

Н. С. Петренко, академік НАН України О. А. Кришталь

Вплив мутацій серину 275 з “лівого плавника” P2X3 рецептора на показники активації каналу та десенситизацію

P2X3 рецептори експресуються в сенсорних нейронах і відповідають за генерацію болювих сигналів після активації їх АТФ. Вони є перспективними мішенями для анальгетичних ліків, проте до сьогодні достеменно не відома точна структура для сайту зв'язування АТФ. Цей фактор сповільнює розробку нових специфічних ліків. За допомогою гомологічної моделі P2X3 рецептора було ідентифіковано амінокислоту серин 275 з ділянки так званого “лівого плавника”, яка розташована біля імовірного сайту зв'язування АТФ і може служити потенціальним кандидатом, що фіксує агоніст у сайті зв'язування та впливає на кінетичні параметри каналу. Для перевірки даної гіпотези було сконструйовано декілька мутантних рецепторів, де серин 275 було замінено на амінокислоти з різними гідропатичними властивостями, а саме S275A, S275V та S275C. За допомогою методики петч клемпу протестовано різні мутанти і виконано порівняння їх функціональних властивостей з гідропатичним індексом для серину, аланіну, валіну, цистеїну. Показано, що серин 275 впливає на процеси десенситизації рецептора, ресенситизацію, ефективність зв'язування агоністів та амплітуду струмів, що вони генерують. Висловлено припущення, що в дикому типі рецептора серин 275 формує “кришку” для сайту зв'язування шляхом формування водневих зв'язків з агоністом. Таким чином агоніст утримується в сайті зв'язування, запобігаючи його швидкій дисоціації. Зроблено висновок, що серин 275, вірогідно, напряму контактує з агоністом, стимулюючи активацію рецептора та десенситизацію.

Однією з найбільш інтригуючих функцій зовнішньоклітинної АТФ є її роль у процесі ініціації та передачі болювого сигналу шляхом активації пуринергічних рецепторів P2X3 [1]. Периферичні АТФ-активовані P2X3 рецептори відіграють вирішальну роль при ушкодженні тканин та їх запаленні. АТФ-генеровані P2X3 рецептори експресуються в ноцицептивних нейронах і є перспективними мішенями для анальгетичних ліків [2].

Явище довготривалої десенситизації є характерною особливістю P2X3 рецепторів, залучених до процесів передачі болювих сигналів [3, 4]. Десенситизація — це інактивація рецептора при довготривалій присутності агоніста, і виникає вона після активації каналу внаслідок прикріплення агоніста до сайту зв'язування. Розвиток десенситизації залежить від рівня дисоціації агоніста із сайту зв'язування.

Нещодавно була опублікована кристалічна структура для P2X4 рецептора, у якій кожна з трьох субодиниць рецептора зображена у вигляді дельфіна, що виринає з океану (океан-плазматична мембрана) [5, 6]. Цікавою ділянкою в даній структурі є так званий “лівий плавник” — петля, яка направлена в імовірний сайт зв'язування АТФ та бере участь у взаємодіях субодиниць субодиниць і, відповідно, може відігравати важливу роль у конформаційних змінах під час зв'язування агоніста. Проте механізм та структура сайту зв'язування для АТФ ще досі точно не встановлені. Оскільки багато з пуринових рецепторів задіяні у процесах болю опосередковано з їх активацією АТФ, то розуміння вищенаведених явищ

дало б можливість розробити анальгетичні препарати, які б усували або зменшували участь пуринергічних рецепторів у механізмах ініціації та передачі болю.

На основі гомологічної моделі P2X₃ рецептора була висунута гіпотеза про важливість ролі серину 275 у процесах взаємодії з агоністом, активації та десенситизації. Тому нами, за допомогою методу петч клемпу та мутагенезу було експериментально досліджено роль амінокислоти серину 275 з “лівого плавника” на параметри функціонування P2X₃ рецептора.

Методи. *Плазмідна та трансфекція.* Для трансфекції використовували плазмідні, що містили рецептор P2X₃ у комбінації з зеленим флуоресцентним білком (enhanced green fluorescent protein (GFP)). Ген P2X₃ рецептора щура було субклоновано у pIRES2-EGFP (“Clontech”, США). Рецептори з однократною мутацією були сконструйовані за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів, що перекриваються (синтезовано “VBC-Genomics”, Австрія), та сайт-направленого мутагенезного комплексу “QuikChange II” (“Stratagene”, США) і P2X₃/pIRES2-EGFP як матриці. Правильність послідовності перевіряли. Для візуалізації трансфєкованих клітин у флуоресцентному мікроскопі застосовували зелений флуоресцентний білок (GFP). В експериментах використовували дикий тип рецептора P2X₃ (далі WT) та рецептори, мутовані в позиції серин 275 на аланін (S275A), цистеїн (S275C) або валін (S275V). Такі мутації були вибрані з огляду на гідрофобні властивості амінокислот (гідропатичний індекс або індекс гідрофобності) та структуру їх бічного ланцюга. Індекс гідрофобності амінокислоти — це число, що характеризує гідрофобні чи гідрофільні властивості її бічного ланцюга. Чим більше число гідрофобного індексу, тим більш гідрофобною є амінокислота. Найбільш гідрофобною є амінокислота ізолейцин (4,5) та валін (4,2). Найбільш гідрофільною є аргінін (-4,5) та лізин (-3,9).

Електрофізіологія. Для дослідження властивостей рекомбінантних рецепторів P2X₃ використовували лінію клітин HEK293. HEK293 були трансфєковані 2000 нг плазмідної ДНК за допомогою FuGENE 6 (“Roche Diagnostics”, США). Досліди проводили за методикою петч клемпу в конфігурації “ціла клітина” із застосуванням підсилювача НЕКА РС-10 (“НЕКА Elektronik”). Клітини постійно омивали (3 мл/хв) фізіологічним розчином, що містив, мМ: NaCl 152, KCl 2,5, глюкозу 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10 (рН доведено до 7,4 за допомогою NaOH). Скляні мікропіпетки виготовляли з легкоплавких капілярів діаметром 1,5 мм. Діаметр отвору в кінчику піпетки становив 2–3 мкм. Опір отриманих піпеток становив 3–5 МОм [7]. Піпетки заповнювали розчином такого складу, мМ: CsCl 130, EGTA 5, CaCl₂ 0,5, MgCl₂ 5, K₂АТФ 5, NaГТФ 0,5 та HEPES 10 (рН доведено до 7,2 за допомогою CsOH). Осмолярність внутрішньопіпеткового розчину доводили до 290 мОсм.

Візуалізацію трансфєкованих клітин здійснювали за допомогою флуоресцентного інвертованого мікроскопа IX-71 Olympus з фільтрами та розташованої на ньому 175 В ксенонної лампи. Підтримуваний потенціал становив -70 мВ. Дані аналізували, використовуючи програму FitMaster (“НЕКА Elektronik”) та Origin 8.0 (“Microcal”, США).

Аплікаційна система. У дослідженнях використовували агоністи P2X₃ рецепторів α , β -меАТФ та АТФ (придбані у “Sigma-Aldrich”), які розчиняли у фізіологічному розчині до фінальної концентрації перед експериментом. Аплікацію агоністів (час зміни розчину 20–40 мс) здійснювали за допомогою швидкої перфузійної системи RSC-200 (“BioLogic Science Instruments”).

Аналіз даних. Дані наведено як середнє значення \pm стандартна похибка (*SE*) середнього (*n* — число клітин). Статистичну достовірність оцінено за допомогою *t*-тесту Стьюдента для

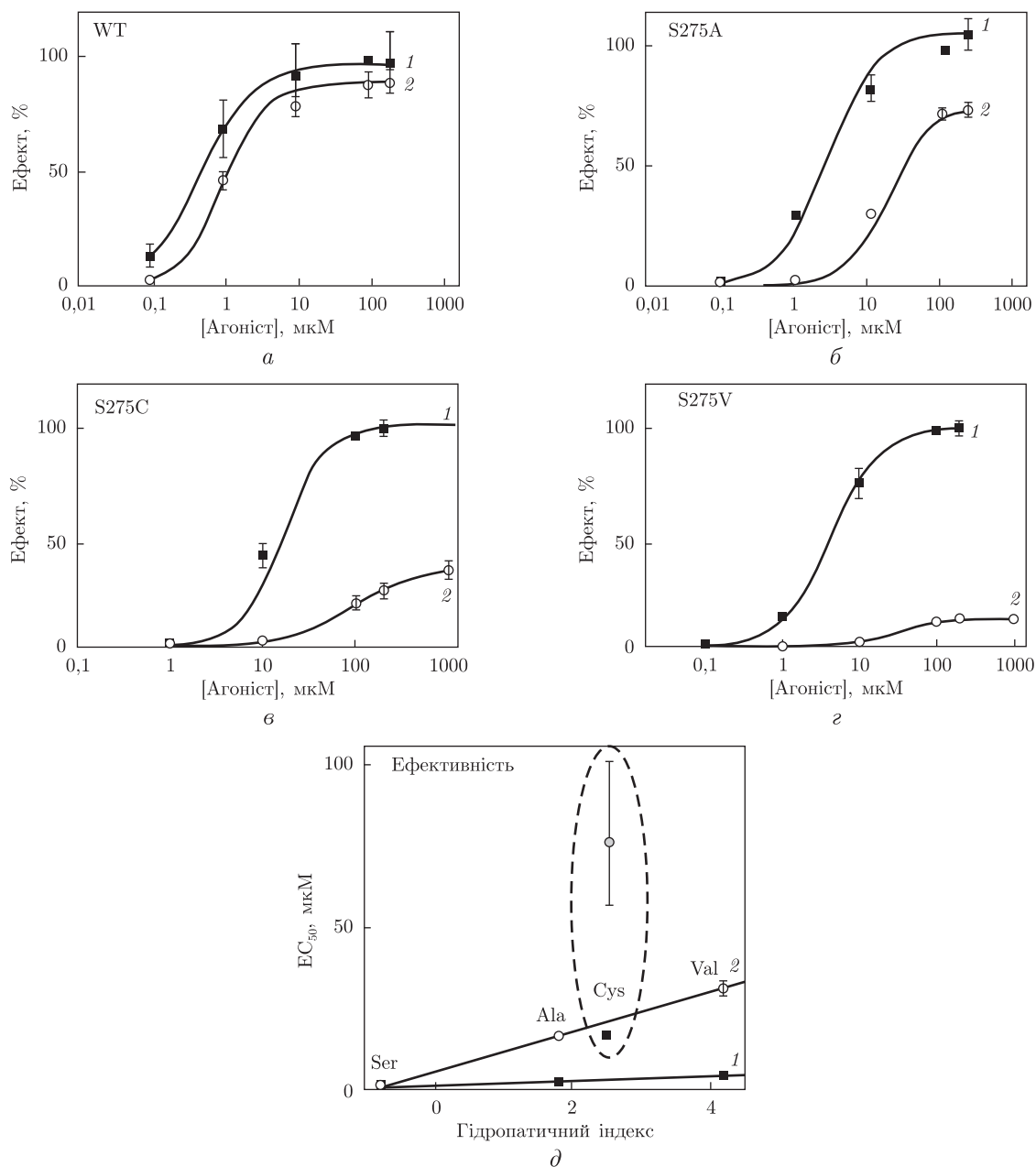


Рис. 1. Порівняння впливу різних неполярних амінокислот у позиції 275 на параметр EC_{50} в рецепторі P2X3. На графіку наведені зміни в значеннях EC_{50} для АТФ (1) та α, β -меАТФ (2) як функція гідропатичного індексу. Лінійне апроксимування застосовувалося для S275 (Ser), S275A (Ala) та S275V (Val). Зауважимо, що EC_{50} для S275C (Cys) не використовувався в апроксимуванні (окреслені штриховою лінією). Дані отримані з 4–10 клітин

параметричних даних чи тесту Манна–Уїтні для непараметричних даних з використанням GraphPad Prism 4.03 (“GraphPadSoftware Inc.”, США) або Origin 8.0 (“Microcal”). Рівень значущості $P < 0,05$ був обраний за індикатор достовірної різниці.

Результати. Сумарні графіки, що описують результати різних замін серину 275 у P2X рецепторі, наведені на рис. 1–4. Спочатку проводилися експерименти, в результаті яких бу-

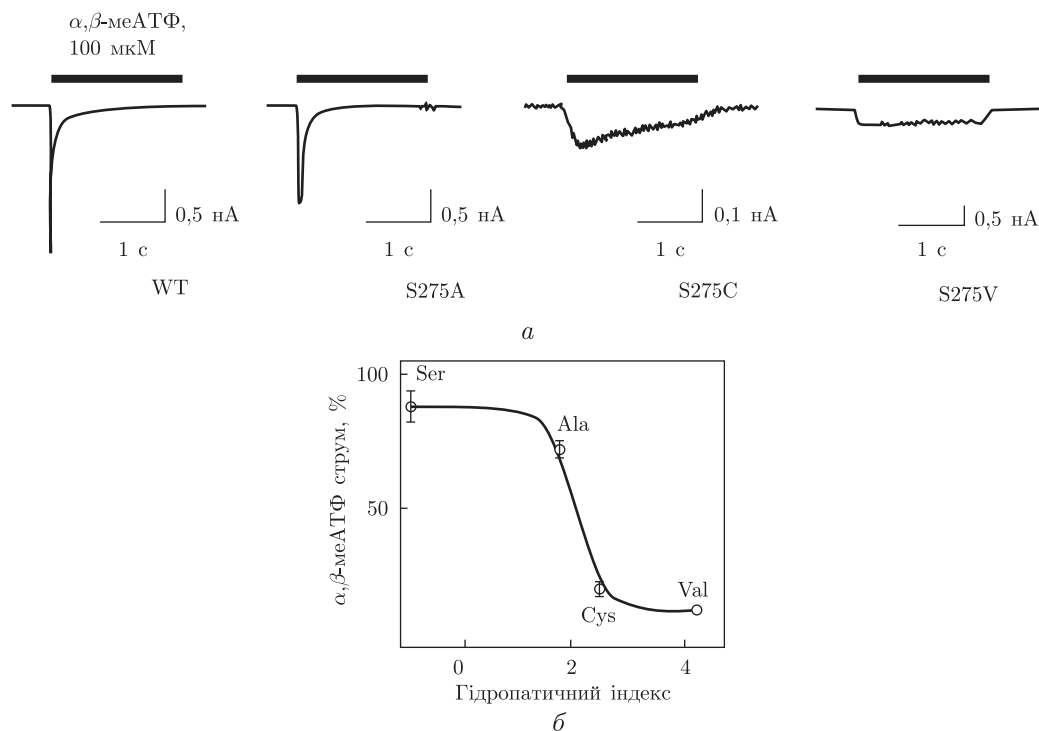


Рис. 2. Порівняння струмів різних мутантів, викликаних прикладанням α, β -меАТФ у концентрації 100 мкМ. *a* — приклади α, β -меАТФ струмів у WT (Ser), S275A (Ala), S275C (Cys) та S275 V (Val); *б* — сигмоїда, що сполучає точки максимального струму, індукованого 100 мкМ α, β -меАТФ у S275, S275A, S275C та S275V формах. Результати нормалізовані до відповідей, індукованих 100 мкМ АТФ. Дані отримані з 4–10 клітин

ли побудовані криві доза–ефект для α, β -меАТФ та АТФ у дикому типі рецептора та трьох мутантах і обчислені значення EC_{50} (рис. 1, *a–г*). В ряді мутантних рецепторів з вмістом серин–аланін–валін параметр EC_{50} для α, β -меАТФ лінійно зростає, пропорційно до значень гідропатичного індексу амінокислот. Збільшення значень EC_{50} говорить про підвищення порогу активації рецептора для того чи іншого агоніста (див. рис. 1, *д*). Мутація серину на цистеїн підвищила поріг активації більше, ніж аналогічна мутація з валіном (проте гідропатичний індекс цистеїну менший за такий для валіну (див. рис. 1, *в, г*). Подібні результати отримані і для АТФ (див. рис. 1).

Наступним кроком було порівняння струмів різних мутантів, викликаних прикладанням α, β -меАТФ у концентрації 100 мкМ на 2 с (рис. 2). Амплітуда струмів для α, β -меАТФ (як процентна частка від відповідей на прикладання 100 мкМ АТФ) зменшувалася в ряді серин–аланін–цистеїн–валін з різким зниженням амплітуди для найбільш гідрофобних амінокислот: цистеїну і валіну (див. рис. 2, *б*).

За рахунок зміщення параметра EC_{50} у правий бік кривої доза–ефект для α, β -меАТФ та АТФ у концентрації 100 мкМ кінетичні параметри активації та деактивації струмів були також сповільнені. Стала часу десенситизації зростала монотонно (рис. 3). Так, у дикому типі рецептора, що представлений серином у позиції 275, струм швидше переходив у десенситизований стан порівняно з мутантом S275A. На противагу дикому типу рецептора, в мутантному S275A рівень десенситизації був значно зміненим: час спаду струму був сповільнений у 13 разів для α, β -меАТФ ($n = 10$), у 2 рази для АТФ ($n = 8$) порівняно з WT.

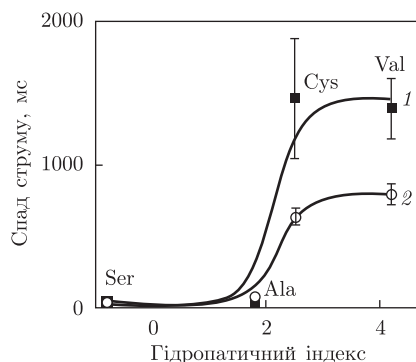


Рис. 3. Порівняння впливу різних неполярних амінокислот у позиції 275 на процес ініціації десенситизації в рецепторі P2X3. На графіку наведені зміни в значеннях константи часу спаду струму для АТФ (1) та α, β -меАТФ (2) як функція гідропатичного індексу для S275, S275A, S275C та S275V. Дані отримані з 4–10 клітин

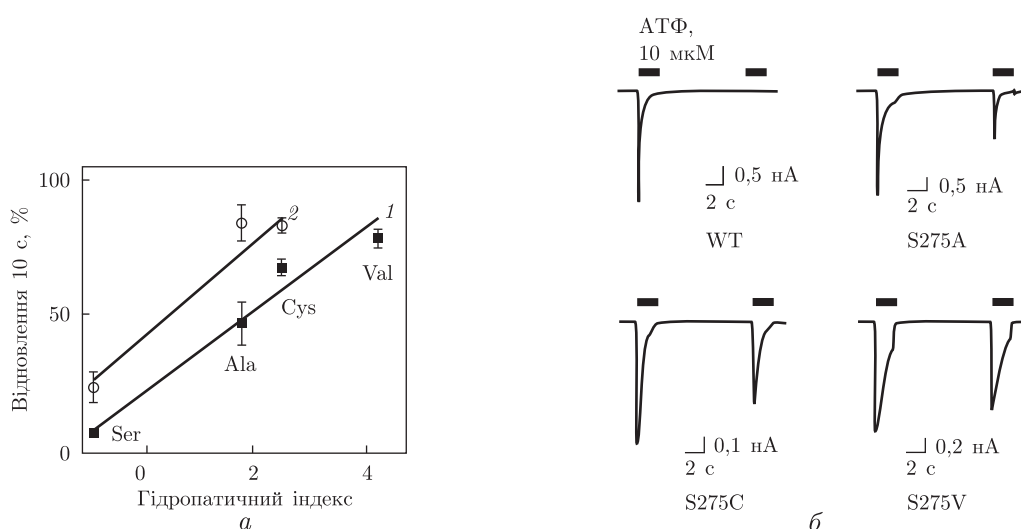


Рис. 4. Порівняння впливу різних неполярних амінокислот у позиції 275 на процес відновлення з десенситизації рецептора P2X3. *a* — на графіку наведені значення відновлення з десенситизації (дані 10 с парного протоколу, як частка від першого тестового струму) для АТФ (1) та α, β -меАТФ (2) як функція гідропатичного індексу для S275, S275A, S275C та S275V, зауважимо лінійний характер функції апроксимування; *б* — приклади парних протоколів з 10 с інтервалом для АТФ. Дані отримані з 4–10 клітин

У мутантних рецепторах S275C та S275V процес ініціації десенситизації був ще більш сповільнений (див. рис. 3).

Для дослідження процесу відновлення рецептора з десенситизації також були використані парні протоколи. Після отримання першого тестового струму другий запис генерувався з інтервалом в 10 с для агоністів α, β -меАТФ та АТФ в дикому та мутантних типах рецепторів. І час, потрібний для відновлення рецептора, зменшувався майже лінійно, корелюючи з гідропатичним індексом (рис. 4).

Обговорення результатів. Базуючись на даних досліджень гомологічної моделі P2X3 рецептора щура, була ідентифікована амінокислота серин 275, що розташована у “лівому плавнику” в межах ектодомену, як один з найважливіших учасників сайту зв’язування агоніста. Відповідно до наших припущень були проведені експерименти з тестування декількох

мутантів серину в позиції 275 і була підтверджена важлива роль цієї амінокислоти у формуванні десенситизації і чутливості до АТФ та α, β -меАТФ.

P2X3 рецептори активуються різними агоністами, в тому числі α, β -меАТФ [4, 8, 9], що активний лише у P2X1 та P2X3 рецепторах [10]. Зважаючи на це, ми протестували α, β -меАТФ та АТФ, що були повними агоністами дикого типу рецептора P2X3. Проте в мутантному рецепторі S275A α, β -меАТФ став лише частковим агоністом. Тести з α, β -меАТФ, проведені на мутантних рецепторах S275C та S275V, показали ще більш значні зменшення в амплітуді струмів. Виходячи з цього, можна припустити, що бічний ланцюг серину 275 відіграє важливу роль у зв'язуванні агоніста, особливо α, β -меАТФ. Це можна пояснити наявністю розташованих поряд позитивно заряджених залишків амінокислот, що були ідентифіковані в попередніх дослідженнях і які залучені до зв'язування агоніста [5, 11]. Важливо, що, на противагу серину 275, сусідній серин 269 не бере участі у зв'язуванні агоністів [12, 13]. Це узгоджується з його периферійним розташуванням на зовнішній частині білка в гомологічній моделі.

Поряд зі збільшеним значенням показника EC_{50} ми також виявили, що в мутантному рецепторі S275A час наростання струму до пікового значення, активований α, β -меАТФ, був довшим, ніж у дикому типі рецептора. Це може бути пов'язано з більш слабким зв'язуванням агоніста чи швидкою дисоціацією. Тому можна припустити, що в рецепторах, в яких відсутній серин 275, треба більше часу для зв'язування агоніста в сайті та перенесення конформаційних змін у трансмембранну зону для відкриття каналу.

Відмінності у властивостях десенситизації були ще більш значними в дикому типі P2X3 порівняно з мутантними рецепторами. У мутантних різновидах здатність рецептора до десенситизації була зменшена під впливом усіх агоністів, тоді як у дикому типі вони швидко десенситизували рецептор. Така слабка активність агоністів у мутантних рецепторах може бути пов'язана повільним зв'язуванням чи швидкою дисоціацією.

Дослідити процес дисоціації агоніста з рецептора на завжди вдається за допомогою електрофізіологічного обладнання. Проте оскільки у P2X3 рецепторі дисоціація агоніста — це обмежуючий фактор повільного відновлення з десенситизації, то рівень дисоціації можна оцінити, використовуючи так звані парні протоколи для струму [4]. З використанням даних протоколів ми показали, що для мутантних рецепторів відновлення з десенситизації відбувалося набагато швидше. Це свідчить про те, що дисоціація агоніста здійснюється набагато швидше, коли “лівий плавник” модифікований і бічний ланцюг серину 275 відсутній. Ми припускаємо, що у WT агоніст зазвичай перебуває в пастці, ніби прикритий так званим “лівим плавником” на вході до сайту зв'язування. Таким чином, “лівий плавник” може служити “кришкою”, в якій бічний ланцюг S275 знаходиться в контакті з лігандною молекулою, перешкоджаючи її швидкій дисоціації. Коли ми замінили серин на аланін, ефективність “кришки” зменшилася внаслідок відсутності полярної групи в аланіні, що, вірогідно, бере участь у формуванні водневого зв'язку з агоністом. Можливо, що, застосовуючи більш гідрофобні та громіздкі амінокислоти, такі як цистеїн та валін, ми забезпечили додаткові стеричні взаємодії з певними агоністами (α, β -меАТФ), і це пояснює статистично достовірне зниження амплітуди струму в мутантних рецепторах S275C та S275V. Наведені результати свідчать про можливість полярної взаємодії між бічним ланцюгом серину 275 та молекулою агоніста.

Таким чином, показано, що серин 275 відіграє важливу роль в процесах зв'язування/вивільнення агоністів із сайту зв'язування рецептора шляхом закриття входу до сайту, опосередкованого бічним ланцюгом серину 275. Висунуто гіпотезу про те, що серин 275 може безпосередньо взаємодіяти з АТФ та його аналогами, контролювати рівень асоціації

та дисоціації агоністів, що обумовлюють такі характеристики, як десенситизація та показники активації каналу тощо.

1. *Burnstock G., Wood J. N.* Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1996. – **6**, No 4. – P. 526–532.
2. *North R. A.* The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2003. – **4**, No 7. – P. 833–840.
3. *North R. A.* Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol Rev.* – 2002. – **82**, No 4. – P. 1013–1067.
4. *Sokolova E., Skorinkin A., Moiseev I. et al.* Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – **70**, No 1. – P. 373–382.
5. *Kawate T., Michel J. C., Birdsong W. T. et al.* Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state // *Nature.* – 2009. – **460**, No 7255. – P. 592–598.
6. *Hattori M., Gouaux E.* Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors // *Nature.* – 2012. – **485**, No 7397. – P. 207–212.
7. *Sakmann B., Neher E.* Single-channel recording. – New York etc.: Springer Science+Business Media, LLC, 2009. – 700 p.
8. *North R. A., Surprenant A.* Pharmacology of cloned P2X receptors // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2000. – **40**, No 563–80. – P. 563–580.
9. *Sokolova E., Skorinkin A., Fabbretti E. et al.* Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation // *Brit. J. Pharmacol.* – 2004. – **141**, No 6. – P. 1048–1058.
10. *Evans R. J.* Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action // *Ibid.* – 2010. – **161**, No 5. – P. 961–971.
11. *Khakh B. S., North R. A.* P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease // *Nature.* – 2006. – **442**, No 7102. – P. 527–532.
12. *Stanchev D., Flehmig G., Gerevich Z. et al.* Decrease of current responses at human recombinant P2X3 receptors after substitution by Asp of Ser/Thr residues in protein kinase C phosphorylation sites of their ecto-domains // *Neurosci. Lett.* – 2006. – **393**, No 1. – P. 78–83.
13. *Petrenko N., Khafizov K., Tvrdonova V. et al.* Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor // *Biochemistry.* – 2011. – **50**, No 39. – P. 8427–8436.

Міжнародний центр молекулярної фізіології
НАН України, Київ
А. І. Віртанен Інститут молекулярних наук,
Куопіо, Фінляндія

Надійшло до редакції 08.10.2012

Н. С. Петренко, академик НАН України О. А. Кришталь

Влияние мутаций серина 275 с “левого плавника” P2X3 рецептора на показатели активации канала и десенситизацию

P2X3 рецепторы экспрессируются в сенсорных нейронах и отвечают за генерацию болевых сигналов после активации их АТФ. Они являются перспективными мишенями для анальгетических лекарств, однако до сих пор точно не известна точная структура для сайта связывания АТФ. Этот фактор замедляет разработку новых специфических лекарств. С помощью гомологической модели P2X3 рецептора была идентифицирована аминокислота серин 275 с участка так называемого “левого плавника”, расположенная возле предполагаемого сайта связывания АТФ и которая может служить потенциальным кандидатом, фиксирующим агонист в сайте связывания и влияющим на кинетические параметры канала. Для проверки данной гипотезы было сконструировано несколько мутантных рецепторов, где серин 275 был заменен на аминокислоты с разными гидропатическими свойствами, а именно S275A, S275V и S275C. С помощью методики пэтч клэмп протестированы различные му-

танты и проведено сравнение их функциональных свойств с гидропатическим индексом для серина, аланина, валина, цистеина. Показано, что серин 275 влияет на процессы десенситизации рецептора, ресенситизацию, эффективность связывания агонистов и амплитуду токов, которые они генерируют. Высказано предположение, что в диком типе рецептора серин 275 формирует “крышку” для сайта связывания путем формирования водородных связей с агонистом. Таким образом агонист удерживается в сайте связывания, что предотвращает его быструю диссоциацию. Сделан вывод, что серин 275, вероятно, напрямую контактирует с агонистом, стимулируя активацию рецептора и десенситизацию.

N. S. Petrenko, Academician of the NAS of Ukraine **O. O. Krishtal**

Effect of serine 275 mutations from the “left flipper” of P2X3 receptor on the receptor activation and desensitization

P2X3 receptors expressed in sensory neurons are responsible for generation of pain signals after activation by extracellular ATP. P2X3 receptor is a prospective target for analgesic drugs, however, the structure of ATP binding site is not known in such details which can help to design new specific ligands. Using the homology model of P2X3 receptor, we identified serine 275 from the region of so-called “left flipper”, which is located near the hypothetical ATP binding site as a potential candidate for the capture of the agonist in the binding pocket and affects channel kinetic characteristics. To explore this hypothesis, we generated several mutants where serine 275 was substituted with aminoacids with variable hydrophobic properties: S275A, S275V and S275C. Using patch clamp technique we tested these mutants and compared their functional properties with the hydropathy indices for serine, alanine, valine, cysteine. It is shown that serine 275 takes part in the processes of receptor desensitization and resensitization and influences the efficiency of agonist binding and the generated current amplitude. We suggest that serine 275 in the WT P2X3 receptor shapes a cap for the binding pocket, by forming H-bonds with the agonist and, in such way, capturing agonist in the binding site, preventing its fast dissociation. Taken together, our results suggest that serine 275 probably directly interacts with the agonist to promote receptor activation and desensitization.