

Амінокислотні залишки відповідальні за взаємодію $\alpha 1$ - гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою

Г.В. Малєєва^{1,2}, С.І. Булдакова¹, Г.Г. Скибо², П.Д. Брежестовський¹

¹Інститут системних нейронаук, Університет Екс-Марсель, Франція,

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: galina_maleeva@ukr.net

Раніше нами було показано, що гінкголева кислота здатна вибірково потенціювати струми, опосередковані $\alpha 1$ -субодиницями гліцинового рецептора. Наступним кроком стало проведення порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць для встановлення амінокислотних залишків, що можуть бути відповідальні за різницю в дії гінкголевої кислоти на ці рецептори. Із використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» нами було продемонстровано, що мутація трьох амінокислотних залишків T59/A261/A303 у $\alpha 2$ -субодиниці, на відповідні їм з $\alpha 1$ -субодиниці, робить $\alpha 2$ -рецептори чутливими до потенціюючого впливу гінкголевої кислоти. Амплітуда струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -мутантними рецепторами, після аплікації гінкголевої кислоти збільшувалася на $89 \pm 14\%$. Так само, як і для $\alpha 1$ -рецепторів, для $\alpha 2$ -мутантних рецепторів було характерним зниження напівефективної дози для гліцину під дією гінкголевої кислоти. Таким чином, субодинична вибірковість гінкголевої кислоти пов'язана із трьома амінокислотними залишками, що є відмінними у $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиницях гліцинового рецептора.

Ключові слова: гліциновий рецептор; гінкголева кислота; іонні струми; patch-clamp; точкові мутації.

ВСТУП

Гліцинові рецептори забезпечують швидку передачу гальмівного сигналу у центральній нервовій системі хребетних. Відомо, що переважно вони локалізовані у спинному мозку, сітківці, мозочку, ядрах стовбура мозку та залучені у контроль рухової діяльності, формування больових відчуттів, зорове та слухове сприйняття [1, 2].

Гліциновий рецептор належить до родини цис-петельних, що характеризуються наявністю консервативного бі-сульфідного зв'язку у зовнішньоклітинному домені. Окрім гліцинового до цієї родини також належать: нікотинівий ацетилхоліновий, γ -аміномасляний (ГАМК) та серотоніновий (3-го типу) рецептори. Було клоновано п'ять субодиниць гліцинового рецептора: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ та β , що відрізняються між собою за амінокислотним складом, локалізацією та часовим патерном експресії [3].

Функціональний гліциновий рецептор складається з п'яти субодиниць, що утворюють центральну пору каналу [4, 5]. Залежно від субодиничного складу гліцинові рецептори поділяють на дві групи: гомомерні (сформовані лише α -субодиницями) та гетеромерні (сформовані α - і β -субодиницями) [6, 7]. Кожна субодиниця рецептора складається із зовнішньоклітинного, чотирьох трансмембранних доменів, а також лінкерних ділянок, що їх поєднують. Другий трансмембранний домен (TM2) повернений до іонної пори каналу, решта контактують із біліпідним оточенням [8].

Гіперплексія – спадкове неврологічне захворювання, зумовлене мутаціями генів, що кодують субодиниці гліцинового рецептора. Характерним її симптомом є довготривале неконтрольоване скорочення м'язів тіла у відповідь на неочікуваний тактильний чи акустичний стимул, що може супроводжуватися мимовільним падінням

© Г.В. Малєєва, С.І. Булдакова, Г.Г. Скибо, П.Д. Брежестовський

[9]. Причиною появи симптомів гіперплексії є нездатність мутантних гліцинових рецепторів забезпечувати ефективну швидку гальмівну нейропередачу в центральній нервовій системі [10]. Значна частина гіперплексичних мутацій локалізовані у ТМ2-домені або у лінкерних ділянках, що поєднують його з іншими трансмембранними доменами (найпоширеніші гіперплексичні мутації позначено на рис.1). Амінокислотні заміни в ТМ2-домені, що визначає іонну провідність та вибірковість, порушують процес відкривання каналу. Це призводить до зменшення його провідності та амплітуди струмів, опосередкованих гліциновими рецепторами [11]. Відповідно актуальним є пошук позитивних модуляторів гліцинового рецептора, які могли б корегувати роботу мутантних рецепторів, сприяючи підвищенню ефективності гліцинергічної передачі.

Гінкголева кислота, котра входить до складу екстракту *Ginkgo biloba*, має здатність підвищувати амплітуду струму, опосередкованого $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, та знижувати напівнефективну дозу (ED_{50}) для гліцину [12]. Характерною особливістю гінкголевої кислоти є субодиночна вибірковість – відсутність потенціюючої дії на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори.

Метою нашої роботи було, використовуючи метод *patch-clamp*, визначити амінокислотні залишки, що є ключовими для позитивної модуляції $\alpha 1$ -субодиноць гліцинового рецептора гінкголевою кислотою.

МЕТОДИКА

Для проведення електрофізіологічного дослідження кДНК (комплементарна ДНК) $\alpha 2$ - та $\alpha 2$ -мутантного гліцинових рецепторів було експресовано у СНО-К1 (*Chinese hamster ovary cells*) клітинах. Клітини висівали на покривні скельця (12-14 мм), що були розміщені всередині чашок для культивування (35 мм) із додаванням 2 мл живильного середовища. Їх трансфекували

кДНК рецептора за протоколом Lipofectamine 2000 («LifeTechnology», США) із додаванням кДНК зеленого флуоресцентного білка GFP (для полегшення ідентифікації клітин, що експресували гліцинові рецептори). Середовище для культивування замінювали через 3 год після початку трансфекції. Посттрансфекційне середовище містило 1 мкмоль/л стрихніну – для запобігання спонтанній активації гліцинових рецепторів. Електрофізіологічні дослідження проводили через 24-72 год після трансфекції.

«Patch-clamp» - реєстрації у конфігурації «ціла клітина» здійснювали за кімнатної температури (20-25°C) із використанням підсилювача ЕРС9 («НЕКА Electronic», Німеччина). Під час експерименту клітини знаходились у зовнішньоклітинному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, CaCl₂ – 2, KCl – 2.8, MgCl₂ – 4, HEPES – 20, глюкоза – 10; pH 7,4; 320-330 мОсм. Розчин, яким було заповнено піпетки для реєстрацій, містив (ммоль/л): глюконат калію – 120, KCl – 20, CaCl₂ – 6, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, ВАРТА/КОН – 2; pH 7,3; 290 мОсм. Для всіх реєстрацій фіксований потенціал становив 0 мВ. Піпетки для реєстрацій виготовлені з боросилікатних скляних капілярів («HarvardApparatusLtd», США), їх опір був 5-10 МОм. Для зміни розчинів використовували систему швидкої аплікації (SF 77A Perfusion Fast-Step, «Warner», США), що розміщували на відстані 40-50 мкм від досліджуваної клітини. Ця система дає змогу змінювати 10-90% розчину протягом 3-5 мс. В усіх експериментах тривалість аплікації агоніста становила 2 с, а гінкголевої кислоти варіювала від 0,5 до 2 хв.

Результати електрофізіологічних досліджень аналізували з використанням програмного забезпечення «НЕКА Electronic» (Німеччина) та «Origin 7.5» («OriginLabs», США). Для статистичної обробки результатів було використано тест ANOVA, виражали їх у середніх значеннях та стандартних похибках середнього.

РЕЗУЛЬТАТИ

Раніше нами було показано, що гінголева кислота має здатність по-різному впливати на $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора [12]. Амплітуда струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, збільшувалася з 364 ± 49 до 846 ± 135 пА ($n=34$, $P<0,01$) протягом 30 с аплікації 25 мкмоль/л гінголевої кислоти. На противагу цьому, при аплікації гінголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори потенціації не спостерігалось, а висока концентрація навіть спричинила зниження амплітуди струмів на $20 \pm 5\%$ ($n=11$).

Для з'ясування механізму субодинично-вибіркової потенціюючої дії гінголевої кислоти на гліцинові рецептори ми сконцентрували свою увагу на встановленні відмінностей амінокислотних послідовностей $\alpha 1$ - та

$\alpha 2$ -субодиниць рецептора. Провідну роль у алостеричній модуляції лігандкерованих іонотропних рецепторів відіграють зовнішньоклітинний, а також ТМ2- та ТМ3-домени [2, 13]. Аналіз амінокислотних послідовностей ТМ2- та ТМ3-доменив $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора, здійснений із використанням електронного каталога протеїнових сиквенсів UniProt, показав, що вони відрізняються між собою лише за двома позиціями. Амінокислотним залишкам G254, S296 $\alpha 1$ -субодиниці відповідають A261 та A303 $\alpha 2$ -субодиниці (див. рис. 1). Низкою досліджень було продемонстровано важливе значення цих залишків для формування різної чутливості $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -рецепторів до модулюючих речовин [14-16]. Зовнішньоклітинний домен характеризується високою міжсубодиничною варіабельністю, однак, раніше було показано, що залишок

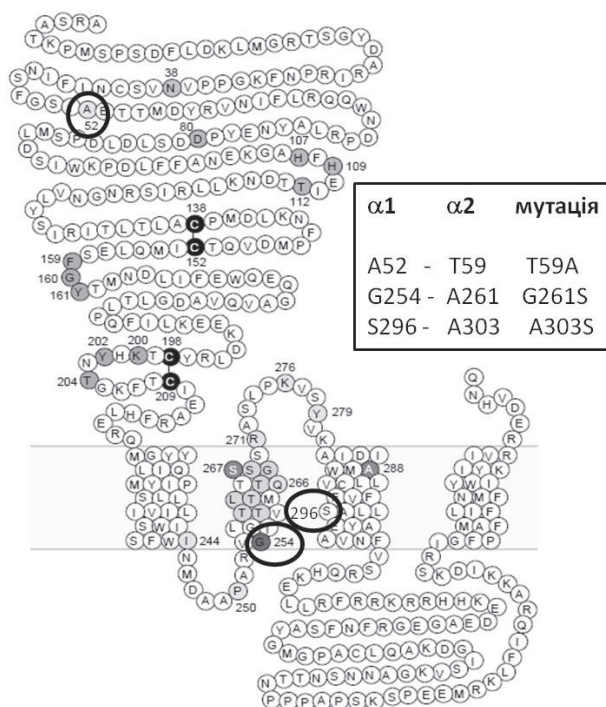


Рис. 1. Амінокислотна послідовність $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора. Колами виділено амінокислотні залишки, мутацію яких вивчали. Вони також представлені у вкладці справа. Амінокислотні залишки, мутація яких найчастіше стає причиною гіперплексії: I244N, P250T, Q266H, R271Q/L, K276E, Y279C; залишки, що беруть участь у зв'язуванні агоніста: F159, Y161, T204 та конкурентного блокатора (стрихніну): G160, K200, Y202; амінокислоти, що взаємодіють з іонами цинку: D80, H107, H109, T112; амінокислотні залишки що, формуючи бі-сульфідні зв'язки, утворюють цис-петлі: C138 – C152 та C198 – C209 (модифіковано з Betz and Luabe, 2006)

A52 є ключовим для позитивної модуляції $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора етанолом [17]. При встановленні сайтів алостеричної модуляції гліцинових рецепторів N-арахідоноїл-гліцином продемонстровано, що $\alpha 2$ -субодиниці, в яких три згадані вище залишки були замінені відповідними з $\alpha 1$, набули здатності потенціюватися під дією N-арахідоноїл-гліцину; в той час як $\alpha 2$ -рецептори дикого типу інгібувалися цією речовиною [18].

Зважаючи на подібність впливу N-арахідоноїл-гліцину та гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори ми припустили, що вони взаємодіють із одними і тими ж амінокислотними залишками $\alpha 1$ -субодиниці. Для перевірки нами здійснено мутацію трьох амінокислотних залишків у $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора на відповідні з $\alpha 1$: T59A у зовнішньоклітинному домені, A261G у TM2 та A303S у TM3.

Наші експерименти показали, що на протипагу $\alpha 2$ -рецепторам дикого типу, мутантні $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S потенціювалися гінкголевою кислотою, подібно до того, як це спостерігалось для $\alpha 1$ -рецепторів

(рис. 2). Преаплікація гінкголевої кислоти (3 мкмоль/л) протягом 30 с призводила до підвищення гліциніндукованих струмів на $105 \pm 18\%$ ($n=5$). При цьому ступінь потенціації варіював від 58 до 153% (див. рис. 2,б).

Кінетика дії гінкголевої кислоти на $\alpha 2$ -мутантні рецептори також була подібною до розвитку потенціації $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів [12]: значне підвищення амплітуди струму після 30 с аплікації гінкголевої кислоти та поступове зростання протягом наступних реєстрацій. Після 30 с преаплікації гінкголевої кислоти було зафіксовано підвищення амплітуди струмів з 97 ± 10 до 203 ± 58 пА ($P < 0,01$; $n=5$), через 2 хв вона збільшилася до 327 ± 47 пА ($P < 0,01$; див. рис. 2,в). На рис. 2,а представлено репрезентативні реєстрації, що ілюструють поступове збільшення амплітуди струму під дією гінкголевої кислоти. Водночас аплікація гінкголевої кислоти (10 мкмоль/л) на клітини, що експресували $\alpha 2$ -гліцинові рецептори дикого типу, призводила до зниження амплітуди іонного струму на $10 \pm 3\%$ ($n=8$).

Для більш детального дослідження особливостей дії гінкголевої кислоти на му-

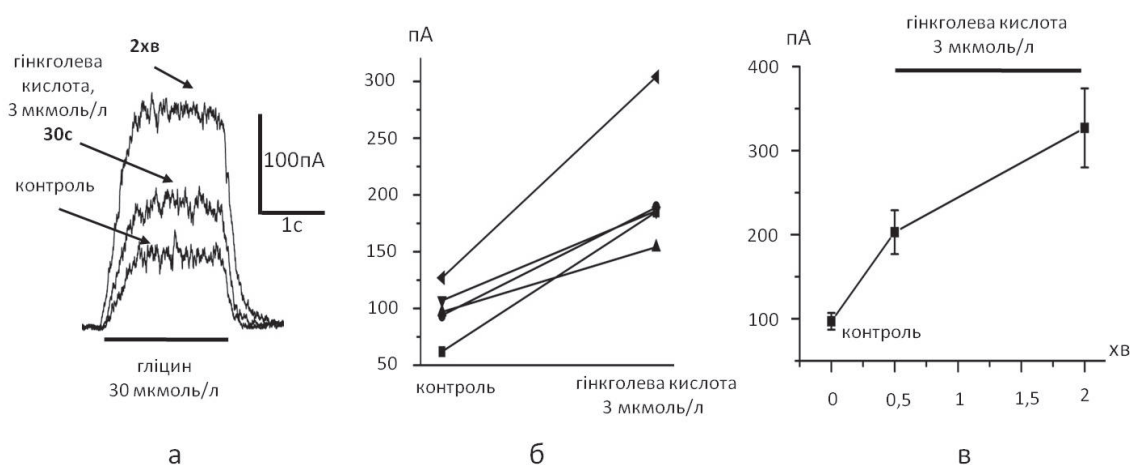


Рис. 2. Потенціація рецепторів $\alpha 2$ T59A/A261G/A303S під дією гінкголевої кислоти:

а – приклади реєстрації струмів у відповідь на аплікацію 30 мкмоль/л гліцину на клітини, що експресували $\alpha 2$ -мутантні рецептори в контролі та після 30 с та 2 хв аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти. Тривалість аплікації показано над реєстраціями. Конфігурація «ціла клітина». Фіксований потенціал = 0 мВ.

б – амплітуди струмів у контролі та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти.

в – розвиток потенціації струмів, опосередкованих мутантними $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами, під дією 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти. Тривалість аплікації гінкголевої кислоти показано у верхній частині графіка

танті $\alpha 2$ -рецептори ми побудували криві залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого гліцину (рис. 3). Раніше було показано, що ED_{50} для $\alpha 2$ -рецепторів становить 42 ± 2 мкмоль/л ($n=10$) [12]. Аналіз кривих концентраційної залежності продемонстрував, що чутливість мутантних $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів до гліцину в 3 рази нижча, ніж $\alpha 2$ -рецепторів дикого типу і становить 119 ± 16 мкмоль/л ($n=12$). В умовах контролю ED_{50} для мутантного $\alpha 2$ -рецептора коливалася від 56 до 238 мкмоль/л. За наявності 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти спостерігався значний зсув кривих концентраційних залежностей вліво: значення ED_{50} варіювали від 31 до 118 мкмоль/л ($n=12$; $P<0,05$). На рис. 3,а представлено репрезентативні реєстрації струмів індукованих 30, 100 та 1000 мкмоль/л гліцину до (зліва) та після (справа) аплікації гінкголевої кислоти. При побудові кумулятивних кривих концентраційної залежності в контролі та за умов дії гінкголевої кислоти було встановлено, що ED_{50} для гліцину змінюється зі 104 до 67 мкмоль/л ($n=12$) під її впливом (див. рис. 3,б). Таким чином, подібно до $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів для мутантних $\alpha 2$ -рецепторів був характерним зсув кривих концентраційної

залежності вліво під дією гінкголевої кислоти.

Отримані нами результати демонструють, що мутація трьох амінокислотних залишків у $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора на відповідні з $\alpha 1$ -субодиниці призводить до проявлення потенціюючого ефекту гінкголевої кислоти. При цьому характер дії останньої на мутантні $\alpha 2$ -рецептори подібний до того, що спостерігається при її впливі на $\alpha 1$ -субодиниці. Це дає змогу припустити, що амінокислоти A52, G254 та S296 залучені у процес взаємодії $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою.

ОБГОВОРЕННЯ

Проблема модуляції гліцинового рецептора привертає увагу дослідників протягом десятиліть. Вони є мішенями для таких фармакологічних агентів, як м'язові релаксанти, знеболювальні та протизапальні ліки [13, 19]. Однак нині відомо лише декілька речовин, що ефективно субодинично-вибірково модулюють роботу гліцинових рецепторів [13].

Окремої уваги заслуговує вивчення механізмів дії модулювальних препаратів на гліцинові рецептори та встановлення

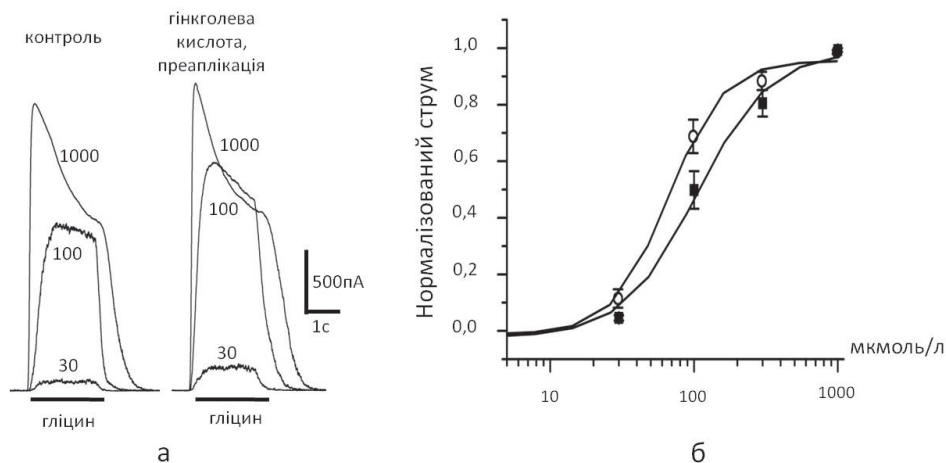


Рис. 3. Аплікація гінкголевої кислоти спричинює зсув кривих концентраційної залежності для гліцину вліво: а – репрезентативні струми, індуковані аплікацією 30, 100 та 1000 мкмоль/л гліцину в контролі (зліва) та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти (справа); б – кумулятивні криві залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого гліцину в контролі (чорні квадрати) та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти (пусті кружечки)

амінокислотних залишків, що є ключовими для взаємодії рецептора із тією чи іншою речовиною. По-перше, це дасть змогу встановити принцип дії фармакологічних агентів та передбачити їх можливий вплив на різні субодиниці гліцинового рецептора; по-друге – краще зрозуміти молекулярну фізіологію гліцинового рецептора, роль окремих регіонів та амінокислотних залишків у його функціонуванні.

Амінокислотний залишок A52¹, розміщений у зовнішньоклітинному домені, бере участь у взаємодії $\alpha 1$ -гліцинового рецептора з етанолом [17]. Було показано, що при здійсненні амінокислотної заміни в $\alpha 1$ -субодиниці (коли аланін 52 замінено на характерний для $\alpha 2$ серин) ефективність дії етанолу на $\alpha 1$ -рецептори знижувалась [17]. Це дає можливість припустити, що A52 задіяна у формуванні одного з сайтів зв'язування етанолу. Пізніше стало відомо, що залишки S267 та A288, розміщені в доменах TM2 та TM3 відповідно, також впливають на взаємодію етанолу з гліциновим рецептором, імовірно, формуючи інший сайт зв'язування [20].

Для TM2- та TM3-доменів гліцинового рецептора характерна висока консервативність. Амінокислотні послідовності $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць відрізняються лише за двома позиціями: одним амінокислотним залишком у TM2 та одним у TM3. Однак ці дві відмінності є причиною того, що $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниці по-різному відповідають на дію декількох біоактивних речовин [14, 16, 17, 21].

TM2-домен кожної субодиниці бере участь у формуванні іонного каналу рецептора [22]. Було показано, що амінокислотний залишок, котрий знаходиться у позиції 254 та є відмінним для $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -субодиниць визначає основний стан провідності каналу. Заміна гліцину в $\alpha 1$ на аланін (характерний для $\alpha 2$)

спричинює появу нової провідності, що зазвичай властива лише каналам, сформованим $\alpha 2$ -субодиницями [23]. Аналогічна заміна призводить до нечутливості $\alpha 1$ -рецепторів до блокатора цианотрифенілборату. [14].

Фітоканабіноїд Δ^9 -тетрагідроканабінол, що є головним психоактивним компонентом марихуани, здатен безпосередньо взаємодіяти з гліциновими рецепторами, сприяючи підвищенню амплітуди струму, опосередкованого $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -субодиницями [16]. Потенціація $\alpha 2$ -субодиниці була менш яскраво виражена. Xiong та співробітники у 2011 р. показали, що важливу роль у субодиничній вибірковості потенціюючої дії Δ^9 -тетрагідроканабінолу відіграє TM3-домен, а зокрема серин 296 ($\alpha 1$) та серин 307 ($\alpha 3$), котрі на відміну від аланіну 303 ($\alpha 2$) здатні формувати гідроксильний зв'язок із ОН-групою тетрагідроканабінолу. Ймовірно, така взаємодія є головною причиною позитивної модуляції $\alpha 1$ - та $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів під дією Δ^9 -тетрагідроканабінолу [16].

Yevenes and Zeilhofer [18] продемонстрували, що лише комбінація трьох амінокислотних замін T59A/A261G/A303S у $\alpha 2$ -гліциновому рецепторі надавала йому чутливості до потенціюючої дії N-арахідоноїл-гліцину. Одиначні мутації A261G, T59A, так само, як і подвійна мутація не були здатні змінити реакцію $\alpha 2$ -рецепторів на аплікацію N-арахідоноїл-гліцину. Зважаючи на подібність субодинично-вибіркового впливу гінголевої кислоти та N-арахідоноїл-гліцину на гліцинові рецептори та їх належність до класу органічних кислот нами було висунуто припущення щодо співпадіння сайтів їх взаємодії з гліциновим рецептором.

Мутація T59A/A261G/A303S, яка передбачає заміну трьох амінокислот у $\alpha 2$ -субодиниці на відповідні амінокислоти з $\alpha 1$ -субодиниці, наділяє $\alpha 2$ -гліцинові рецептори здатністю потенціюватися під дією гінголевої кислоти. Таким чином, нами було встановлено амінокислотні залишки, відповідальні за взаємодію $\alpha 1$ -рецепторів

¹ тут і далі амінокислотні залишки пронумеровано згідно з амінокислотою послідовністю $\alpha 1$ -гліцинового рецептора.

із гінкголевою кислотою, що збігаються із сайтом взаємодії рецептора із N-арахідоноїл-гліцином. Питання про те, яким саме чином ці амінокислоти безпосередньо визначають чи впливають на місце взаємодії $\alpha 1$ -субодиниці із модульовальними речовинами, вимагає подальших досліджень.

Амінокислоти, на вивченні яких була сфокусована наша увага, відіграють важливу роль у формуванні сайтів взаємодії гліцинового рецептора із модуляторами [14, 16 – 18, 21]. Вперше демонструючи амінокислотні залишки, що необхідні для позитивної модуляції $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів гінкголевою кислотою, ми підтвердили провідне значення амінокислот A52/G254/S296 для потенціації гліцинових рецепторів. Встановлення принципів модуляції гліцинових рецепторів та механізмів їх взаємодії з фармакологічноактивними речовинами є важливим для кращого розуміння функціонування рецептора та необхідним для розробки ліків, які могли би застосовуватись як високо специфічна терапія гіперплексії.

Г.В. Малеева^{1,2}, С. И. Булдакова¹, Г. Г. Скибо²,
П. Д. Брежестовский¹

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ $\alpha 1$ -ГЛИЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ГИНКГОЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Ранее нами было показано, что гинкголевая кислота обладает способностью избирательно потенцировать токи, опосредованные $\alpha 1$ -субъединицами глицинового рецептора. Следующим шагом стало проведение сравнительного анализа аминокислотных последовательностей $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц для определения аминокислотных остатков, которые могут быть ответственны за различия в действии гинкголевой кислоты на эти рецепторы. С использованием метода *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» нами было продемонстрировано, что мутация трех аминокислотных остатков T59/A261/A303 в $\alpha 2$ -субъединице, на соответствующие им из $\alpha 1$ -субъединицы, делает $\alpha 2$ -рецепторы чувствительными к потенцирующему влиянию гинкголевой кислоты. Амплитуда токов, опосредованных $\alpha 2$ -мутантными рецепторами, после аппликации гинкголевой кислоты увеличились на $89 \pm 14\%$. Так же, как и для $\alpha 1$ -рецепторов, для $\alpha 2$ -мутантных рецепторов было характерным сниже-

ние полуэффективной дозы для глицина под действием гинкголевой кислоты. Таким образом, субъединичная избирательность действия гинкголевой кислоты связана с тремя аминокислотными остатками, различными для $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц глицинового рецептора.

Ключевые слова: глициновый рецептор; гинкголевая кислота; ионные токи; *patch-clamp*; точечные мутации.

G. Maleeva^{1,2}, S. Buldakova¹, G. Skibo²,
P. Brejestovski¹

AMINOACID RESIDUES INVOLVED IN POSITIVE MODULATION OF $\alpha 1$ GLYCINE RECEPTORS BY GINGKOLIC ACID

Previously, we have shown that ginkgolic acid has an ability to potentiate currents, mediated by $\alpha 1$ subunits of glycine receptor. In order to define the mechanism of subunit specific action of ginkgolic acid we have performed comparative analysis of the amino acid sequences of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of glycine receptor. Amino acids that contribute to the different action of ginkgolic acid on glycine receptors formed by these subunits were determined. Using whole-cell configuration of patch-clamp recording, we have demonstrated that mutation of three residues in $\alpha 2$ subunit for corresponding ones from $\alpha 1$ subunit makes $\alpha 2$ receptors sensitive to the potentiation by ginkgolic acid. Currents, mediated by $\alpha 2$ mutant receptors, increased by $89 \pm 14\%$ after application of ginkgolic acid. Similarly to $\alpha 1$ receptors $\alpha 2$ mutant receptors have shown a decrease in EC_{50} for glycine under the action of ginkgolic acid. Thus, subunit selectivity of the ginkgolic acid is in strong connection with three amino acid residues that are different in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of glycine receptor.

Key words: glycine receptor; ginkgolic acid; ionic currents; patch-clamp; point mutations.

¹Institute de Neurosciences des Systemes, INSERM UMR 1106, Aix-Marseille Université, France ;

²Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

1. Malosio M, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. Wide spread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.* 1991; 10:2401–09.
2. Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem.* 2006; 97:1600–10.
3. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004; 84:1051–95.
4. Langosch D, Thomas L, Betz H. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:7394–98.
5. Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G. An

- intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17(1):90-8.
6. Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. Cloning and expression of the 58 kd β subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron.* 1990; 4(6):963-70.
7. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 2005; 45:727-39.
8. Dutertre S, Becker C-M, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* 2012; 287:40216-23.
9. Schaefer N, Vogel N and Villmann C. Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation? *Front Mol Neurosci.* 2012; doi: 10.3389/fnmol.2012.00098.
10. Shiang R, Ryan S, Zhu Y-Z, Hahn A, O'Connell P, Wasmuth J. Mutations in the alpha subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Gen.* 1993; 5:351-8.
11. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:519-27.
12. Maleeva G, Buldakova S, Bregestovski P. Selective potentiation of alpha 1 glycine receptors by ginkgolic acid. *Front Mol Neurosci.* 2015; doi: 10.3389/fnmol.2015.00064.
13. Yevenes GE, Zeilhofer HU. Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol.* 2011; 164:224-36.
14. Rundstrom N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D. Cyanotriphenylborate: Sybtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *PNAS.* 1994; 91:8950-4.
15. Yang Z, Cromer B, Harvey R, Parker M, Lynch J. A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem.* 2007; 103:580-9.
16. Xiong W, Cheng K, Cui T, Godlewski G, Rice KC, Xu Y, Zhang L. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nat Chem Biol.* 2011; 7(5):296-303.
17. Mascia MP, Mihic SJ, Valenzuela CF, Schofield PR, Harris RA. A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol.* 1996; 50(2):402-6.
18. Yevenes GE, Zeilhofer HU. Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. *PLoS One.* 2011; 6: e23886.
19. Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(23):2350-67.
20. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature.* 1997; 389(6649):385-9.
21. Fuentealba J, Munoz B, Yevenes G, Moraga-Cid G, Perez C, Guzman L, Rigo JM, Aguayo LG. Potentiation and inhibition of glycine receptors by tulin. *Neuropharmacology.* 2011; 60:453-9.
22. Du J, Lu W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature.* 2015; doi:10.1038/nature14853.
23. Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and heterooligomers. *EMBO J.* 1993; 12:3729-37.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.08.2015*