

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Матяш Віталій Вікторович.

УДК 612. 82. 014.3: 547. 466.6

ЕКСПРЕСІЯ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ  
ГЛЮТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ В КЛІТИНАХ  
БЕРГМАНІВСЬКОЇ ГЛІЇ МОЗОЧКА МИШЕЙ

<sup>05</sup>  
03.00.02- Біофізика

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ-1997



Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті Фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та Центрі Молекулярної Медицини ім. Макса Дельбрюка, Берлін, Германия

Науковий керівник: доктор медичних наук  
Верхратський Олексій Несторович,  
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України, пр.н.сп.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, член-кор. НАН України  
Кришталь Олег Олександрович  
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України, завідуючий відділом.

доктор біологічних наук  
Костерін Сергій Олексійович  
Інститут біохімії ім. О.О. Палладіна  
НАН України, завідуючий відділом.

Провідна установа: Інститут Молекулярної Біології та Генетики  
НАН України, відділ структури та функцій  
нуклеїнових кислот, м. Київ.

Захист відбудеться „18” листопада 1997 р. о 14<sup>00</sup> годині на  
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.13.01 при Інституті Фізіології ім.  
О.О. Богомольця НАН України за адресою: 252024 м. Київ-24, вул.  
Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту Фізіології ім. О.О.  
Богомольця НАН України.

Автореферат розіслано „15” листопада 1997 року.

Вчений Секретар

Спеціалізованої вченої ради,  
доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

**Актуальність проблеми.** Іони кальцію відіграють важливу роль в регуляції клітинних процесів, виступаючи в ролі вторинного посередника в усіх типах еукаріотичних клітин. Внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію регулюється активністю ряду клітинних структур: потенціал- та хемокерованих каналів, метаботропних рецепторів, кальцієвих насосів та обмінників плазматичної мембрани, а також внутрішньоклітинних кальцієвих депо та розчинними кальцієвими буферами цитоплазми.

Функціонування вказаних систем досить детально вивчено в нервових та м'язових клітинах, проте відносно мало відомо про механізми кальцієвої сигналізації в гліальних клітинах, зокрема в клітинах астроглії. В цих клітинах головуюча роль у генерації кальцієвих сигналів належить метаботропним та іонотропним мембранним рецепторам, які відіграють важливу роль в нейрогліальній взаємодії. Тому дослідження експресії астроцитами різних типів нейромедіаторних рецепторів, а також молекулярних механізмів, що лежать в основі кальцієвих сигналів, виникаючих при активації цих рецепторів, становить науковий інтерес. Крім того, цікавим є порівняння наборів рецепторів, що експресуються в нервово-гліальній парі, котру можна визначити як функціональну одиницю нервово-гліальної мережі.

**Мета та задачі роботи.** Мета роботи полягала у вивченні кальцієвих сигналів, що виникають при активації нейромедіаторних рецепторів в клітинах Бергманівської глії та нейронах Пуркін'є.

Для досягнення вказаної мети були сформульовані наступні задачі:

1. Розробити методику реєстрації змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в клітинах Бергманівської глії в гостроізольованих зрізах мозочка мишей.
2. Встановити типи нейротрансмітерних рецепторів, що експресуються клітинами Бергманівської глії, та вивчити їх функціональні властивості, використовуючи біофізичні та молекулярнобіологічні методи.
3. Провести аналогічне дослідження властивостей рецепторів в нейронах Пуркін'є.

**Наукова новизна.** Вперше показана експресія клітинами Бергманівської глії метаботропних глутаматних рецепторів mGluR1 і mGluR5. Показана відсутність в цих клітинах іонотропних глутаматних рецепторів кайнатного типу. Вперше показано, що клітини Бергманівської глії та нейронами Пуркін'є експресують практично однаковий набір рецепторів.

**Теоретичне та практичне значення роботи.** Одержані дані є основою для подальшого вивчення нейро-гліальної взаємодії в центральній нервовій системі, зокрема для встановлення механізмів участі гліальних клітин в забезпеченні синаптичної передачі.

**Апробація роботи.** Основні положення роботи доповідались і обговорювались на I конгресі нейробиологічного товариства Германії (1996), конференціях фізіологічного товариства Великобританії (1995, 1996), Європейській гліальній конференції (1997), на семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ) та Центру Молекулярної Медицини ім. М. Дельбрюка (Берлін). За матеріалами дисертації опубліковано 3 роботи.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису методів дослідження, результатів дослідження, обговорення результатів, висновків та списку літератури із 196 джерел. Робота викладена на 130 сторінках та ілюстрована 23 рисунками.

#### **Декларація конкретного особистого внеску дисертанта в розробку наукових результатів.**

1. Показана експресія в клітинах Бергманівської глії метаботропних глутаматних рецепторів mGluR1 та mGluR5, а також встановлено набір субодиниць, з яких складаються іонотропні глутаматні рецептори AMPA типу в цих клітинах (GluRA, GluRD).
2. Досліджені механізми глутаматіндукованого підвищення внутрішньо-клітинної концентрації іонів кальцію в клітинах Бергманівської глії.
3. Досліджено набір нейротрансмітерних рецепторів в нейронах Пуркін'є, та встановлено, що він є практично ідентичним з набором нейротрансмітерних рецепторів в клітинах Бергманівської глії.

#### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Об'єкт досліджень.** Дослідження проводились на гостроізолюваних парасагітальних зрізах мозочку мишей лінії NMRI віком від 20 до 30 діб. Мишей забивали декапітацією, виділяли мозочок, та прикріпляли його цианоакрилатним клеєм до камери вібратора, заповненого охолодженим сольовим розчином. Товщина зрізів була 200 мкм. Зрізи переносили в постійно насичуваний карбогеном (5% CO<sub>2</sub> + 95% O<sub>2</sub>) карбонатний фізіологічний розчин і зберігали до використання при кімнатній температурі.

**Електрофізіологічні вимірювання.** Для реєстрації трансмембранних струмів був використаний метод *patch-clamp* в конфігурації *whole-cell*. Мікроелектроди, виготовлені з боросилікатного скла, мали опір 5 - 6 МОм. Реєстрація проводилась за допомогою підсилювача ЕРС-7 чи ЕРС-9 (List Electronics, Німеччина). Результати обробляли за допомогою комп'ютерної програми WINTIDA (НЕКА Electronic, Німеччина).

**Методи введення кальцієвих індикаторів в цитоплазму клітин.** При роботі з клітинами методом *patch-clamp* кальцієві індикатори (fura-2 або Oregon Green ВАРТА-1) входили до складу внутрішньоклітинного розчину. При загрузці клітин мембранопроникною формою кальцієвого зонда fura-2 (fura-2/AM), зрізи

витримували на протязі 30 - 40 хвилин в зовнішньоклітинному розчині, що містив 5 ммоль/л fura-2/AM при температурі 37°C.

**Методи реєстрації кальцієвих сигналів.** Виміри концентрації іонів кальцію в клітинах, заповнених індикатором fura-2, проводили з використанням однодетекторної двохвильової кальцієвої системи (Luigs-Neumann GmbH, Німеччина), або методом цифрової відеомікроскопії. Для збудження флуоресценції використовували довжини хвиль 360 та 380 нм, реєстрацію проводили на довжині хвилі 510 нм. Для реєстрації кальцієвих сигналів в клітинах, заповнених індикатором Oregon Green BAPTA-1, був використаний конфокальний лазерний скануючий мікроскоп ODYSSEY XL (Noran Instruments, США). Кальцієві сигнали, отримані за допомогою зонду Oregon Green BAPTA-1, наведені у відношенні вимірюемого сигналу до сигналу у стані спокою, тобто на початку досліджу.

**Вивчення експресії mPDK, що кодує глутаматні рецептори в поодиноких клітинах методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).** Після закінчення електрофізіологічних досліджень, вміст клітин забирався в мікроелектрод докладанням до нього від'ємного тиску. Мікроелектроди були заповнені розчином, який містив (в ммоль/л): 130 KCl, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 3 MgCl<sub>2</sub>, 3 Na<sub>2</sub>ATФ, 10 HEPES, pH7,2. Після цього, вміст електроду (об'ємом приблизно 6 мкл) переносили в стерильну пробірку для ПЛР, яка містила 0,5 мкл 10 ммоль/л dNTPs (Boehringer Mannheim), 1 мкл 0,1 ммоль/л DTT (Gibco-BRL), 0,5 мкл 30 U/мкл RNAsin (Promega) та 0,5 мкл 200 U/мкл зворотної транскриптази (Superscript II, Gibco-BRL), загальний об'єм реакційної суміші становив приблизно 10 мкл. Після інкубації при 37°C на протязі 1 години для синтезу кДНК, реакцію зупиняли охолодженням до -20°C. Одержану в результаті цієї реакції кДНК використовували для подальшого аналізу полімеразною ланцюговою реакцією. ПЛР проводили в програмованому термоконтролері PCR9600 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). Після початкової денатурації (94°C, 5 хв.) проводили 40 циклів ампліфікації (денатурація 94°C, 30 сек.; відпалювання 50°C, 30 сек.; елонгація 72°C, 30 сек. (+ 1 сек./цикл)) та кінцеву елонгацію - 72°C, 10 хв.). Для підвищення специфічності була використана *nested*-стратегія ПЛР, при цьому 1 мкл продукту першого раунду ПЛР використовували для реампліфікації з іншою парою праймерів, другий раунд ПЛР проводили, як описано вище, але температура відпалювання була 55°C. Щоб запобігти отриманню помилково-позитивних результатів за рахунок ампліфікації геномної ДНК, позиції праймерів були вибрані на різних екзонах. Для ампліфікації mGluR1 були використані наступні праймери: 5'-праймер АТГ ГАТ ГТГ ЦАГ АЦА ГАГ АТГ АА, 3'-праймер ГТЦ ААГ ААА АЦЦ ЦГА ТТГ ЦТА Т, та *nested* 3г'-праймер ЦАТ ГТС АТА ГАТ ГТЦ АТТ ГАТ Г. Для mGluR5: 5'-праймер ТТГ ГГА ГЦА АЦТ АЦА АЦА ТЦА ТЦА Ц, *nested* 5г'-праймер ТАЦ АТЦ АТЦ ЦТТ ГЦЦ ААА ЦЦТ ГАГ А та 3'-

праймер ГТГ ТТТ ГАТ ГАС ТГЦ СГТ ТТГ ГТТ. Для ампліфікації субодиниць AMPA-рецепторів були використані наступні праймери: 5'-праймер ЦЦТ ЦТА ГЦТ ТАТ ГАА АТЦ ТТГ АТГ ТГ, 3'-праймер ТЦГ ТАЦ ЦАЦ ЦАТ ТТГ ЦТТ ТТС А, *nested* 5'-праймер ГЦГ ААТ ТЦТ ТТГ ГЦЦ ТАТ ГАГ АТЦ ЕГГ АТГ ТГ, *nested* 3'-праймер ГЦГ ГТА ЦЦА АГТ ТТЦ ЦТЦ ЦАА ЦТТ ТЦА ТТГ Т. Продукти ПЛР аналізували електрофорезом в 2% агарозному гелі. У випадку mGluR1 та mGluR5 специфічність ампліфікованих фрагментів перевіряли секвенуванням. У випадку субодиниць AMPA рецепторів для визначення типів субодиниць був використаний рестриктазний аналіз.

**Розчини.** Стандартний сольовий розчин містив (у ммоль/л): NaCl - 125, KCl - 3, CaCl<sub>2</sub> - 2,5, MgCl<sub>2</sub> - 1, NaHCO<sub>3</sub> - 26, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,8, глюкоза - 10 (pH=7,4). У безкальцієвому розчині кальцій було замінено еквімолярно на магній та додано 1ммоль/л EGTA. Внутрішньоклітинний розчин містив (у ммоль/л): KCl - 130, MgCl<sub>2</sub> - 3, Na<sub>2</sub>ATФ - 2, NEPEP - 10 (pH=7,4) и 200 мкмоль/л fura-2/K<sub>5</sub> або 500мкмоль/л Oregon Green BAPTA-1/K<sub>6</sub> (Molecular Probes, Eugene, USA). Аплікацію біологічно активних речовин проводили заміною розчину, яким проводили перфузію камери. Швидкість потоку розчину можна було змінювати від 1 до 20 мл/хв. (при об'ємі камери 0,5 мл). Досліди проводили при кімнатній температурі (22 - 24°C).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Кальцієві транзйенти, що викликаються глутаматом та його аналогами у клітинах Бергманівської глії

Аплікація глутамату в концентраціях від 30 до 100 мкмоль/л на протязі 10 с, викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в усіх досліджених клітинах (n=22). Пороговою концентрацією, достатньою для ініціації сигналу, було 10 мкмоль/л, відповіді досягали максимальної амплітуди при концентраціях глутамату 300 - 1000мкмоль/л (рис. 1). Інкубація зрізів мозочка на протязі 5 хв. в присутності 1мкмоль/л тетродотоксина не призводила до помітних змін глутамат - індукваного підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  (n=24).

Для встановлення типів глутаматних рецепторів, що приймають участь у генерації кальцієвих сигналів, було досліджено дію агоністів глутаматних рецепторів, здатних селективно активувати різні підтипи цих рецепторів (рис. 2). Аплікація квісквалату, який є активатором як іоно-, так і метаботропних GluR, викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в усіх досліджених клітинах (n=37).

Аплікація селективного активатора метаботропних GluR 1-аміно-циклопентан-1,3-дикарбоксилату ((1S,3R)-ACPD) викликала кальцієві транзйенти лише в 9 з 39 досліджених клітин. Каїнат - активатор іотропних GluR AMPA та каїнатного підтипів, викликав значне підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в усіх досліджених клітинах

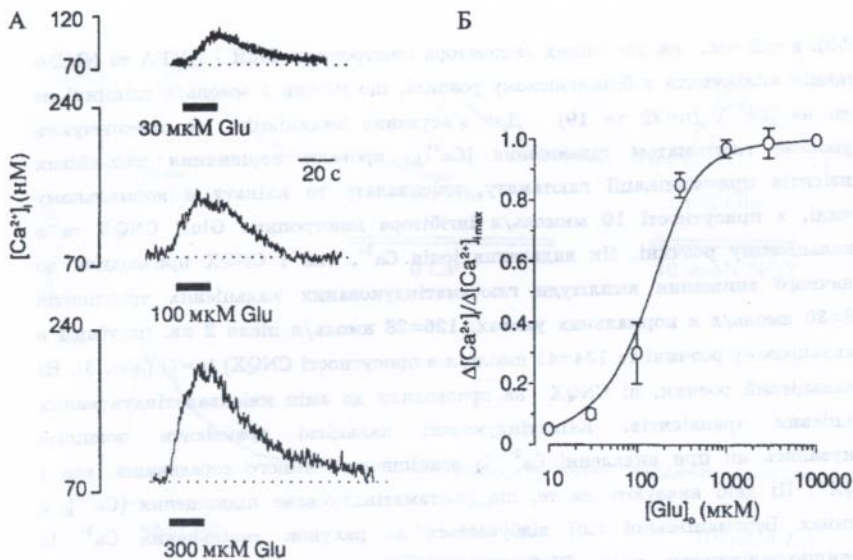


Рис. 1. Залежність амплітуди глутаматіндукованих кальцієвих транзєнтів від концентрації глутамату в зовнішньоклітинному розчині. А: три репрезентативних кальцієвих транзєнта зарєєстрованих у відповідь на аплікацію різних концентрацій глутамату. Б: Крива доза-ефект була отримана на основі 12 дослідів. Величини кальцієвих транзєнтів були нормалізовані до амплітуди кальцієвого транзєнта при аплікації 10 ммоль/л глутамата. Величина  $EC_{50}$  для глутамату становила 132 мкмоль/л.

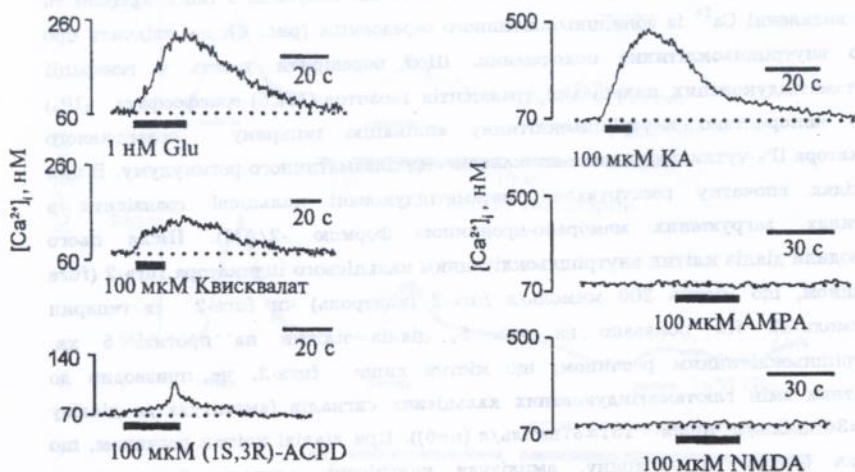


Рис. 2. Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію при аплікації агоністів глутаматних рецепторів.

( $n=59$ ), в той час, як два інших активатора іонотропних GluR - AMPA та NMDA (останній аплікували в безмагнієвому розчині, що містив 1 ммоль/л гліцину) не діяли на  $[Ca^{2+}]_i$  ( $n=22$  та 19). Для з'ясування механізмів, що забезпечують індуковане глутаматом підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ , провели порівняння кальцієвих транзєнтів при аплікації глутамату, квїсквалату та кайнату в нормальному розчині, в присутності 10 мкмоль/л інгібітора іонотропних GluR CNQX та в безкальцієвому розчині. Як видалення іонів  $Ca^{2+}$ , так і CNQX призводили до незначного зниження амплїтуди глутаматїндукованих кальцієвих транзєнтів ( $158 \pm 30$  нмоль/л в нормальних умовах,  $126 \pm 28$  нмоль/л після 2 хв. їнкубації в безкальцієвому розчині та  $134 \pm 41$  нмоль/л в присутності CNQX) ( $n=7$ ) (рис. 3). Нї безкальцієвий розчин, нї CNQX не призводили до змін квїсквалатїндукованих кальцієвих транзєнтів. Кайнатїндукованї кальцієвї транзєнти повністю блокувались як при видаленнї  $Ca^{2+}$  їз зовнїшньоклітинного середовища, так і CNQX. Цї данї вказують на те, що глутаматїндуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в клітинах Бергманївської глїї відбувається за рахунок вивільнення  $Ca^{2+}$  їз внутрїшньоклітинних депо. Щоб перевірити це припущення, була вивчена здатність фармакологічних агентів, що специфічно взаємодїють з внутрїшньоклітинними кальцієвими депо (тапсигаргїн та гепарин), модулювати глутаматїндукованї кальцієвї сигнали в клітинах Бергманївської глїї. Амплїтуди глутаматїндукованих кальцієвих транзєнтів після їнкубації з тапсигаргїном були набагато нижчі ( $90 \pm 35$  нмоль/л) нїж до їнкубації ( $163 \pm 40$  нмоль/л). Повторна аплікація глутамату в присутності тапсигаргїну викликала кальцієвий транзєнт з амплїтудою лише  $45 \pm 20$  нмоль/л. Амплїтуда цього тапсигаргїнечутливого компоненту не змїнювалась навіть після 40 - 60 хв. їнкубації з тапсигаргїном та при видаленнї  $Ca^{2+}$  їз зовнїшньоклітинного середовища (рис. 4), що свїдчить про його внутрїшньоклітинне походження. Щоб перевірити участь у генерації глутаматїндукованих кальцієвих транзєнтів їнозитол-(1,4,5)-трїсфосфату ( $IP_3$ ) було використано внутрїшньоклітинну аплікацію гепарину - селективного блокатора  $IP_3$ -чутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулуму. В цих дослїдах спочатку реєстрували глутаматїндукованї кальцієвї транзєнти в клітинах, загрузених мембрано-проникною формою -2/AM). Після цього проводили діалїз клітин внутрїшньоклітинним кальцієвим індикатором fura-2 (fura розчином, що містив 200 мкмоль/л fura-2 (контроль) чи fura-2 та гепарин (5 мкмоль/л). Як показано на рис. 5, діалїз клітин на протязї 5 хв. внутрїшньоклітинним розчином, що містив лише fura-2, не призводив до помітних змін глутаматїндукованих кальцієвих сигналів (амплїтуда до діалїзу  $155 \pm 34$  нмоль/л, після -  $151 \pm 37$  нмоль/л ( $n=6$ )). При діалїзі клітин розчином, що містив 5 мкмоль/л гепарину, амплїтуди кальцієвих сигналів були значно

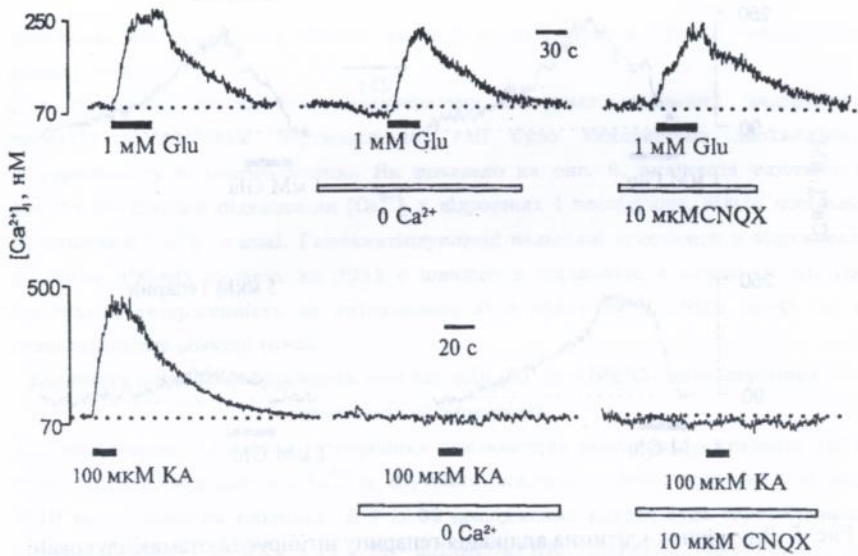


Рис. 3. Зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$  під час аплікації глютамату та кайнату в безкальцієвому розчині чи в присутності CNQX

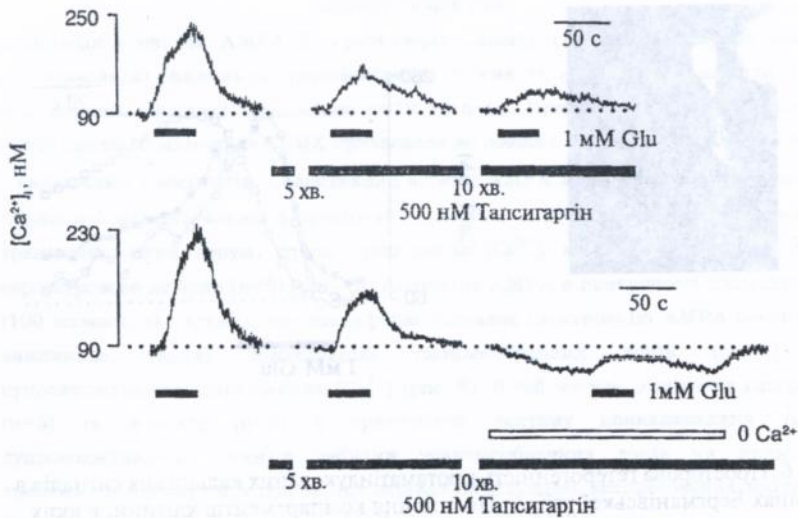


Рис. 4. Інкубація зрізів мозочка в присутності тапсигаргину призводить до інгібування глютамаціїндукованих кальцієвих транзєнтів.

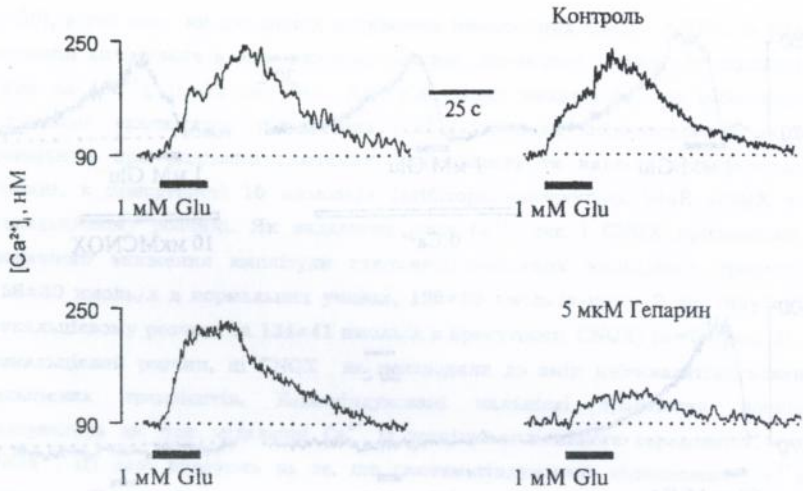


Рис. 5. Внутрішньоклітинна аплікація гепарину інгібує глутаматіндуковані кальцієві транзєнти в кітинах Бергманівської глїї.

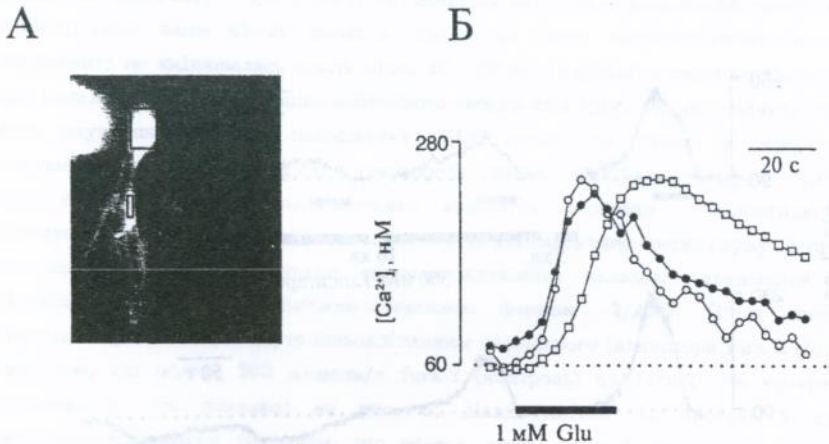


Рис. 6. Просторова гетерогенність глутаматіндукованих кальцієвих сигналів в клітинах Бергманівської глїї. А: Положення компартментів клітини, в яких реєструвались представлені на Б кальцієві транзєнти. □ - сома, ● - проксимальні відростки, ○ - дистальні відростки.

нижчими, ніж до діалізу ( $52 \pm 23$  нмоль/л в порівнянні з  $145 \pm 48$  нмоль/л до діалізу,  $n=6$ ).

Для вивчення просторових характеристик глутаматіндукованих кальцієвих сигналів в клітинах Бергманівської глії було використано двохвильову флуоресцентну відеомікроскопію. Як показано на рис. 6, аплікація глутамату викликала швидке підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  у відростках і послідує, більш повільне підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в сомі. Глутаматіндуковані кальцієві транзєнти у відростках досягали пікових значень на  $20 \pm 5$  с швидше в порівнянні з сомою ( $n=8$ ). Ця просторова гетерогенність не змінювалась ні в присутності CNQX ( $n=4$ ), ні в безкальцієвому розчині ( $n=5$ ).

#### Експресія клітинами Бергманівської глії mGluR1 та mGluR5 метаботропних глутаматних рецепторів.

Для визначення підтипів метаботропних глутаматних рецепторів, активація яких призводить до вивільнення  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо, було використано ПЛР на поодинокі клітинах. В 7 із 32 досліджених клітин була зареєстрована експресія mGluR1 мРНК і в 11 з 24 - mGluR5-мРНК. Праймери, використані для детекції mGluR5, давали можливість одночасно досліджувати експресію двох відомих сплайсових варіантів цього рецептора - mGluR5a та mGluR5b. В 9 з 11 позитивних клітин було зареєстровано експресію лише mGluR5a варіанта рецептора, в той час, як 2 клітини експресували обидва сплайсових варіанта рецептора (рис. 7).

#### Дослідження експресії AMPA/KA глутаматних рецепторів клітинами Бергманівської глії.

Аплікація агоністів AMPA/KA рецепторів кайнату (100 мкмоль/л) та домоату (100 мкмоль/л) викликала трансмембранні струми та кальцієві транзєнти в усіх досліджених клітинах (відповідно  $n=19$  та  $n=9$ ). Прейнкубація зрізів мозочка в присутності 10 мкмоль/л CNQX призводила до повного подавлення як струмів, так і кальцієвих транзєнтів. Селективний агоніст AMPA підтипу GluR ( $\pm$ )- $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонат (AMPA, 100 мкмоль/л) викликав трансмембранний струм, проте підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в сомі клітин при цьому зареєстровано не було ( $n=5$ ) (рис. 8). Аплікація AMPA в присутності циклотіазиду (100 мкмоль/л) - агента, що специфічно подавляє інактивацію AMPA-рецепторів, викликала значну потенціацію трансмембранних токів ( $n=25$ ), що супроводжувалось підвищенням  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 8). В той же час, аплікація глутамату ( $n=5$ ) та домоату ( $n=3$ ) в присутності лектину конканаваліну А, не супроводжувалась ніякими змінами трансмембранних токів чи кальцієвих транзєнтів. Це свідчить про те, що переважна більшість експресованих клітинами Бергманівської глії іонотропних GluR належить до AMPA типу.

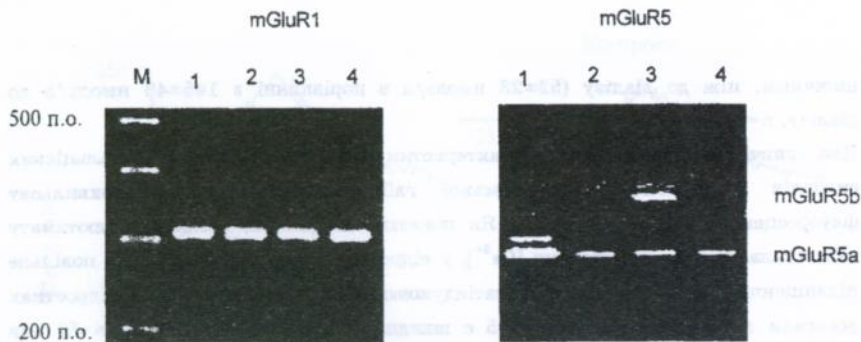


Рис. 7. Результати аналізу експресії mGluR1 та mGluR5 мРНК в поодиноких клітинах Бергманської глії методом ПЛР. М - маркери молекулярної ваги; 1 - 4 номера досліджуваних клітин.

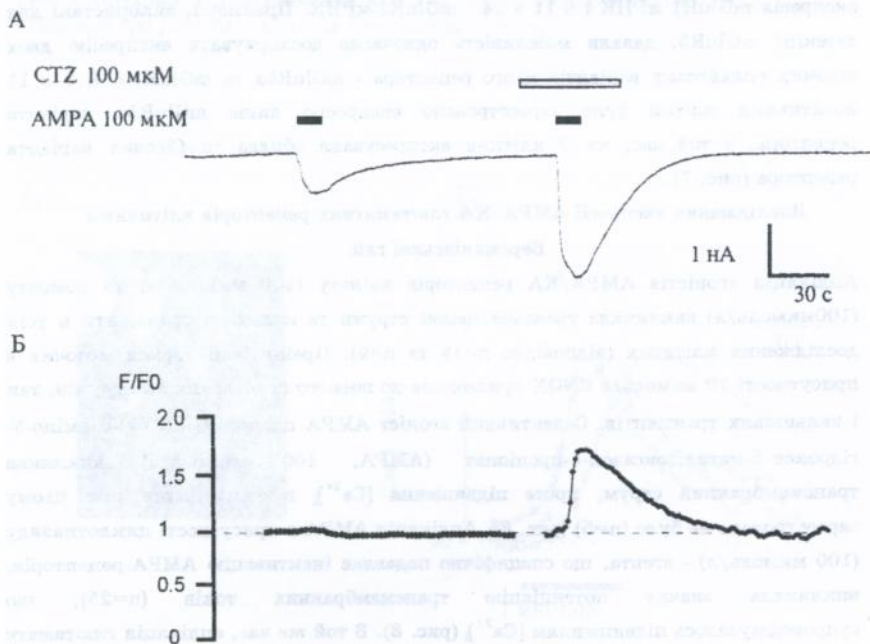


Рис. 8. Потенціація AMPA-індукованих трансмембранных струмів (А) та кальцієвих транзентів (Б) в присутності циклотиозида в клітинах Бергманівської глії.

### Зміни експресії GluRB субодиниці AMPA рецепторів під час постнатального розвитку в клітинах Бергманівської глії.

Експресію мРНК, що кодує субодиниці AMPA рецепторів, досліджували в клітинах Бергманівської глії мишей двох вікових груп - 6 (n=5) та 20 (n=12) днів після народження. Полімеразну ланцюгову реакцію на поодиноких клітинах проводили як описано в розділі "Матеріали та методи досліджень". Для визначення типів субодиниць, експресованих клітинами, був використаний рестриктазний аналіз. Одержані в результаті ПЛР фрагменти ДНК містили сайти рестрикції, специфічні для кожного типу субодиниць: BamHI для GluRA, BglII для GluRB, NdeI для GluRC та EcoRI у випадку GluRD. В жодній з 12 досліджених клітин з вікової групи P20 не спостерігалось експресії мРНК, що кодує субодиниці GluRB та GluRC. В 10 клітинах були присутні GluRA та GluRD мРНК, в 2 клітинах - лише GluRA. У віковій групі P6, на відміну від P20, було зареєстровано експресію GluRB мРНК. В 2 з 5 досліджених клітин спостерігалась експресія GluRA та GluRD мРНК, в 1 - GluRA та GluRB, в 1 - лише GluRB та лише GluRA в 1 клітині (рис. 9).

### Відсутність змін кальцієвої проникності AMPA-рецепторів в процесі постнатального розвитку в клітинах Бергманівської глії.

Присутність у складі рецепторних комплексів AMPA-рецепторів редагованої форми субодиниць GluRB призводить до практично повної непроникності цих рецепторів для іонів  $Ca^{2+}$ . Тому ми порівняли в клітинах мишей названих вікових груп, зміни  $[Ca^{2+}]_i$ , що виникають при аплікації селективного агоніста AMPA-рецепторів - AMPA в присутності циклотіазида, який специфічно подавляє інактивацію цих рецепторів. Коаплікація зазначених речовин викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в 7 із 10 досліджених клітин у віковій групі P20, та у всіх досліджених клітинах (n=6) у віковій групі P6. Використаний в цих дослідах однохвильовий кальцієвий зонд Oregon Green BAPTA-1 не дозволяв провести кількісне порівняння амплітуд кальцієвих транзєнтів в клітинах мишей двох вікових груп, тому одержані результати не виключають повністю невеликих відмінностей в кальцієвій проникності AMPA-рецепторів в клітинах Бергманівської глії в ці періоди онтогенезу.

### Експресія нейронами Пуркін'є функціональних метаботропних глутаматних рецепторів mGluR1 підтипу.

Аплікація глутамату в концентрації 1 ммоль/л викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в дендритах та сомі нейронів Пуркін'є (n=14). Селективний агоніст метаботропних GluR (1S,3R)-ACPD (100 мкмоль/л) також викликав кальцієві транзєнти в сомі та дендритах цих клітин (n=5). Амплітуди кальцієвих сигналів в дендритах були в  $7,5 \pm 0,6$  раз вищі, ніж в сомі. Експресію нейронами Пуркін'є мРНК, що кодує mGluR1 підтип метаботропних глутаматних рецепторів, досліджували, як описано

вище для клітин Бергманівської глії. В усіх досліджених клітинах (n=8) встановили експресію mGluR1-mРНК.

**Кальцієві сигнали, що викликаються в нейронах Пуркін'є аплікацією АТФ, адреналіну та гістаміну.**

Аплікація АТФ (100 мкмоль/л), гістаміну (100 мкмоль/л) та адреналіну (10 мкмоль/л) викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах Пуркін'є. Амплітуди кальцієвих транз'єнтів, що викликаються вказаними агоністами були відповідно  $179 \pm 54$  нмоль/л (n=46),  $111 \pm 67$  нмоль/л (n=39) та  $203 \pm 94$  (n=44). Преінкубація зрізів мозочка на протязі 5 хв. в присутності 1 мкмоль/л тетродотоксину, 10 мкмоль/л CNQX та 10 мкмоль/л бікукуліна не призводила до помітних змін кальцієвих транз'єнтів, викликаних цими агоністами (n=11 для АТФ, 9 для гістаміну та 14 для адреналіну). Щоб встановити походження іонів кальцію, які входять в цитозоль під час кальцієвих сигналів, що викликаються цими агоністами, ми провели порівняння кальцієвих транз'єнтів в нормальному та безкальцієвому розчинах. На відміну від викликаного деполяризацією підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  під час аплікації 50 мкмоль/л KCl, де кальцієві сигнали повністю інгібувались в безкальцієвому розчині (n=21), АТФ (n=19), гістамін (n=17) та адреналін (n=27) викликали підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в безкальцієвому розчині. Це свідчить про те, що всі три агоністи індукують вивільнення іонів  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо.

**Фармакологічні властивості кальцієвих сигналів, що викликаються АТФ, гістаміном та адреналіном.**

Аплікація АТФ (100 мкмоль/л, n=8), але не АМФ та аденозина (100 мкмоль/л, n=8), викликала підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах Пуркін'є. Це свідчить про те, що підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  при аплікації АТФ відбувається за рахунок активації  $P_{2U}$  підтипу пуринорецепторів. Гістамініндуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  подавлювалось селективним антагоністом  $H_1$  гістамінових рецепторів хлорфеніламіном (1 мкмоль/л, n=7), в той час як антагоністи  $H_2$  та  $H_3$  рецепторів ранітідин (1 мкмоль/л, n=5) та тіопірамід (1 мкмоль/л, n=7) не викликали ніяких змін гістамініндукованих кальцієвих транз'єнтів. Викликані адреналіном кальцієві транз'єнти повністю подавлювались селективним блокатором  $\alpha_1$ -адренорецепторів празозином (1 мкмоль/л, n=7). В той же час, антагоністи  $\alpha_2$ - та  $\beta$ -адренорецепторів йохімбін (1 мкмоль/л, n=4) та пропранолол (1 мкмоль/л, n=5) не викликали змін епінефрін - індукованих кальцієвих сигналів (рис. 10).

**ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

В даній роботі досліджували дію глутамату та його аналогів на  $[Ca^{2+}]_i$  та експресію глутаматних рецепторів в клітинах Бергманівської глії. Було встановлено, що головуюча роль в генерації глутаматіндукованих кальцієвих транз'єнтів належить вивільненню іонів  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо.

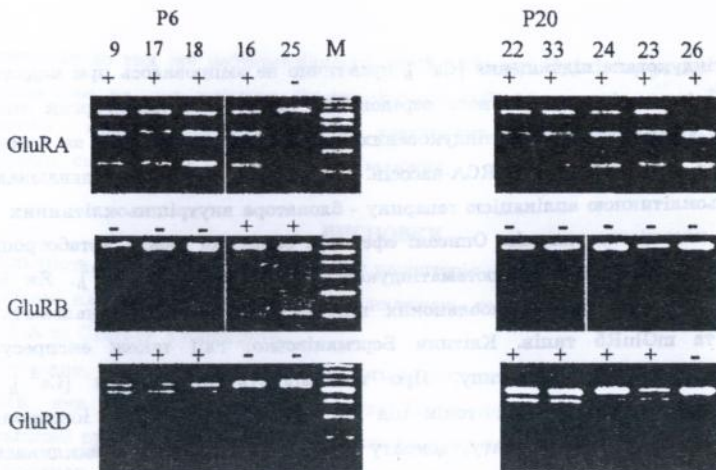


Рис. 9. Експресія мРНК що кодує субодиниці GluRA - D AMPA рецепторів клітинами Бергманівської глії.

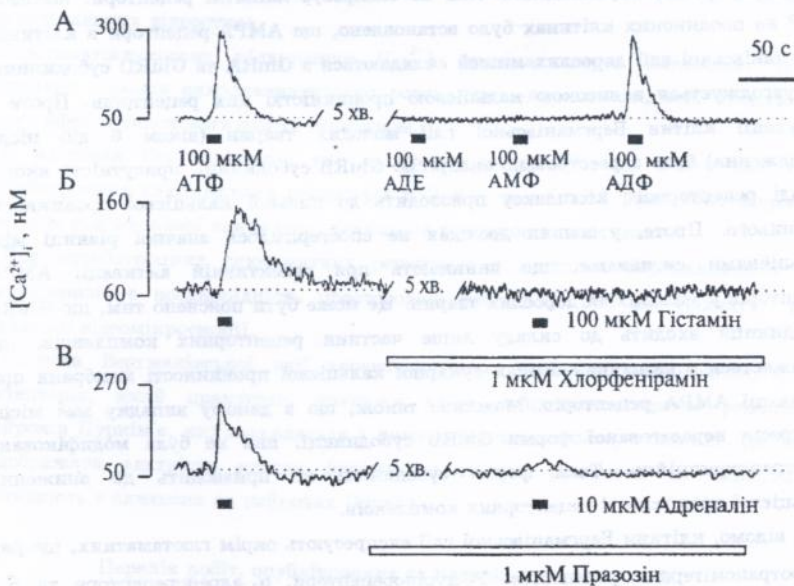


Рис. 10. Фармакологічні властивості агоністіндукованих кальцієвих транзєнтів в нейронах Пуркін'є. А: Регістрація змін  $[Ca^{2+}]_i$  при аплікації АТФ, аденозину (АДЕ), АМФ та АДФ. Б: Селективний інгібітор  $H_1$  гістамінових рецепторів хлорфенірамін повністю блокує гістамін-індуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ . В: Селективний інгібітор  $\alpha_1$ -адренорецепторів празозин повністю блокує епінефрін-індуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ .

Глютаматіндуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  практично не змінювалось при видаленні іонів  $Ca^{2+}$  із зовнішньоклітинного середовища. Крім того, тапсигаргин значно знижував амплітуду глютаматіндукованих кальцієвих транзєнтів за рахунок подавлення функціонування SERCA-насосів. Ці транзєнти також подавлювались внутрішньоклітинною аплікацією гепарину - блокатора внутрішньоклітинних  $IP_3$ -чутливих кальцієвих каналів. Описані ефекти є ознаками участі метаботропних глютаматних рецепторів в глютаматіндукованому підвищенні  $[Ca^{2+}]_i$ . Як було показано методом ПЛР на поодиноких клітинах, ці рецептори належать до mGluR1 та mGluR5 типів. Клітини Бергманівської глії також експресують іонотропні GluR AMPA-підтипу. Про це свідчить підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  та виникнення трансмембранних токів під час аплікації агоністів іонотропних глютаматних рецепторів кайнату, домоату та AMPA. Потенціяція викликаємих AMPA трансмембранних струмів та кальцієвих транзєнтів в присутності циклотиазиду, який селективно блокує інактивацію AMPA-рецепторів, свідчить про експресію рецепторів цього підтипу клітинами Бергманівської глії. Крім того, відсутність потенціяції домоат- та глютаматактивованих трансмембранних струмів вказує на те, що Бергманівська глія не експресує кайнатні рецептори. Методом ПЛР на поодиноких клітинах було встановлено, що AMPA-рецептори в клітинах Бергманівської глії дорослих мишей складаються з GluRA та GluRD субодиноць. Це узгоджується з високою кальцієвою проникністю цих рецепторів. Проте в популяції клітин Бергманівської глії молодих тварин (віком 6 дїб після народження) було зарєстровано експресію GluRB субодиноць, присутність якої у складі рецепторного комплексу призводить до низької кальцієвої проникності останнього. Проте, у наших дослідах не спостерїгалося значної різниці між кальцієвими сигналами, що виникають при селективній активації AMPA рецепторів у молодих та дорослих тварин. Це може бути пояснено тим, що GluRB субодиноця входить до складу лише частини рецепторних комплексів, що виражається в незначних змінах сумарної кальцієвої проникності мембрани при активації AMPA рецепторів. Можливо також, що в даному випадку має місце експресія нередагованої форми GluRB субодиноць, яка не була модифїкована посттранскрипційно. Така форма субодиноць не призводить до зниження кальцієвої проникності рецепторних комплексів.

Як відомо, клітини Бергманівської глії експресують окрім глютаматних, ще ряд нейротрансмітерних рецепторів:  $P_2$ -пуринорецептори,  $\alpha_1$ -адренорецептори та  $H_1$ -гістамінові рецептори. Ми встановили, що нейрони Пуркін'є також експресують ці рецептори. Гістамінові та адренорецептори можуть забезпечувати синаптичну передачу від гістамінергічних нервових волокон, що беруть початок із туберомамїлярного ядра гіпоталамуса та моноамінергічних волокон з *locus coeruleus* до нейронів Пуркін'є. Експресія клітинами Бергманівської глії

рецепторів до тих же нейромедіаторів, що й нейрони Пуркін'є, разом з відомим фактом про те, що клітини Бергманівської глії формують гліальну оболонку навколо цих нейронів, вказує на можливість участі Бергманівської глії в регуляції синаптичної передачі в корі мозочка.

### ВИСНОВКИ

1. Більшість іонотропних глутаматних рецепторів, розташованих на плазматичній мембрані клітин Бергманівської глії, належать до AMPA типу, та складається з GluR-A та GluR-D субодиниць.
2. Показано, що в процесі постнатального розвитку має місце подавлення експресії мРНК, яка кодує GluR-B субодиницю. Проте це не викликає помітних змін кальцієвої проникності іонотропних глутаматних рецепторів.
3. Глутамат, фізіологічний агоніст іонотропних та метаботропних глутаматних рецепторів, викликає підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  в клітинах Бергманівської глії. Ведуча роль у цьому процесі належить вивільненню іонів  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо. Вхід іонів  $Ca^{2+}$  із зовнішньоклітинного середовища через AMPA тип глутаматних рецепторів відіграє незначну роль в підвищенні  $[Ca^{2+}]_i$  в сомі та проксимальних відростках.
4. Глутаматіндуковане підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  протікає через активацію  $InP_2$ -чутливих каналів ендоплазматичного ретикулулу, про що свідчить блокування цього ефекта тапсигаргіном та гепарином.
5. В клітинах Бергманівської глії експресується мРНК, яка кодує два типи метаботропних глутаматних рецепторів mGluR1 та mGluR5. Дані було одержано методом полімеразної ланцюгової реакції на поодиноких клітинах.
6. Для метаботропних глутаматних рецепторів в клітинах Бергманівської глії характерною є неоднорідність просторового розподілу, про що свідчать дані цифрової відеомікроскопії.
7. Клітини Бергманівської глії характеризуються набором нейротрансмітерних рецепторів, який практично повторює набір нейротрансмітерних рецепторів нейронів Пуркін'є, які знаходяться з ними в безпосередньому контакті. Це може відображати здатність клітин Бергманівської глії реагувати на синаптичну активність в синапсах на нейронах Пуркін'є.

### Перелік робіт, опублікованих за матеріалами дисертації.

1. S. Kirischuk, V. Matias, A. Kulik, N. Voitenko, P. Kostyuk, A. Verkhratsky / Activation of  $P_2$ -purino-,  $\alpha_1$ -adreno- and  $H_1$ -histamine receptors triggers cyto-plasmic calcium signalling in cerebellar Purkinje neurons. // Neuroscience.-1996.-73, No.3.- p.643-647.

2. В.В.Матяш, С.І.Киришук, О.Н.Верхратський. Експресія та функціональні властивості глутаматних рецепторів в клітинах Бергманівської глії *in situ* // Журнал Академії Медичних Наук України.-1997.-3, No.1.-С.100-111.
3. V.Matyash, A.Verkhratsky. Expression of type 1 metabotropic glutamate receptors in Purkinje neurons of mice. // *Нейрофізіологія*.-1997.-29, No.1.-С.35-39.
4. S.Kirischuk, V.Matiash, A.Kulic, P.Kostyuk, A.Verkhratsky. ATP, epinephrine and histamine induced calcium mobilization in cerebellar Purkinje cells. // *Proceedings of the first meeting of Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Berlin, 1996, p. 69.*
5. S.Kirischuk, V.Matiash, A.Kulic, A.Verkhratsky. ATP, epinephrine and histamine induced calcium mobilization in mouse cerebellar Purkinje cells. // *Proceedings of the meeting of the Physiological Society of the UK, Bristol, 1996, p. 78.*
6. S.Kirischuk, V.Matiash, F.Kirchhoff, H.Kettenmann, A.Verkhratsky. Bergmann glial cells *in situ* express mGluR1 and mGluR5 metabotropic glutamate receptors // *Proceedings of the Final symposium of the DFG study group, "Functions of glial cells", Berlin, 1997, p.97.*

## АНОТАЦІЯ

Матяш В.В. Експресія та функціональні властивості глутаматних рецепторів в клітинах Бергманівської глії мозочка мишей. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика. Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 1997.

Глутаматіндуковані кальцієві транзєнти і трансмембранні токи досліджені в клітинах Бергманівської глії мозочка мишей методами мікрофлуориметрії, цифрової видеомікроскопії, конфокальної мікроскопії та методом петч-клємп. Аплікація глутамата призводила до підвищення  $[Ca^{2+}]_i$  опосередковане активацією метаботропних і іонотропних глутаматних рецепторів; метаботропні рецептори грають у цьому процесі головну роль. Методом полімеразної ланцюгової реакції на поодиноких клітинах було встановлено, що ці клітини експресують mGluR1 та mGluR5 метаботропні глутаматні рецептори GluRA та GluRD субодиниці іонотропних глутаматних рецепторів AMPA підтипу. В клітинах від тварин віком 6 днів після народження була виявлена експресія субодиниці GluRB, але це не упродовжувалось зниженням проникності для іонів  $Ca^{2+}$  AMPA рецепторів у молодих тварин. Встановлено також, що нейрони Пуркін'є експресують  $\alpha_1$ -адрено,  $H_1$ -гістамінові та  $P_2$ -пуринорецептори, експресія яких була раніше показана на клітинах Бергманівської глії. Ці дані дозволяють зробити висновок, що Бергманівська глія має набір нейротрансмітерних рецепторів, що здатні реагувати на синаптичну передачу в синапсах, що утворені аферентними волокнами на нейронах Пуркін'є.

Ключові слова: мозочок, астроцити, Бергманівська глія, нейрони Пуркін'є, кальціометрія, глутаматні рецептори.

Матяш В.В. Экспрессия и функциональные свойства глутаматных рецепторов в клетках Бергмановской глии мозжечка мышей. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02. - Биофизика, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 1997.

Глутаматиндуцированные кальциевые транзєнты и трансмембранные токи исследовали в клетках Бергмановской глии мозжечка мышей методами микрофлуориметрии, цифровой видеомікроскопии, конфокальной микроскопии и методом петч-клємп. Аплікація глутамата вызывала повышение  $[Ca^{2+}]_i$  опосредованное активацией метаботропных и ионотропных глутаматных рецепторов, метаботропные рецепторы играют в этом процессе основную роль. Как было установлено методом полимеразной цепной реакции на одиночных клетках, эти клетки экспрессируют mGluR1 и mGluR5 метаботропные глутаматные

рецепторы и GluRA и GluRD субъединицы ионотропных глутаматных рецепторов AMPA подтипа. В клетках от животных возрастом 6 дней после рождения была обнаружена экспрессия субъединицы GluRB, однако это не сопровождалось пониженной проницаемостью для ионов  $Ca^{2+}$  AMPA рецепторов у молодых животных. Установлено также, что нейроны Пуркинье экспрессируют  $\alpha_1$ -адрено-,  $H_1$ -гистаминовые и  $P_2$ -пуринорецепторы, экспрессия которых была ранее показана в клетках Бергмановской глии. Эти данные позволяют заключить, что Бергмановская глия обладает набором нейротрансмисмиттерных рецепторов, способных реагировать на синаптическую передачу в синапсах, образуемых афферентными волокнами на нейронах Пуркинье.

Ключевые слова: мозжечок, астроциты, Бергмановская глия, нейроны Пуркинье, кальциометрия, глутаматные рецепторы.

Matyash V.V. Expression and functional characteristics of glutamate receptors in Bergmann glial cells of mouse cerebellum. - Manuscript.

The thesis is presented in accordance with requirements for the degree of candidate of biological sciences in speciality 03.00.02. - Biophysics, A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1997.

Glutamate-activated calcium transients and transmembrane currents were studied in Bergmann glial cells in acutely isolated slices of mouse cerebellum by employing fura-2 microfluorimetry, calcium imaging, confocal microscopy and patch-clamp techniques. Application of glutamate evoked rise in  $[Ca^{2+}]_i$  mediated by activation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors. Metabotropic receptors appeared to play the major role in this process. As revealed by single cell RT-PCR technique, these cells exhibit mGluR1 and mGluR5 types of metabotropic glutamate receptors and GluRA and GluRD subunits of ionotropic glutamate receptors of AMPA subtype. In 6 days old animals we have detected expression of GluRB subunit, but this does not result in decrease of calcium permeability of AMPA receptors of the young animals. We have shown also that Purkinje neurons express  $\alpha_1$ -adreno-,  $H_1$ -histamine and  $P_2$ -purinoreceptors, which, as it was shown earlier, are expressed also by Bergmann glial cells. These data suggest that Bergmann glial cells are equipped with appropriate receptors to sense synaptic events in synapses formed by afferent fibers on Purkinje neurons.

Cerebellum, astrocytes, Bergmann glial cells, Purkinje neurons, calcium imaging and microfluorimetry, glutamate receptors.





---

Підписано до друку 07.10.97р. Формат 60х90/16.  
Ум. друк. арк.1,0. Обл.-вид. арк. 0,8.  
Наклад 100. Зам. 261.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

434 0111

AB 38.580