassan lecsengő áramkomponens (23. Ábra). Ennek

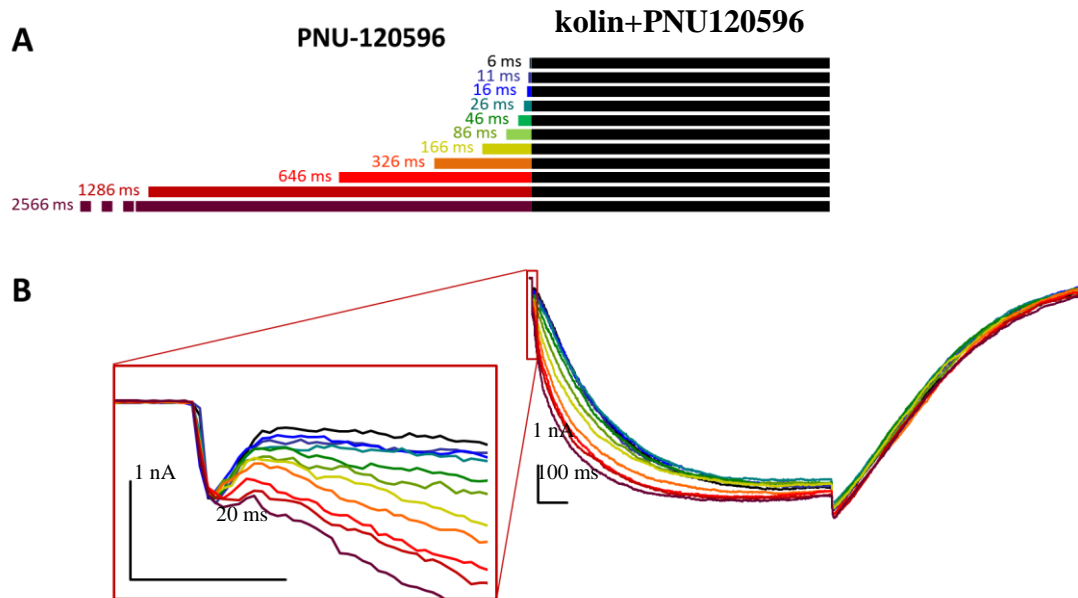


23. Ábra Manuális patch clamp: PNU-120596 preinkubáció: 1  $\mu\text{M}$  PNU-120596 – 10 mM kolin

A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felvétel kinagyítva)

amplitúdója csak mintegy felét érte el a gyors komponensének ( $48.9 \pm 5,8\%$ ), és általában még az agonista pulzus vége előtt teljesen lecsengett. A preinkubálás hosszával arányosan lassult az exponenciális lecsengés, a leghosszabb preinkubációnál az időállandók  $365 \pm 88.8$  ms értékeket vettek fel. A görbe alatti terület a teljes 1000 ms alatt is csak a tüskekomponens alatti terület mintegy százszorosát érte el. (függelékben lévő táblázat). A változatlan csúcsamplitúdóból láthatjuk, hogy a PNU-120596 folyamatos jelenléte ellenére sem volt képes a nyugalmi állapotban lévő receptorokhoz kötni, inkább a deszenzitizált állapotot részesítette előnyben (Szabo et al., 2014). A PNU-120596 hatását single-channel szinten vizsgálva láthattuk (Pesti et al., 2014) (Szabo et al., 2014), hogy a nyitott, és a zárt állapotok hosszúak (1-3 s hosszú burst-ök jellemzőek (C. J. B. daCosta, Free, Corradi, Bouzat, & Sine, 2011) – Fig. 2, (Williams, Stokes, Horenstein, & Papke, 2011)), Ilyen hosszú egyedi csatornanyitásokból nem lehet 2-5 ms széles tüskéket "összerakni" egész sejt szinten, vagyis gyors, tüskeszerű áram nem alakulhat ki modulált csatornák működéséből (Corrie J. B. daCosta et al., 2011). Mivel a makroszkópikus szintű kinetikát az egyedi csatornák nyitott és zárt állapotban töltött ideje határozza meg, a PNU-

120596 által modulált receptorok csak lassabb felfutást képesek produkálni. A hosszabb preinkubációk hatására megjelenő lassabb áramkomponensre a legvalószínűbb magyarázat, hogy a preinkubáció alatt a modulátor feldúsult a membrán fázisban, ahonnan az aktivációt/deszzenzitizációt követően gyorsan el tudta érni kötőhelyét.



A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva)

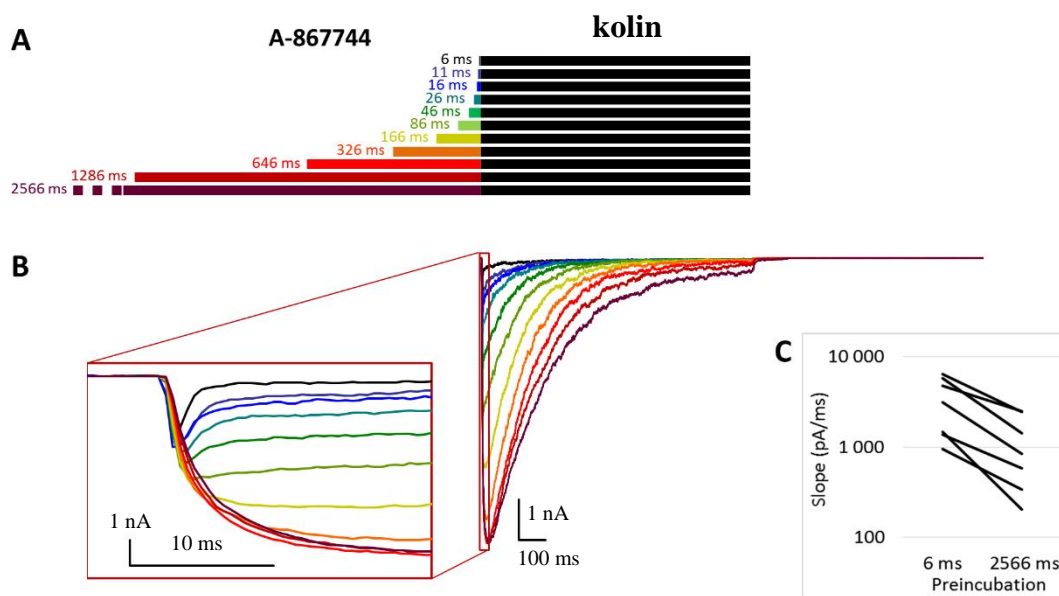
Amennyiben az előinkubációt követően a kolin pulzussal egyidejűleg  $1\mu\text{M}$  PNU-t is adtunk jellegzetes, modulált, bifázikus áramalakot kaptunk (Szabo et al., 2014) (24. Ábra). Az első tüske-szerű komponens az agonista váltja ki, itt még a modulátor hatása nem észlelhető. A második, lassabb felfutású komponens mutatja az agonista és a PNU-120596 jellegzetes együttes hatását, a hatékony modulációt mutatja hogy a görbe alatti terület itt már több mint 2000-szerese volt a tüske-komponens alatti területnek. A perfúzió befejeztével szintén jellegzetes lassú deaktivációt tapasztaltunk (Szabo et al., 2014). (Míg a *deszzenzitizáció* során az áram lecsengésének alapja az, hogy a receptor kötött agonistával vesz fel nem-vezető konformációt, *deaktiváció* alatt azt értjük, hogy az áram azért cseng le, mert az agonista elhagyja kötőhelyét, és a receptor újra a nyugalmi konformációt veszi fel.) Sem az első, sem a második komponens amplitúdója nem változott számottevően, de a válaszok második komponensének felfutása a preinkubáció hosszával arányosan gyorsult (ahogy azt már korábban megállapítottuk (Szabo et al., 2014)). A deaktiváció sebessége sem változott szignifikánsan a preinkubáció hosszával.



Összefoglalva, a PNU-120596 előinkubáció a relatív amplitúdóra nem volt hatással. A második komponens felgyorsulásának valószínű magyarázata, hogy az előinkubáció hatására a modulátor felhalmozódik a membránban, amely felgyorsítja az asszociációt, mielőtt azt a receptor konformációs állapota lehetővé teszi.

#### 4.1.2.3 Az 1 $\mu\text{M}$ A-867744 preinkubáció hatása

A válaszokat ebben a kísérletben is 10 mM kolinral és 1  $\mu\text{M}$  modulátorral váltottuk ki (25. Ábra). A rövid 6 ms-os preinkubáció hatása minimális volt, alig változtatta meg az agonista által kiváltott válaszokat, azonban 30 ms-nál hosszabb preinkubációk hatására az áramok teljesen átalakultak. Kis időbeli felbontás esetén azt lehetne hinni, hogy a kezdeti tüske-komponens nőtt meg, a nagy időbeli felbontással végzett mérés, és különösen a gyors oldatcsere azonban lehetővé tette hogy megfigyeljük, hogy ennél valami sokkal érdekesebb történik. A tüske-komponens gyors (<1ms) felfutása fokozatosan átadta helyét egy árnyalatnyival lassabb felfutásnak, amely azonban nagyobb amplitúdót ért el, de csak mintegy 50 ms alatt (25. Ábra B panel az áram felfutás kinagyított képe).



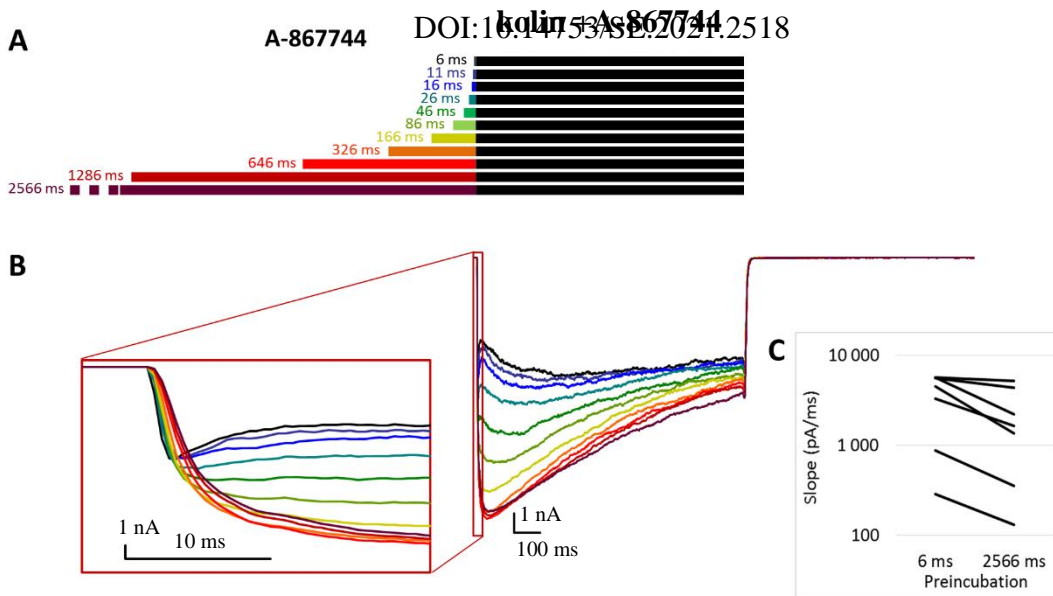
25. Ábra Manuális patch clamp: A-867744 preinkubáció: 1  $\mu\text{M}$  A-867744–10 mM kolin

A) A preinkubációs protokoll sématis ábrája. B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva)  
C) A felfutási meredekségek alakulását mutatja n=7 sejt esetében.

A felfutás kezdeti szakaszának meredekségét úgy mértük, hogy a 20 kHz frekvenciával (50  $\mu$ s-onként) mintavételezett áramokon pont-páronként kiszámoltuk a meredekséget, majd az értékeket egy 200  $\mu$ s-os ablakot használva (vagyis mindig 4 egyedi meredekséget átlagolva) kerestük meg a maximális meredekséget. A kezdeti maximális meredekségek csökkenését láthatjuk a 25. Ábra B paneljén, ahol az áttekinthetőség kedvéért csak a 6 ms és 2566 ms-os preinkubációkhoz tartozó értékeket ábrázoljuk. Az a tény, hogy az áram alakja már a legelejétől fogva megváltozott, azt mutatja, hogy az A-867744 a PNU-120596-tal ellentétben képes a nyugalmi állapotú receptorhoz kötődni.

Az agonista perfúzió alatt az áramok lassú lecsengést mutattak, ez részben annak következménye, hogy a modulátor molekulák elhagyták kötőhelyüket, részben pedig annak, hogy a receptor populáció egy része fokozatosan felvette a "mélyebb", modulátorra érzéketlen deszenzitizált állapotot. A lecsengési idők a preinkubációval arányosan hosszabbodtak (legutolsó pulzus után az időállandó  $233 \pm 33.1$  ms). A relatív amplitúdó az előinkubáció hatására 2-3-szorosára növekedett ( $2.48 \pm 0.31$ ;  $n = 8$ ), míg a görbe alatti területet az első válaszokhoz viszonyítva kb. 300-szorosára gyarapodott. Az agonista perfúzió végén nagyon gyors deaktivációt lehetett megfigyelni ( $\tau = 4.27 \pm 0.33$  ms).

Amikor a preinkubáció után egyszerre adtuk az agonistát és a modulátort, nem lett nagyobb a kezdeti amplitúdó növekedés (függelékben lévő táblázat), ez ugyanis a preinkubáció ideje alatti modulátor asszociációtól függ. Az áram alakja azonban megváltozott: Míg az előbbi esetben az 1 másodperces perfúzió alatt modulátor disszociációval, jelen esetben modulátor asszociációval kell számolnunk, és ez jól meg is látszik, különösen a rövidebb ( $< 100$  ms) preinkubációkat követő görbék alakján, amelyek néhány száz ms-on keresztül növekedtek, mielőtt a "mélyebb" deszenzitizált állapotba jutás miatt csökkenni kezdtek volna. A csökkenés lassabb volt, és az 1 s végére jóval nagyobb áram maradt meg, ami összességében nagyobb görbe alatti területet eredményezett (függelékben lévő táblázat). A deaktiváció azonban az agonista + modulátor eltávolítása után ugyanolyan gyors volt ( $6.16 \pm 1.54$  ms) (26. Ábra).



26. Ábra Manuális patch clamp: A-867744 preinkubáció: 1  $\mu$ M A-867744–1  $\mu$ M A-867744 + 10 mM kolin

A) A preinkubációs protokoll sematikus ábrája. B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram feljutás kinagyítva)  
C) A feljutási meredekségek alakulását mutatja

A leglényegesebb különbségek tehát a két modulátor között: A PNU-120596 egyrészt nem képes nyugalmi konformációhoz asszociálni, másrészt asszociációja viszonylag lassú ( $\tau > 100$  ms), harmadrészt a deaktiváció kifejezetten lassú ( $\tau \approx 300$  ms). Az A-867744 ezzel szemben egyrészt könnyen asszociál nyugalmi konformációban lévő receptorhoz is, másrészt asszociációja gyorsan lejátszódik, majd ezután a “mélyebb” deszenzitizáció kialakulása következtében exponenciálisan lecsengő görbe jellemző rá, harmadrészt pedig deaktivációja nagyon gyors ( $\tau < 10$  ms). A preinkubációt követő aktiváció során a konformációs állapotok között bejárt útvonalat szemlélteti az alábbi séma, melyet egy korábbi cikkből kölcsönöztem (SZABO ET AL., 2014) (27. Ábra). Az előtérben lévő háromszög az agonistát kötött, de modulátort nem kötött receptor három



27. Ábra jobb oldal: PNU-120596, bal oldal: A-867744 állapot-preferenciabeli különbségei

fő konformációját mutatja: nyugalmi (Resting):  $a_nR$ ; nyitott (Open):  $a_nO$ ; és deszenzitizált:  $a_nD$ . A háttérben lévő háromszög mutatja ezen állapotok modulátort is kötött megfelelőit. A PNU-120596 esetében hiába van preinkubáció, az eredeti, nyugalmi állapotból nem képes a receptor populáció közvetlenül a modulátor-kötött nyugalmi

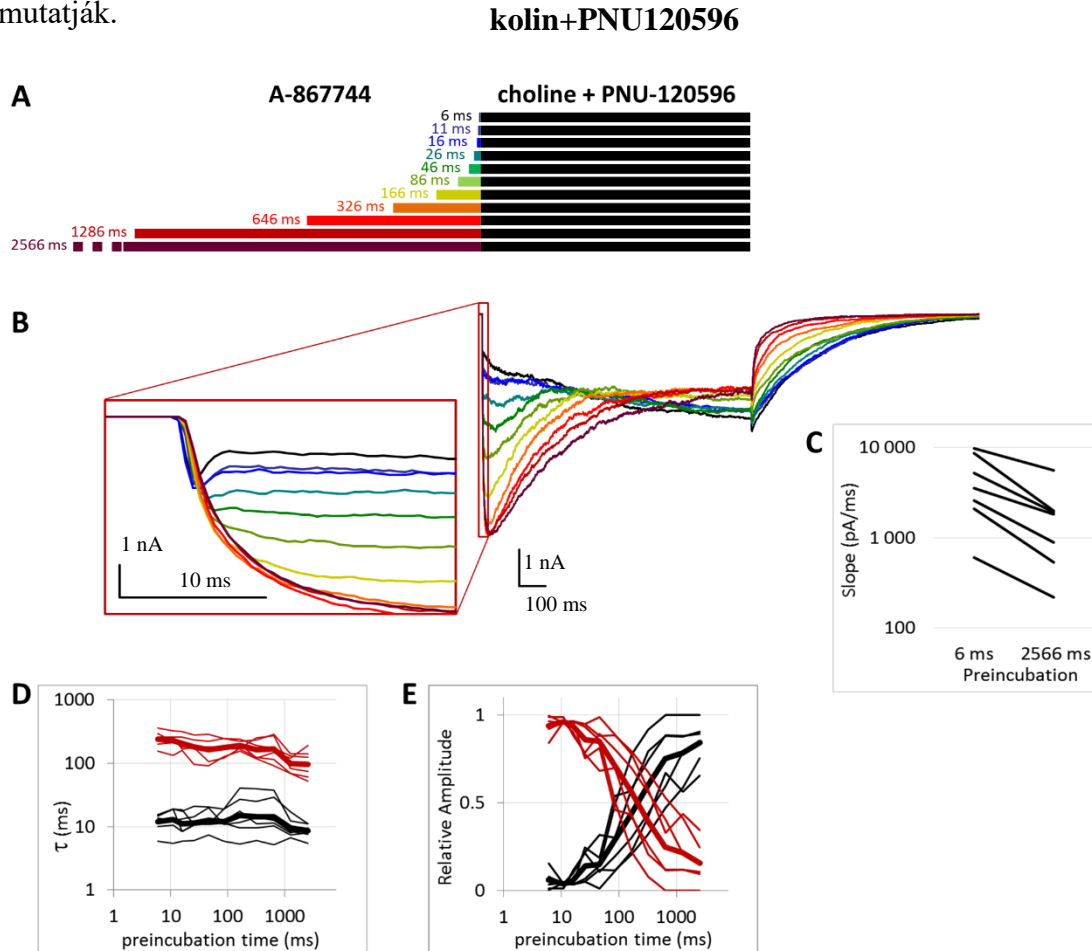
állapotba jutni, előbb az agonista hatására a receptoroknak deszenzitizálódniuk kell (közben a receptor-populáció egy kis része kinyílik, majd visszacsukódik). Az A-867744 esetében nincs akadálya a nyugalmi állapothoz történő asszociációnak, ezért az agonista megjelenlésekor a receptorok rögtön nyitni tudnak.

#### **4.1.2.4 Az 1 $\mu$ M A-867744 és a 1 $\mu$ M PNU-120596 versengése a kötőhelyért**

A továbbiakban meg akartuk vizsgálni, hogy a két anyag ugyanazért a kötőhelyért verseng-e, ezért egymásra gyakorolt hatásukat teszteltük leszorításos kísérletekben. Megvizsgáltuk a különböző hosszúságú 1  $\mu$ M A-867744 előinkubáció hatását a 10 mM kolin + 1  $\mu$ M PNU-120596 által kiváltott áramokon. Három jól elkülöníthető szakaszt érdemes megvizsgálni, ahol a két modulátor eltérő áram mintázatot vált ki, ezért az áram alakjából következtetni lehet arra hogy melyik modulátor hatása alatt van a receptorok többsége. Először is, a kezdeti tüske-komponenst a PNU-120596 nem változtatta meg, míg az A-867744 átalakította: a lassabb felfutású és megnövelt amplitúdójú kezdeti szakaszban eltűnt az eredeti tüske. Másodszor, az 1 másodperces agonista + modulátor perfúzió alatt PNU-120596 jelenlétében az áram az első 500 ms alatt folyamatosan növekedett, a lassabb asszociáció miatt. Ezzel szemben A-867744 esetében a maximális amplitúdó már az első 50 ms-ban megjelent, amely után az áram exponenciálisan csökkent. Harmadszor, a deaktiváció kolin + PNU-120596 együttes alkalmazás után lassú volt (időállandó  $\approx$  300 ms), ezzel ellentétben kolin + A-867744 után gyors (időállandó  $<$ 10 ms). A leszorításos kísérletek eredményeinek kiértékelésében ezen jellemzők alapján igyekeztünk arra következtetni, hogy a modulátor kötőhelyet melyik anyag milyen mértékben foglalja el.

Az egyre hosszabb A-867744 előinkubációs pulzusok következtében a kolin + PNU-120596 válaszok látványosan átalakultak, egyre inkább a preinkubált anyagra jellemző mintázatot mutattak. A PNU-120596 hatása fokozatosan csökkent, és az 1 másodpercnél hosszabb preinkubációk után már alig észrevehetővé vált (28. Ábra). Az A-867744-ra jellemző lassabb felfutású kezdeti csúcs amplitúdó fokozatosan kialakult; a kiváltott áramnak az alakja is a PNU-120596-ra jellemző emelkedőből az A-867744-re jellemző exponenciálisan lecsengővé alakult; és ami a legmeglepőbb, a deaktiváció is jelentősen felgyorsult. A deaktiváció esetében nem egyszerűen az időállandó lecsökkenéséről volt szó, hanem arról, hogy a kezdetben egykomponensű, a PNU-120596-ra jellemzően lassú

lecsengés mellett a hosszabb preinkubációkkal megjelent az A-867744-re jellemző gyors komponens, melynek kontribúciója folyamatosan növekedett, míg végül uralkodóvá ( $84.3 \pm 3.8 \%$ ) vált. A két komponens értékét és kontribúcióját a 28. Ábra D, E panelek mutatják.



28. Ábra Manuális patch clamp: Az  $1 \mu\text{M}$  A-867744 és a  $1 \mu\text{M}$  PNU-120596 együttes hatása

A) Preinkubáció sprotokol sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva) C) A felfutási meredekségek alakulását mutatja D) deaktivációs időállandók E) relatív amplitúdók

Összefoglalva: Az 1 másodperces kolin + PNU-120596 koapplikáció alatt a teljes receptor populáció telítetté vált PNU-120596-tal, amit az egykomponensű, lassú deaktiváció mutat. Az A-867744 előinkubáció hatása azonban már néhány tíz milliszekundum után felfedezhető, ezt a kezdeti tüske-komponens átalakulása mutatja a legjobban, de az áram alak is vegyes jellemzőket mutatott (ld. a 28. Ábra B panelén szereplő 16, 26, 46, 86, és 166 ms-os görbéket). A ~200 ms-nál hosszabb preinkubációs pulzusok mellett az A-867744 hatása vált dominánssá, még a deaktivációs kinetikában is, amiből arra következtethetünk, hogy a preinkubált A-867744 az 1 perces kolin + PNU-

120596 koapplikáció alatt sem távozott el a kötőhelyről, a PNU-120596 bekötődése mindvégig akadályozott volt, emiatt moduláló hatása is elmaradt.

Joggal tehetjük fel a kérdést, hogy valójában mi is történik itt? Ugyanazért a kötőhelyért verseng a két modulátor? Miért látszik az A-867744 dominánsnak? Esetleg csak modulációs hatékonyságukban különböznek? Vajon két hatóanyag kölcsönhatásából tényleg arra következtethetünk, hogy osztoznak a kötőhelyükön? Vagy mégis lehetséges, hogy két külön kötőhely van amelyek csak a csatorna-kapuzásra gyakorolt hatásuk szintjén versengenek? Lehetséges, hogy a PNU-120596 hatása csak akkor érvényesülhet, ha az A-867744 kötőhelye nincs betöltve?

Kísérletink alapján feltételezhetjük, hogy (a modulátorok azonos koncentrációja mellett) vegyes betöltöttségű kötőhelyek esetén, ha az ötből egyetlen kötőhely betöltöttsége elegendő a moduláció megjelenéséhez, akkor lehetséges, hogy az A-867744 „*domináns*” módon viselkedik. A problémát egy genetikából kölcsönvett hasonlattal lehetne megvilágítani. A hasonlatban az áram megjelenése a „*fenotípusnak*”, a modulátor kötőhelyek betöltöttsége pedig a fenotípust meghatározó „*gén variációjának*” lehetne megfeleltetni. Tegyük fel, hogy a vegyes betöltöttség jelenti a „*heterozigóta*” állapotot. Az áram „*morfológiájából*” próbálunk következtetni, hogy a két modulátor egyazon kötőhelyen (*egy gén alléljei*), vagy két külön kötőhelyen történő kötődése (*több gén hatása*) eredményezi ezt a kevert mintázatot<sup>§</sup>.

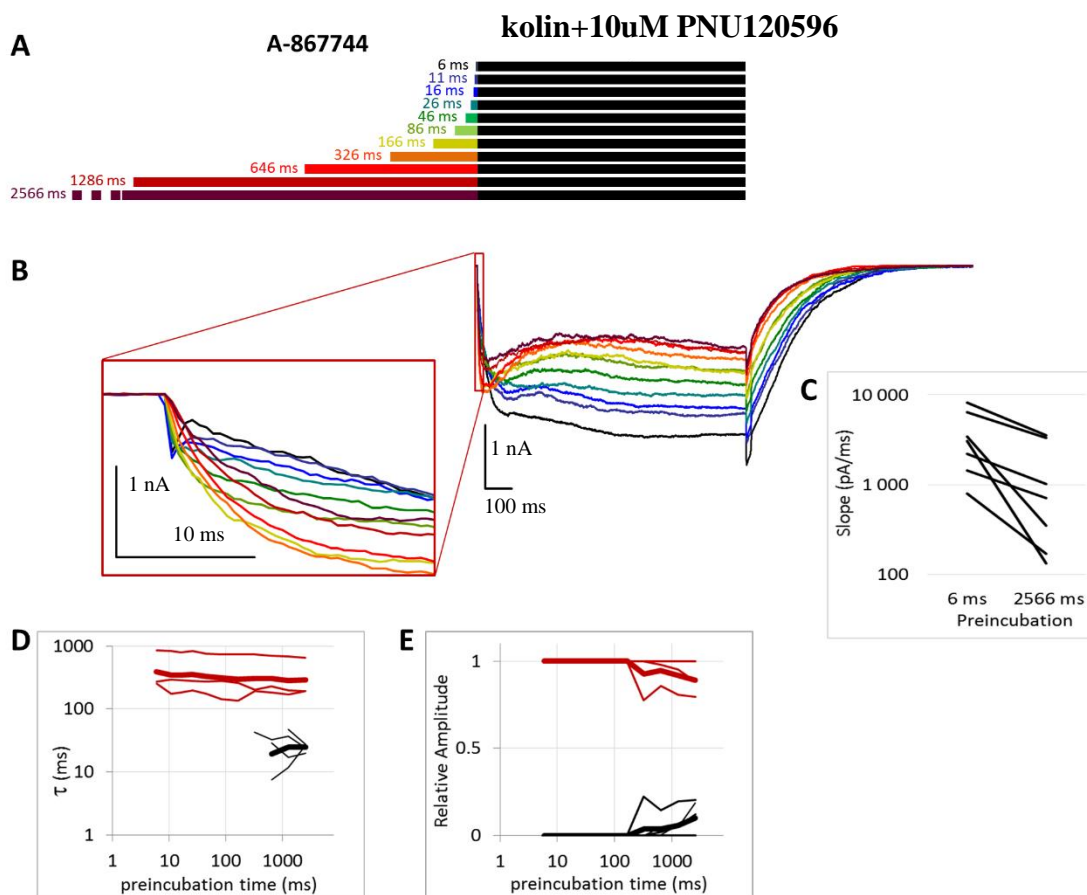
A kérdésekre könnyen válaszolni lehet: ha gondoskodunk arról, hogy a PNU-120596 kötőhelyei teljesen telítettek legyenek (hogy ne érvényesülhessen az esetleges A-867744 dominancia). Ha a PNU-120596 ekkor sem tudja hatását megjeleníteni, akkor valóban két különböző kötőhelyről lehet szó. Ha viszont ebben az esetben megjelennek a PNU-120596-ra jellemző tulajdonságok, az azt bizonyítja, hogy azonos kötőhelyért versengtek a modulátorok.

---

<sup>§</sup> Az is elképzelhető ugyanis, hogy két külön kötőhely van, de ha az A-867744 kötőhelye betöltött, akkor a PNU-120596 hatása már nem tud érvényesülni, hasonlóan pl. az emberi szem színének öröklődéséhez, ahol a zöld színt meghatározó gén csak abban az esetben tud érvényesülni, ha a barna színt meghatározó gén *homozigóta recesszív*.

#### 4.1.2.5 A koaplikált 10 $\mu$ M PNU-120596 hatása preinkubált 1 $\mu$ M A-867744-tal szemben.

Amikor 1  $\mu$ M A-867744 előinkubálás után 10  $\mu$ M PNU-120596-ot perfundáltunk 10 mM kolinral együtt, az A-867744 már alig tudta befolyásolni a PNU-120596 lecsengésre gyakorolt hatását (29. Ábra). A gyors komponens 7 sejtől 3 esetben teljesen hiányzott, míg a fennmaradó 4 sejtben a gyors komponens megjelenéséhez legalább 300 ms hosszúságú A-867744 előinkubációra volt szükség, emellett az amplitúdó hozzájárulás is mindössze  $12,0 \pm 3,1\%$  volt (34. Ábra D, E). Az A-867744 előinkubálás hatása nagyon jól látszott az áramok kezdeti szakaszán (megnövekedett amplitúdók ( $255 \pm 52\%$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0,04$ ) és csökkent meredekség ( $32,4 \pm 7,0\%$ ),  $n = 7$ ,  $p = 0,007$ ). Az áram alakja azonban már nem mutatta sem a PNU-120596-ra jellemző fokozatos növekedést, sem az A-867744-re jellemző exponenciális csökkenést.



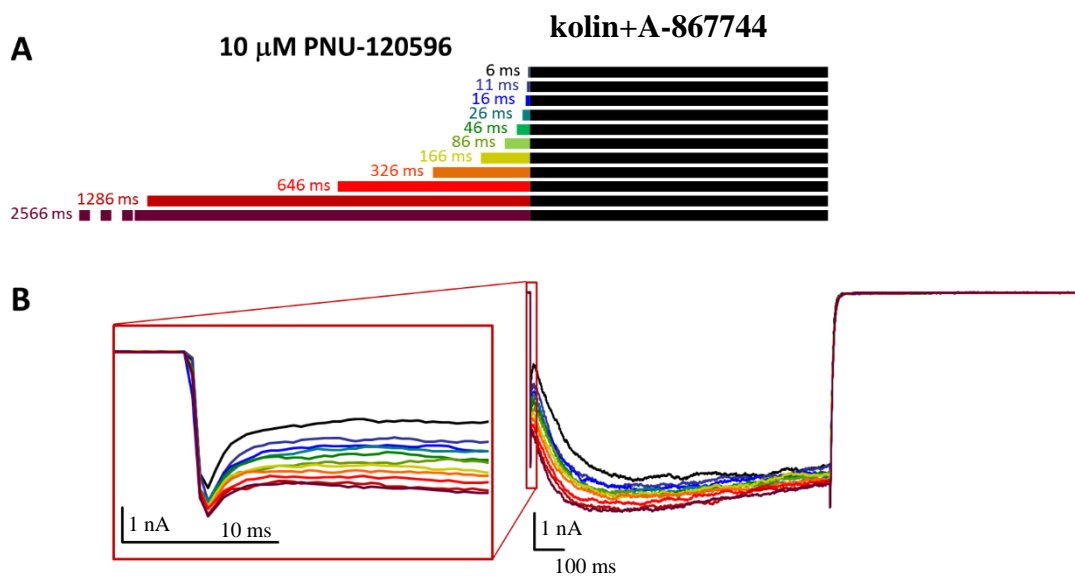
29. Ábra Manuális patch clamp: koaplikált 10  $\mu$ M PNU-120596 hatása az előinkubált 1  $\mu$ M A-867744

A)Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagytva) C) A felfutási meredekségek alakulását mutatja D) deaktivációs időállandók E) relatív amplitúdók

Míg mindkét modulátorra önmagában az volt jellemző, hogy a görbe alatti terület monoton növekedést mutatott a preinkubáció hosszabbodásával, itt nem találtunk monoton növekedést, hanem inkább a csökkenés volt jellemző. Ez is mutatja, hogy a két modulátor hatása nem összeadódik, hanem versengnek egymással. Tehát a kísérletek eredményei azt mutatják, hogy kötőhely azonos vagy részben átfedő, amelyért a modulátorok egymást leszorítva versengnek.

#### 4.1.2.6 A preinkubált 10 $\mu$ M PNU-120596 hatása a koapplikált 1 $\mu$ M A-867744-tal szemben

Az előző protokollt fordított sorrendben is kipróbáltuk; 10  $\mu$ M PNU-120596-val preinkubálva a kolin + A-867744 koapplikáció előtt. A PNU-120596 koncentrációját azért emeltük tízszeresre, hogy mindenképpen észrevegyük, ha valami hatás jelentkezik. Azonban megállapítottuk, hogy a PNU-120596 előinkubálás hossza alig befolyásolta koapplikált válaszok alakját (30. Ábra). Az előinkubálás hatásai azonban egyértelműen megfigyelhetők voltak az áramokon, de természetesen a hatást nem a 26. Ábra megfelelő



30. Ábra Manuális patch clamp: A preinkubált 10  $\mu$ M PNU-120596 hatása a koapplikált 1  $\mu$ M A-867744-tal szemben

A)Preinkubációsprotokol sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva)

színű görbéivel, hanem annak fekete görbéjével (a legrövidebb, 6 ms-os preinkubáció) kell összevetni. Ott a görbe alatti terület  $289 \pm 100$ -szoros volt a túske komponens görbe alatti területének. PNU-120596 preinkubálás után a relatív görbe alatti terület 1000 körüli



értékeket ért el, és nem változott szignifikánsan a preinkubáció hosszával (6 ms-nál  $944 \pm 331$ -szeres, 2566 ms-nál  $998 \pm 450$ -szeres növekedés). A kolin + A-867744 koapplikációval kiváltott áramok tüske-komponens utáni kezdeti szakasza az első 2–300 ms-ban lassú felfutású volt, ezután azonban az A-867744 hatására a lecsengés is megjelent. Az áram azonban sokkal lassabban,  $889 \pm 227$  ms időállandóval kezdett csökkenni, az A-867744-ra jellemző lecsengés ( $\sim 200$ –400 ms) nem alakult ki. Megállapíthatjuk tehát, hogy a koapplikáció során mindkét modulátor kifejtette hatását, ami arra utal, hogy a kötőhelyeket vegyes betöltöttséget mutattak. Figyelemre méltó azonban, hogy az A-867744 + kolin 1 perces pulzusa végén a deaktiváció gyors és egy exponenciálissal illeszthető volt (az időállandó  $9,56 \pm 0,29$  ms,  $n = 6$ ), mintha az A-867744 teljesen leszorította volna a PNU-120596-t. Mi lehet az oka annak, hogy az 1 perces anyagadásra kapott válasz egészen a legvégéig vegyes tulajdonságokat mutat, és csak a lecsengésen látszik igazán A-867744 hatása? Úgy gondoljuk, hogy a magyarázat – az előbbi genetikából kölcsönzött példával élve – az lehet hogy "heterozigóta" esetben az A-867744 határozza meg "domináns" módon a deaktivációs kinetikát. Itt az áramok megjelenését (fenotípusát) az öt alegység modulátorokkal való betöltöttségének aránya határozza meg, amely a két modulátor esetében eltérő lehet. Természetesen itt nem két "allél" versenyezhet, hanem pontosan öt, és a domináns hatás a két modulátor eltérő sztöchiometriáiból adódhat.

Kimutatták ugyanis, hogy a PNU-120596 hatása csak akkor érvényesül, ha 4 vagy 5 kötőhelyet betöltött (Corrie J B daCosta & Sine, 2013). Ilyen adat az A-867744-ről nincs, feltételezhetjük, hogy akár 1-2 kötött A-867744 molekula is már képes jellegzetes áramalakot kialakítani. Az 1 másodperces koapplikáció éppen elegendő ahhoz, hogy az A-867744 minden receptorról leszorítson legalább 2 PNU-120596 molekulát. Következésképpen, a PNU-120596 betöltöttségi szintje 4 alá csökken, ami már kevés lesz a deaktiváció lelassításához, de elégséges az A-867744-modulált válaszok alakjának megváltoztatásához. Mindez természetesen csak feltételezés. Ezért úgy gondoltuk, hogy a későbbiekben érdemes lenne megvizsgálni a kötési helyért versengő modulátorok dinamikáját is.

Összefoglalva, az áram első felében a PNU-120596 hatása dominál, a koapplikáció alatt a két moduláció keveredését tapasztalhatjuk, amíg a lecsengést már teljesen az A-867744 uralja.

A két modulátor közötti kompetitív leszorítás dinamikájának tanulmányozására egy másik protokollt alkalmaztunk, amelyet koapplikációs protokollnak fogunk nevezni (34. Ábra- 36. Ábra). Ebben a protokollban azonos hosszúságú modulátor előinkubációt (1000 ms) követően növekvő hosszúságú (8, 16, 40, 136, 520, és 2056 ms) ugyanolyan vagy másik modulátor + agonista pulzusokat alkalmaztunk. Az eddig használt preinkubációs protokollban a nyugalmi állapothoz való kötődést vizsgáltuk. Ezzel szemben a koapplikációs protokollban a modulátorok aktivált ill. deszenzitizált állapotú receptorokhoz való kötődését tudjuk vizsgálni.

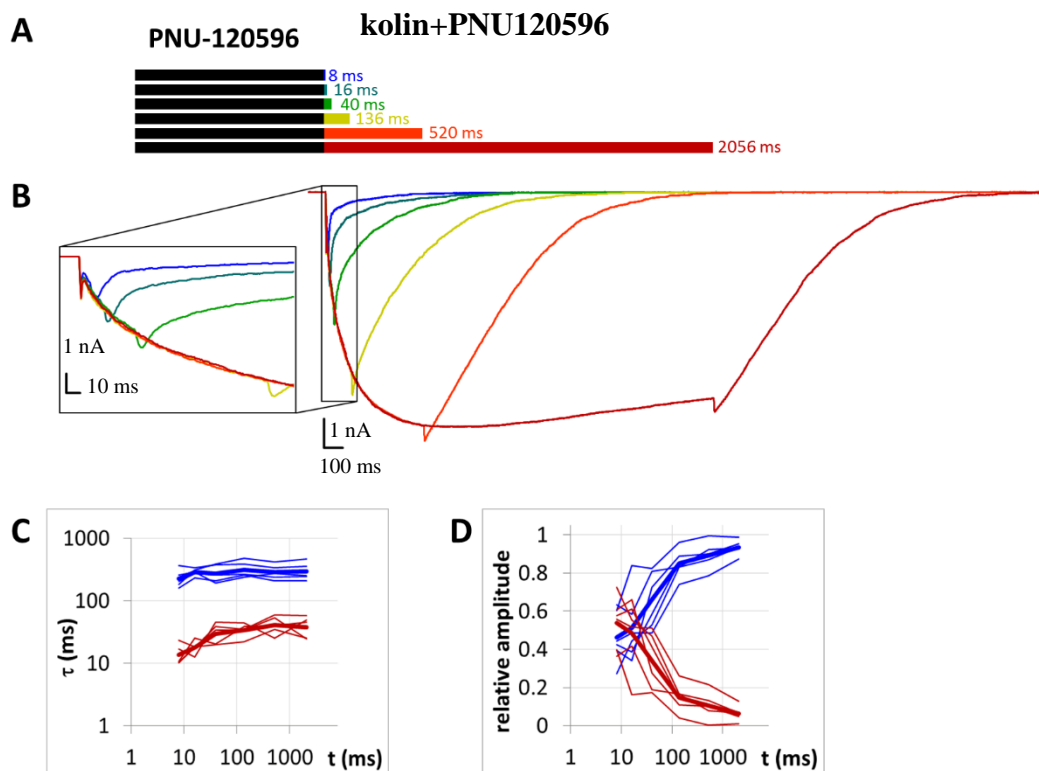
#### **4.1.2.7 A PNU-120596 asszociációjának dinamikája a koapplikációs kísérletek alapján**

Korábban publikált kísérleteink tanulságaiból merítve a következő jellegzetes hatásokra számítottunk amikor a PNU-120596 preinkubáció utáni kolin + PNU-120596 koapplikációt vizsgáltuk (Szabo et al., 2014):

- 1) A modulátor-agonista koapplikáció kezdetén, a preinkubációtól függetlenül megjelenik egy körülbelül 5 ms-os szélességű “tüske”, amelyet az agonista által kiváltott válaszként azonosíthatunk.
- 2) A PNU-120596-ra jellemző, 100-300 ms-os időállandóval lassan felfutó, körülbelül 500 ms körül tetőző modulált válaszokat várunk.
- 3) A koapplikáció végén megjelenő, az agonista blokkoló hatásának megszűnését jelző “fülecskeszerű” áramkomponens. (A kolin és az acetilkolin pozitív töltésű kismolekulák lévén, hajlamosak az ortoszterikus agonista kötőhely mellett – jóval kisebb affinitással – a csatorna külső szájába is bekötni, ezzel blokkolva az ionvezetést. Bővebben ld. az idézett közleményt (Szabo et al., 2014):
- 4) Lassú monoexponenciálissal illeszthető deaktiváció 200-400 ms-os lecsengési időállandóval.

Az első 3 pont kivétel nélkül teljesült, viszont a deaktiváció gyorsabb, vagy kétkomponensű volt a rövidebb koapplikációs pulzusok után. Például a legrövidebb, 8 ms hosszúságú anyagadás végén a lassú komponens aránya  $46 \pm 5.5$  % volt amely az egyre hosszabb pulzusokkal folyamatosan növekedett egészen  $93.6 \pm 1.5$  %-ig, az utolsó 2056 ms hosszúságú pulzus után (31. Ábra C és D panelje).

A gyors komponens megléte a receptor populáció azon hányadát jelzi, amely még nem kötött megfelelő számú modulátor molekulát. A moduláció megnyilvánulásához szükséges betöltöttségi szint elérése tehát a teljes receptor populáción jelentős időt vett igénybe. A 31. Ábra D görbéire illesztett exponenciális egyenletből származó időállandót  $97.8 \pm 60.2$  ms-nak találtuk ( $n = 6$ ). Vegyük észre, hogy az 1 másodperces preinkubáció után is, csak akkor tudott elkezdődni az asszociáció, amikor már az agonista konformáció változásra bírta a receptorokat. Ebből arra következtethetünk, hogy a PNU-120596 kötődését valóban akadályozza, hogy a receptor receptor nyugalmi állapotban van. A



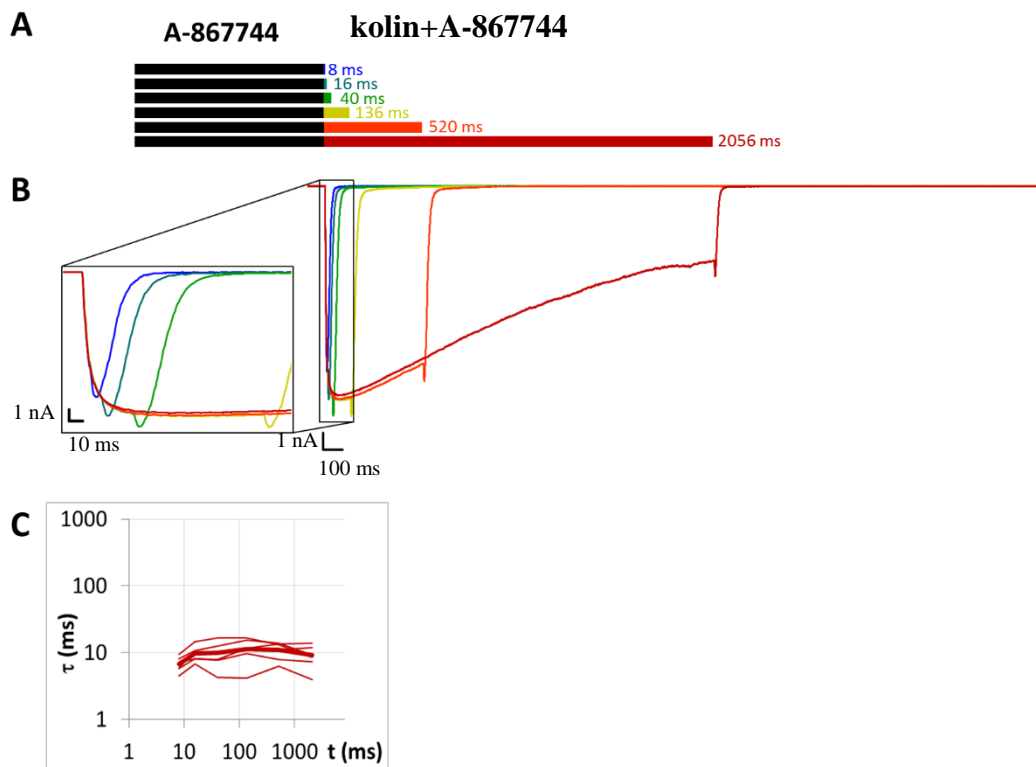
31. Ábra Manuális patch clamp: PNU-120596 preinkubáció – PNU-120596 + Kolin koapplikáció

A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva) C) A felfutási időállandók D) relatív amplitúdók

pozitív moduláció kialakulásához legalább 20-200 ms-ig deszenzitizált állapotban lévő receptor volt szükséges. A lassú komponens kialakulásának időállandója lényegében megegyezett a PNU-120596 által kiváltott áramkomponens felfutásának időállandójával, ahogy azt a 24. Ábrán láthatjuk. Mindkét jelenség a PNU-120596 molekulák asszociációját tükrözi.

#### 4.1.2.8 Az 1 $\mu\text{M}$ A-867744 preinkubáció hatása a koapplikációs kísérletek alapján

Amikor a koapplikációs protokollal a nyugalmi állapotban lévő receptorokhoz történő A-867744 asszociációt vizsgáltuk, a kolin + A-867744 koapplikációval kiváltott válasz a korábbiakban leírtakhoz hasonlóan az előinkubáció jellegzetes tulajdonságait mutatta. A túske-komponensnek nyoma sem volt, helyében az A-867744-re jellemző lassabb kezdeti felfutás, valamint a kiszélesedő csúcsamplitúdót lehetett megfigyelni (32. Ábrán). A lecsengés időállandója a legrövidebb koapplikációs pulzusnál  $6.83 \pm 0.71$  ms, leghosszabb esetében pedig  $9.12 \pm 1.40$  ms volt, szignifikáns különbség nem volt



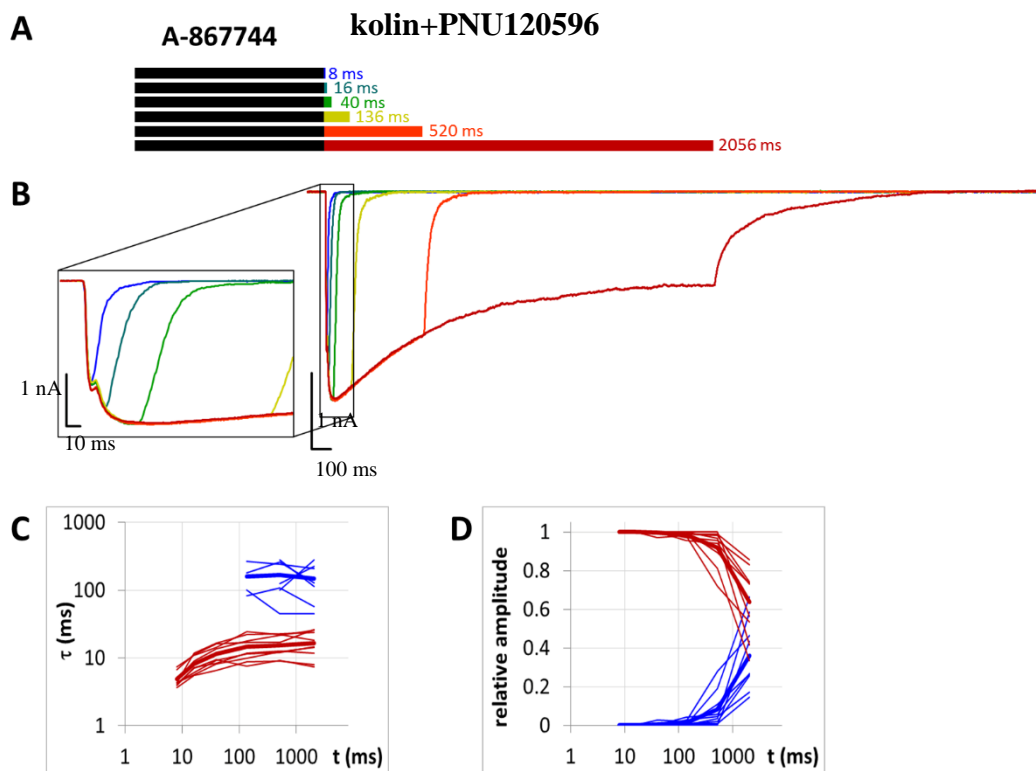
32. Ábra manuális patch clamp: 1  $\mu\text{M}$  A-867744 preinkubáció – 10 mM kolin és 1  $\mu\text{M}$  A-867744 koapplikáció hatása

A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva) C) Lecsengési időállandók alakulása

közöttük ( $p = 0.14$ ,  $n = 6$ ). Ebből arra következtettünk hogy az A-867744 képes kötődni a nyugalmi állapotú receptorokhoz.

#### 4.1.2.9 A PNU-120596 asszociációjának dinamikája 1 $\mu$ M A-867744 preinkubáció után, a koapplikációs kísérletek alapján

Az A-867744 preinkubáció alapvetően meghatározta az áramok alakját. A rövidebb koapplikációk esetében az áramok alakja gyakorlatilag megegyezett az előbbi kísérletben (A-867744 preinkubáció után kolin + A-867744 koapplikáció) megfigyelt áramokéval, és csak a két leghosszabb koapplikáció esetében jelent meg számottevő hatása a PNU-120596-nak. Ez a deaktiváció kétkomponensűvé válásában mutatkozott meg; a lassabb áram komponens ( $\tau = 155 \pm 18$  ms) kontribúciója az amplitúdóhoz a  $36.2 \pm 6.1$  %-ot érte el a leghosszabb koapplikációnál (33. Ábra).



33. Ábra manuális patch clamp: 1  $\mu$ M A-867744 preinkubáció – 10 mM kolin és 1  $\mu$ M PNU-120596 koapplikáció hatás

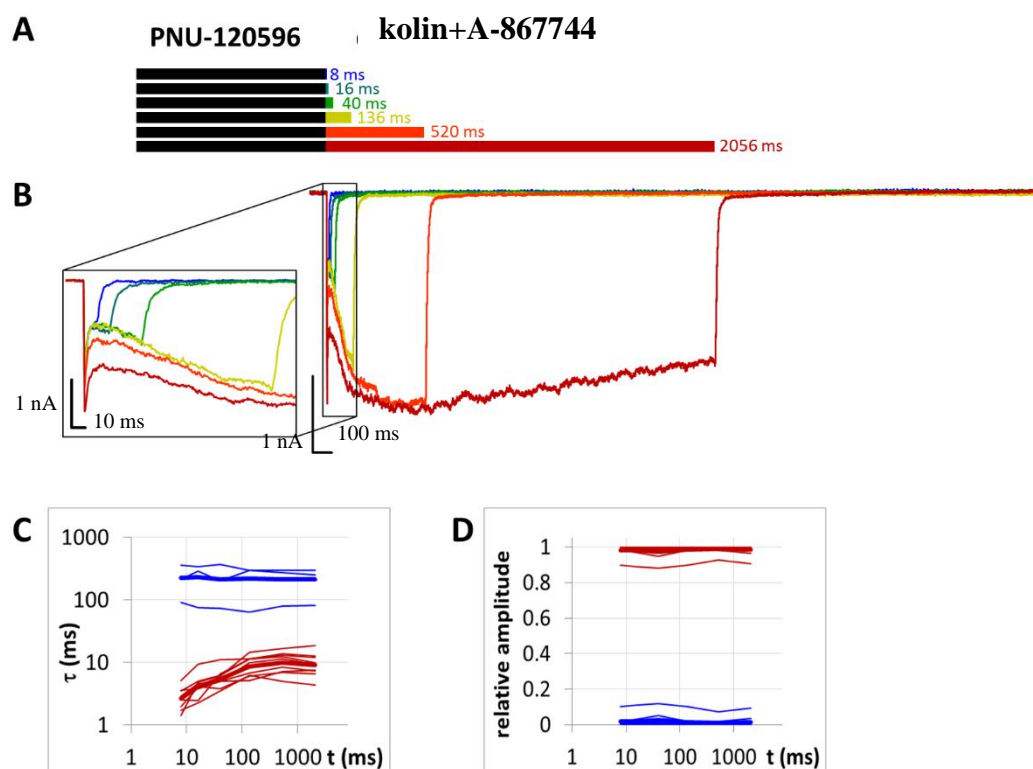
A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva) C) lecsengési időállandók D) relatív amplitúdók

A lassú komponens megjelenésére illesztett monoexponenciális görbe  $5304 \pm 1325$  ms-os ( $n = 9$ ) időállandót adott. Ez körülbelül ötször lassabb, mint amelyet a PNU-120596 preinkubáció esetében tapasztalhatunk. Ennyivel lassabban tudott csak lejátszódni a PNU-120596 molekulák asszociációja abban az esetben, ha a kötőhelyről az A-867744

molekulákat le kellett szorítani. Az A-867744 jelenlétében megfigyelt gyors deaktiváció és az A-867744 perfúzió után több másodpercig fennmaradó moduláció ellentmondásosnak tűnik. Arra kell következtetnünk, hogy az agonista disszociációt követő gyors deaktiváció ellenére a modulátor még nagyon sokáig nem hagyja el a kötőhelyet. Az A-867744 molekulákat a PNU-120596 szép lassan leszorítja a kötőhelyről. A jelenség magyarázatában itt is szerepet játszhat a modulátorok eltérő sztöchiometriája. A vegyes betöltöttségű receptorok feltehetően az A-867744-re jellemző áramokat mutatják. A PNU-120596 hatása akkor kerül érvényre ha mind az öt A-867744 molekulát sikeresen leszorította a kötőhelyről (33. Ábra).

#### **4.1.2.10 Az A-867744 asszociációjának dinamikája 1 $\mu$ M PNU-120596 preinkubáció után, a koapplikációs kísérletek alapján**

Fordított kísérleti felállásban azt vártuk, hogy a PNU-120596 nem lesz képes megfelelő betöltöttséget kialakítani mielőtt az A-867744 asszociál a receptorhoz, ezért semmi különösebb jelét nem látjuk majd a PNU-120596 hatásnak. Valóban így történt, megállapítottuk, hogy az áramok alakja összességében az kolin + A-867744 kiváltott válaszokhoz hasonlóan alakult (ld. a 29. Ábra fekete görbéje), azzal a különbséggel, hogy a görbe alatti terület nagyobb volt (ld. a 30. Ábra görbéit). A kezdeti túske-komponens megmaradt, utána az áram maximális méretét  $331 \pm 38$  ms ( $n = 9$ ) alatt érte el, majd lassan elkezdett lecsengeni ( $\tau \gg 1000$  ms). Ez még nem bizonyíték arra, hogy a PNU-120596 akadályozza az A-867744-et a kötőhelyhez való hozzáférésben, mert az A-867744 és a kolin hosszabb preinkubáció nélkül is hasonló áram mintázatokat produkált. Érdekes megfigyelni, hogy a legrövidebb koapplikáció (8 ms) után a deaktiváció különösen gyors volt. Ahogy az a 34. Ábra C paneljén látható, a deaktiváció csak a 40 ms-os koapplikáció után kezdte elérni a megszokott 5 – 10 ms-os időállandót (a 8 ms-os pulzusnál  $2.65 \pm 0.38$  ms, a 16 ms-osnál  $4.15 \pm 0.68$  ms volt az időállandó, mindkettő szignifikánsan rövidebb a 136 – 2056 ms-nál mért értékeknél,  $n = 9$ ,  $p < 0.001$ ).



34. Ábra Manuális patch clamp: Az 1  $\mu$ M PNU-120596 preinkubáció – 10 mM kolin és 1  $\mu$ M A-867744

A) Preinkubációs protokoll sémája B) A modulátor preinkubáció és az agonista hatása (áram felfutás kinagyítva) C) Lecsengési időállandók D) relatív amplitúdók

A gyors deaktiváció valószínűleg azzal magyarázható, hogy 8, ill. 16 ms még nem volt elegendő az A-867744 asszociációjához, és a lecsengés értékét ezért a sem PNU-120596-ot, sem A-867744-et nem kötött, és a részlegesen telített kötőhelyű receptorok deaktivációjának keveréke adja. A 34. Ábrán látható piros vonalak exponenciális illesztésével következtethetünk az asszociáció sebességére, az időállandó  $47.8 \pm 6.65$  ms-nak adódott. Mivel hasonló asszociációs időállandókat kaptunk nyugalmi állapotú receptorok esetében is, ezért nincs okunk azt a feltételezni, hogy a PNU-120596 az előinkubálás során már a elfoglalta volna a kötőhelyet és ezzel akadályozta volna az A-867744 kötődését. A PNU-120596 hatása azért nem volt teljesen észrevehető, a deaktiváció során kilencből három esetben megfigyeltük egy lassú áram komponens megjelenését is, amely minimális aránnyal ( $2.53 \pm 0.6$  %) járult hozzá az amplitúdóhoz. Ez nem ellentétes azzal a feltételezéssel, hogy a PNU-120596 molekula nem tud asszociálni nyugalmi állapotú receptorhoz, azt gondoljuk, itt is ugyanaz történhetett, mint

amit a 24. Ábrán láthattunk, a preinkubáció következtében kialakuló PNU-120596 hatást a membrán fázisban felhalmozódó modulátor okozhatja.

#### **4.1.2.11 A posztaplikációs protokoll hatás**

Hogyan lehetne vizsgálni azt a folyamatot, amikor az A-867744 szorítja le a kötött PNU-120596-ot? Mivel a PNU-120596 nem köt a nyugalmi receptorhoz, csakis úgy, ha koapplikáljuk a kolin a PNU-120596-tal, majd utána perfundálunk A-867744-et, és ezután megnézzük, hogy az újból koapplikált kolin + PNU-120596 ugyanolyan áramot vált-e ki. A protokoll tehát két darab 1 perces agonista + modulátor pulzusból állt, amelyet egy növekvő hosszúságú (210, 410, 810, 1610 és 2910 ms) modulátor pulzus választott el egymástól (35. Ábra A paneljén). Kontroll kísérletként először PNU-120596-ot perfundáltunk a két koapplikáció között. Ebben az esetben a korábbi kísérletekhez hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy 1 perces PNU-120596+kolin pulzusok között alkalmazott növekvő hosszúságú PNU-120596 inkubáció hatásaként a második agonista+modulátor válasz felfutása egyre gyorsult, valamint kismértékben nőtt a nettó beáramló töltés mennyiség és a relatív amplitúdó (35. Ábra B panel).

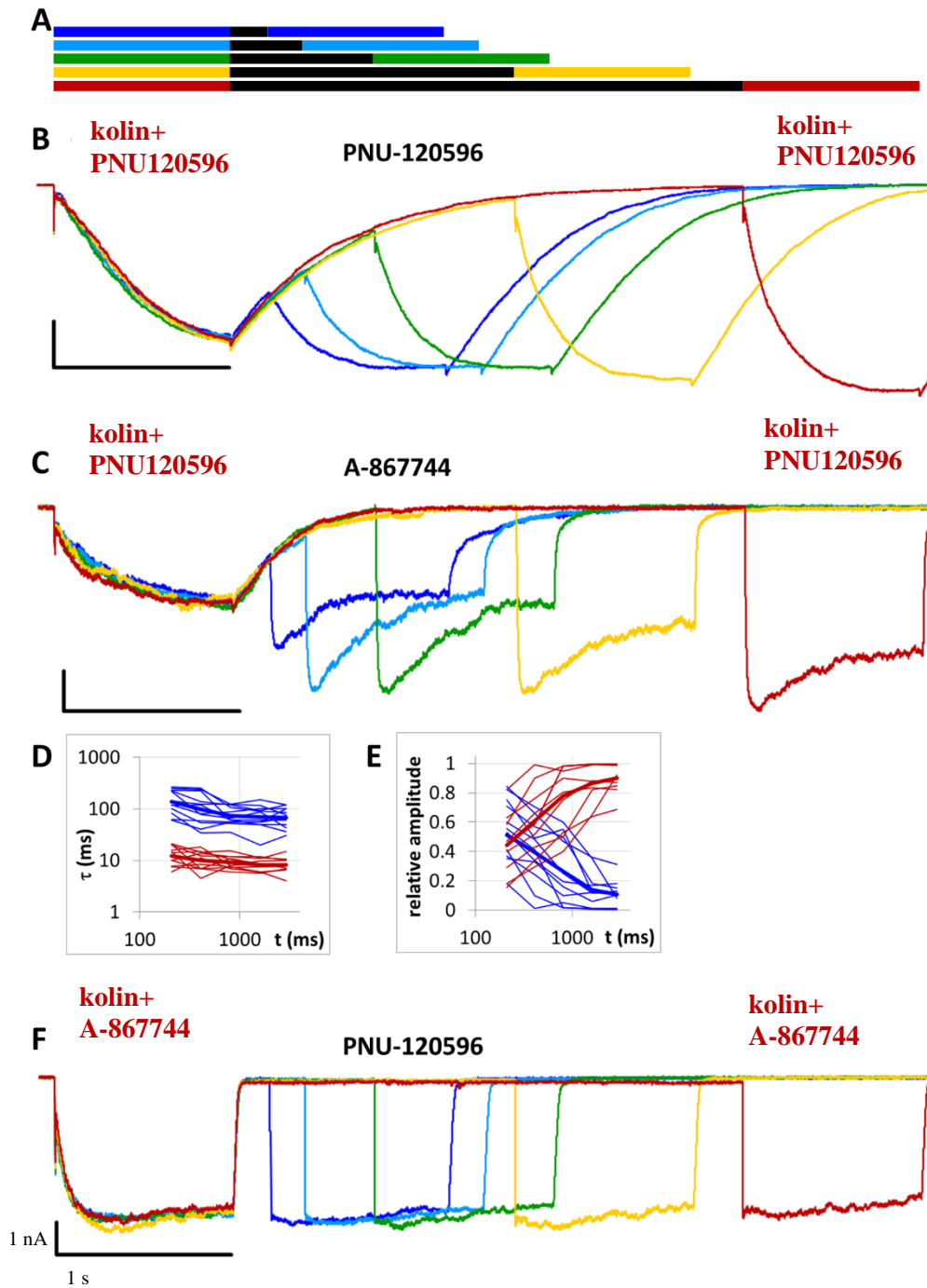
Ellentétben ezzel, amikor a két PNU-120596+kolin pulzus között A-867744-et perfundáltunk, a második pulzus alakja gyökeresen megváltozott (35. Ábra C panelje). Már a legrövidebb (210 ms) A-867744 hatása is jelentősen átformálta az áramalakot. A túske-komponens eltűnt, a szokásos módon kicsivel lassabb lett az áram felfutása, de egyre inkább megnövekedett az amplitúdója (210 ms-nál  $287 \pm 56\%$ , 2910 ms-nál  $481 \pm 102\%$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n=11$ ). A második pulzus utáni deaktiváció két-komponensűvé vált, az A-867744 kötődését jelző gyorsabb komponens egyre növekedett ( $44 \pm 6.5\%$ -ról  $90 \pm 3.1\%$ -ra).

Érdekes megfigyelni, hogy az A-867744 perfúziója alatt hogyan keverednek az egyes modulátorokra jellemző "fenotípusok". A kolin + PNU-120596 koapplikációt követő deaktiváció lecsengése teljes egészében a PNU-120596-ra jellemző karakterisztikát (lassú lecsengés) mutatta, ugyanakkor a második koapplikáció által kiváltott áram alakja egyértelműen az A-867744 jellegzetességeit viselte magán. Mi lehet ennek magyarázata? Legvalószínűbb, hogy eltérő szubpopulációk viselkedését látjuk: A két koapplikáció között megfigyelhető deaktiváció során kizárólag a PNU-120596 által modulált



receptorokat látjuk, hiszen az A-867744-et kötött receptorok agonista híján gyorsan becsukódtak. A lecsengés tehát valószínűleg a PNU-120596 folyamatos disszociációját tükrözi. Az ismételt aktiváció során azonban a még PNU-120596-ot kötő receptorok mellett kinyílnak az A-867744-et kötött receptorok is, ezek 210 ms után még csak a receptorok kb. felét tudják elérni, de 410 ms alatt már egyértelműen többségbe kerülnek, és ezért meghatározzák az áramalak "fenotípusát". A modulátor kötőhelyek betöltöttsége legegyszerűbben a második koapplikáció utáni deaktivációból határozható meg: ezt tükrözi a 35. Ábra E panelje.

A fordított kísérleti elrendezésben a PNU-120596 egyértelműen módosítani tudta a kolin + A-867744 koapplikációval kiváltott áramokat. A második koapplikáció során nem az A-867744 modulációnál megszokott exponenciálisan lecsengő áramokat láttuk, hanem valami vegyes hatásra utaló mintázatot. Ebből arra következtethetünk, hogy az A-867744 jelenlétében létrejövő deaktivált konformáció nem ugyanaz mint a nyugalmi konformáció, és ehhez, bár korlátozott mértékben, de a PNU-120596 tudott asszociálni. Azt feltételezzük, hogy a kialakuló vegyes betöltöttségű receptorok az áramalakban vegyes "fenotípust" jelenítenek meg, míg a deaktiváció során az A-867744 által diktált "fenotípus" jelenik meg (a hosszú lecsengéshez feltehetően mind az öt kötőhelynek PNU-120596-ot kellene kötnie).



35. Ábra Manuális patch clamp: A posztapplikációs protokoll hatása

A) Posztapplikációs protokoll sematikus rajza. B) PNU-120596 inkubáció hatása. C) Az A-867744 inkubáció hatása az agonistával koapplikált PNU-120596-ra. D) A felfutási idők alakulása. E) A relatív amplitúdó értékek alakulása. F) A PNU-120596 inkubáció hatása az agonistával koapplikált A-867744-ra

### 4.1.3 Automata patch clamp előkísérletek

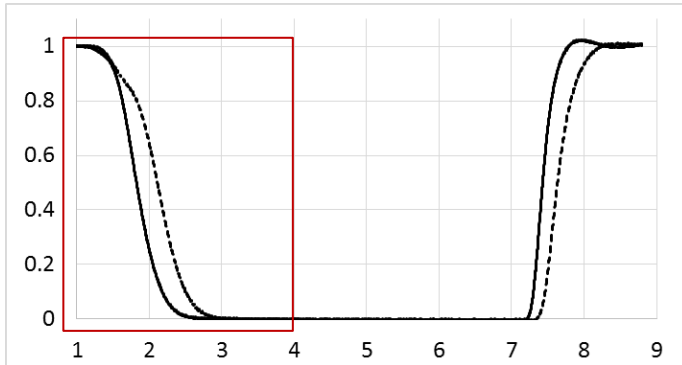
#### 4.1.3.1 Háttér

Egy nemzetközi kollaboráció keretén belül munkacsoportunk részt vesz  $\alpha 7nAChR$ -ra ható modulátorok tesztelésében. A laborunkban rendelkezésre álló IonFlux Mercury automata patch clamp műszer mikrofluidikai elven alapuló viszonylag gyors oldatcserélő rendszere elméletben kiválóan alkalmas lenne erre a feladatra, ezért elkezdtük tesztelni teljesítményét, hogy megállapítsuk a valóságban fel tudjuk-e használni a rendszert erre a célra. A konkrét gyógyszer-jelöltekkel kapott eredményeink jelenleg publikálás alatt állnak, ezért ezeket még nem tudom bemutatni, ismertetem azonban három referenciaként használt modulátorral kapott adatainkat. A tesztelés során felmerült kihívások megoldása alapja lesz későbbi ligand-függő ioncsatorna vizsgálatainknak. Az  $\alpha 7nAChR$ -ok különleges tulajdonságaiból adódóan feltételezhetjük, hogy ha ezt a receptort sikeresen tudjuk tesztelni, akkor gyakorlatilag bármely más ligandum-függő ioncsatorna tesztelése is megoldható lesz.

Az  $\alpha 7nAChR$ -ok mérése több szempontból is nagy kihívást jelentett. Először is, a receptor rendkívül gyors kinetikával rendelkezik (egy receptor átlagos nyitvatartási ideje mindössze  $\sim 50 \mu s$ ), és magas agonista koncentráció alkalmazása mellett is csak kis százalékban (a receptor populáció  $\sim 20-25\%$  -a) aktiválódik, legalább  $75\%$  -a pedig nyitás nélkül kerül deszenzitizált állapotba. A  $20-25\%$ -ból, még extra gyors ( $< 1 ms$ ) oldatcsere esetén is legfeljebb  $\sim 3\%$  van nyitva egyidejűleg. Alacsonyabb koncentrációnál, vagy lassabb oldatcserénél, ahol az áram elnyújtottabb,  $1\%$  alatt lesz az egyidejűleg nyitott receptorok aránya, ami könnyen észrevehetetlenné teszi az áramot. Ha tehát az oldatcsere nem kellőképpen gyors, és a receptorokhoz előbb a kihígult, alacsonyabb koncentrációjú oldat érkezik, akkor nem fogunk kiváltott áramot látni egyáltalán. Másodszor, az  $\alpha 7nAChR$  tipikus modulátorai különösen nehezen kimosódó lipofil vegyületek, amelyek előszeretettel akkumulálódnak a sejt belsejében és plazmamembránjában, valamint „szívesen” és látszólag kimoshatatlanul adszorbeálódnak szilikon és műanyag felületekhez. Az utóbbi nehézségek nagy örömeinkre elvileg kiküszöbölhetőek lennének az automata rendszer egyszer használatos plate-jeivel. A megfelelően gyors oldatáramlás eléréséhez, és a kereszt-kontamináció kiiktatásához azonban a vizsgálati protokollok optimalizálására volt szükség.

#### 4.1.3.2 Nyomásértékek optimalizálása

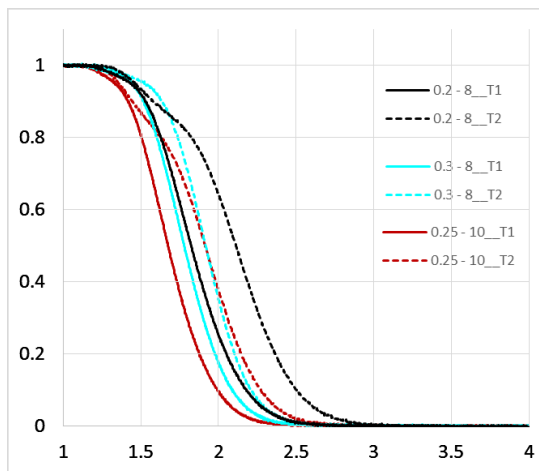
A standard kalibrálási (konduktancia teszt) eljárás során a gyári beállításokkal a két csapdázási zóna között oldatsebesség különbséget találtunk (36. Ábra).



A gyári beállítás értékei:  
0.2 PSI (perfúziós csatorna)  
8 PSI (anyagadó csatornák)

36. Ábra Ionflux: konduktancia teszt gyári beállításokkal

A nyomásértékek változtatásával csak kismértékben tudtuk a különbséget csökkenteni.



gyári beállítások  
(0.2 PSI – 8 PSI)

perfúziós csatorna megnövelt nyomásértékekkel  
(0.3 PSI – 8 PSI)

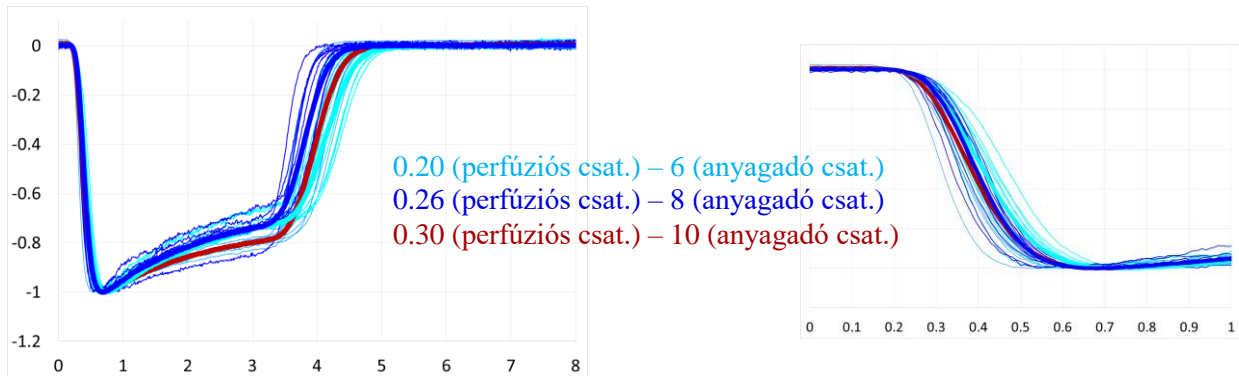
mind a perfúziós, mind az anyagadó csatornák megnövelt nyomásértékekkel  
(0.25 PSI – 10 PSI)

37. Ábra Ionflux: Példa különböző nyomásértékekkel mért kalibrációra

A legjobb eredményeket akkor kaptuk, ha az anyagadó csatorna nyomásértéke 25 – 35-szöröse volt a perfúziós csatorna nyomásának. Ennél nagyobb anyagadó csatorna nyomás esetén (40-szeres a fekete ill. piros görbéknél) a szivárgó hatóanyag miatt két komponensű, lassabb felfutást kaptunk (37. Ábra).

Ezután a nyomásértékek arányát 25 és 35 között tartva a nyomások abszolút értékét próbáltuk optimalizálni. Meglepő módon a nyomásértékek párhuzamos növelése nem gyorsította fel az oldatcserét. A 0.2 – 0.3 PSI (perfúziós csatorna) tartományban a felfutás

sebessége alig változott. Ezt már  $\alpha 7nAChR$ -ok által mediált áramokon szemléltetem (38. Ábra). Az áramokat 30 s 10  $\mu M$  A-867744 preinkubáció után 10 mM kolin + 10  $\mu M$  A-867744 koapplikációjával váltottuk ki. A 38. Ábra a felfutást mutatja nagyobb időbeli felbontásban. A fentebb tárgyalt kísérletek alapján egyértelmű hogy a felfutások és lecsengések nem az A-867744 által modulált receptor saját kinetikáját, hanem az oldatcserező rendszer sebességét tükrözik.

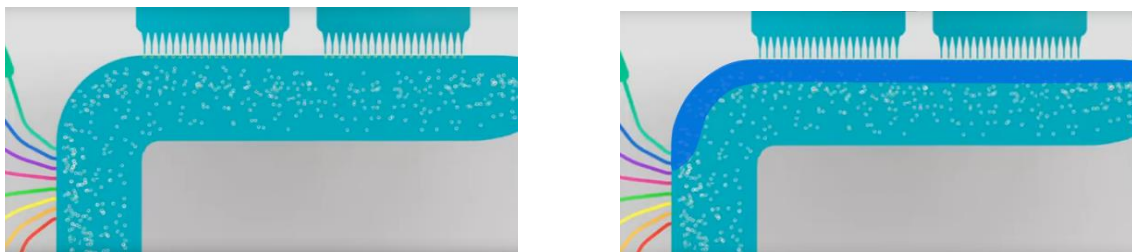


38. Ábra Ionflux: Példa párhuzamos nyomás emelésre

A nyomásértékek optimalizálását követően az anyagadási protokollok tesztelésével és paramétereinek beállításával foglalkoztunk.

#### 4.1.3.3 Protokollok optimalizálása

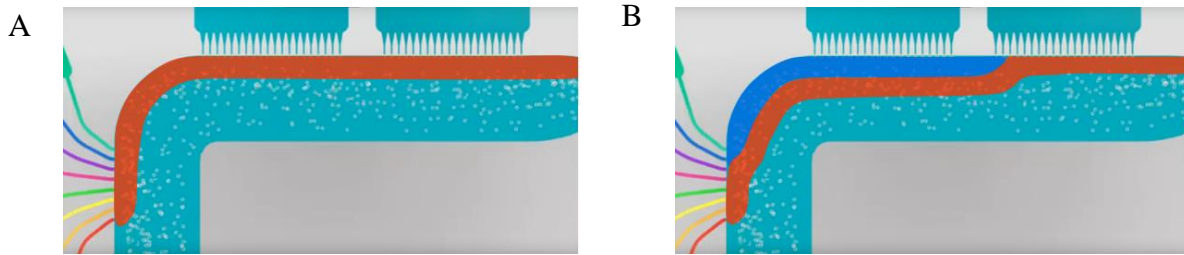
A perfúziós csatorna folyamatos nyomás alatt van, az anyagadó csatornák pedig az előre beprogramozott időszakokra kerülnek csak nyomás alá. Ilyenkor a perfúzió oldatáramlása viszi magával az anyagadó csatornákból kiengedett oldatot, úgy hogy a megfogott és felnyitott membránú sejtek felőli oldalhoz nyomja azt (39. Ábra).



39. Ábra Ionflux: Anyagadó csatornák és a sejt-csapdák elrendezése (populációs regisztráció) (eredeti kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

A) Az anyagadó csatornák és a sejt-csapdák elrendezése populációs regisztráció esetén. B) Az oldatok áramlása, a 7-es (kék) anyagadó csatorna nyomás alá helyezésekor.

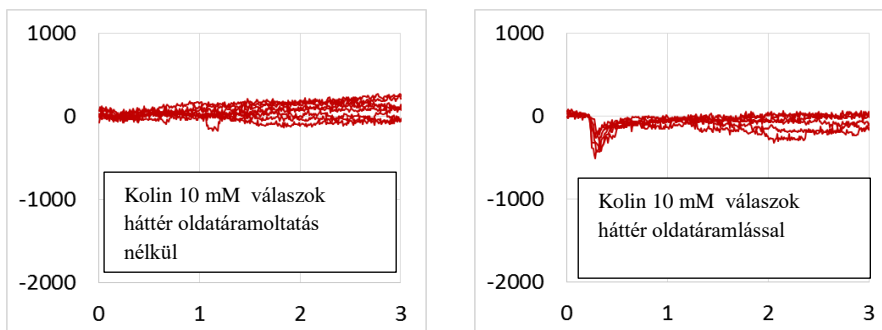
Megvizsgáltuk, hogy ha az 1-es anyagadó csatornából az egész kísérlet alatt folyamatosan kontroll extracelluláris oldatot áramoltatunk (40. Ábra A), az javítja-e az oldatcsere sebességét. Ha két anyagadó csatornára adunk nyomást egy időben, akkor a sejt-csapdákhoz közelebbi csatornán kiáramló oldat elnyomja a távolabbi csatornából kiáramló oldatot, ezért a sejtek a kettős anyagadás ideje alatt csak az előbbivel érintkeznek (40. Ábra B).



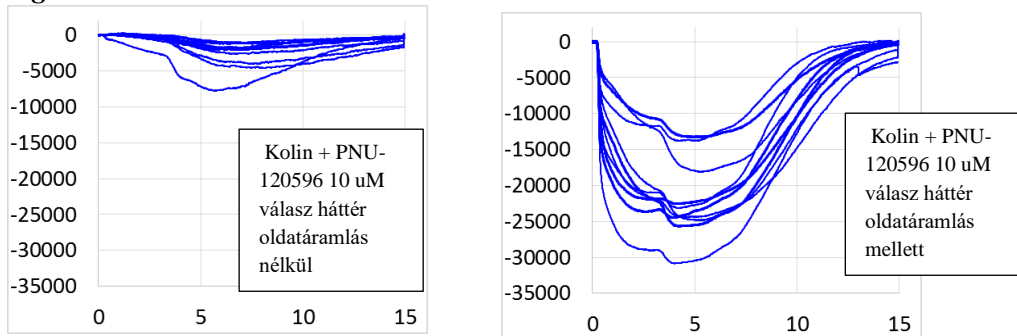
40. Ábra Ionflux: Mérési eredmények különböző paraméterekkel (eredeti kép a Fluxion hivatalos honlapjáról)

Meglepő módon a két anyagadási módszer között (amelyet a 41. Ábra és 42. Ábra szemléltet), óriási különbséget találtunk. A 10 mM kolin által kiváltott válaszok nem voltak mérhetőek amikor a perfúziós csatorna háttérével adtuk az agonistát, de szépen mérni lehetett őket, amikor a folyamatosan áramló extracelluláris oldat háttérével adtuk (41. Ábra agonista válaszok). A modulátorok hatása is sokkal jobban látszott az utóbbi esetben. A 42. Ábra Agonista és modulator válaszok mutatják 10  $\mu$ M PNU-120596 hatását a kolin által kiváltott válaszra (30 s preinkubáció után 3s koapplikációval kiváltott válaszok).

### *Agonista válaszok*

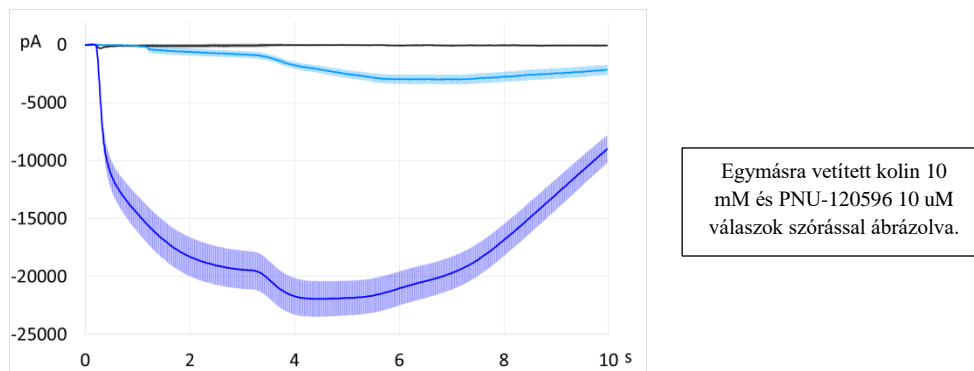


41. Ábra Ionflux: Agonista és agonista válaszok háttér oldatáramlással illetve anélkül

**Agonista és modulátor válaszok**

42. Ábra Ionflux: Agonista + modulátor válaszok háttér oldatáramlással illetve anélkül

Tehát megállapíthatjuk, hogy a hatóanyag pulzusok alatti folyamatos oldatáramlás elengedhetetlen, amelyet az egyik anyagadó csatornából a legcélszerűbb megoldani.



43. Ábra Ionflux: A háttér oldatáramlás jelentősége

A különbség oka nem teljesen világos, lehetséges hogy az anyagadó csatornából folyamatosan áramló kontroll extracelluláris oldat valamilyen módon jobban összetartja a vizsgálandó oldatot, vagy növeli annak áramlási sebességét, illetve lehet hogy a perfúziós csatornában áramló sejtek megkötik a modulátor molekulák egy részét.

Vizsgáltuk azt is, van-e jelentősége annak, hogy az anyagadó csatornából folyamatosan áramoltatjuk-e az extracelluláris oldatot, vagy megszakítjuk áramlását az anyagadás idejére.

Vizsgáltuk továbbá, hogy megszakított áramlás esetén van-e jelentősége annak, hogy a kontroll extracelluláris oldatot a legtávolabbi (1-es), vagy a legközelebbi (8-as) anyagadó csatornából áramoltatjuk.

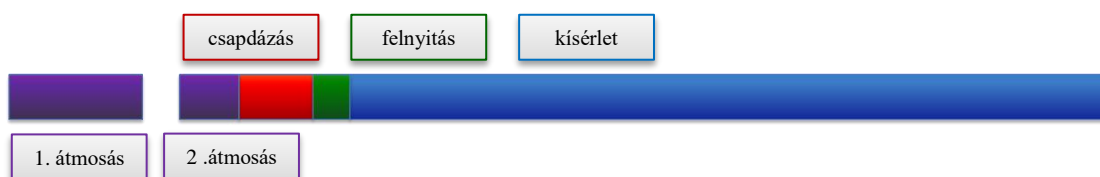
Érdekes módon lényeges különbséget egyik esetben sem tapasztaltunk.

#### 4.1.3.4 A keresztzennyezés minimalizálása

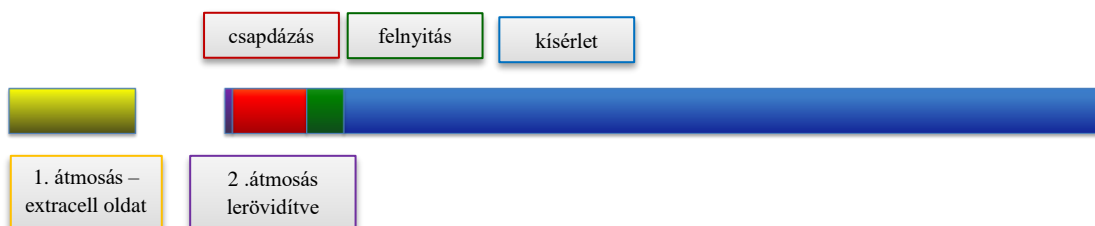
Kezdeti kísérleteinkben észrevettük, hogy az erősen lipofil, könnyen adszorbeálódó anyagok (mint például az A-867744) esetében, mielőtt még egyáltalán elkezdenénk a modulátorokat perfundálni, a tiszta agonistával kiváltott áramok is jóval nagyobbak, mint azokon a csatornákon, amelyeken más modulátorokat tanulmányoztunk. Arra jutottunk, hogy a keresztzennyezés valószínűleg a protokoll kezdeti szakaszán a mikrofluidikai edények kísérleti oldatokkal történő átöblítésénél történhet, így a kontroll áramokon már minimális koncentrációban is látható változást okozott. A protokoll kezdeti szakaszának átalakításával teljes mértékben elkerülhetővé vált a keresztzennyezés.

A gyári protokollban (44. Ábra felső sor) a mérést megelőzően a megfelelő hatóanyagokkal feltöltött plate-en, először egy pár percig tartó átöblítés zajlik. A sejtszuspenzió betöltését követően egy rövidebb ismételt átmosás után kezdődik meg a sejtek csapdázása, felnyitása. A különösen lipofil anyagokhoz ezért olyan protokollt alkalmaztunk, amellyel kiküszöbölhető a hatóanyagok idő előtti perfúziós csatornába való jutása. A módosítás az átöblítést érinti, az elsőnél a hatóanyagok helyett extracelluláris oldattal dolgozunk, amelyet a sejtek betöltésével egyidőben lecserélünk hatóanyagokra. A második átöblítés hosszát pedig mininálisra (5-10 s) vettük. A következő ábrán illusztráltuk a protokollok sematikus szerkezetét (44. Ábra alsó sor)

Gyári beállítás:



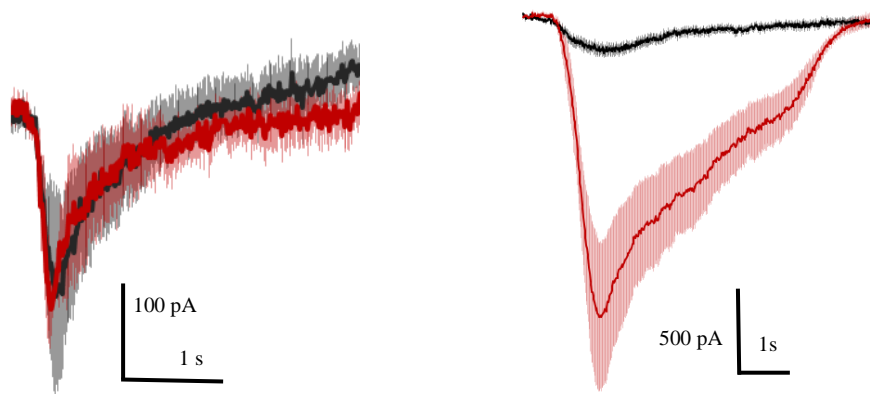
Módosított beállítás:



44. Ábra Ionflux: A gyári és a módosított protokollok sematikus rajza

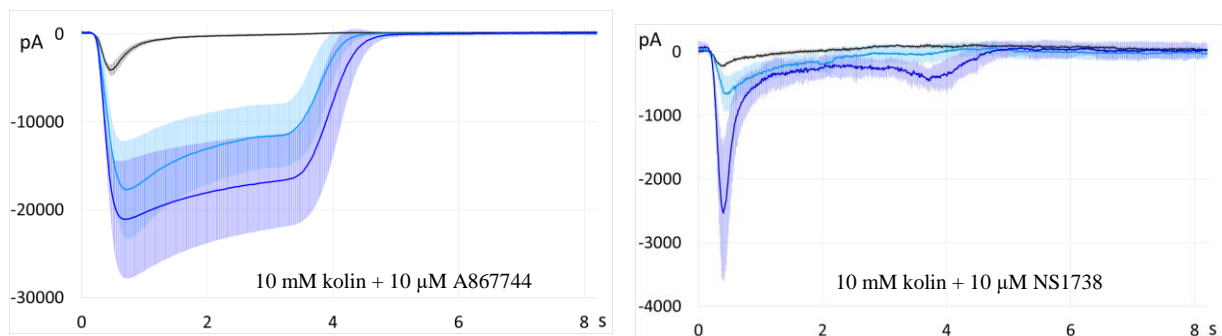


A két lépésben extracelluláris oldattal történő átöblítés, majd hatóanyagokkal való betöltés után, közvetlenül a kísérlet előtti csökkentett hosszúságú öblítés megakadályozta a keresztzennyezést. A 45. Ábrán a 10 mM kolinral kiváltott kontroll áramok láthatók. Az ábrákon gyári (piros görbék szórással) és a módosított beállításokkal (fekete görbék szórással) végzett kísérlet eredményeit hasonlítjuk össze. A bal oldalon 1  $\mu$ M NS-1738-at töltöttünk be a plate-be, itt nem látható jelentős kereszt-zennyezés. Ennek az az oka, hogy az NS-1738 hosszú előinkubációt igényel (ld. a következő fejezetet, 46. Ábra). A jobb oldalon, az A-867744 esetében a gyári előinkubációval viszont jelentős keresztzennyezés lépett fel, amely a módosított átöblítési protokollal megelőzhető volt (45. Ábra jobb oldal).



45. Ábra Ionflux: 10 mM-os kolin válaszok a gyári beállításokkal

#### 4.1.3.5 A preinkubáció szerepe



46. Ábra A preinkubáció szerepe

A kísérletek során kiderült, hogy a preinkubálás hosszának helyes megválasztása egyes hatóanyagoknál kulcsfontosságú lehet. A (46. Ábra bal oldali kép) A-867744 (10 $\mu$ M)

előinkubáció hatására már nem növelte számottevően a koapplikált válaszokat, ezzel ellentétben az (46. Ábra jobb oldali ábra) NS1738 (10  $\mu$ M) hatását nagy mértékben befolyásolta a hosszabb modulátor preinkubációs pulzus. A fekete görbék a kontroll, a világoskék a 3 s, a sötétkék pedig a 30 s hosszúságú modulátor preinkubációt követő 10 mM kolin + modulátor koapplikáció által kiváltott válaszok láthatók.

## 5 Megbeszélés

Az  $\alpha 7nAChR$  különféle kognitív-, gyulladási- és fájdalom érzékelési folyamatokhoz társítható, ezért ígéretes célpontja lehet számos központi idegrendszeri megbetegedés (mint például Alzheimer-kór, skizofrénia, Parkinson-kór) bizonyos tüneteinek, továbbá különböző gyulladással és fájdalommal járó kórképeknek terápiás kezelésében. A preklinikai és klinikai fázisban hatékonyak talált molekulák között vannak agonisták, parciális agonisták, csendes agonisták, alloszterikus agonisták, I. és II. típusú pozitív alloszterikus modulátorok, illetve olyan vegyületek amelyek ezekből több kategóriába is besorolhatók. Költséghatékonyság szempontjából először érdemes lenne megvizsgálni és megérteni, hogy az adott ligandum pontosan milyen hatást gyakorol a receptorra, a terápiás indikációt hatásmechanizmus alapján megállapítani, majd hatásmechanizmus alapján szűrni a molekulákat. Ezzel a stratégiával feltehetően sok állatkísérletet lehetne megspórolni. A PAM-ok az utóbbi időben egyre fontosabb szerephez jutnak az  $\alpha 7nAChR$ -okra ható gyógyszerek fejlesztésében. Központi idegrendszeri betegségek esetén modulátorok alkalmazása előnyösebb lehet az agonistákénál, mert nem okoznak kiterjedt aktivációt vagy deszenzitizációt, hanem csak az aktív célfehérje által közvetített jeleket erősítik fel, annak tér- és időbeli mintázatát megőrizve. A PAM-ok hatásmechanizmusáról kevés információval rendelkezünk.

Csoportunk szemléletére az jellemző, hogy megpróbáljuk megérteni az adott receptor vagy ioncsatorna működését, és ezután tesszük fel azt a kérdést, hogy ez a működés hogyan módosul egy adott ligandum hatására.

Az  $\alpha 7nAChR$ -ok esetében ez azt jelentette, hogy mielőtt hozzáfognánk a PAM-ok hatásmechanizmusának kutatásához, meg kellett válaszolnunk néhány alapvető kérdést a csatorna működésével kapcsolatban is. Noha az  $\alpha 7nAChR$ -okat már több mint 30 éve tanulmányozzák, alapvető dolgokat még mindig nem tudtunk róla. Nem volt ismert például a receptorra jellemző koncentráció-függő kinetika, mivel minél gyorsabb oldatcsereelő rendszert használtak, annál gyorsabb kinetikájú és nagyobb amplitúdójú áramot kaptak. Ez a bizonytalanság egyre nagyobb ahogy növekszik az agonista koncentráció, ezért a maximális csúcsamplitúdó meghatározása gyakorlatilag lehetetlen. Ha megfigyeljük az irodalomban található koncentráció-válasz görbéket, azt láthatjuk, hogy nem mennek telítésbe, a legnagyobb koncentrációnál is még jócskán fölfele

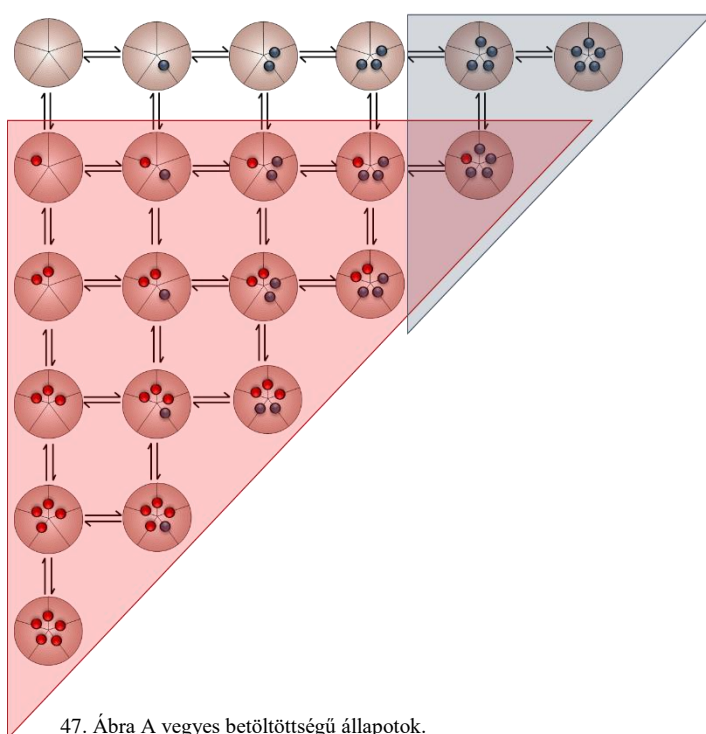
tartanak. Ebből az következik, hogy az  $EC_{50}$  érték sem határozható meg korrekt módon, hiszen nem tudjuk mi az a maximális amplitúdó érték, amelynek a felét kellene nézni. Ez lehet egyik oka annak, hogy az irodalomban szereplő  $EC_{50}$  értékek széles határok között szórnak (pl.  $74 \mu\text{M}$  ACh – (Papke, 2006);  $1071 \mu\text{M}$  ACh – (Zhao et al., 2003)). Első, csak nagy vonalakban ismertetett munkámban sikerült meghatároznunk a  $10 \text{ mM}$  kolinra adott válasz valódi alakját és amplitúdóját, illetve azt, hogy ennek eléréséhez milyen sebességű oldatcserére lenne szükség. Az elemzés azt is megmutatta, pontosan mi történik egy agonista által kiváltott aktiváció során a receptor populációban: A receptorok 75-80 %-a nyitás nélkül vált át deszenzitizált konformációba, és csak 20-25 % aktiválódik.

Kísérleteinket az A-867744 és a PNU-120596 pozitív alloszterikus modulátorok összehasonlítása céljából végeztük. A II. típusú PAM-ok csoportján belüli heterogenitást már többen megfigyelték, de részletes vizsgálat még nem született arról, pontosan miben különböznek ezek a modulátorok, és hogy a különbségnek milyen mechanisztikus oka lehet. Williams és munkatársai (Dustin K. Williams, Jingyi Wang, 2011) összefoglaló cikkükben említik is, hogy bizonyos PAM molekulákra alacsony PAM koncentrációnál bifázikus áram jellemző, amelyek nagyobb koncentrációknál egybeolvadnak, de ennek a jelenségnek magyarázata nem ismert. A PNU-120596 esetében gyors oldatcserével végzett kísérleteinkben sikerült az első, gyors fázist azonosítanunk, mivel ez teljesen egybevágtott az agonista által (modulátor nélkül) kiváltott válasszal. Azt is megfigyeltük, hogy ez a komponens a legnagyobb PAM koncentrációnál sem olvadt egybe a második komponenssel. A jelenséget csak úgy tudtuk magyarázni, hogy azt feltételeztük, a PNU-120596 képtelen a nyugalmi receptoron hatni, ezért csak agonistával együtt adva tudja hatását kifejteni. Ekkor elsősorban a deszenzitizált állapotban lévő receptorokhoz köt, ezért hagyja változatlanul a kezdeti “kolin komponens”. Ez az oka annak, hogy a preinkubáció PNU-120596-tal szinte teljesen hatástalan. Ezzel szemben az A-867744-gyel való preinkubációt hatékonyan találtuk, ez a molekula tehát képes a nyugalmi állapotú receptorokhoz is kötődni. Másik fontos különbség, hogy míg PNU-120596 és agonista koapplikáció után a deaktiváció lassú volt, különösen lassú akkor amikor a modulátor továbbra is jelen volt, A-867744 és agonista koapplikáció után a deaktiváció  $10 \text{ ms}$ -nál is kisebb időállandóval rendkívül gyorsan lecsengett. Ennek nem a modulátor disszociációja volt az oka, mivel annak jelenlétéről a kötőhelyen több különböző kísérletben is volt alkalmunk meggyőződni. A két modulátor közötti különbséget

valószínűleg a modulátor által indukált nyitott állapotok átlagos hossza okozza. A PNU-120596 rendkívül hosszú (több másodperces) burst-öket képes indukálni, míg az A-867744-ről azt feltételezzük, hogy rövid nyitásokat indukál.

Kísérleteinkben bizonyítékot találtunk arra, hogy a két modulátor ugyanazért a kötőhelyért verseng. A kísérlet során nem tapasztaltuk a moduláló hatások összeadódását, inkább úgy tűnt, hogy az egyik modulátor jelenléte gátolja másik hatását. Ez azonban nem bizonyítja, hogy megosztják a kötőhelyet, mivel a kölcsönhatás a konformációk szintjén is lehetséges. Azonos koncentrációban alkalmazva a két modulátort, feltűnő volt, hogy az A-867744 mennyivel hatékonyabban tudja jellegzetes mintázatát "rákényszeríteni" a receptorra, mint a PNU-120596. Ez annál is érdekesebb, mert az irodalom alapján a két modulátor affinitása hasonló (PNU-120596: 216 nM – (John Malysz et al., 2009); 1.58  $\mu$ M – (Grønlien et al., 2007); A-867744: 0.98  $\mu$ M ill. 1.12  $\mu$ M – (John Malysz et al., 2009)). Ha viszont megvizsgáljuk a kísérleteinkben tapasztalt asszociációs és disszociációs sebességeket, akkor óriási különbségeket találunk. Célszerű nem a nyugalmi állapothoz való asszociációt vizsgálni, mivel ez a PNU-120596 esetében praktikusán nem létezik. A deszenzitizált állapothoz való asszociációra viszont következtetni tudunk a deaktiváció lassú komponensének kifejlődéséből (31. Ábra), amely 97.8 ms-os időállandóval haladt. Az A-867744 esetében a (31. Ábra) mutatja ugyanezt, a nem-modulált receptor kissé gyorsabb deaktivációja 47.8 ms-os időállandóval adta át helyét az A-86774-re jellemző kissé lassabb deaktivációnak. A disszociációk sebességére csak indirekt úton tudunk következtetni: ha a másik modulátor már asszociált, akkor az egyiknek előzetesen már disszociálnia kellett. Ezért érdemes a leszorításos kísérleteket megvizsgálni. Az A-867744 456 ms-os időállandóval tudta átvenni a PNU-120596 helyét (35. Ábra), míg a PNU-120596 csak 5304 ms-os időállandóval tudta az A-867744-et leszorítani (33. Ábra). Ha kicsit kerekítünk az egyszerűség kedvéért, az A-867744 50 ms-os időállandóval asszociált és 5000 ms-ossal disszociált, míg a PNU-120596 100 ms-os időállandóval asszociált és 500 ms-ossal disszociált. Ha az egy lépéses asszociáció/disszociáció folyamatára érvényes képletet alkalmaznánk:  $EC_{50} = [PAM] * \tau_{on} / (\tau_{off} - \tau_{on})$ , 1  $\mu$ M-os koncentrációkkal számolva 0.25  $\mu$ M-t kapnánk a PNU-120596-ra (ami megfelel az irodalmi adatnak), de 10 nM-t az A-867744-re, ami viszont 100-szor nagyobb affinitás az irodalmi értéknél. Mi lehet a titka annak, hogy az A-867744 önmagában ekvipotensnek látszik, de a versengésben ennyivel

jobbnak tűnik a PNU-120596-nál? Kézenfekvő magyarázatnak a sztöchiometria látszik. A PNU-120596-ról kimutatták, hogy a hatás kialakításához 4 vagy 5 kötőhelyet be kell töltenie az 5-ből, és nagyon valószínű hogy ilyen korlátozás az A-867744-re nem létezik, már egyetlen kötött molekula is ki tudja váltani a modulátorra jellemző mintázatot. A betöltöttségi állapotok és a „fenotípus” kapcsolatát az 47. Ábra szemlélteti. A körök a receptorokat jelölik, az egyszerűség kedvéért most eltekintünk az agonista kötőhely betöltöttségi állapotától, és attól hogy a receptor nyugalmi, nyitott, vagy deszenzitizált állapotban lehet. Azt feltételezzük, hogy a PNU-120596-ra (kék pöttyök) jellemző "fenotípus" kizárólag 4 illetve 5 kötőhelyet elfoglalva valósulna meg (kék háromszög), míg az A-86774-re (piros pöttyök) jellemző nem csak a tisztán A-867744-et kötött állapotok esetén, hanem a legtöbb vegyes betöltöttségű állapotú receptornál is (rózsaszín háromszög). Ez részben magyarázhatná, hogy miért tart annyival több ideig a PNU-120596-nak az A-867744-et leszorítani mint fordítva, és természetesen a kooperativitást



sem zárhatjuk ki (egy A-867744 molekula kötése növelheti a pentamer másik négy kötőhelyének affinitását az A-867744 iránt).

Amint az kísérleteinkből kiderült, az  $\alpha 7nAChR$ -ok tanulmányozása során az eredmények csak úgy értelmezhetők helyesen, ha ismerjük a használt technikák előnyeit és hátrányait. Kísérleteinkben mind a manuális, mind az

automata patch clamp lehetőségeit és határait felderítettük. A két vizsgálati rendszer technikai előnyeinek ötvözésével a vizsgált célmolekulákról sokkal több információ gyűjthető. A manuális patch clamp esetében a pipetta-sejtmembrán kapcsolat jobb minőségű, de kevésbé stabil. A pulzusok és a regisztrátumok hossza rövidebb időintervallumra korlátozódik ezért kevésbé alkalmas a több percen át tartó modulátor

applikáció hatásainak vizsgálatára. Előnye viszont, hogy a piezoelektromos vezérlésű theta-cső jóval gyorsabb oldatcserét tesz lehetővé, amely elősegíti az események jobb időbeli felbontással történő követését. Ez különösen fontos a hatásmechanizmusok értelmezésénél. Például ahhoz hogy sikerüljön megkülönböztetni a PNU-120596 hatását (változatlan "kolin-komponens" után kezd el hatni) az A-867744 hatásától (már a "kolin-komponens" is átalakítja), 1 ms alatti időbeli felbontásra volt szükségünk

Az automata patch clamp esetében nyilvánvaló előny hogy rövid idő alatt sok kísérlet végezhető. A plate és sejt közti kapcsolat rosszabb minőségű (alacsonyabb ellenállású) ugyan, de rendkívül stabil, ezért nyugodtan lehet percekig tartó perfúziót is alkalmazni. További előny, hogy csak kis térfogatra van szükség a kísérletekhez, tehát gazdaságosabban lehet a sokszor magas áron és kis mennyiségben beszerezhető vegyületeket felhasználni. A kis oldatmennyiségnek azonban lehet hátránya is. A mikrofluidikai elven működő anyagadó rendszer térfogatához képest igen nagy felülettel rendelkezik, amely képes szelektíven adszorbeálni bizonyos vegyületeket, különösen az erősen lipofil tulajdonságúakat, mint amilyenek az általunk használt modulátorok is. A sejtekhez ezért csökkent koncentrációjú oldat érkezik, egészen addig amíg a rendszer teljes felülete nem telítődik. Ezt az eredmények értelmezésénél minden esetben érdemes figyelembe venni. Például az IonFlux rendszeren vizsgálva a PNU-120596 esetében is szükséges volt a hosszabb preinkubáció a hatás kiváltásához. Ezt tévedés lenne úgy értelmezni, hogy a preinkubációra a kötés kialakítása miatt van szükség. Sokkal valószínűbb, hogy a preinkubációra azért van szükség, hogy a mikrofluidikai rendszer teljes felülete telítődhessen, és az anyag közel teljes koncentrációban eljusson a sejtekhez.

Adszorpció természetesen nincsen deszorpció nélkül. Számítani kell rá, hogy a mikrofluidikai rendszer falához tapadt molekulák el is hagyják azt, esetlegesen kereszt-kontaminációt okozva. Amint azt az Eredmények részben tárgyaltuk, ez a hatás szerencsére kivédhető, ha az előzetes átöblítést ligandum mentes oldattal végezzük, és a kísérlet során az átöblítés idejét minimalizáljuk. Ilyen óvintézkedések mellett is célszerű a különböző koncentrációkat kumulatíván, növekvő sorrendben adni, és számítani kell rá, hogy teljes kimosást nem minden anyagnál tudunk elérni.

## 6 Következtetések

A gyógyszergyárak a célfehérjén való kötődés erősségére, és nem hatásmechanizmus szerint választják ki a potenciális hatóanyagokat, majd állatkísérletek alapján döntenek el, hogy végül mire lesz jó a talált molekula. Ez jelentősen felgyorsítja a kutatást, viszont költséghatékonyság szempontjából érdemes lenne hatásmechanizmus alapján szűrni. A hatásmechanizmus megértéséhez viszont először meg kell ismerni a célfehérje biofizikai tulajdonságait (receptor kapuzási kinetikája), majd megvizsgálni, hogy ezt hogyan módosítja a hatóanyag (figyelembe véve a ligandumok asszociációs- disszociációs kinetikáját és állapot-preferenciáját). Mindehhez megfelelő időbeli felbontásra van szükség, mind a regisztráláshoz, mind az oldatcseréhez.

Az ultragyors oldatcsere lehetővé tette számunkra, hogy megválaszolhassunk néhány alapvető kérdést egyrészt a receptor saját biofizikai tulajdonságait, másrészt pedig a rá ható modulátorok hatásmechanizmusát illetően:

### *A receptor tulajdonságai:*

Az  $\alpha 7nAChR$  saját kinetikájáról régóta tudjuk hogy rendkívül gyors (nagy koncentrációjú agonista gyorsan felfutó és lecsengő áramot vált ki), de hogy pontosan milyen gyors, az mindezidáig ismeretlen volt. Sok kutatócsoport mérte meg az áram felfutásának és lecsengésének sebességét, de az eredmények több nagyságrenddel különböztek. Az irodalmi adatok összevetéséből az derült ki, hogy az áram felfutásának és lecsengésének sebessége az oldatcsere sebességét követi (Fig 2(Pesti et al., 2014)), tehát amikor egy-egy kutatócsoport az  $\alpha 7nAChR$  kinetikáját gondolta mérni, valójában saját oldatcserélő rendszerének sebességét mérte. Gyorsabb oldatcsere gyorsabb áram kinetikát, és nagyobb áram amplitúdót eredményez, ez a hatás annál kifejezettebb, minél nagyobb az agonista koncentráció. Ez gyakorlatilag lehetetlenné teszi az agonista  $EC_{50}$  értékének pontos meghatározását, mivel a maximális amplitúdó meghatározása nem lehetséges. Egy másik mind a mai napig "népszerű" tévhit a felfutás sebességét az aktiváció (csatorna nyitás) sebességével, a lecsengés sebességét pedig a deszenzitizáció sebességével azonosítani. Ez csak abban az esetben lenne így, ha a receptorok többsége valóban előbb kinyitna, majd deszenzitizálna, ami az  $\alpha 7nAChR$  esetében egyáltalán nem biztos.



**Felmerülő kérdések a receptor kinetikájával kapcsolatban:**

- 1) Milyen gyors a receptorok saját (intrinsic) kinetikája?
- 2) A receptor populáció hány százaléka nyílik ki egyszerre? Hány százaléka nyílik ki egyáltalán?
- 3) Milyen folyamatokat tükröz az áramok felfutása, lecsengése?

**A modulátorok hatásmechanizmusa:**

- 1) Valóban azonos-e a két azonos kategóriába (II. típus) sorolt modulátor hatásmechanizmusa?
- 2) Ha nem, miben különböznek? Pl. állapot-preferencia, asszociációs és disszociációs sebesség, a modulált receptor viselkedése: nyitások hossza, deaktiváció sebessége, sztöchiometria, stb
- 3) Azonos kötőhelyen osztoznak-e?

**Legfontosabb következtetések a fenti kérdésekre vonatkozólag:**

- 1) Az  $\alpha 7nAChR$  saját tulajdonságaiból fakadó kinetikája kb. kétszer gyorsabb mint amit 1 ms-os oldatkicserélődési sebességnél mérünk, és az áram amplitúdója is kb. kétszer akkora lenne. Ahhoz hogy ezt el tudjuk érni kb. 80  $\mu s$  –os oldatkicserélődési sebességre lenne szükség.
- 2) 10 mM kolin perfúziója esetén,  $\sim 1$  ms oldatkicserélődési sebességnél a receptorok  $3.3 \pm 0.6$  %-a volt nyitott állapotban az áram csúcsánál. Ebből az következik, hogy a receptorok kevesebb mint egynegyede nyílik ki egyáltalán az agonista hatására, és legalább háromnegyede nyitás nélkül deszenzitizálódik. A modulátorok ezeket az arányokat alapvetően meg tudják változtatni, például 10  $\mu M$  PNU-120596 hatására az egyidőben nyitott receptorok aránya  $59.9 \pm 5.8$  %-ra nőtt.
- 3) Kinetikai szimulációk alapján alapvetően nem a nyitás, hanem a záródás és a deszenzitizáció sebességi állandója határozza meg mind a felfutás idejét, mind a lecsengés időállandóját. A nyitás sebessége elsősorban a lecsengés időállandójára hat, mégpedig paradox módon gyorsabb nyitás késlelteti a lecsengést.
- 4) A két modulátor hatásmechanizmusa alapvetően eltér egymástól.

5) A két modulátor ugyanazon kötőhelyért verseng.

**A főbb különbségek a két modulátor hatásmechanizmusa között:**

- A PNU-120596 nem képes nyugalmi állapotban lévő receptorokhoz kötni, míg az A-867744 igen
- Az A-867744 esetében mind a modulált áram felfutása, mind a lecsengése sokkal gyorsabb. Ez a nagy különbség azonban nem feltétlen az asszociáció ill. disszociáció sebességében lévő különbséget tükrözi.
- A gyorsabb felfutás az előzetes asszociációnak köszönhető
- A gyorsabb lecsengés pedig annak, hogy az A-867744 által okozott modulációra sokkal rövidebb egyedi csatornanyitások jellemzők.
- Feltételezzük, hogy eltér a két modulátor sztöchiometriája. A PNU-120596-tal szemben, amely csak akkor képes hatását kialakítani, ha az 5 kötőhelyből 4 vagy 5 betöltött, feltételezzük, hogy az A-867744 kevesebb elfoglalt kötőhellyel is képes modulációra.

Terápiás szempontból fontos következménye a különbségeknek, hogy az A-867744 szinaptikus vagy periszinaptikus receptorokon (amelyek az acetilkolin ill. kolin koncentráció hirtelen változásait érzékelik) I. típusú PAM-ként viselkedne, míg sérülés, gyulladás, vagy iszkémiás körülmények között tartósan megemelkedett kolin szintre II típusú PAM-ként reagálna.

Ezeket a részleteket mindeztáig nem sokan kutatták, pedig terápiás szempontból fontos lehet, hogy fiziológias/patológias körülmények között mi lesz az adott modulátor hatása.

Tekintettel arra, hogy igazán tiszta I. típusú PAM molekulát mindeztáig nem találtak, és hogy a II. típuson belül gyökeresen különböző hatásmechanizmusokkal találkoztunk, úgy véljük, a PAM-ok csoportosítása átalakításra szorul. Reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a kedvező terápiás hatású, ígéretes molekulák alaposabb megismeréséhez és az értelmi hanyatlás kezelésére irányuló gyógyszerkutatás hatékonyabbá tételéhez.

## 7 Összefoglalás

Az  $\alpha 7$  altípusú nikotinos acetilkolin receptorok ( $\alpha 7nAChR$ ) lehetséges terápiás célpontok a kognitív zavarok, gyulladás, akut és krónikus neurodegeneratív kórképekben valamint a különböző fájdalom szindrómákban. Többféle hatásmechanizmusú ligandját is próbálták gyógyszer jelöltként alkalmazni, például agonistákat, parciális agonistákat, alloszterikus agonistákat, és pozitív alloszterikus modulátorokat (PAM-okat). A PAM-ok előnye, hogy nem általános receptor aktivációt okoznak, hanem a fiziológiai aktivitás mintázatot megőrizve csak felerősítik a receptorok válaszát. Különböző hatásmechanizmusú PAM-okat ismerünk, ezek különböző terápiás alkalmazásokra lehetnek optimálisak. A PAM-ok hatásmechanizmusáról azonban meglepően keveset tudunk. Munkám célja a PNU-120596 és az A-867744 jelű PAM vegyületek hatásmechanizmusának összehasonlító elemzése volt.

A hatásmechanizmus kutatást gyors oldatcserélő rendszer segítségével végeztem. Ez lehetővé tette a receptor kinetikájának pontos meghatározását, a PNU-120596 jelenlétében kiváltott áram két komponensének azonosítását, és a két PAM hatásmechanizmusa részleteinek meghatározását. Kimutattuk hogy a két modulátor alapvetően különbözik egymástól: A PNU-120596 csak agonista jelenlétében, a deszenzitizált receptorokhoz képes kötni, és az általa modulált receptorra a rendkívül hosszú (több másodperces) "burst"-ök jellemzők. Ez meghatározza a deaktiváció sebességét is, amely lassan következik be, különösen a modulátor folyamatos jelenléte esetén. Ezzel szemben az A-867744 képes a nyugalmi konformációjú receptorhoz is kötni agonista nélkül is, és az általa modulált receptorra sokkal rövidebb burst-ök jellemzők. Ennek megfelelően a modulált áram felfutása, és deaktivációja is sokkal gyorsabb. Ez a különleges hatásmechanizmus azt eredményezi, hogy hirtelen agonista koncentráció változások alkalmával (pl. szinaptikus, periszinaptikus elhelyezkedés esetén) képes az aktivitás mintázatot nagy pontossággal követni, de hosszabb, enyhe agonista koncentráció emelkedés esetén tónusos hatása van. Úgy véljük, hogy érdemes lenne a különböző indikációk területén végzett *in vivo* hatékonyság vizsgálatokat és az *in vitro* hatásmechanizmus kutatást összekapcsolni. Reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a kedvező terápiás hatású, ígéretes molekulák alaposabb megismeréséhez és az értelmi hanyatlás kezelésére irányuló gyógyszerkutatás hatékonyabbá tételéhez.

## 8 Summary

The  $\alpha 7$  subtype of nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha 7$ nAChR) is a potential therapeutic target in cognitive impairment, inflammation, acute or chronic neurodegenerative diseases, and in various pain syndromes. Currently, multiple mechanisms of action have been considered as potential therapeutic strategies, such as agonists, partial agonists, allosteric agonists, and positive allosteric modulators (PAMs). The advantage of using PAM compounds is, that the physiological neuronal activity pattern is preserved, only  $\alpha 7$ nAChR mediated signals are augmented. Surprisingly little is known about the exact mechanism of action of PAMs, even though specific therapeutic applications may require specific mechanisms. My goal in this study was to investigate and compare the detailed mechanism of action of two PAM compounds PNU-120596 and A-867744. Experiments were performed using an ultrafast solution exchange system that allowed the precise determination of receptor kinetics. We identified the mechanism behind the unique biphasic current evoked in the presence of PNU-120596, and we performed a detailed analysis of the mechanism of action of the two PAMs. We found fundamental differences: PNU-120596 was only able to bind to desensitized receptors in the presence of the agonist, and it induced extremely long bursts of openings (lasting for several seconds). Because of the long bursts, deactivation at the end of agonist application was slow. In contrast, A-867744 was able to bind to receptors in resting conformation, in the absence of agonist. Bursts of openings induced by A-867744 were significantly shorter, therefore, rise times and deactivation times were also much shorter. This mechanism of action results in an ability of modulated receptors to follow neuronal activity patterns at high temporal precision, when agonist concentration changes abruptly (such as in synaptic or perisynaptic locations), but also to react to slow, moderate increases of agonist concentration with tonic activation. We propose that in vitro and in vivo mechanism of action studies should be performed in parallel in order to best predict the therapeutic applicability of individual  $\alpha 7$ nAChR PAMs. We hope that our results will contribute to a more effective research for the treatment of cognitive decline.

## 9 Irodalomjegyzék

- Al Rawashdah, S., Hamrouni, A., Sadek, B., Amer, R., Metwaly, M., Atatreh, N., & Ghattas, M. A. (2019). Molecular modelling studies on  $\alpha 7$  nicotinic receptor allosteric modulators yields novel filter-based virtual screening protocol. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 92, 44–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.07.001>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Albuquerque, E. X., & Schwarcz, R. (2013). Kynurenic acid as an antagonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochemical Pharmacology*, 85(8), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.014>
- Alexei Verkhratsky, V. P. (2014). Patch-Clamp Methods and Protocols. In M. Marzia & S. Taverna (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1183, pp. 1–19).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0_1)
- Alkondon, M., Pereira, E. F., Cortes, W. S., Maelicke, a, & Albuquerque, E. X. (1997). Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2734–2742.  
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9517478>
- Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Cartes, W. S., & ... (2006). Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *European Journal of ...*, 9(May), 2734–2742. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01702.x/abstract>
- Alzarea, S., & Rahman, S. (2018). Effects of alpha-7 nicotinic allosteric modulator PNU 120596 on depressive-like behavior after lipopolysaccharide administration in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.018>
- Andersen, N., Corradi, J., Bartos, M., Sine, S. M., & Bouzat, C. (2011). Functional relationships between agonist binding sites and coupling regions of homomeric

- Cys-loop receptors. *Journal of Neuroscience*, 31(10), 3662–3669.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5940-10.2011>
- Andersen, O. S. (1983). Ion movement through gramicidin A channels. Studies on the diffusion-controlled association step. *Biophysical Journal*, 41(2), 147–165.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84416-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84416-6)
- Arias, H R, Gu, R.-X., Feuerbach, D., Guo, B.-B., Ye, Y., & Wei, D.-Q. (2011). Novel positive allosteric modulators of the human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 50(23), 5263–5278. Retrieved from  
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79958830196&partnerID=40&md5=113a624d6db0a748f1167f8950b508ca>
- Arias, Hugo R., Ghelardini, C., Lucarini, E., Tae, H.-S., Yousuf, A., Marcovich, I., ... Di Cesare Mannelli, L. (2020). (E)-3-Furan-2-yl-N-p-tolyl-acrylamide and its Derivative DM489 Decrease Neuropathic Pain in Mice Predominantly by  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Potentiation. *ACS Chemical Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00476>
- Arneric, S. P., Holladay, M., & Williams, M. (2007). Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1092–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.033>
- Asmild, M., Oswald, N., Krzywkowski, K. M., Friis, S., Jacobsen, B., Reuter, D., ... Bech, M. (2011). *Upscaling and Automation of Electrophysiology: Toward High Throughput Screening in Ion Channel Drug Discovery*. *Upscaling and Automation of Electrophysiology: Toward High Throughput Screening in Ion Channel Drug Discovery*. 6823. <https://doi.org/10.3109/10606820308258>
- Bagdas, D., Wilkerson, J. L., Kulkarni, A., Toma, W., AlSharari, S., Gul, Z., ... Damaj, M. I. (2016). The  $\alpha 7$  nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, 2506–2520.  
<https://doi.org/10.1111/bph.13528>
- Bartos, M., Corradi, J., & Bouzat, C. (2009). Structural basis of activation of Cys-loop receptors: The extracellular-transmembrane interface as a coupling region.

- Molecular Neurobiology*, 40(3), 236–252. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8084-x>
- Ben-David, Y., Mizrachi, T., Kagan, S., Krisher, T., Cohen, E., Brenner, T., & Treinin, M. (2016). RIC-3 expression and splicing regulate nAChR functional expression. *Molecular Brain*, 9(1), 3–11. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0231-5>
- Bertrand, D., & Gopalakrishnan, M. (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.011>
- Bertrand, D., & Jr, A. V. T. (2017). The Wonderland of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Corresponding Author : *Biochemical Pharmacology*, (December). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.008>
- Blunt, C. E. W., & Dougherty, D. A. (2019). Binding Interactions of NS6740, a Silent Agonist of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor . *Molecular Pharmacology*, 96(2), 212–218. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116244>
- Bouzat, C., Nielsen, B. E., & Esandi, C. (2017). *Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets*. 00, 1–15. <https://doi.org/10.1113/JP275101>
- Briggs, C. A., Grønlien, J. H., Curzon, P., Timmermann, D. B., Ween, H., Thorin-Hagene, K., ... Gopalakrishnan, M. (2009). Role of channel activation in cognitive enhancement mediated by  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1486–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00426.x>
- Broad, L. M., Zwart, R., Pearson, K. H., Lee, M., Wallace, L., McPhie, G. I., ... Sher, E. (2006). Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1108–1117. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.104505>
- Carswell, C. L., Hénault, C. M., Murlidaran, S., Therien, J. P. D., Juranka, P. F., Surujballi, J. A., ... Baenziger, J. E. (2015). Role of the Fourth Transmembrane  $\alpha$  Helix in the Allosteric Modulation of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Structure*, 23(9), 1655–1664. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.020>

- Cecchini, M., & Changeux, J.-P. (2014). The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology*, *96*(December), 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.006>
- Changeux, J. P. (2012). The nicotinic acetylcholine receptor: The founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40207–40215. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.407668>
- Changeux, J. P., & Christopoulos, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell*, *166*(5), 1084–1102.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.015>
- Chatzidaki, A., & Millar, N. S. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, *97*(4), 408–417.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.028>
- Cheng, H., Fan, C., Zhang, S., Wu, Z., Cui, Z., Melcher, K., ... Xu, H. E. (2015). Crystallization scale purification of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor from mammalian cells using a BacMam expression system. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.34>
- Chimienti, F., Hogg, R. C., Plantard, L., Lehmann, C., Brakch, N., Fischer, J., ... Hohl, D. (2003). Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Human Molecular Genetics*, *12*(22), 3017–3024. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg320>
- Chojnacka, K., Papke, R. L., & Horenstein, N. A. (2013). Synthesis and evaluation of a conditionally-silent agonist for the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *23*(14), 4145–4149. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84879415652&partnerID=40&md5=43704de323bb2877132a468612df86f3>
- Collins, T., & Millar, N. S. (2010). Nicotinic acetylcholine receptor transmembrane mutations convert ivermectin from a positive to a negative allosteric modulator. *Molecular Pharmacology*, *78*(2), 198–204. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->



77954926628&partnerID=40&md5=97add615ddd62ed144f564757aa25c

- Collins, T., Young, G. T., & Millar, N. S. (2011). Competitive binding at a nicotinic receptor transmembrane site of two  $\alpha 7$ -selective positive allosteric modulators with differing effects on agonist-evoked desensitization. *Neuropharmacology*, *61*(8), 1306–1313. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053618320&partnerID=40&md5=12b9e8b8ab6a422a98cab55ef1c3ee6f>
- Comley, J. (2014). Automated patch clamping finally achieves high throughput! *Drug Discovery World*, *15*(4), 45–56.
- Conroy, W. G., Liu, Q.-S. S., Nai, Q., Margiotta, J. F., & Berg, D. K. (2003). Potentiation of  $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins. *Molecular Pharmacology*, *63*(2), 419–428. <https://doi.org/10.1124/mol.63.2.419>
- Corradi, J., & Bouzat, C. (2016). Understanding the bases of function and modulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors : Implications for drug discovery. *Molecular Pharmacology*, *90*(3), 288–299. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>
- Corringer, P. (2012). *Review Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels : From Bacteria to Brain*. 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.003>
- Corringer, P. J., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1999). Mutational analysis of the charge selectivity filter of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, *22*(4), 831–843. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80741-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80741-2)
- Croy, C. H., Schober, D. A., Xiao, H., Quets, A., Christopoulos, A., & Felder, C. C. (2014). Characterization of the Novel Positive Allosteric Modulator, LY2119620, at the Muscarinic M2 and M4 Receptors. *Molecular Pharmacology*, *86*(1), 106–115. <https://doi.org/10.1124/mol.114.091751>
- daCosta, C. J. B., Free, C. R., Corradi, J., Bouzat, C., & Sine, S. M. (2011). Single-Channel and Structural Foundations of Neuronal  $\alpha 7$  Acetylcholine Receptor Potentiation. *Journal of Neuroscience*, *31*(39), 13870–13879. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2652-11.2011>
- daCosta, Corrie J. B., Free, C. R., Corradi, J., Bouzat, C., & Sine, S. M. (2011). Single-

- channel and structural foundations of neuronal  $\alpha 7$  acetylcholine receptor potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(39), 13870–13879. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2652-11.2011>
- daCosta, Corrie J B, & Sine, S. M. (2013). Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), 6595–6600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301909110>
- Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>
- Denyer, J., Worley, J., Cox, B., & Allenby, G. (1998). HTS approaches to voltage-gated ion channel drug discovery. *Medicinal Chemistry*, 3(7), 323–332.
- Dinklo, T., Shaban, H., Thuring, J. W., Lavreysen, H., Stevens, K. E., Zheng, L., ... Lesage, A. S. J. (2011). Characterization of 2-[[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 560–574. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78751507926&partnerID=40&md5=1e57f2f20322de19aad189b9dee746db>
- Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., & Arias, R. (2008). High-throughput electrophysiology : an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(april), 358–368. <https://doi.org/10.1038/nrd2552>
- Dunlop, J., Lock, T., Jow, B., Sitzia, F., Grauer, S., Jow, F., ... Brown, J. (2009). Old and New Pharmacology : Positive Allosteric Modulation of the alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by the. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 766–776. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146514>. Nicotinic
- Dustin K. Williams, Jingyi Wang, and R. L. P. (2011). Positive allosteric modulators as

an approach to nicotinic acetylcholine receptor- targeted therapeutics: advantages and limitations. *Biochem Pharmacol.*, 82(8), 915–930.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.001>.Positive

Elise Demeter, M. S. (2013). Leveraging the cortical cholinergic system to enhance attention. *Neuropharmacology*, 64(1), 249–304.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Eskildsen, J., Redrobe, J. P., Sams, A. G., Dekermendjian, K., Laursen, M., Boll, J. B., ... Bastlund, J. F. (2014). Discovery and optimization of Lu AF58801, a novel, selective and brain penetrant positive allosteric modulator of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors: attenuation of subchronic phencyclidine (PCP)-induced cognitive deficits in rats following oral ad. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.022>

Faghih, R., Gopalakrishnan, S. M., Gronlien, J. H., Malysz, J., Briggs, C. A., Wetterstrand, C., ... Gopalakrishnan, M. (2009). Discovery of 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl) benzenesulfonamide (A-867744) as a novel positive allosteric modulator of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(10), 3377–3384. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-66349096318&partnerID=40&md5=17a17a76c551df63833a6f157b83b3b9>

Fei, R., Zhang, Y., Wang, S., Xiang, T., & Chen, W. (2017).  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in tumor-associated macrophages inhibits colorectal cancer metastasis through the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncology Reports*, 38(5), 2619–2628. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5935>

Finkel, a, & Bookman, R. (2001). The electrophysiology setup. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.], Chapter 6*, Unit 6.1. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0601s00>

Frazier, C. J., Strowbridge, B. W., Papke, R. L., Charles, J., Strowbridge, B. W., & Papke, R. L. (2019). *Nicotinic Receptors on Local Circuit Neurons in Dentate Gyrus : A Potential Role in Regulation of Granule Cell Excitability*. 3018–3028.

Friis, S., Mathes, C., Sunesen, M., Bowlby, M. R., & Dunlop, J. (2009).

- Characterization of compounds on nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  channels using higher throughput electrophysiology. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(1), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.007>
- Fryer, J. D., & Lukas, R. J. (1999). Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *Journal of Neurochemistry*, 72(3), 1117–1124. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721117.x>
- Fucile, S. (2017). The Distribution of Charged Amino Acid Residues and the  $\text{Ca}^{2+}$  Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Predictive Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(May), 155. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00155>
- Gahring, L. C., Myers, E. J., Dunn, D. M., Weiss, R. B., & Rogers, S. W. (2017). Lung epithelial response to cigarette smoke and modulation by the nicotinic  $\alpha 7$  receptor. In *PLoS ONE* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187773>
- Gaidhani, N., & Uteshev, V. V. (2018). Treatment duration affects cytoprotective efficacy of positive allosteric modulation of  $\alpha 7$  nAChRs after focal ischemia in rats. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.09.001>
- Gass, N., Weber-Fahr, W., Sartorius, A., Becker, R., Didriksen, M., Stensbøl, T. B., ... Schwarz, A. J. (2016). An acetylcholine  $\alpha 7$  positive allosteric modulator rescues a schizophrenia-associated brain endophenotype in the 15q13.3 microdeletion, encompassing CHRNA7. *European Neuropsychopharmacology*, 26(7), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.03.013>
- Gay, E. A., Giniatullin, R., Skorinkin, A., & Yakel, J. L. (2008). Aromatic residues at position 55 of rat  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors are critical for maintaining rapid desensitization. *Journal of Physiology*, 586(4), 1105–1115. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149492>
- Gee, K. W., Olincy, A., Kanner, R., Johnson, L., Hogenkamp, D., Harris, J., ... Freedman, R. (2017). First in human trial of a type I positive allosteric modulator of  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors : Pharmacokinetics , safety , and evidence for neurocognitive effect of AVL-3288. 1–8. <https://doi.org/10.1177/0269881117691590>

- Gill-Thind, J. K., Dhankher, P., D'Oyley, J. M., Sheppard, T. D., & Millar, N. S. (2014). Structurally similar allosteric modulators of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors exhibit five distinct pharmacological effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 1–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619221>
- Gill, J K, Chatzidaki, A., Ursu, D., Sher, E., & Millar, N. S. (2013). Contrasting Properties of  $\alpha 7$ -Selective Orthosteric and Allosteric Agonists Examined on Native Nicotinic Acetylcholine Receptors. *PLoS ONE*, 8(1). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84873833484&partnerID=40&md5=bec33a2c14e8c874cdd05e74bc57a827>
- Gill, Jaskiran K, Savolainen, M., Young, G. T., Zwart, R., Sher, E., & Millar, N. S. (2011). Agonist activation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5867–5872. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017975108>
- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(6), 363–396. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.006>
- Grønlien, J. H., Håkerud, M., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Briggs, C. A., Gopalakrishnan, M., ... Malysz, J. (2007). Distinct profiles of  $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Molecular Pharmacology*, 72(3), 715–724. <https://doi.org/10.1124/mol.107.035410.tamers>
- Guercio, G. D., & Panizzutti, R. (2018). Potential and Challenges for the Clinical Use of d-Serine As a Cognitive Enhancer. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00014>
- Gulsevin, A., Papke, R. L., Stokes, C., Garai, S., Thakur, G. A., Quadri, M., & Horenstein, N. A. (2019). Allosteric agonism of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors: Receptor modulation outside the orthosteric site S. *Molecular Pharmacology*, 95(6), 606–614. <https://doi.org/10.1124/mol.119.115758>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-

- free membranes. *European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100.  
<https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hansen, S. B., Wang, H. L., Taylor, P., & Sine, S. M. (2008). An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36066–36070.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C800194200>
- Harvey, A. J., Avery, T. D., Schaeffer, L., Joseph, C., Huff, B. C., Singh, R., ... O'Connor, S. M. (2019). Discovery of BNC375, a Potent, Selective, and Orally Available Type I Positive Allosteric Modulator of  $\alpha 7$ nAChRs. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(5), 754–760.  
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00001>
- Hénault, C. M., Sun, J., Therien, J. P. D., DaCosta, C. J. B., Carswell, C. L., Labriola, J. M., ... Baenziger, J. E. (2015). The role of the M4 lipid-sensor in the folding, trafficking, and allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 96(PB), 157–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.011>
- Hibbs, R. E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T. T., Conrod, S., Kem, W. R., ... Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO Journal*, 28(19), 3040–3051. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.227>
- Hogekamp, D. J., Ford-Hutchinson, T. a, Li, W.-Y., Whittemore, E. R., Yoshimura, R. F., Tran, M. B., ... Gee, K. W. (2013). Design, Synthesis and Activity of a Series of Arylpyrid-3-ylmethanones as Type I Positive Allosteric Modulators of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, (Figure 2).  
<https://doi.org/10.1021/jm400704g>
- Hoover, D. B. (2018). Cholinergic Modulation of the Immune System Presents New Approaches for Treating Inflammation. *Pharmacol Ther.*, 179, 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.002>.Cholinergic
- Horenstein, N. A., Papke, R. L., Kulkarni, A. R., Chaturbuj, G. U., Stokes, C., Manther, K., & Thakur, G. A. (2016). Critical molecular determinants of  $\alpha 7$

- nicotinic acetylcholine receptor allosteric activation: Separation of direct allosteric activation and positive allosteric modulation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 5049–5067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692392>
- Horenstein, N. A., Papke, R. L., Kulkarni, A. R., & Ganesh, U. (n.d.). Critical molecular determinants of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor allosteric activation: separation of direct allosteric activation and positive allosteric modulation. *The Journal of Biological Chemistry*, VOLUME 291(NUMBER 10), 5049 –506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692392>
- Huang, M., Felix, A. R., Flood, D. G., Bhuvaneshwaran, C., Hilt, D., Koenig, G., & Meltzer, H. Y. (2014). The novel  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist EVP-6124 enhances dopamine, acetylcholine, and glutamate efflux in rat cortex and nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 231(23), 4541–4551. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3596-0>
- Hurst, R. S., Hajós, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., ... Arneric, S. P. (2005). A novel positive allosteric modulator of the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor: In vitro and in vivo characterization. *Journal of Neuroscience*, 25(17), 4396–4405. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-20944441082&partnerID=40&md5=c50605cacd4b377c052874abb36a84d7>
- Jaiteh, M., Taly, A., & Héning, J. (2016). Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: Pro-loop receptors. *PLoS ONE*, 11(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151934>
- Jiang, S., Li, Y., Zhang, C., Zhao, Y., Bu, G., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 295–307. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1406-z>
- Kabbani, N., & Nichols, R. A. (2018). Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(4), 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.002>
- Kalappa, B. I., & Uteshev, V. V. (2013). The dual effect of PNU-120596 on  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor channels. *European Journal of Pharmacology*,

- 718(1–3), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.027>
- Kalkman, H. O., & Feuerbach, D. (2016). Modulatory effects of  $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(13), 2511–2530. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2175-4>
- King, J. R., Nordman, J. C., Bridges, S. P., Lin, M. K., & Kabbani, N. (2015). Identification and characterization of a G protein-binding cluster in  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20060–20070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647040>
- Kirton, H. M., Pettinger, L., & Gamper, N. (2013). Automated Planar Patch-Clamp. In *Ion Channels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 998, pp. 55–64). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-351-0>
- Kryukova, E. V., Egorova, N. S., Kudryavtsev, D. S., Lebedev, D. S., Spirova, E. N., Zhmak, M. N., ... Tsetlin, V. I. (2019). From Synthetic Fragments of Endogenous Three-Finger Proteins to Potential Drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 10(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00748>
- Lasala, M., Fabiani, C., Corradi, J., Antollini, S., & Bouzat, C. (2019). Molecular modulation of human  $\alpha 7$  nicotinic receptor by amyloid- $\beta$  peptides. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00037>
- Lendvai, B., Kassai, F., Szájli, T., & Némethy, Z. (2013).  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Research Bulletin*, 93, 86–96. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875618027&partnerID=40&md5=197123b1e327a14193088313a8a7192e>
- Li, H., Zhang, Z., Zhan, J., He, X., & Song, X. (2012). *Protective Effect of PNU-120596, a Selective Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor – positive Allosteric Modulator, on Myocardial Ischemia – reperfusion Injury in Rats*. 59(6), 507–513.
- Li, T., Lu, G., Chiang, E. Y., Chernov-Rogan, T., Grogan, J. L., & Chen, J. (2017). High-throughput electrophysiological assays for voltage gated ion channels using SyncroPatch 768PE. *PLoS ONE*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180154>



- Li, X., Xie, W., Wang, X., Huang, Z., Bian, X., Wang, K. W., & Sun, Q. (2019). Chemical conversion of nicotinamide into type I positive allosteric modulator of  $\alpha 7$ nAChRs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(15), 1928–1933. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.05.046>
- Li, Y., Sun, L., Yang, T., Jiao, W., Tang, J., Huang, X., ... Sun, Q. (2019). Design and Synthesis of Novel Positive Allosteric Modulators of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors with the Ability to Rescue Auditory Gating Deficit in Mice [Research-article]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(1), 159–173. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01492>
- Liu, X., Xu, Y., Li, H., Wang, X., Jiang, H., & Barrantes, F. J. (2008). Mechanics of channel gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS Computational Biology*, 4(1), e19. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040019>
- Liu, Z. (2006). Sequential Interplay of Nicotinic and Neuronal Development. *Science*, 314, 1610–1613. <https://doi.org/10.1126/science.1134246>
- Lopes, C., Pereira, E. F. R., Wu, H.-Q., Purushottamachar, P., Njar, V., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2007). Competitive antagonism between the nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine and kynurenic acid at  $\alpha 7^*$  nicotinic receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 48–58. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123109>
- Lykhmus, O., Voytenko, L. P., Lips, K. S., & Bergen, I. (2017). *Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  Subunits Are Expressed in the Brain of Mice*. 11(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00282>
- M. S. Thomsen (Neurobiology Research Unit, University Hospital Copenhagen, Denmark), J. D. Mikkelsen (Neurobiology Research Unit, University Hospital Copenhagen, D. (2012). Type I and II positive allosteric modulators differentially modulate agonist-induced up-regulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochemistry, Journal O F*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07876.x>
- Macpherson, A., Zoheir, N., Awang, R. A., Culshaw, S., Ramage, G., Lappin, D. F., & Nile, C. J. (2014). The  $\alpha 7$  nicotinic receptor agonist PHA-543613

- hydrochloride inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced expression of interleukin-8 by oral keratinocytes. *Inflammation Research*, 63(7), 557–568.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-014-0725-5>
- Mahgoub, M., Keun-Hang, S. Y., Sydorenko, V., Ashoor, A., Kabbani, N., Al Kury, L., ... Oz, M. (2013). Effects of cannabidiol on the function of  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 720(1–3), 310–319.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.011>
- Malysz, J., Anderson, D. J., Grønlien, J. H., Ji, J., Bunnelle, W. H., Håkerud, M., ... Gopalakrishnan, M. (2010). In vitro pharmacological characterization of a novel selective  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-107. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334(3), 863–874. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77956239822&partnerID=40&md5=bb23c21fc68380c3f2fb9ecd981abb5a>
- Malysz, John, Grønlien, J. H., Anderson, D. J., Håkerud, M., Thorin-hagene, K., Ween, H., ... Gopalakrishnan, M. (2009). In vitro pharmacological characterization of a novel allosteric modulator of  $\alpha 7$  neuronal acetylcholine receptor, 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744), exhibiting unique pharmacological profile. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(1), 257–267.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.151886>. Neuronal
- Maouche, K., Polette, M., Jolly, T., Medjber, K., Cloëz-Tayarani, I., Changeux, J. P., ... Tournier, J. M. (2009).  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Airway Epithelium Differentiation By Controlling Basal Cell Proliferation. *American Journal of Pathology*, 175(5), 1868–1882.  
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090212>
- Marcus, M. M., Björkholm, C., Malmerfelt, A., Möller, A., Pålsson, N., Konradsson-Geuken, A., ... Svensson, T. H. (2016).  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonists and PAMs as adjunctive treatment in schizophrenia. An experimental study. *European Neuropsychopharmacology*, 26(9), 1401–1411.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.07.004>
- Micoulaud, F. G., Fond, G., Micoulaud-Franchi, J. A., MacGregor, A., Richieri, R.,

- Miot, S., ... Repantis, D. (2015). Neuroenhancement in Healthy Adults, Part I: Pharmaceutical Cognitive Enhancement: A Systematic Review. *Journal of Clinical Research & Bioethics*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9627.1000213>
- Mike, a, Castro, N. G., & Albuquerque, E. X. (2000). Choline and acetylcholine have similar kinetic properties of activation and desensitization on the alpha7 nicotinic receptors in rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 882(1–2), 155–168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11056195>
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nature*, 538(7625), 411–415. <https://doi.org/10.1038/nature19785>
- Moretti, M., Zoli, M., George, A. A., Lukas, R. J., Pistillo, F., Maskos, U., ... Gotti, C. (2014). The Novel  $\alpha 7$  2-Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Is Expressed in Mouse and Human Basal Forebrain: Biochemical and Pharmacological Characterization. *Molecular Pharmacology*, 86(3), 306–317. <https://doi.org/10.1124/mol.114.093377>
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., & Wescott, W. C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194, 979–980. <https://doi.org/10.1038/194979a0>
- Nayak, T. K., Bruhova, I., Chakraborty, S., Gupta, S., Zheng, W., & Auerbach, A. (2014). Functional differences between neurotransmitter binding sites of muscle acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49), 17660–17665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414378111>
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799–802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>
- Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C. H., Zhou, Y., & Lindstrom, J. (2003). Alternate Stoichiometries of  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol*, 63(2), 332–341. <https://doi.org/10.1124/mol.63.2.332>
- Nemecz, Á. (2011). Towards an Understanding of Human  $\alpha$ -7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Selectivity : The Creation and Characterization of a

Soluble Ligand Binding Domain A dissertation submitted in partial satisfaction of the requ. *Dissertation*, 174.

- Newcombe, J., Chatzidaki, A., Sheppard, T. D., Topf, M., & Millar, N. S. (2018). Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulators Revealed by Mutagenesis and a Revised Structural Model. *Molecular Pharmacology*, *93*(2), 128–140. <https://doi.org/10.1124/mol.117.110551>
- Ng, H. J., Whittemore, E. R., Tran, M. B., Hogenkamp, D. J., Broide, R. S., Johnstone, T. B., ... Gee, K. W. (2007). Nootropic  $\alpha 7$  nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(19), 8059–8064. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34249947698&partnerID=40&md5=e3b992b266663be27cbb3416928e8686>
- Nikiforuk, A., Kos, T., Hołuj, M., Potasiewicz, A., & Popik, P. (2015). Positive allosteric modulators of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors reverse ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.034>
- Nikiforuk, A., Potasiewicz, A., Kos, T., & Popik, P. (2016). The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: The synergistic role of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behavioural Brain Research*, *313*, 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.023>
- Obergrussberger, A., Goetze, T. A., Brinkwirth, N., Becker, N., Friis, S., Rapedius, M., ... Fertig, N. (2018). An update on the advancing high-throughput screening techniques for patch clamp-based ion channel screens: Implications for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *13*(3), 269–277. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1428555>
- Ortells, M., & Lunt, G. G. (1995). *history of the ligand-gated superfamily of receptors*. 121–127.
- Pałczyn, M. M., Jindrichova, M., Gibb, A. J., Millar, N. S., Pałczyńska, M. M., Jindrichova, M., ... Millar, N. S. (2012). Activation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors by orthosteric and allosteric agonists: influence on single-channel kinetics and

- conductance. *Molecular Pharmacology*, 82(5), 910–917.  
<https://doi.org/10.1124/mol.112.080259>
- Papke, R. L. (2006). Estimation of both the potency and efficacy of a 7 nAChR agonists from single-concentration responses. *Elsevier Life Sciences*, 78(24), 2812–2819.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.009>
- Papke, R. L., Chojnacka, K., & Horenstein, N. A. (2014). The Minimal Pharmacophore for Silent Agonism of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(September), 665–680.
- Pepper, C., Tu, H., Morrill, P., Garcia-Rates, S., Fegan, C., Greenfield, S., ... Greenfield, S. (2017). Tumor cell migration is inhibited by a novel therapeutic strategy antagonizing the  $\alpha 7$  receptor. *Oncotarget*, 5(0), 1–11.  
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14545>
- Pereira, E. F. R., Hilmas, C., Santos, M. D., Alkondon, M., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 479–500.  
<https://doi.org/10.1002/neu.10146>
- Perkel, M. (2010). High-throughput Ion Channel Screening: A “Patch”-work Solution. *BioTechniques*, January(48), 25–29. <https://doi.org/doi.10.2144/000113339>
- Pesti, K., Szabo, A. K., Mike, A., & Vizi, E. S. (2014). Kinetic properties and open probability of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 81, 101–115.
- Potasiewicz, A., Kos, T., Ravazzini, F., Puia, G., Arias, H. R., Popik, P., & Nikiforuk, A. (2015). Pro-cognitive activity in rats of 3-furan-2-yl-N-p-tolyl-acrylamide, a positive allosteric modulator of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *British Journal of Pharmacology*, 172(21), 5123–5135. <https://doi.org/10.1111/bph.13277>
- Prickaerts, J., van Goethem, N. P., Chesworth, R., Shapiro, G., Boess, F. G., Methfessel, C., ... König, G. (2012). EVP-6124, a novel and selective  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 62(2), 1099–1110.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.024>

- Quadri, M., Bagdas, D., Toma, W., Stokes, C., Horenstein, N. A., Damaj, M. I., & Papke, R. L. (2018). The antinociceptive and anti-inflammatory properties of the  $\alpha 7$ nAChR weak partial agonist p-CF3 N,N-diethyl-N9-phenylpiperazine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *367*(2), 203–214. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.249904>
- Quadri, M., Garai, S., Thakur, G. A., Stokes, C., Gulsevin, A., Horenstein, N. A., & Papke, R. L. (2019). Macroscopic and Microscopic Activation of  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors by the Structurally Unrelated Allosteric Agonist-Positive Allosteric Modulators (ago-PAMs) B-973B and GAT107. *Molecular Pharmacology*, *95*(1), 43–61. <https://doi.org/10.1124/mol.118.113340>
- Rang, H. P. (2006). The receptor concept: Pharmacology's big idea. *British Journal of Pharmacology*, *147*(SUPPL. 1), 9–16. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706457>
- Razani-Boroujerdi, S., Boyd, R. T., Dávila-García, M. I., Nandi, J. S., Mishra, N. C., Singh, S. P., ... Sopori, M. L. (2007). T Cells Express  $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits That Require a Functional TCR and Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase for Nicotine-Induced Ca<sup>2+</sup> Response. *The Journal of Immunology*, *179*(5), 2889–2898. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2889>
- Rizzetto, R., Agus, V., Pizzi, S., Rolland, J.-F., Scarabottolo, L., Renhelt, S., ... Fertig, N. (2018). Optogenetic Technologies Enable High Throughput Ion Channel Drug Discovery and Toxicity Screening. *Biophysical Journal*, *114*(3), 489a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.2681>
- Rudolph, U., & Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nature Reviews Drug Discovery*, *10*(9), 685–697. <https://doi.org/10.1038/nrd3502>. Beyond
- Ryoko M. Krause, Bruno Buisson, Sonia Bertrand, Pierre-Jean Corringer, Jean-Luc Galzi, 1 Jean-Pierre Changeaux, and D. B. (1998). Ivermectin : A Positive Allosteric Effector of the alpha 7 Neuronal. *Mol Pharmacol*, *294*(53), 283–294.
- Sachs, F. (1999). Practical limits on the maximal speed of solution exchange for patch clamp experiments. *Biophysical Journal*, *77*(2), 682–690.

[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76923-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76923-7)

Sadek, B., Khanian, S. S., Ashoor, A., Prytkova, T., Ghattas, M. A., Atatreh, N., ... Oz, M. (2015). Effects of antihistamines on the function of human  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 746, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.046>

Sahdeo, S., Wallace, T., Hirakawa, R., Knoflach, F., Bertrand, D., Maag, H., ... Button, D. C. (2014). Characterization of RO5126946, a novel  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-positive allosteric modulator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(2), 455–468. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.210963>

Samochocki, M., Höffle, A., Fehrenbacher, A., Jostock, R., Ludwig, J., Christner, C., ... Maelicke, A. (2003). Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 1024–1036. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.045773>

Schuller, H. M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 195–205. <https://doi.org/10.1038/nrc2590>

Schwiening, C. J. (2012). A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 11), 2571–2575. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230458>

Sharma, G., & Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *PNAS*, 98(7), 4148–4153. <https://doi.org/10.1073/pnas.071540198>

Shimazaki, T., Kaku, A., & Chaki, S. (2010). d-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology*, 209(3), 263–270. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1794-y>

Shytle, R. D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., ... Tan, J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 337–343. <https://doi.org/10.1046/j.1471->

4159.2004.02347.x

- Sieghart, W. (2015). Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 72).  
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.002>
- Sitzia, F., Brown, J. T., Randall, A. D., & Dunlop, J. (2011). Voltage- and temperature-dependent allosteric modulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptors by PNU120596. *Frontiers in Pharmacology*, 2 DEC(December), 81.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00081>
- Skok, M. V. (2009). Editorial: To channel or not to channel? Functioning of nicotinic acetylcholine receptors in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 1–3.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0209106>
- Sofi, A., & Barrantes, F. J. (2014). *Targeting Brain  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer ' s Disease : Rationale and Current Status*.  
<https://doi.org/10.1007/s40263-014-0201-3>
- Spencer, J. P., Middleton, L. J., & Davies, C. H. (2010). Investigation into the efficacy of the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, and novel procognitive agents to induce gamma oscillations in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 59(6), 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.06.005>
- Spurny, R., Debaveye, S., Farinha, A., Veys, K., Vos, A. M., Gossas, T., ... Ulens, C. (2015). Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), E2543–E2552.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1418289112>
- Sun, L. lan, Yang, T. yi, Wei, N. ning, Lu, W., Jiao, W. xuan, Zhou, Q. qi, ... Wang, K. W. (2019). Pharmacological characterization of JWX-A0108 as a novel type I positive allosteric modulator of  $\alpha 7$ nAChR that can reverse acoustic gating deficits in a mouse prepulse inhibition model. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(6), 737–745. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0163-y>
- Sydserrff, S., Sutton, E. J., Song, D., Quirk, M. C., Maciag, C., Li, C., ... Smith, J. S. (2009). Selective  $\alpha 7$  nicotinic receptor activation by AZD0328 enhances cortical



- dopamine release and improves learning and attentional processes. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 880–888.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.005>
- Szabo, A. K., Pesti, K., Mike, A., & Vizi, E. S. (2014). Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 81, 42–54.
- Szabó Anett, & Mike Árpád. (2016). *Az affinitás és akcesszibilitás szerepe az ioncsatornákon ható gyógyszerek hatásmechanizmusában*. Semmelweis Egyetem.
- Takata, K., Amamiya, T., Mizoguchi, H., Kawanishi, S., Kuroda, E., Kitamura, R., ... Ashihara, E. (2018).  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBA (GTS-21) attenuates A $\beta$  accumulation through suppression of neuronal  $\gamma$ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model. *Neurobiology of Aging*, 62, 197–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021>
- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., & Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), 733–750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>
- Targowska-duda, K. M., Kaczor, A. A., Jozwiak, K., & Arias, H. R. (2018). Molecular interactions of type I and type II positive allosteric modulators with the human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor : an in silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1102, 1–29.  
<https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1427634>
- Thakur, G. A., Kulkarni, A. R., Deschamps, J. R., & Papke, R. L. (2013). Expedient Synthesis, Enantiomeric Resolution, and Enantiomer Functional Characterization of (4-(4-Bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-sulfonamide (4BP-TQS): An Allosteric Agonist-Positive Allosteric Modulator of  $\alpha 7$  Nicotinic A. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(21), 8943–8947.  
<https://doi.org/10.1021/jm401267t>
- Thomsen, M S, El-Sayed, M., & Mikkelsen, J. D. (2011). Differential immediate and sustained memory enhancing effects of  $\alpha 7$  nicotinic receptor agonists and

- allosteric modulators in rats. *PLoS ONE*, 6(11). Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80655141560&partnerID=40&md5=680c8e24a181449409dc8ebc4bf5f8d4>
- Thomsen, Morten Skøtt, Zwart, R., Ursu, D., Jensen, M. M., Pinborg, L. H., Gilmour, G., ... Mikkelsen, J. D. (2015). A7 and B2 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Form Heteromeric Receptor Complexes That Are Expressed in the Human Cortex and Display Distinct Pharmacological Properties. *PLoS ONE*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130572>
- Timmermann, D B, Grønlien, J. H., Kohlhaas, K. L., Nielsen, E. Ø., Dam, E., Jørgensen, T. D., ... Olsen, G. M. (2007). An allosteric modulator of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 294–307. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34548689531&partnerID=40&md5=be77539eda143f23136b4133b673af52>
- Timmermann, Daniel B, Grønlien, J. H., Kohlhaas, K. L., Nielsen, E. Ø., Dam, E., Jørgensen, T. D., ... Olsen, G. M. (2009). An Allosteric Modulator of the  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Possessing Cognition-Enhancing Properties in Vivo. 294–307. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.120436.vidual>
- Trexler, E. B., & Verselis, V. K. (n.d.). The Study of Connexin Hemichannels (Connexons) in *Xenopus* Oocytes. *Methods in Molecular Biology*, 154(6), 341–355. <https://doi.org/10.1109/ICEBE.2005.21>
- Tsai, G., Yang, P., Chung, L. C., Lange, N., & Coyle, J. T. (1998). D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 44(11), 1081–1089. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836012>
- Uteshev, V. V. (2014). The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *European Journal of Pharmacology*, 727(1), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.072>
- Van Maanen, M. A., Papke, R. L., Koopman, F. A., Koepke, J., Bevaart, L., Clark, R., ... Vervoordeldonk, M. J. (2015). Two novel  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ligands: In vitro properties and their efficacy in collagen-induced arthritis in mice.

- PLoS ONE*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116227>
- Vasilyev, D. V, Merrill, T. L., & Bowlby, M. R. (2005). Using “ Inside-Out ” Whole-Cell Membranes. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(8), 806–813. <https://doi.org/10.1177/1087057105279481>
- Vasyl Bondarenko, David D. Mowrey, Tommy S. Tillman, Edom Seyoum, Yan Xu, and P. T. (2014). NMR structures of the human  $\alpha 7$ nAChR transmembrane domain and associated anesthetic binding sites. *Biochim Biophys Acta*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Vázquez-Gómez, E., Arias, H. R., Feuerbach, D., Miranda-Morales, M., Mihailescu, S., Targowska-Duda, K. M., ... García-Colunga, J. (2014). Bupropion-induced inhibition of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors expressed in heterologous cells and neurons from dorsal raphe nucleus and hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 740, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.059>
- Verma, S., Kumar, A., Tripathi, T., & Kumar, A. (2018). Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer’s disease therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(8), 985–993. <https://doi.org/10.1111/jphp.12919>
- Wallace, T. L., Ballard, T. M., Pouzet, B., Riedel, W. J., & Wettstein, J. G. (2011). Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(2), 130–145. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.03.022>
- Wallace, T. L., & Porter, R. H. P. (2011). Targeting the nicotinic  $\alpha 7$  acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.034>
- Wang, J., Horenstein, N. A., Stokes, C., & Papke, R. L. (2010). Tethered Agonist Analogs as Site-Specific Probes for Domains of the Human  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor that Differentially Regulate Activation and Desensitization. *Molecular Pharmacology*, 78(6), 1012–1025. <https://doi.org/10.1124/mol.110.066662>.neuroprotection
- Wang, X. J., Liu, Y. F., Wang, Q. Y., Tsuruoka, M., Ohta, K., Wu, S. X., ... Inoue, T.

- (2010). Functional expression of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. *Cell and Tissue Research*, 340(2), 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0949-9>
- Weed, M. R., Polino, J., Signor, L., Bookbinder, M., Keavy, D., Benitex, Y., ... Bristow, L. J. (2017). Nicotinic alpha 7 receptor agonists EVP-6124 and BMS-933043, attenuate scopolamine-induced deficits in visuo-spatial paired associates learning. 1–21.
- Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154(8), 1558–1571. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- Williams, D. K., Peng, C., Kimbrell, M. R., & Papke, R. L. (2012). Intrinsically low open probability of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors can be overcome by positive allosteric modulation and serum factors leading to the generation of excitotoxic currents at physiological temperatures. *Molecular Pharmacology*, 82(4), 746–759. <https://doi.org/10.1124/mol.112.080317>
- Williams, D. K., Stokes, C., Horenstein, N. a, & Papke, R. L. (2011). The effective opening of nicotinic acetylcholine receptors with single agonist binding sites. *The Journal of General Physiology*, 137(4), 369–384. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010587>
- Williams, D. K., Wang, J., Papke, R. L., Donnelly-Roberts, D., Bertrand, D., Gopalakrishnan, M., ... Papke, R. L. (2011). Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 915–930. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.001>
- Wu, J., Liu, Q., Tang, P., Mikkelsen, J. D., Shen, J., Whiteaker, P., & Yakel, J. L. (2016). Heteromeric  $\alpha 7\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(7), 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.005>
- Wu, Z., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2015). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Acta*

- Pharmacologica Sinica*, 36(8), 895–907. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.66>
- Xu, J., Wang, X., Ensign, B., Li, M., Wu, L., Guia, A., & Xu, J. (2001). Ion-channel assay technologies: Quo vadis? *Drug Discovery Today*, 6(24), 1278–1287. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02095-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02095-5)
- Y. Kabakov, Ph.D. and R.L. Papke, P. D. (1997). Ultra Fast Solution Applications for Prolonged Gap-free Recordings: Controlling a Burleigh Piezo-Electric Positioner with Clampex 7. *Axobits*, 20(February), 7–10.
- Yakel, J. L. (2015). Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflugers Arch*, 85(0 1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The
- Yang, S., Zhang, R., Wang, G., & Zhang, Y. (2017). The development prospect of HDAC inhibitors as a potential therapeutic direction in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0089-1>
- Yang, T., Xiao, T., Sun, Q., & Wang, K. (2017). The current agonists and positive allosteric modulators of  $\alpha 7$ nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(6), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.001>
- Young, G. T., Zwart, R., Walker, A. S., Sher, E., & Millar, N. S. (2008). Potentiation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14686–14691. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804372105>
- Yu, H. B., Li, M., Wang, W. P., & Wang, X. L. (2016). High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), 34–43. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108>
- Zhang, C., Yu, P., Zhu, L., Zhao, Q., Lu, X., & Bo, S. (2017). Blockade of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors inhibit nicotine-induced tumor growth and vimentin expression in non-small cell lung cancer through MEK/ERK signaling way. *Oncology Reports*, 38(6), 3309–3318. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6014>
- Zhao, L., Kuo, Y. P., George, A. A., Peng, J. H., Purandare, M. S., Schroeder, K. M., ...

- Wu, J. (2003). Functional properties of homomeric, human  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in the SH-EP1 human epithelial cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *305*(3), 1132–1141. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.048777>
- Zhou, D., Zhang, M., Ye, X., Gu, C., Piser, T. M., Lanoue, B. A., ... Grimm, S. W. (2011). In vitro metabolism of  $\alpha 7$  neuronal nicotinic receptor agonist AZD0328 and enzyme identification for its N-oxide metabolite. *Xenobiotica*, *41*(3), 232–242. <https://doi.org/10.3109/00498254.2010.536855>
- Zoli, M., Pistillo, F., & Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, *96*(PB), 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Neuropharmacology*, *16*(4), 338–349. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>
- Zwart, R., Filippi, G. De, Broad, L. M., Mcphie, G. I., Pearson, K. H., Baldwinson, T., & Sher, E. (2002). Responses and Enhances Acetylcholine-Induced Glutamate Release in Cerebellar Slices. *Cns Drug Reviews*, *43*, 374–384.

## 10 Saját publikációk jegyzéke

### A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:

Type I-like behavior of the type II  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator A-867744

Pesti K, Lukács P., Mike Á.

PeerJ. 2019 jul doi:10.7717/peerj.7542 Epub 2019 sept 2.

Kinetic properties and open probability of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors.

Pesti K, Szabo AK, Mike A, Vizi ES.

Neuropharmacology. 2014 Jun;81:101-15. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.034. Epub 2014 Jan 31.

Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors.

Szabo AK, Pesti K, Mike A, Vizi ES.

Neuropharmacology. 2014 Jun;81:42-54. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.033. Epub 2014 Jan 31.

### A dolgozat témájához nem kapcsolódó publikációk:

Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells.

Chandrasekaran A, Avci HX, Ochalek A, Rösingh LN, Molnár K, László L, Bellák T, Téglási A, Pesti K, Mike A, Phanthong P, Bíró O, Hall V, Kitiyanant N, Krause KH, Kobolák J, Dinnyés A.

Stem Cell Res. 2017 Dec;25:139-151. doi: 10.1016/j.scr.2017.10.010. Epub 2017 Oct 14.

Different pH-sensitivity patterns of 30 sodium channel inhibitors suggest chemically different pools along the access pathway.

Lazar A, Lenkey N, Pesti K, Fodor L, Mike A.

Front Pharmacol. 2015 Sep 25;6:210. doi: 10.3389/fphar.2015.00210. eCollection 2015.

## 11 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenkinek, akik lehetővé tették számomra, hogy ez a munka megszülethessen. Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenekelőtt témavezetőmnek dr. Mike Árpádnak, aki az elmúlt évek során tudományos pályámat egyengette. Szigorú szakmai elvárásait követve rengeteget tanulhattam tőle. Szaktudását, elhivatottságát nagyra becsülöm. Köszönettel tartozom neki doktori értekezésem javításáért valamint a tudományos publikációk elkészítésében nyújtott segítségével. Köszönöm professzor Vizi E. Szilveszternek doktori tanulmányaim első éveiben nyújtott támogatását. Köszönöm Lukács Péternek az e-Orr kutatóműhely projektvezetőjének, hogy lehetőséget biztosított dolgozatom befejezéséhez, előteremtette kutatásaim szakmai és anyagi feltételeit. Köszönöm a házi védelem kapcsán az opponensi véleményében megfogalmazott észrevételeit, kritikus gondolkodása, objektív szemlélete a dolgozat hasznára vált. Köszönöm dr. Fodor Lászlónak, hogy alaposan elolvasta és véleményezte a tézisemet, köszönöm a házi védelem során elhangzott megjegyzéseit, az előadással kapcsolatos hasznos tanácsait. Köszönettel tartozom továbbá a kutatócsoport valamennyi egykori és jelenlegi munkatársának: köszönöm nekik a sok éven át tartó közös munkát, a jó hangulatot és a motiváló légkört. Köszönöm Lenkey Nórának, a szakmai és baráti tanácsokat, a felejthetetlen KOKI-s éveket, valamint a „kitapostott ösvényt” amelyen könnyebben járhattam.

Hálás köszönet illeti szerető családomat, akik támogató környezetet biztosítottak és a kezdettől fogva figyelemmel kísérték természettudományok iránti lelkesedésemet. Köszönettel tartozom testvéremnek, barátaimnak a türelemért és a támogatásért, különösen Forgács-Dajka Emesének és Láng Orsolyának a lelki támaszáért, Szabó Laurának és Novák Zsoltnak az éles kritikákért és a rengeteg tanácsért, amellyel elhalmoztak az évek során.

GINOP pályázat (GINOP-2.3.2-15-2016-00051)

Nemzeti Agykutatási Program (KTIA-NAP-13-2-2014-002).



## 12 Függelék

<b>M1mAChR Ortoszterikus agonisták</b>	<b>Hatás</b>	<b>Mellékhatás</b>
<i>Xanomeline</i>	kognitív és pszichotikus tünetek csökkentek	hányinger, hasmenés ezért fázis II-ben leállították
<i>Talsaclidine</i>	amiloid szint csökkenés	nyáladás, izzadás
<i>AF102B</i>	visszafordította a kognitív hanyatlást	gasztrointesztinális tünetek, erőtlenség, izzadás leállították
<i>AF267B</i>	visszafordította a kognitív hanyatlást, csökkenő amiloid szintézis egerekben	klinikai kísérletekben nem működött, leállították
<i>WAY-132983</i>	állatkísérletekben kognitív funkciók javultak	leállították

<b>M1 mAChR Alloszterikus modulátorok</b>	<b>Hatás</b>	<b>Mellékhatás</b>
<i>Brucine</i>	első lepublikált M1 PAM	túl magas dózis a hatás érvényesüléséhez
<i>VU0029767</i>	növeli az Ach M1-hez való affinitását	nincs jelentett mellékhatás
<i>VU0090157</i>	növeli az Ach M1-hez való affinitását	nincs jelentett mellékhatás
<i>BQCA</i>	AD-s modell állatokban tanulási folyamatokat serkenti	nincs jelentett mellékhatás

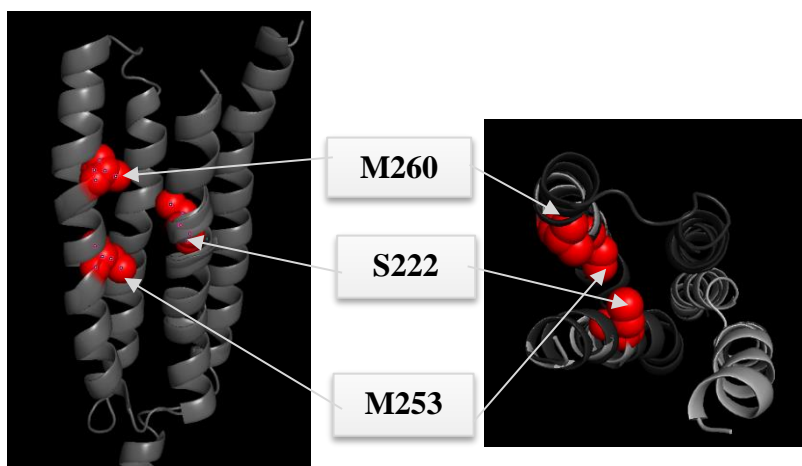
<b>M1mAChR Alloszterikus agonisták</b>	<b>Hatás</b>	<b>Mellékhatás</b>
<i>AC-42</i>	első szelektív M1 alloszterikus agonista sejtenyészeten vizsgálták	agyszeleten nem működött
<i>TBPB</i>	erősen M1 szelektív, amiloid szintézis csökkentő és antipszichotikus hatás	más G-proteinkapcsolt receptor alloszterikus kötőhelyein is köt
<i>77-LH-28-1</i>	erősen M1 szelektív, hatékony, kognitív folyamatokat serkenti	nincs jelentett mellékhatás
<i>AC-260584</i>	orálisan hasznosuló, kevező antipszichotikus- és kognitív serkentő hatás	nem M1 szelektív
<i>VU0184670</i>	erősen M1 szelektív, NMDAR serkentő, kiváló farmakokinetikai profil	nincs jelentett mellékhatás
<i>VU0357017</i>	erősen M1 szelektív, mAChR skopolamin idukált kognitív zavart visszafordította, kiváló farmakokinetikai profil	nincs jelentett mellékhatás

A PAM kötésben résztvevő aminosav oldalláncok összefoglaló táblázata:

Szerző	Év		<i>ECD</i>	<i>PRE MI</i>	<i>TM1</i>	<i>TM2</i>	<i>M2-M3 loop</i>	<i>TM3</i>	<i>TM4</i>
Newcombe, J.	2018	A-867744	W54			S222	L247T		
Newcombe, J.	2018	A-867744					M253L		
Newcombe, J.	2018	A-867744					M260L		
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	F33	L213	I217	T251	P269	F275	F456
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	L56	N214	P218	P253	A272	S277	T457
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	M58		L221	L255		T278	C460
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	I90		L215	M254		I281	T461
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	L91		L216	L256			I464
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	S95		C219	V257			L465
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	E98		V220	A258			
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	R99		S223	A263			
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	F100			T264			
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	A102						
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	P120						
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	G122						
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	F124						
Targowska-duda, K M	2018	PNU-120596	F146						
Collins, T	2011	NS & PNU				S222	M260		
Collins, T	2011	NS & PNU				A225	M253		
Collins, T	2011	NS & PNU					F455		
Collins, T	2011	NS & PNU					C459		
Collins, T	2011	NS & PNU							
Bertrand, D	2008	NS & PNU					X		
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	L56	L209	L216	V257	I271	F275	A468
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	K87	Y210	C219	A258	Y274	T278	I464
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	I90	Y211	V220	E259	S267	A276	F471
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	L91	L213	L215	I260	V268	M279	
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	S95	N214	I217	M261	P269	I280	
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	E98		P218	A263	A272		
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	R99		L221	L247			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	A102		I222	L248			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	T103		L225	S249			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	P120			L250			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	P121			V252			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	I123			T251			
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	F124						
Targowska-duda, K M	2018	NS-1738	K125						
Marotta CB,	2015	PNU-120596			C241	F275		M301	
Marotta CB,	2015	PNU-120596			S245	M276			F478

Marotta CB,	2015	PNU-120596			A248				C482
Marotta CB,	2015	PNU-120596							
Young, G T	2008	PNU-120596			S222	M253			C459
Young, G T	2008	PNU-120596			A225				
Young, G T	2008	PNU-120596							
Collins, T	2011	PNU-120596			G211	M253		Q272	F455
Collins, T	2011	PNU-120596			S222	M260		S276	T456
Collins, T	2011	PNU-120596			A225				C459
Collins, T	2011	PNU-120596			L230				

A táblázatban zölddel az NS-1738 és A867744, pirossal az NS-1738 és PNU120596, sárgával pedig az irodalom szerint mindhárom anyag kötésében résztvevő aminosav oldalláncokat jelöltük. Az alábbi ábra a TM doméneken lévő 3 aminosav oldalláncokat ábrázolja (PDB: 2MAW). A bal oldali az oldal nézetet, a jobb oldali felülnézetet mutatja.



Az  $\alpha 7$  nikotinos acetilkolin receptor agonisták összefoglaló táblázata:

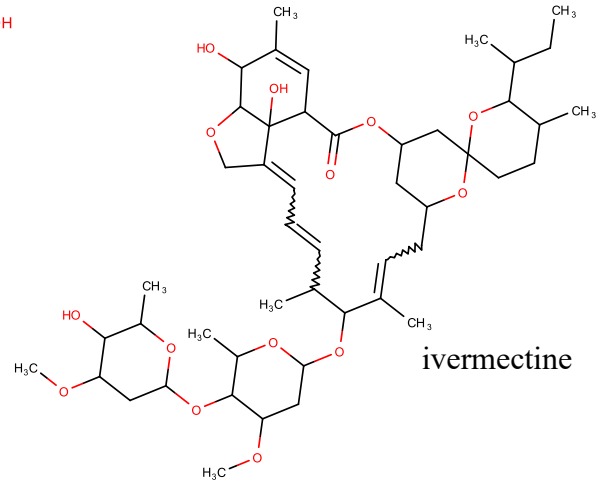
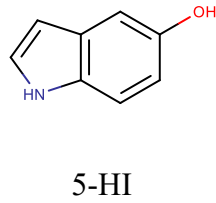
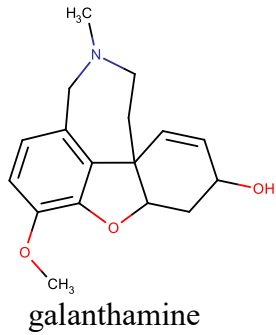
<b><math>\alpha 7</math>nAChR agonisták</b>					
<b>Hatóanyag</b>	<b>Besorolás</b>	<b>Hatékonyság</b>	<b>Állatmodell</b>	<b>Terápiás indikáció</b>	<b>Klinikai státusz</b>
<b>Tropisteron</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 6.9 nmol/L ( $\alpha 7$ ) Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 $\frac{1}{4}$ 0.6 $\mu$ mol/L; Emax $\frac{1}{4}$ 25% $\alpha 7$	egér: PCP-indukált kognitív zavar. Fiatal, idős patkány: naloxon-indukált térbeli tájékozódással kapcsolatos kognitív teszt	Fájdalom, Dohányzás, Skizofrénia	Fázis IV (2009 Egyetemi Kórház, Clermont-Ferrand)
<b>GTS-21/DMXB-A</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 2000 nmol/L $\alpha 7$ -on Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50=11.0 $\mu$ mol/L; Emax= 9% $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 5.2 $\mu$ mol/L; Emax: 32%	patkány: egészséges vagy izoflurán-indukált kognitív zavar idős patkányokban; iboténsav-indukált demencia; mecamlamine- okozta tanulási zavar; auditoros jelfeldolgozás vizsgálata izolációs stressznek alávetett állatokon; apomorfín-, MK-801 indukált szenzoros jelfeldolgozási, és -továbbítási hiba (PPI teszt)	Skizofrénia	Fázis III (2011)
<b>ABT-126</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki:12–14 nmol/L (in $\alpha 7$ , $\alpha 7$ és $\alpha 7$ )	Parkinsonos majmok	AD, ADHD, Dohányzás	Fázis II (2015)
<b>AZD0328</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás:3.0 nmol/L, $\alpha 7$ Ki 4.7 nmol/L Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitákban: EC50= 338 nmol/L; Emax = 64.7% $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 150 nmol/L; Emax=61%	majom: térbeli tájékozódással kapcsolatos kognitív tesztek, egér: tárgyfelismerés kísérletek	AD, Skizofrénia	Fázis II (2008 AstraZeneca)
<b>BMS-933043</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 8.1 és 3.3 nmol/L ( $\alpha 7$ és $\alpha 7$ ) Ca2 mérés: $\alpha 7$ HEK293 sejt vonal: EC50 = 23.4 nmol/L Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$  $\alpha 7$ oocitában: EC50 =0.29 $\mu$ mol/L; Emax =24% $\alpha 7$ in oocita: EC50 0.14 nmol/L; Emax: 27%	patkány: MK-801-indukált kognitív hiány; S( $\beta$ )ketamin-indukált információfeldolgozási- és továbbítási problémák	Skizofrénia	Fázis I (2013 Bristol-Myers)
<b>EVP-6124</b>	Parciális agonista	kötési affinitás: Ki: 9.98 nmol/L ( $\alpha 7$ ) Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50= 0.39 $\mu$ mol/L; Emax=42%	patkány: szkopolamin-indukált kognitív zavar; késleltetés függő felejtés tárgyfelismerés kísérletekben	AD, demencia, Skizofrénia, nikotin függőség, kognitív zavarok, dohányzás	Fázis III (2017 FORUM)
				AD	Fázis III (2016 FORUM)
				Skizofrénia	Fázis II (2015) (A.

Az  $\alpha 7$  nikotinos acetilkolin receptorra ható anyagok összefoglaló táblázata:

<b><math>\alpha 7</math>nAChR agonisták és PAM-ok</b>					
<b>Hatóanyag</b>	<b>Besorolás</b>	<b>Hatékonyság</b>	<b>Állatmodell</b>	<b>Terápiás indikáció</b>	<b>Klinikai státusz</b>
<b>MEM3454/ RG3487</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 6 nmol/L ( $\alpha 7$ ) Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 0.8 $\mu$ mol/L; Emax=63% $\alpha 7$ in QM sejtvonalon: EC50 Ki: 7.7 $\mu$ mol/L; Emax = 69%	egészséges patkány: figyelem, idős patkány; apomorfin-indukált szenzoros jelfeldolgozási hiányok	AD, Skizofénia	Fázis II (2007 Memory)
<b>AQW051</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 27 nmol/L (in $\alpha 7$ ) Ca <sup>2+</sup> flux mérések: $\alpha 7$ : EC50 = 7.4 $\mu$ mol/L, Emax=73%, Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 7.5 $\mu$ mol/L; Emax=75%	idős patkányokban; egereken tárgyfelismerés tesztekben (NOR), Parkinsonos majmokban	Skizofréria, Parkinson	Fázis II (2013 Novartis), Fázis II (2009 Novartis)
<b>TC-5619</b>	Teljes értékű agonista	Kötési affinitás: Ki: 1-1.4 nmol/L (in $\alpha 7$ , $\alpha 7$ ) Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitákban: EC50 = 33 nmol/L; Emax = 100% $\alpha 7$ in GH4C1 cell line: EC50 = 17 nmol/L;	mutáns egereken apomorfin indukált szenzoros jelfeldolgozási, és - továbbítási hiba (PPI teszt), egereken tárgyfelismerés tesztek (NOR)	Skizofréria, AD, ADHD	Fázis II (2013 Targacept), Fázis II (2012 Targacept), Fázis II (2011 Targacept)
<b>SSR-180711</b>	Parciális agonista	Kötési affinitás: Ki: 14 and 22 nmol/L ( $\alpha 7$ , $\alpha 7$ ) Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 4.4 $\mu$ mol/L; Emax=51% $\alpha 7$ GH4C1: EC50= 0.9 $\mu$ mol/L;	patkány: MK-801/PCP- indukált kognitív zavar, depresszió- és skizofréria modellben, egér: krónikus stressz modell; $\alpha 7$ -indukált memória zavarok; PCP-indukált kognitív zavarok; úszás kényszerítés és farkok felfüggesztéses kísérletekben	Skizofénia	Fázis II (2008 Sanofi)
<b>APN1125</b>	Parciális agonista	Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 1.16 $\mu$ mol/L; Emax=41%	patkány: tárgyfelismerés tesztek normál állapotban(NOR)	AD, Skizofréria	Fázis I-II (2016 CoMentis felfüggesztve)
<b>ALV-3288/ XY4083/CCMI</b>	PAM type I	Elektrofiziológiai aktivitás: $\alpha 7$ oocitában: EC50 = 0.7 $\mu$ mol/L; Emax=9-szeres	egér: DBA/2 egérmodell szenzoros jelfeldolgozási hibák MK-801-indukált hiperlokómóció 8 karú pallón normál állapotokban; NOR, patkány: ketamin indukált kognitív zavar	Skizofénia/ skizoaffektív betegség	Fázis I (New York Állami Pszichiátriai Intézet; Colorado Egyetem)

Az alloszerikus modulátorok szerkezeti ábrái:

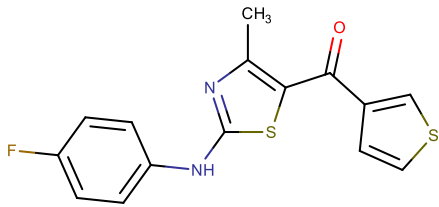
Elsőgenerációs pozitív alloszerikus modulátorok:



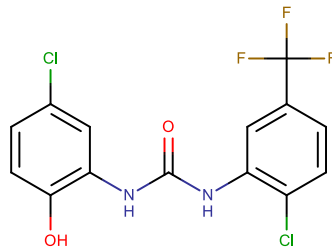
Másodikgenerációs pozitív alloszerikus modulátorok:

I-es típus:

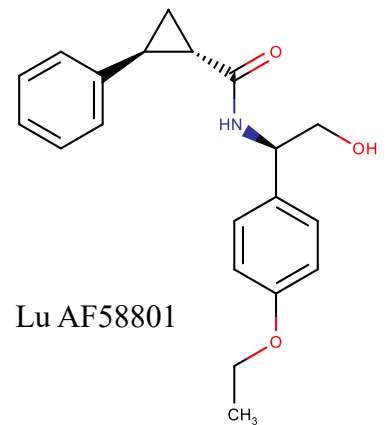
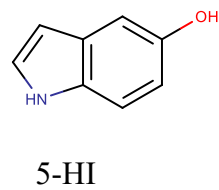
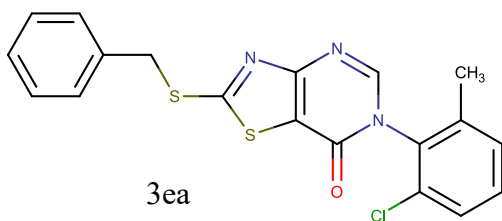
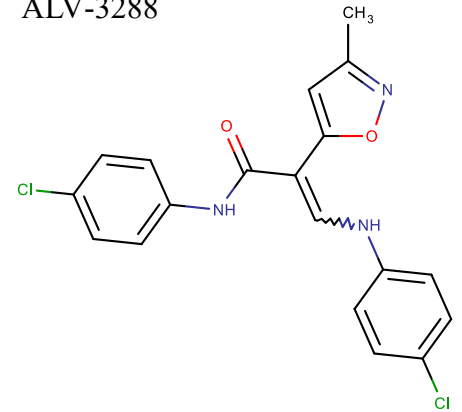
LY-2087101



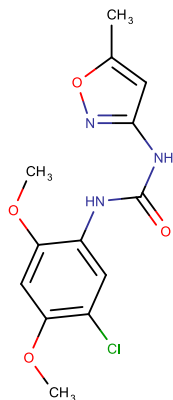
NS1738



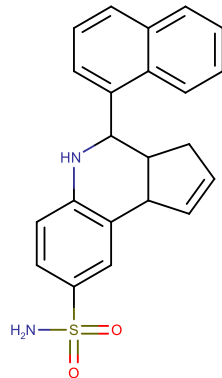
ALV-3288



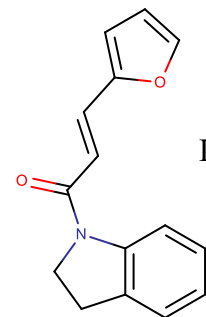
## II típusú pozitív alloszerikus modulátorok:



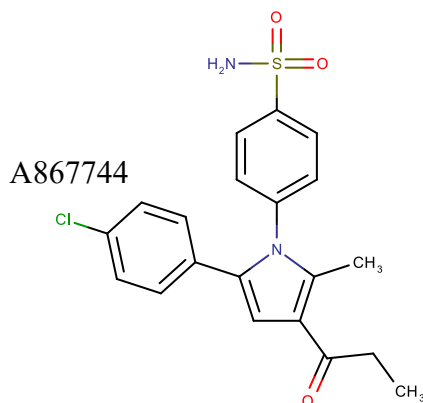
PNU-120596



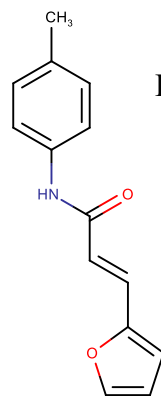
TQS



DM489

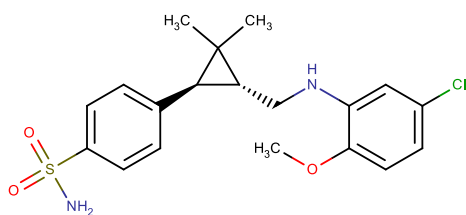


A867744

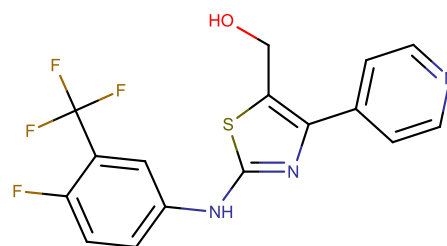


PAM-2

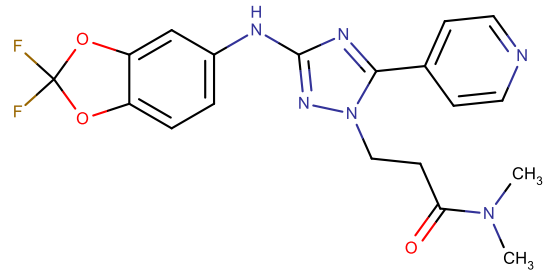
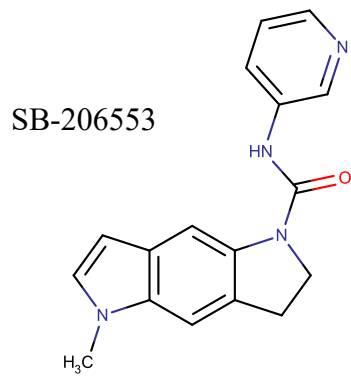
## I-II típus (Intermedier) pozitív alloszerikus modulátorok:



BNC375

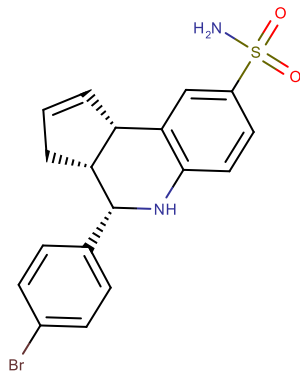


JNJ-1930942

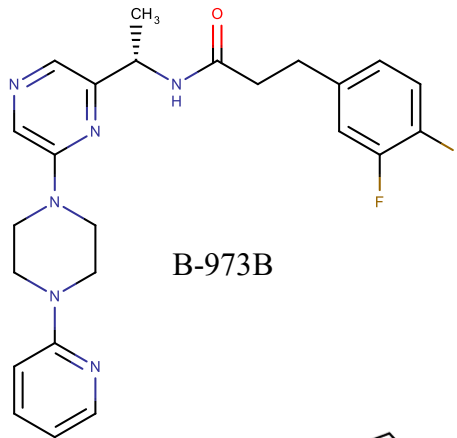


JNJ-39393406;

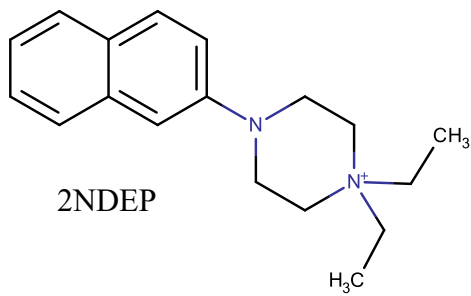
Alloszterikus agonisták (AgoPAM-ok):



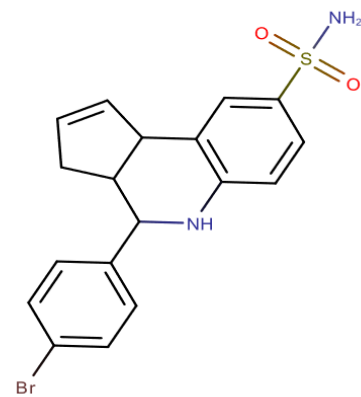
GAT107



B-973B



2NDEP



4BP-TQS



A modulátorokkal végzett kísérletek összefoglaló táblázata:

Pre-app	Co-app	Post-app	Csúcsamplitúdó növekedés	Görbe alatti terület növekedés	Lecsengési állandó változásai
A-867744 $\Delta t$	kolin	-	248 $\pm$ 31% $\tau = 332 \pm 43$ ms	311 $\pm$ 28-szeres $\tau = 303 \pm 50$ ms	92 $\pm$ 19%
A-867744 $\Delta t$	kolin + A-867744	-	263 $\pm$ 41% $\tau = 169 \pm 76$ ms	633 $\pm$ 96-szeres	105 $\pm$ 14%
PNU-120596 $\Delta t$	kolin	-	99 $\pm$ 7%	112 $\pm$ 17-szeres $\tau = 2\,813 \pm 902$ ms	-
PNU-120596 $\Delta t$	kolin + PNU-120596	-	96 $\pm$ 2% (csúcs) 410 $\pm$ 27% (lassú komponens)	2183 $\pm$ 110-szeres	104 $\pm$ 2%
A-867744 $\Delta t$	kolin + PNU-120596	-	268 $\pm$ 33% $\tau = 182 \pm 99$ ms	928 $\pm$ 91-szeres	gyors lecsengés "legyűri" a lassú lecsengést $\tau = 246 \pm 72$ ms
A-867744 $\Delta t$	kolin + 10 $\mu$ M PNU- 120596	-	255 $\pm$ 52%	1820 $\pm$ 1,059-szeres	lassú lecsengés megjelenése $\tau > 5865 \pm 2,398$ ms- időállandóval
10 $\mu$ M PNU-120596 $\Delta t$	kolin + A-867744	-	129 $\pm$ 18%	1076 $\pm$ 438-szeres	lassú komponens minimális, vagy hiányzik
PNU-120596	kolin + PNU-120596 $\Delta t$	-	95 $\pm$ 8% (csúcs) 306 $\pm$ 93% (lassú komponens)	1554 $\pm$ 443-szeres	az együttadás alatti asszociáció $\tau = 97.8 \pm 60.2$ ms
A-867744	kolin + A-867744 $\Delta t$	-	-	-	135 $\pm$ 20%
A-867744	kolin + PNU-120596 $\Delta t$	-	-	-	lassú komponens megjelenése : $\tau = 5304 \pm 1,325$ ms-os időállandóval
PNU-120596	kolin + A-867744 $\Delta t$	-	108 $\pm$ 7% (csúcs) 122 $\pm$ 10% (lassú komponens)	768 $\pm$ 80-szeres	ko-app alatti hatóanyag asszociáció $\tau =$ 47.8 $\pm$ 6.65 ms
-	kolin + PNU-120596	PNU-120596 $\Delta t$	106 $\pm$ 21% (csúcs) 260 $\pm$ 45% (lassú komponens) 293 $\pm$ 74% (2. pulzus lassú komponens)	1195 $\pm$ 206-szoros (1. pulzus) 1366 $\pm$ 230-szoros (2. pulzus)	94 $\pm$ 11%
-	kolin + PNU-120596	A-867744 $\Delta t$	113 $\pm$ 13% (csúcs) 190 $\pm$ 34% (lassú komponens) 481 $\pm$ 102% (2. pulzus, 2,910 ms)	647 $\pm$ 76-szeres (1. pulzus) 1704 $\pm$ 266-szeres (2. pulzus, 2,910 ms)	gyors lecsengés legyűri a lassút $\tau = 456 \pm 155$ ms
-	kolin + A-867744	PNU-120596 $\Delta t$	78 $\pm$ 6% (csúcs) 141 $\pm$ 20% (lassú komponens) 147 $\pm$ 16% (2. pulzus, 2910 ms)	770 $\pm$ 147-szeres (1. pulzus) 922 $\pm$ 162-szeres (2. pulzus, 2910 ms)	99 $\pm$ 1%