

КАЛЬЦИЙЗАВИСИМАЯ МОДУЛЯЦИЯ ГЛИЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ

© С. Булдакова,¹ Е. Реаль,² И. Жакоб,² П. Брежестовский¹

¹ Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, и ² Институт им. Пастера, Париж, Франция;
¹ электронный адрес: pbreges@inmed.univ-mrs.fr

Работа является начальным этапом проверки гипотезы, согласно которой регуляция глициновых рецепторов осуществляется через неизвестный Са-связывающий белок (Fucile et al., 2000). Проведенный скрининг кДНК библиотеки мозга человека выявил Са-связывающий белок (СаБ), который может быть кандидатом на роль функционального регулятора работы глициновых рецепторов (ГлиР). В настоящей работе мы анализировали влияние укороченной формы этого белка (СаБ-1) на ионные токи, вызываемые быстрой аппликацией глицина к поверхности клеток НЕК-293 и СНО, экспрессирующих либо глициновый рецептор человека (ГлиР-1), либо ГлиР-1 и СаБ-1. Для количественной оценки влияния СаБ-1 на чувствительность ГлиР-1 к глицину определяли концентрацию, вызывающую 50%-ный ответ (ЕД50). Через 40–72 ч после трансфекции клеток кДНК были обнаружены достоверные ($P < 0.01$, ANOVA-тест) различия в ЕД50 контрольных НЕК-293 (экспрессирующих только ГлиР-1) и клеток, коэкспрессирующих ГлиР-1 и СаБ-1. Значение ЕД50 в контроле составляло в среднем 68 ± 49 мкМ ($n = 29$). Средний коэффициент Хилла (n_H) составлял 3.3 ± 1.3 . Для клеток, экспрессирующих ГлиР-1 и СаБ-1, значение ЕД50 составляло в среднем 409 ± 421 мкМ ($n = 60$), а коэффициент n_H был равен 2.9 ± 1.2 . Для контрольных клеток СНО средние значения ЕД50 и коэффициент n_H составляли соответственно 54 ± 43 мкМ ($n = 25$) и 2.9 ± 1.3 . Для клеток, экспрессирующих ГлиР-1 и СаБ-1, средние значения ЕД50 и n_H были равны соответственно 123 ± 104 мкМ ($n = 28$) и 2.4 ± 1.2 . Таким образом, наличие в клетках СаБ-1 приводит к достоверному снижению чувствительности ГлиР-1 к агонисту. Результаты позволяют предположить, что СаБ-1 модулирует работу ГлиР, взаимодействуя с их цитоплазматическим доменом.

Ключевые слова: глициновый рецептор, внутриклеточный кальций, кальцийсвязывающий белок, клетки линий НЕК-293 и СНО, ионные токи.

Рецепторы глицина (ГлиР) обеспечивают тормозную нейротрансдукцию в спинном мозге, стволе и в некоторых сенсорных системах (Lynch, 2004). Эти рецепторы играют важную роль в контроле движения, болевых ощущений, обработке сенсорной информации. Активность глициновых рецепторов регулируется через специализированные молекулярные домены, расположенные с наружной и внутренней сторон (Bregestovski et al., 2003) трансмембранных белков, встроенных в плазматическую мембрану клетки (Lynch, 2004; Diana, Bregestovski, 2005). Было показано, что ионы кальция (Ca^{2+}) являются мощными регуляторами активности глициновых рецепторов (Fucile et al., 2000). Повышение внутриклеточного Ca^{2+} приводит к увеличению длительности работы глицинактивируемых каналов и как следствие — возрастанию амплитуды интегральных токов. Этот обратимый эффект развивается быстро, менее чем за 100 мс. Была высказана гипотеза, согласно которой регуляция ГлиР осуществляется через неизвестный диффузионный фактор, возможно Са-связывающий белок (СаБ) (Fucile et al., 2000). В отсутствие Ca^{2+} этот белок взаимодействует с цитоплазматическим доменом ГлиР и поддерживает его в состоянии неполной активации. Возрастание внутриклеточного Ca^{2+} стимулирует освобождение рецептора глицина от СаБ, что приводит к более эффективной активации

глицинууправляемых каналов (Fucile et al., 2000). Настоящая работа является начальным этапом проверки этой гипотезы.

Используя двухгибридную систему дрожжей (Field, Song, 1989; Uetz et al., 2000), мы выявили, что среди нескольких белков, взаимодействующих с цитоплазматическим доменом ГлиР человека, один относится к классу СаБ (Bregestovski et al., 2003).

Целью работы является исследование влияния укороченного варианта СаБ (СаБ-1) на ионные токи глицинактивируемых каналов в клетках линий НЕК-293 и СНО.

Материал и методика

Клеточные линии и трансфекция. Опыты проводили на двух клеточных линиях — НЕК-293 (линия клеток почек человека) и СНО (линия яйцеклеток хомяка). Клетки растили, как описано ранее (Fucile et al., 1999, 2000; Medina et al., 2000). Клетки обеих линий трансфицировали либо кДНК, кодирующей $\alpha 1$ -субъединицу ГлиР человека (ГлиР-1), либо ГлиР-1 совместно с СаБ-1. Для обеспечения эффективности экспрессии СаБ-1 была создана IRES-конструкция этой последовательности с зеленым флуоресцентным белком (GFP).

Этот вектор обеспечивает одновременную экспрессию двух белков в одной клетке (Rhodes et al., 1998). Чтобы облегчить идентификацию контрольных клеток, в которых экспрессирован только ГлиР-1, эти клетки котрансфицировали с GFP. Для экспрессии использовали липофектамин-реагент + (плюс)-метод (Life Technology, США).

Электрофизиологическая регистрация. Глицинактивируемые токи исследовали в конфигурации «целая клетка», используя усилитель ЕРС-9 (НЕКА Electronics, Lambrecht, Германия). Эксперименты проводили при комнатной температуре (20—24 °С). Клетки инкубировали в растворе (в мМ): NaCl — 140, CaCl₂ — 2, KCl — 2.8, MgCl₂ — 4, HEPES/NaOH — 40, глюкоза — 10, рН 7.4, 330—340 мосмоль. Для быстрой смены растворов использовали систему с тремя параллельными прямоугольными трубочками диаметром 100 мкм, расположенными в 40—50 мкм от исследуемой клетки. Положение трубочек управлялось компьютером, контролирующим систему быстрой перфузии (SF 77A Perfusion Fast-Step, Warner, США).

Ионные токи регистрировали при поддерживаемом потенциале –20 мВ. Для анализа отобраны только клетки, входное сопротивление которых превышало 200 МОм. Пипетки имели сопротивление 3—8 МОм. В работе использовали два основных «внутриклеточных» раствора. «Бескальциевый» раствор имел следующий состав (в мМ): CsCl — 140, ВАРТА — 20, MgCl₂ — 2, MgATP — 2, Na₂GTP — 0.4, HEPES/CsOH — 10, рН 7.2, 280—290 мосмоль. «Кальциевый» внутриклеточный раствор содержал (в мМ): CsCl — 140, MgCl₂ — 2, MgATP — 2, Na₂GTP — 0.4, HEPES/CsOH — 10, а также 50 мкМ CaCl₂, рН 7.2, 280—290 мосмоль.

Для статистического анализа использовали ANOVA-тест. Данные приведены в виде средних значений и их среднестатистических отклонений.

Результаты и обсуждение

Идентификация СаБ. Для идентификации потенциальных белков-партнеров, взаимодействующих с ГлиР, мы использовали двухгибридную систему дрожжей, позволяющую выявлять физические взаимодействующие пары белков (Field, Song, 1989; Uetz et al., 2000). Поскольку потенциальной мишенью для взаимодействия с гипотетическим СаБ является цитоплазматический домен рецептора, этот участок (альфа-1-субъединицы ГлиР человека, аминокислоты 311—392) был использован в качестве «наживки». Проведенный скрининг кДНК библиотеки мозга человека с этим доменом позволил выявить 5 белков — потенциальных кандидатов на роль функционального регулятора работы глицинового рецептора (Bregestovski et al., 2003).

Анализ библиотеки банка данных позволил определить, что один из белков относится к классу СаБ. В аминокислотной последовательности этого белка содержатся две «ЕF-руки». Были получены две формы этого белка: укороченная, в которой «ЕF-домены» отсутствуют (СаБ-1), и полная (СаБ-2).

Приведенный в настоящей работе электрофизиологический анализ посвящен выяснению влияния укороченного белка СаБ-1 на ионные токи глицинактивируемых каналов в клетках линий НЕК-293 и СНО.

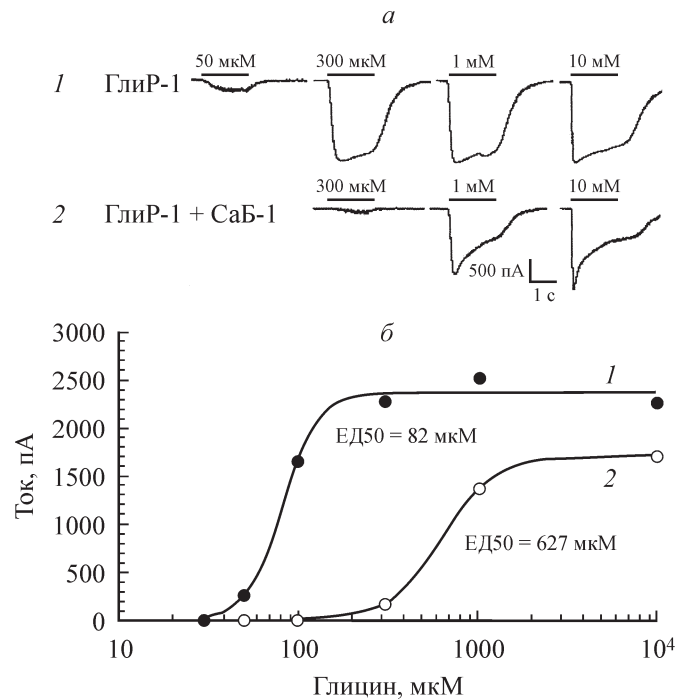


Рис. 1. Модуляция Са-связывающим белком (СаБ-1) чувствительности глицинового рецептора (ГлиР-1) человека, экспрессированных в культивируемые клетки линии НЕК-293.

a — токи, зарегистрированные в клетке, трансфицированной ГлиР-1 (вверху, 1), и в клетке, трансфицированной ГлиР-1 и СаБ-1 (внизу, 2), в ответ на аппликацию различных концентраций глицина (концентрация указана над каждым ответом); калибровка — 500 пА, 1 с. *б* — кривые зависимости токов от концентрации глицина для клеток, показанных на рис. 1, *a*: для клетки, экспрессирующей ГлиР-1, концентрация глицина ЕД50 составляет 82 мкМ (1), для клетки, трансфицированной ГлиР-1 и СаБ-1, — 627 мкМ (2).

Электрофизиологический анализ действия СаБ-1. При регистрации токов пипетками, заполненными «бескальциевым» раствором, контрольные клетки НЕК-293, экспрессирующие только ГлиР-1, имели порог активации при действии глицина 10—50 мкМ. Эти данные соответствуют полученным ранее наблюдениям для ГлиР, экспрессируемых в этих клетках (Fucile et al., 1999, 2000). В течение первых 24 ч после трансфекции клетки, экспрессирующие ГлиР-1 и СаБ-1, мало отличались от контрольных. Однако через 40—72 ч культивирования многие клетки, экспрессирующие ГлиР-1 и СаБ-1, в ответ на аппликацию глицина имели уже порог активации в пределах 50—300 мкМ (рис. 1, *a*).

Для количественной оценки влияния СаБ-1 на чувствительность ГлиР-1 к глицину мы определяли концентрацию агониста, вызывающую 50%-ный ответ (ЕД50). Через 40—72 ч после трансфекции клеток были обнаружены значительные различия в величине ЕД50 между контрольными клетками НЕК-293 и НЕК-293, экспрессирующими ГлиР-1 и СаБ-1. Рис. 1, *б*, на котором представлены концентрационные зависимости глицинактивируемых токов от контрольных клеток и клеток, экспрессирующих СаБ-1, иллюстрирует эти различия. Величина ЕД50 глицина для контрольных клеток варьировала от 16 до 330 мкМ, составляя в среднем 68 ± 49 ($n = 29$). Средний коэффициент Хилла (n_H) составлял 3.3 ± 1.3 . Среди клеток, экспрессирующих ГлиР-1 и СаБ-1, были обнаружены две популяции: клетки, близ-

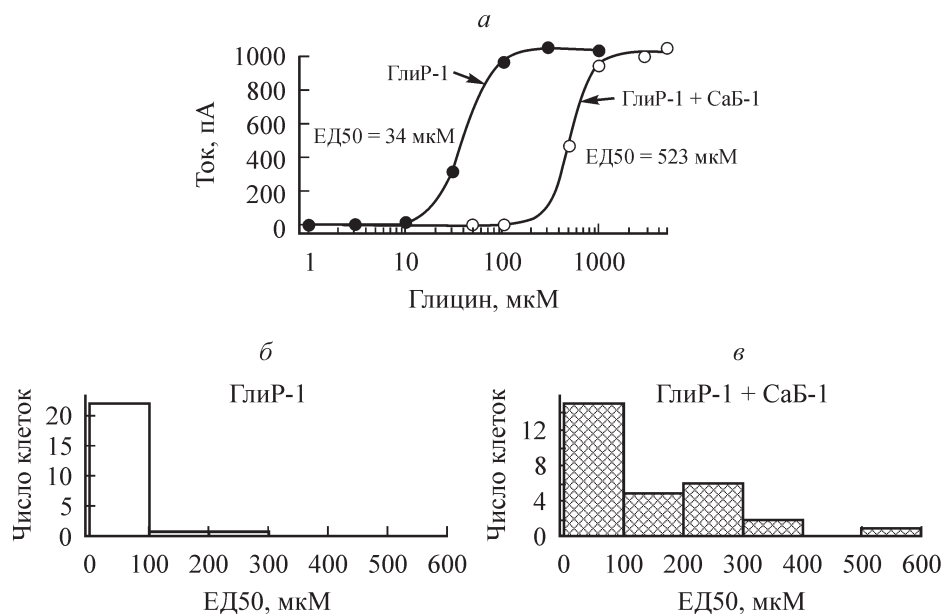


Рис. 2. Модуляция Са-связывающим белком чувствительности глициновых рецепторов человека, экспрессированных в культивируемые клетки линии СНО.

a — кривые зависимости токов от концентрации глицина: для клетки, трансфицированной ГлиР-1 (черные кружки), и для клетки, трансфицированной ГлиР-1 + СаБ-1 (белые кружки). Значения ЕД50 глицина указаны возле кривых. *б, в* — гистограммы распределения клеток по величине ЕД50 глицина для клеток, экспрессирующих только ГлиР-1 (*б*), и для клеток, трансфицированных ГлиР-1 + СаБ-1 (*в*).

кие по глициновой чувствительности к контрольным, и клетки, экспрессирующие ГлиР, с низкой чувствительностью к этому агонисту. Величина ЕД50 варьировала от 35 до 800 мкМ, составляя в среднем 409 ± 421 мкМ ($n = 60$), а n_H был равен 2.9 ± 1.2 . Различия достоверны при $P < 0.01$.

На клетках СНО были получены меньшие, но достоверные различия. Подобно клеткам НЕК-293, клетки СНО, экспрессирующие ГлиР-1 и СаБ-1, в течение первых 24 ч после трансфекции мало отличались от контрольных. Однако через 40—80 ч культивирования многие клетки, экспрессирующие ГлиР-1 и СаБ-1, повышали порог активации до концентрации глицина 50—100 мкМ.

Рис. 2, *a*, на котором представлены концентрационные зависимости глицинактивируемых токов от контрольных клеток и клеток, экспрессирующих СаБ-1, демонстрирует эти различия. Значение ЕД50 для контрольной клетки составляет 34 мкМ, а для клетки, экспрессирующей ГлиР-1 и СаБ-1, — 523 мкМ. Значения ЕД50 для контрольных клеток СНО варьировали от 14 до 209 мкМ, составляя в среднем 54 ± 43 ($n = 25$). Коэффициент n_H был равен 2.9 ± 1.3 . Гистограмма распределения клеток по величине ЕД50 для контрольных клеток показана на рис. 2, *б*.

Для клеток, экспрессирующих ГлиР-1 и СаБ-1, значения ЕД50 варьировали от 10 до 523 мкМ, составляя в среднем 123 ± 104 мкМ ($n = 28$), а коэффициент n_H был равен 2.4 ± 1.2 . Из гистограммы распределения этих клеток по величине ЕД50 (рис. 2, *в*) видно, что среднее увеличение ЕД50 в результате трансфекции обусловлено появлением популяции клеток с очень низкой чувствительностью к глицину.

При использовании внутриклеточного раствора, содержащего 50 мкМ Ca^{2+} , различия между контрольными клетками и клетками, экспрессирующими ГлиР-1 и

СаБ-1, были недостоверны. Значения ЕД50 составляли соответственно 35 ± 28 ($n = 7$) и 64 ± 38 мкМ ($n = 7$).

Представленные результаты позволяют предполагать, что белок СаБ-1 модулирует работу ГлиР, взаимодействуя с его цитоплазматическим доменом. Эти данные подтверждают высказанную ранее гипотезу о механизме Са-зависимой модуляции ГлиР (Fucile et al., 2000) и позволяют объяснить существенные различия в чувствительности этих рецепторов к глицину, которые были описаны во многих работах (Grenningloh et al., 1990; Mascia et al., 1998; Moorhouse et al., 1999; Wick et al., 1999; Imboden et al., 2001) и суммированы нами ранее (De Saint Jan et al., 2001). Однако для получения окончательных выводов требуются дополнительные исследования.

Список литературы

- Bregestovski P., Real E., Jacob Y., Mukhtarov M., Ragozzino D. 2003. Glycine receptor channels: modulation by calcium. In: Sixth IBRO world congress of neuroscience. Prague.
- De Saint Jan D., David-Watine B., Korn H., Bregestovski P. 2001. Activation of human $\alpha 1$ and $\alpha 2$ homomeric glycine receptors by taurine and GABA. *J. Physiol.* 535 : 741—755.
- Diana M. A., Bregestovski P. 2005. Calcium and endocannabinoids in the modulation of inhibitory synaptic transmission. *Cell Calcium.* 37 : 497—505.
- Donato R., Nistri A. 2000. Relative contribution by GABA or glycine to Cl⁻-mediated synaptic transmission on rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 84 : 2715—2724.
- Fields S., Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340 : 245—246.
- Fucile S., De Saint Jan D., David-Watine B., Korn H., Bregestovski P. 1999. Comparison of glycine and GABA actions on the zebrafish homomeric glycine receptor. *J. Physiol.* 517 : 369—383.
- Fucile S., De Saint Jan D., Prado de Carvalho L., Bregestovski P. 2000. Fast potentiation of glycine receptor channels by intra-

cellular calcium in neurons and transfected cells. *Neuron*. 28 : 571—583.

Grenningloh G., Schmieden V., Schofield P. R., Seeburg P. H., Siddique T., Mohandas T. K., Becker C. M., Betz H. 1990. Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J.* 9 : 771—776.

Imboden M., De Saint Jan D., Leulier F., Korn H., Goblet C., Bregestovski P. 2001. Isolation and characterization of a alpha 2-type zebrafish glycine receptor subunit. *Neuroscience*. 103 : 799—810.

Lynch J. W. 2004. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84 : 1051—1095.

Mascia M. P., Wick M. J., Martinez L. D., Harris R. A. 1998. Enhancement of glycine receptor function by ethanol: role of phosphorylation. *Br. J. Pharmacol.* 125 : 263—270.

Medina I., Krapivinsky G., Arnold S., Kovoov P., Krapivinsky L., Clapham D. E. 2000. A switch mechanism for G beta gamma activation of I(KACh). *J. Biol. Chem.* 275 : 29 709—29 716.

Moorhouse A. J., Jacques P., Barry P. H., Schofield P. R. 1999. The startle disease mutation Q266H, in the second transmembrane domain of the human glycine receptor, impairs channel gating. *Mol. Pharmacol.* 55 : 386—395.

Rhodes A. D., Bevan N., Patel K., Lee M., Rees S. 1998. Mammalian expression of transmembrane receptors for pharmaceutical applications. *Biochem. Soc. Trans.* 26 : 699—704.

Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S., Rothberg J. M. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403 : 623—627.

Wick M. J., Bleck V., Whatley V. J., Brozowski S. J., Nixon K., Cardoso R. A., Valenzuela C. F. 1999. Stable expression of human glycine alpha 1 and alpha 2 homomeric receptors in mouse L (tk-) cells. *J. Neurosci. Meth.* 87 : 97—103.

Поступила 24 VI 2006

Ca-DEPENDENT MODULATION OF HUMAN GLYCINE RECEPTORS EXPRESSED IN CULTURED CELL LINES

S. Buldakova,¹ E. Real,² Y. Jacob,² P. Bregestovski¹

¹ Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), 13273 Marseille, and

² Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France;

e-mail: pbreges@inmed.univ-mrs.fr

Glycine receptors (GlyRs) provide the main inhibitory neurotransmission in spinal cord and brainstem synapses of vertebrates. Fucile et al. (2000) discovered that elevation of intracellular Ca²⁺ caused rapid potentiation of GlyRs. This modulation develops in less than 100 ms. It is characterized by an increase in GlyR apparent affinity for glycine. It has been suggested that the phenomenon of Ca-induced potentiation involves an unknown Ca²⁺-binding protein (CaBP). Using the yeast two-hybrid system, screening of human brain cDNA library against the cytoplasmic loop of human alpha 1 subunit (GlyRh1) allowed us to identify five new interactors. One of them belongs to a family of Ca-binding proteins. We analyzed effect of «short» forms of this protein (CaBP-S) on functional properties of GlyRh1 expressed in HEK-293 and CHO cells. Using whole-cell recordings and rapid agonist application we constructed concentration dependencies of glycine-induced currents. This analysis revealed statistical differences in EC50s between control cells (expressing only GlyRh1) and those expressing CaBP-S. In HEK-293 cells recorded under conditions of low intracellular Ca concentration (BAPTA 20 mM in the recording pipette), EC50 for glycine in control cells and expressing GlyRh1 + CaBP-S were, correspondently, 68 ± 49 μM (n = 29) and 409 ± 421 μM (n = 60). In CHO cells EC50 were 54 ± 43 μM (n = 25) and 123 ± 104 μM (n = 28). These differences were statistically not significant at recording with intracellular solution containing high Ca concentration (50 μM). In this case EC50 were correspondently 35 ± 28 μM (n = 7) and 64 ± 38 μM (n = 7). These results suggest that CaBP-S causes decrease of GlyR sensitivity to agonist through interaction with cytoplasmic domain of GlyR.

Key words: glycine receptor, intracellular calcium, Ca²⁺-binding protein, cell lines HEK-293 and CHO, ion currents.