

***Postnatal development of GABA_B-
receptors in the frontal rat brain cortex***

***Postnatální vývoj GABA_B-receptorů v
kůře předního mozku potkana***

Mgr. Dmytro Kagan

Pracovní hypotéza mé disertační práce byla založena na předpokladu, že se množství a afinita GABA_B-receptorů, jakož i trimerních G proteinů které jsou aktivovány těmito receptory, mění během ontogenetického vývoje mozku potkana. Cílem mé disertační práce bylo zjistit jak.

Metody

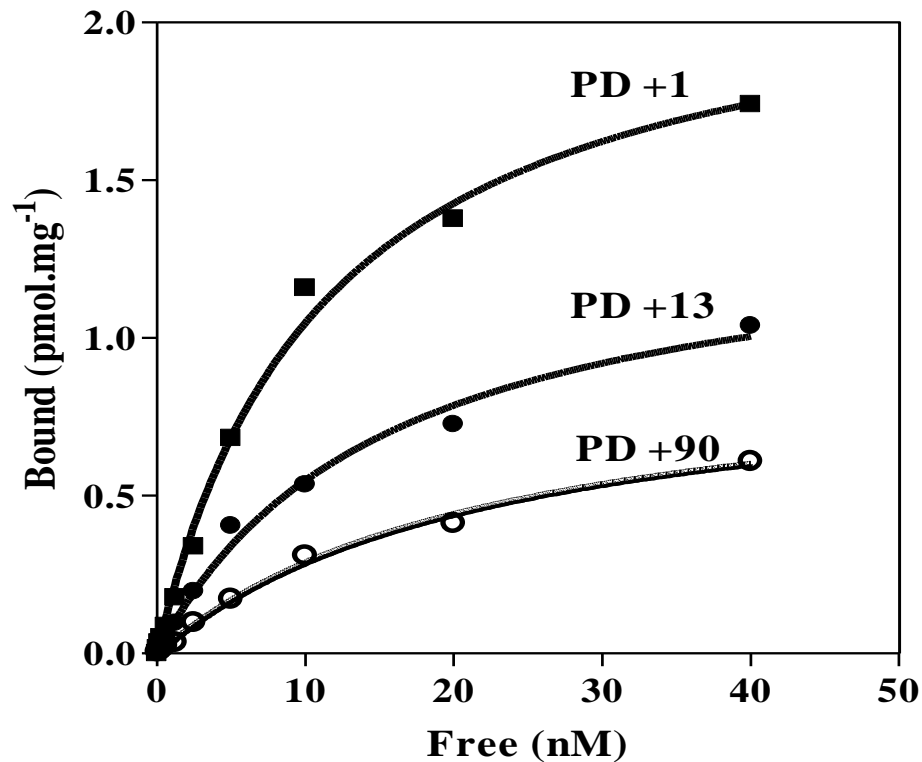
- *Příprava kůry předního mozku potkana*
- *Zamražení a uchovávání vzorků*
- *Isolace plasmatických membrán z kůry předního mozku potkana centrifugací v hustotním gradientu Percolu*
- *Stanovení bílkovin v membránových frakcích*
- *Stanovení funkční aktivity G proteinů stimulovaných agonisty GABA_B-receptorů; vazba nehydrolyzovatelného analoga GTP, **[35S]GTPγS***

- ***Stanovení množství a afinity GABA_B-receptorů; vazebné studie se specifickým antagonistou [3H]CGP 54626A***

Výsledky

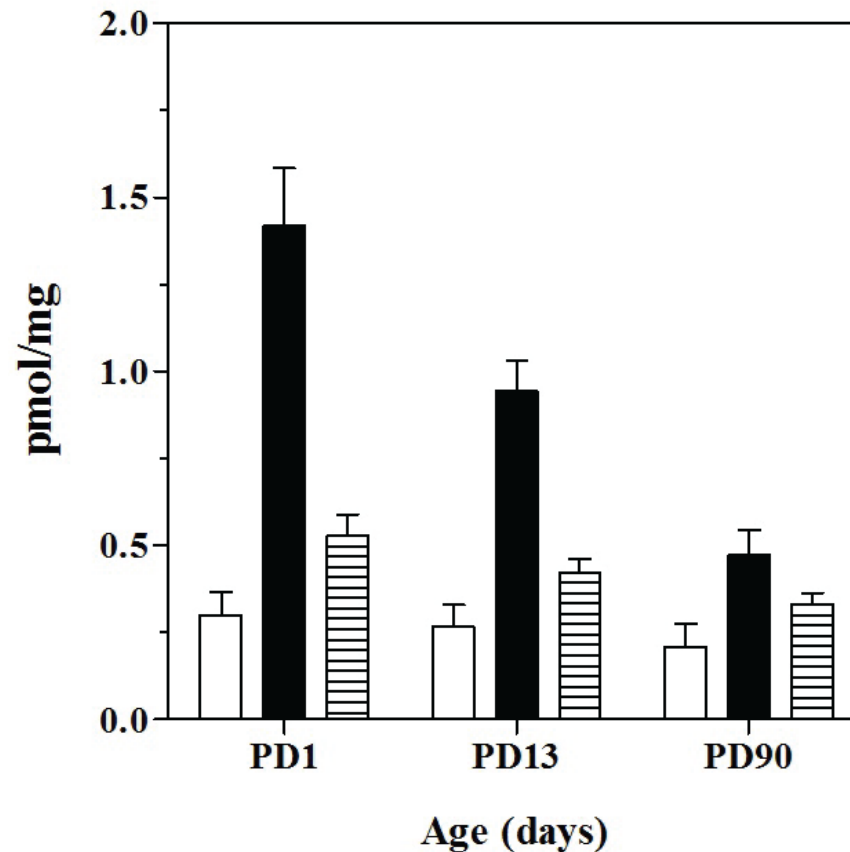
Počet a afinita GABA_B-R v izolovaných plasmatických membránách kůry předního mozku potkana během ontogenetického vývoje **klesá**; *saturační vazebná studie [3H]CGP 54626A v prostředí 2.5 mM CaCl₂*

a



Výsledky získané saturační vazebnou studií [³H]CGP54526A v inkubačním médiu obsahujícím 2.5 mM CaCl₂ byly potvrzeny stanovením v médiu bez iontů (ion-free) a 5 mM MgCl₂ při „saturující“ koncentraci radioligandu.

[³H]CGP 54626A binding



Hustota GABA_B-receptorů v izolovaných plasmatických membránách kůry předního mozku potkana během ontogenetického vývoje dramatickým způsobem klesá

Hladina v dospělosti (zvířata stará 90 dnů, „young adults“) je 2.5x nižší než po narození

Stanovení funkční aktivity G proteinů stimulovaných agonisty GABA_B-R; křivky dávka-odpověď pro PD2, PD14 a PD90.

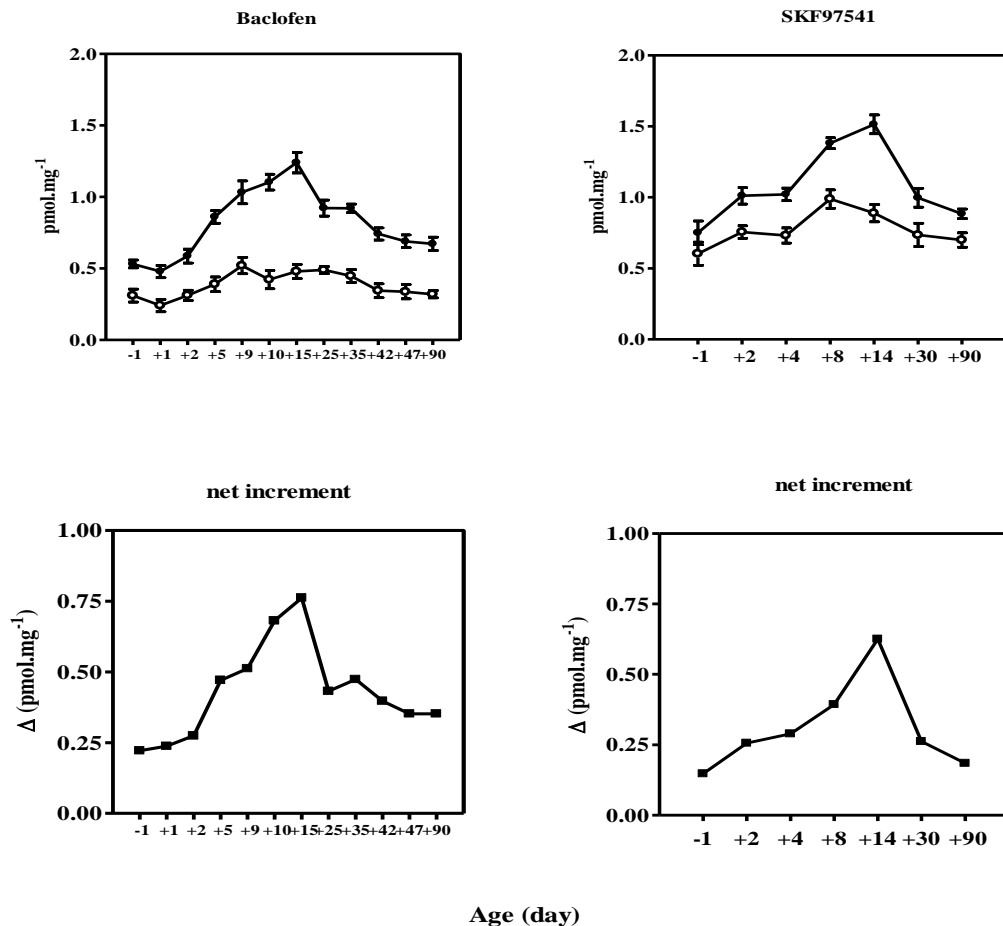
Table 1. Maximum response (B_{max}) and affinity (EC_{50}) of baclofen- and SKF97541-stimulated [35 S]GTP γ S binding in PM isolated from 2-, 14- and 90-days old rats.

A(-)-baclofen	2-days	14-days	90-days
B_{basal}	0.72 ± 0.01	1.23 ± 0.02	0.64 ± 0.01
B_{max}	1.03 ± 0.02	1.85 ± 0.03	1.04 ± 0.01
$\Delta = B_{max} - B_{basal}$	0.31	0.62	0.40
$100 \times B_{max} / B_{basal}$	152 %	152 %	166 %
EC_{50} (μ M)	9.00 (4.46-18.15)	13.34 (7.81-22.88)	13.26 (9.96-17.65)
B(-)-SKF97541			
B_{basal}	0.83 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.66 ± 0.01
B_{max}	1.13 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.08 ± 0.02
$\Delta = B_{max} - B_{basal}$	0.30	0.49	0.42
$100 \times B_{max} / B_{basal}$	142 %	152 %	168 %
EC_{50} (μ M)	9.79 (5.30-18.10)	23.45 (14.34-38.35)	36.51 (21.87-60.95)

B_{basal} (pmol · mg⁻¹), binding in the absence of agonist; B_{max} (pmol · mg⁻¹), binding at saturating agonist concentration; $\Delta = B_{max} - B_{basal}$, net-increment of agonist stimulation; $100 \times B_{max} / B_{basal}$, % stimulation of the basal level by agonist. EC_{50} (μ M), agonist concentration inducing half-maximum stimulation (95 % confidence limit). B_{max} , B_{basal} and EC_{50} values were determined by analysis of the sigmoidal dose-response curves of baclofen- (A) and SKF97541- (B) stimulated [35 S]GTP γ S binding presented in Figure 1 by GraphPad Prism 4 and represent the average of three experiments ± S.E.M. The significance of difference between B_{basal} , B_{max} and EC_{50} values in PM prepared from 2 (PD2)-, 14 (PD14)- and 90 (PD90)-days-old rats was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* comparison test. **A (baclofen)**. B_{basal} (PD2 versus PD14, $p < 0.0001$, ****; PD14 versus PD90, $p < 0.0001$, ****; PD2 versus PD90, $p > 0.05$, not significant). B_{max} (PD2 versus PD14, $p < 0.0001$, ****; PD14 versus PD90, $p < 0.0001$, ****; PD2 versus PD90, $p > 0.05$, not significant). EC_{50} (PD2 versus PD14, $p > 0.05$, NS; PD14 versus PD90, $p > 0.05$, NS; PD2 versus PD90, $p > 0.05$, NS). **B (SKF97541)**. B_{basal} (PD2 versus PD14, $p < 0.001$, ***; PD14 versus PD90, $p < 0.0001$, ****; PD2 versus PD90, $p < 0.001$, ***). B_{max} (PD2 versus PD14, $p < 0.001$, ***; PD14 versus PD90, $p < 0.0001$, ****; PD2 versus PD90, $p > 0.05$, NS). EC_{50} (PD2 versus PD14, $p > 0.05$, NS; PD14 versus PD90, $p > 0.05$, NS; PD2 versus PD90, $p < 0.01$, **).

Stanovení funkční aktivity G proteinů stimulovaných agonisty GABA_B-R; podrobná analýza ontogenetického vývoje; **maximální aktivace 14 a 15 den po narození.**

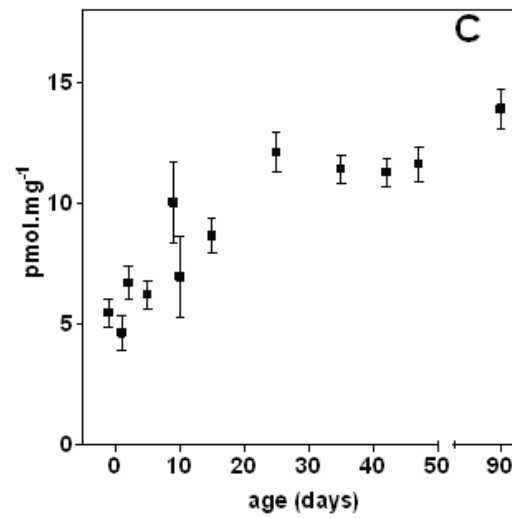
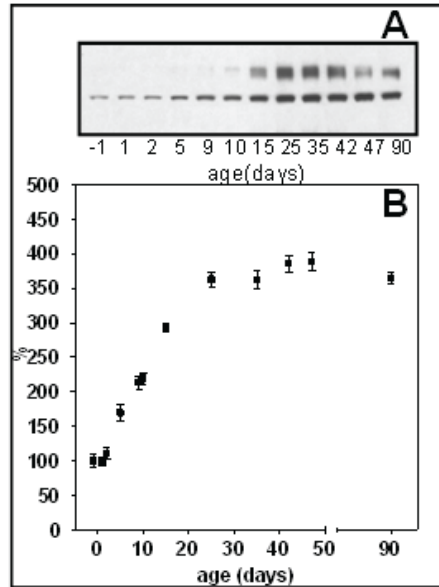
a



Ontogenetický vývoj GABA_B-R signální kaskády se zásadně odlišuje od vývoje sodíkem a draslíkem aktivované, ouabainem-inhibované Na,K-ATPasy.

Množství Na,K-ATPasy v plasmatických během během ontogenetického vývoje monotoně roste tak, že v dospělosti je hladina tohoto enzymu 2.5x vyšší než při narození

Na, K-ATPase



Závěry mé disertační práce

Kůra předního mozku potkana obsahuje nejvyšší množství receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou typu B ($\text{GABA}_B\text{-R}$) již při narození

$\text{GABA}_B\text{-R}$ receptory jsou aktivní již v době těsně před a po porodu

Množství $\text{GABA}_B\text{-R}$ během ontogenetického vývoje klesá tak, že hladina receptorů v dospělém mozku je 2.5x nižší než po narození

Aktivita G proteinů, které jsou GABA_B-receptory aktivovány je maximální 14 a 15 den po narození.

Ontogenetický profil GABA_B-R je v ostrém kontrastu s obecným vývojovým trendem mozku, který byl v mé práci monitorován stanovením Na,K-ATPázy; množství tohoto enzymu během ontogenetického vývoje systematiky roste tak, že v dospělosti je 3x vyšší než po narození.

Snížení obsahu Na,K-ATPasy v plasmatických membránách kůry předního mozku bylo detekováno jak technikou imunoblot, tedy detekcí alfa-podjednotky Na,K-ATPasy s pomocí specifických protilátek, tak stanovením vazby specifického inhibitoru tohoto enzymu, [3H]ouabainu.