

# IDENTYFIKACJA MODULACJI ALLOSTERYCZNEJ W GRUPIE RECEPTORÓW SEROTONINOWYCH GPCR

*Grzegorz Satała, Tomasz Lenda, Beata Duszyńska, Andrzej J. Bojarski*

Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Smętna 12, Kraków



# Plan prezentacji:

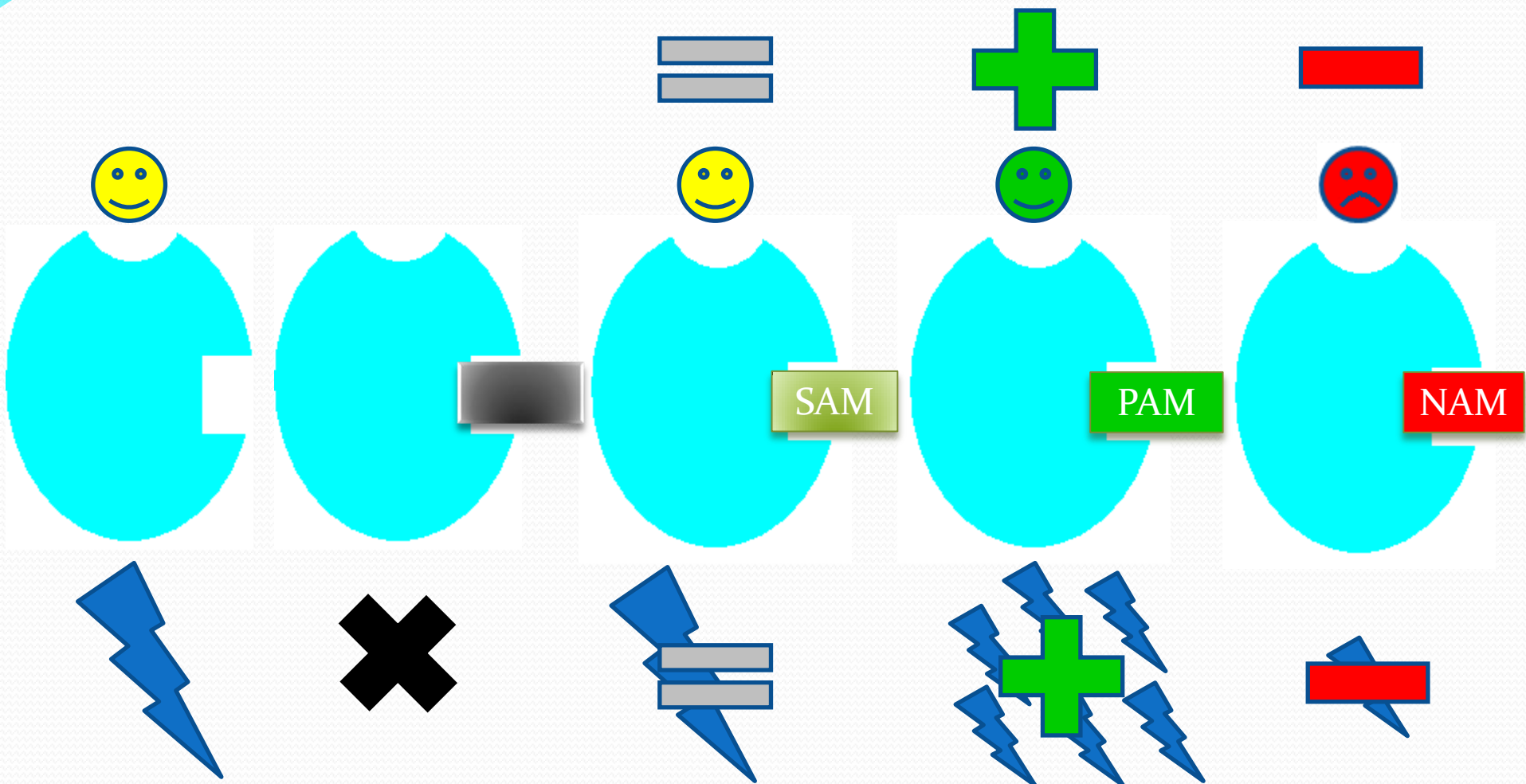
- Cel naukowy
- Podstawy teoretyczne
- Przyjęta metodyka
- Plan eksperymentów
- Wyniki zrealizowanych badań
- Wnioski

# Cel naukowy:

Cynk jest wymieniany wśród endogennych czynników, które poprzez mechanizmy allosteryczne regulują funkcje GPCR, interesującym jest sprawdzenie czy zjawisko opisane dla receptora 5-HT<sub>1A</sub> [1] może być zidentyfikowane także dla innych typów receptorów serotoninowych. W tym celu sposób oddziaływania jonów cynku z receptorem 5-HT<sub>7</sub> badano w porównaniu do efektów obserwowanych dla receptora 5-HT<sub>1A</sub>.

[1] Barrondo S, Sallés J. Allosteric modulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by zinc: Binding studies. *Neuropharmacology*. 2009, 56, 455-62.

# Podstawy teoretyczne



Przesłanki wskazujące na możliwość modulacji allosterycznej w grupie receptorów serotoninowych przez jony cynku

## **Zn<sup>2+</sup> jest modulatorem allosterycznym receptorów: dopaminowych, adrenergicznych i serotoninowych (5-HT<sub>1A</sub>).**

- [1] Barrondo S, Sallés J. Allosteric modulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by zinc: Binding studies. *Neuropharmacology*. 2009, 56, 455-62.
- [2] Ciolek J, Maïga A, Marcon E, Servent D, Gilles N. Pharmacological characterization of zinc and copper interaction with the human alpha(1A)-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol*. 2011, 655, 1-8.
- [3] Swaminath G, Lee TW, Kobilka B. Identification of an allosteric binding site for Zn<sup>2+</sup> on the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2003, 278, 352-6.
- [4] Swaminath G, Steenhuis J, Kobilka B, Lee TW. Allosteric modulation of beta2-adrenergic receptor by Zn(2+). *Mol Pharmacol*. 2002, 61, 65-72.
- [5] Schetz JA, Sibley DR. Zinc allosterically modulates antagonist binding to cloned D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors. *J Neurochem*. 1997, 68, 1990-7.
- [6] Liu Y, Teeter MM, DuRand CJ, Neve KA. Identification of a Zn<sup>2+</sup>-binding site on the dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 339, 873-9.
- [7] Schetz JA, Sibley DR. The binding-site crevice of the D<sub>4</sub> dopamine receptor is coupled to three distinct sites of allosteric modulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 296, 359-63.

## **Dla receptorów serotoninowych typu 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>7</sub> znane są przykłady modulacji allosterycznej.**

- [1] Hedlund PB, Carson MJ, Sutcliffe JG, Thomas EA. Allosteric regulation by oleamide of the binding properties of 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptors. *Biochem Pharmacol*. 1999, 58, 1807-13.
- [2] Thomas EA, Carson MJ, Neal MJ, Sutcliffe JG. Unique allosteric regulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signal transduction by oleamide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94, 14115-9,

# Przyjęta metodyka

1. Badanie wpływu  $\text{Zn}^{2+}$  na wiązanie specyficznych radioligandów do danego typu receptora.

Receptor	Agonista	Antagonista
5-HT <sub>7</sub>	[ <sup>3</sup> H]5-CT	[ <sup>3</sup> H]SB-269970
5-HT <sub>1A</sub>	[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT	[ <sup>3</sup> H]WAY-100635

Równanie 1

$$DR - 1 = \frac{[A](1 - \alpha)}{\alpha[A] + K_A}$$

gdzie: DR – „affinity shift”; [A] – stężenie modulatora;  
K<sub>A</sub> – stała powinowactwa modulatora; α – współczynnik kooperatywności [α>1 PAM ; α<1 NAM ]

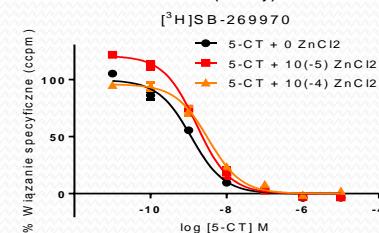
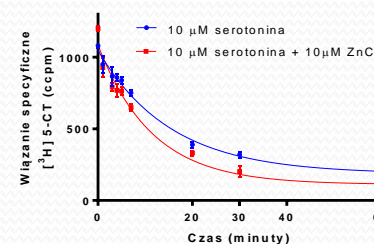
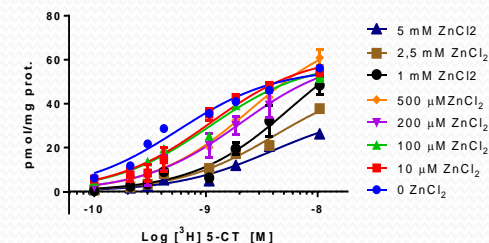
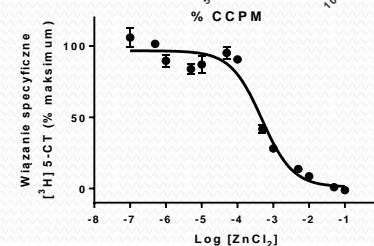
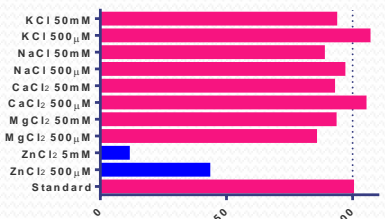
Równanie 2

$$pK_{DApp} = -\log([A] + 10^{-pK_A}) + \log\left(\frac{[A]}{\alpha} + 10^{-pK_A}\right) - \log c$$

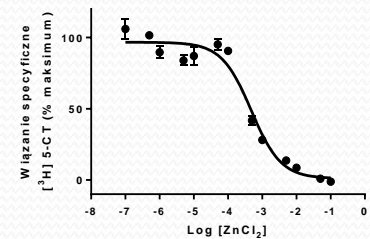
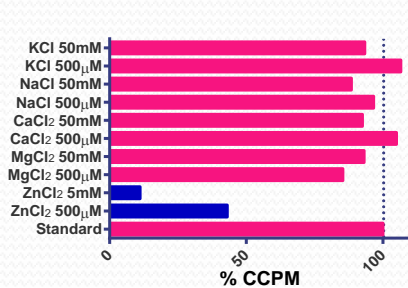
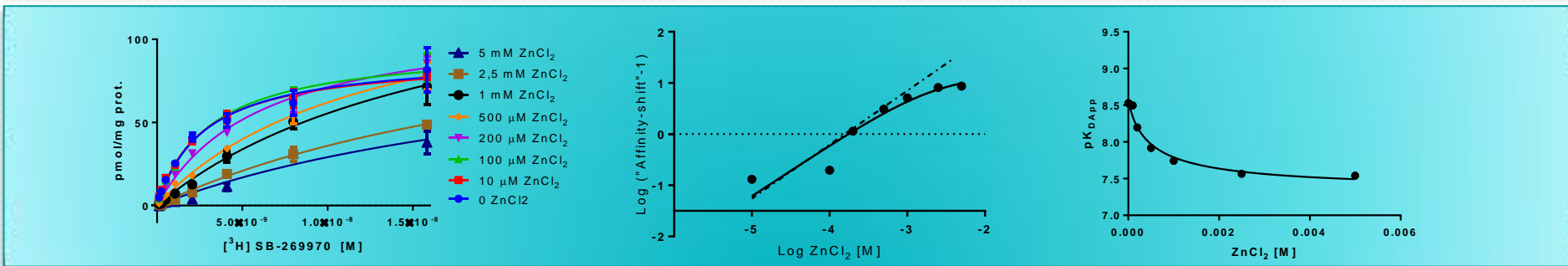
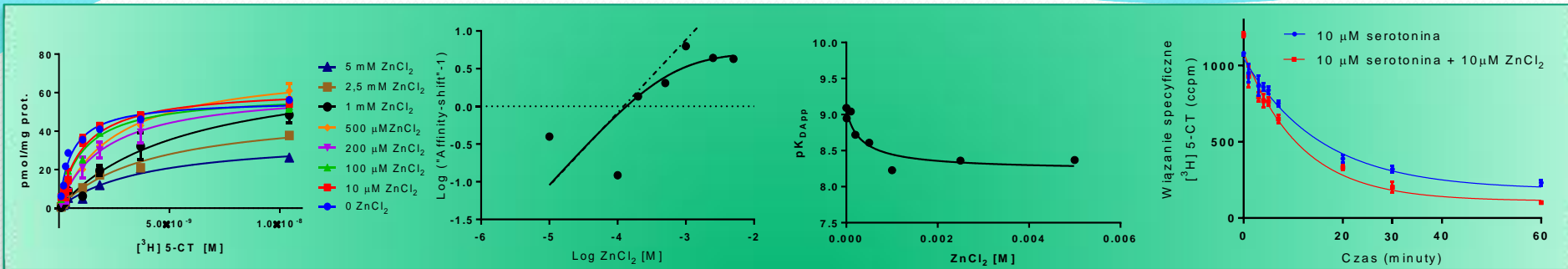
gdzie:  $pK_{DApp}$  – ujemny logarytm stałej powinowactwa radioliganda w obecności modulatora [A] ;  
log c – współczynnik korelacji.

# Plan eksperymentów

1. Ocena specyficzności oddziaływań cynku w stosunku do danego receptora poprzez analizę wpływu szeregu różnych jonów metali (dwu i jednowartościowych) na wiązanie danego radioliganda.
2. Wyznaczenie wartości  $IC_{50}$  oraz  $K_i$  dla cynku do danego receptora w eksperymentach kompetycji.
3. Wyznaczenie wartości parametrów  $K_D$  i  $B_{max}$  dla wiązania specyficznych radioligandów w stanie równowagi w obecności różnych stężeń oraz bez jonów cynku, przeprowadzenie analizy Schilda.
4. Ocena wpływu  $Zn^{2+}$  na stałą dysocjacji radioliganda ( $K_{off}$ ).
5. Badanie wpływu cynku na wiązanie znanych ligandów do danego typu receptora.



# 5-HT7



ZnCl <sub>2</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	[ $^3\text{H}$ ]5-CT		
	K <sub>D</sub> [nM]	B <sub>max</sub> [pmol/mg]	K <sub>off</sub> [min <sup>-1</sup> ]
0	0.6	56	0.064
10	1.1	62	0.087
100	1.1	59	
200	2.0	62	
500	2.5	74	
1000	5.7	76	
2500	4.2	51	
5000	3.9	37	
Współczynnik $\alpha$	Równanie 1	Równanie 2	
	0.16	0.14	

[ $^3\text{H}$ ]SB-269970	
K <sub>D</sub> [nM]	B <sub>max</sub> [pmol/mg]
2.8	91
2.7	89
3.1	96
6.1	115
12.5	140
17.9	154
26.1	130
26.5	106
Równanie 1	Równanie 2
0.06	0.06



- Podwyższone wartości  $K_D$  względem wiązania bez cynku (przy czym osiąga ono plateau w stężeniu  $> 1\text{mM}$  ) wskazuje na niekompetycyjny charakter interakcji o cechach negatywnej modulacji allosterycznej, ponieważ w przypadku oddziaływań kompetycyjnych wzrost stężenia jednego liganda powinien obniżać powinowactwo bez ograniczeń.
- Wartości współczynnika alfa świadczą o negatywnej kooperacji oddziaływania modulatora i ortosterycznego liganda z receptorem.
- Obserwowany wzrost wartości stałej dysocjacji  $K_{\text{off}}$  w wyniku działania cynku jest kolejnym dowodem negatywnej modulacji allosterycznej

# Dziękuję za uwagę

**The study is supported by a grant PRELUDIUM  
DEC-2012/05/N/NZ7/02110 financed by the National Science Centre**



**Projekt "Depresja - mechanizmy - terapia" współfinansowany przez  
Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego  
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka,  
2007-2013**



**Środki statutowe Zakładu Chemii Leków**

