

**АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ.А.А.БОГОМОЛЬЦА
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
МАКСА-ПЛАНКА**

На правах рукописи

БУРНАШЕВ Наиль Абдурахманович

УДК 612.17

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ИОНОТРОПНЫХ
ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

03.00.13 - Физиология человека и животных

Диссертация
в виде научного доклада на
соискание ученой степени
доктора биологических наук

Киев 1993

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00802605 (L)

AB 28.714

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Синаптическая передача в центральной нервной системе (ЦНС) осуществляется при посредстве основного нейротрансмиттера глутамата, который активирует глутаматные рецепторы. Эти рецепторы представляют собой белковые молекулы встроенные в клеточную мембрану и образующие ионные каналы. При связывании трансмиттера с рецептором, последний активирует прохождение ионного тока через постсинаптическую мембрану.

Традиционно ионотропные глутаматные рецепторы классифицируются согласно их предпочтению к связыванию с соответствующими агонистами на AMPA-каинатные (не-NMDA) и NMDA рецепторы (Moneghan et al., 1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 365; Watkins et al., 1990, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 25).

Синаптический ток состоит из двух компонент: быстрой и медленной. Фармакологический анализ тока показал, что каждая из компонент обусловлена активностью соответствующего типа рецептора. AMPA-каинатные рецепторы ответственны за быструю составляющую синаптического тока и проводят в основном натриевые токи. NMDA рецепторы отвечают за медленную компоненту и характеризуются ярко выраженной потенциалом зависимой кальциевой проницаемостью (Headley and Grillner, 1990, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 205; Collingridge and Singer, 1990, *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 290). Вход ионов кальция в нервную клетку, как полагают, играет ключевую роль в регулировании долговременных изменений в синаптической активности, являющихся молекулярной основой таких процессов как память и обучение. В то же время чрезмерный вход ионов кальция имеет токсический эффект и приводит к гибели клетки (Nicol et al., 1988, *Neuron*, 1, 97; Choi, 1988, *Neuron*, 1, 623). Молекулярное клонирование выявило наличие большого числа субъединиц глутаматных рецепторов и позволило приступить к детальному изучению свойств различных типов рецепторов и в частности к выявлению структурных элементов, ответственных за особенности ионной проницаемости субъединиц.

Предлагаемый цикл работ посвящен, в основном, анализу свойств различных типов рекомбинантных глутаматных рецепторов на основе знания их первичной структуры. Иными словами, выяснению того, какие общие структурные элементы определяют характер ионной проницаемости глутаматных рецепторов и, в особенности их кальциевой проницаемости. Эти вопросы анализировались с использованием двух методических подходов: электрофизиологического описания свойств рецепторов, экспрессированных в фибробласты и техники точечной мутации, позволяющей целенаправленно изменять элементы первичной структуры. Сделана попытка провести молекулярную идентификацию нативных глутаматных рецепторов на основе анализа свойств составляющих их субъединиц.

Цель и основные задачи исследования.

Цель настоящей работы - исследование свойств рекомбинантных глутаматных рецепторов в контексте структура-функция. Основные задачи заключались в следующем:

1. Описать электрофизиологические свойства различных субъединиц клонированных глутаматных рецепторов, экспрессированных в клетки фибробластов.
2. Провести классификацию глутаматных рецепторов на основе анализа их функциональных особенностей и первичной структуры.
3. Выявить элементы в первичной структуре белковой молекулы, определяющие ионную проницаемость глутаматных рецепторов различных классов.
4. Исследовать влияние посттранскрипционных генетических механизмов: "сплайсинга" и "редактирования" мРНК на характеристики ионного тока глутаматных рецепторов.
5. Провести молекулярную идентификацию глутаматных рецепторов в клетках ЦНС на основе сравнения свойств нативных и рекомбинантных рецепторов.

Конкретные задачи исследования указаны в соответствующих разделах изложения.

Научная новизна работы.

Проведен детальный анализ функциональных характеристик всех типов рекомбинантных ионотропных глутаматных рецепторов. Проведена классификация глутаматных рецепторов на основе анализа структуры и функциональных характеристик.

Впервые идентифицирован участок в аминокислотной последовательности трансмембранного сегмента TM2 (Q/R участок), ответственный за контроль ионной проводимости AMPA рецепторов.

Исследованы структурные детерминанты проницаемости глутаматных рецепторов для двухвалентных ионов. Для рецепторов AMPA типа показано, что низкая проницаемость для ионов кальция определяется наличием положительно заряженного аминокислотного остатка аргинина в Q/R участке, внесенного в этот участок вследствие редактирования мРНК на более поздней стадии развития. Показано, что различная степень экспрессии отредактированной формы субъединицы GluR-B определяет Ca^{2+} проницаемость гетеромерных каналов.

Исследовано влияние альтернативного "сплайсинга" на функциональные характеристики AMPA рецепторов.

Впервые идентифицирована структурная композиция нативных глутаматных рецепторов AMPA типа в клетках Бергмановской глии, на основе сравнения их свойств со свойствами рекомбинантных глутаматных рецепторов.

Показано существование восьми вариантов субъединицы GluR-6 семейства катионных рецепторов обусловленных редактированием мРНК в трансмембранных участках TM2 и TM1. Выявлено влияние редактирования как в TM2, так и в TM1 на Ca^{2+} проницаемость этой субъединицы.

Для NMDA рецепторов идентифицирован участок в TM2, ответственный за контроль кальциевой и магниевой проницаемости и потенциалозависимого блока ионами магния этого типа рецепторов.

В результате исследования для разных типов глутаматных рецепторов удалось выявить общие структурные элементы определяющие характер их ионной проницаемости. Сформулированные представления открыли новые направления в исследовании генетических механизмов контроля функций глутаматных рецепторов и их молекулярной идентификации.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на следующих научных собраниях: На конференциях физиологического общества ФРГ (Фрайбург, 1991; Мюнхен, 1993), на конференции физиологического общества Великобритании (Лондон, 1991), на ежегодных конференциях Американской Ассоциации по Нейронаукам (Нью Орлеанс, 1991; Анахайм, 1992), на Весенней конференции по гиппокампу (Каймановы острова, 1992), на конгрессе Европейской Ассоциации по Нейронаукам (Мюнхен, 1992), на конференции биофизического общества США (Вашингтон, 1993). Результаты работы были также представлены и обсуждались при чтении лекций и докладов в институтах и университетах ФРГ, Англии, США.

Публикации.

Результаты работы полно представлены в 22 статьях и коротких сообщениях в ведущих международных журналах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Здесь представлены только основные детали методики, необходимые для последующего изложения. Подробно методы исследования, включая технику клонирования субъединиц, точечную мутацию и способы выявления посттранскрипционных изменений аминокислотных последовательностей изложены в соответствующих статьях.

Клеточная культура и трансфекция.

Трансформированные эмбриональные клетки почек человека (ATCC CRL 1573, 293) были культивированы на подложке в среде MEM-Gibco (Eggenstein, ФРГ), содержащей 10% телячей плазмы (fetal calf serum). После инкубации в 5% CO₂ в течение 48 часов клетки трансфектировали соответствующей плазмидой сДНК (PCDM-8), содержащей аминокислотные последовательности желаемых субъединиц, используя модифицированный метод Са₃(PO₄)₂ преципитации (Chen and Okayama, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7, 2745;

Pritchett et al., 1988, *Science*, 242, 1306). В тех случаях когда трансфектировали комбинации, для каждой из субъединиц брали плазмиды одинакового веса (1000 нг, 500 нг или 100 нг на одну ячейку культуральной посуды). В ряде случаев сДНК для различных субъединиц трансфектировали в пропорции 1:10 или 1:5. Приблизительно через 48 часов после трансфекции клетки использовались для электрофизиологического эксперимента.

Глиальные клетки и клетки нейронов.

Первичную культуру нейронов и глиальных клеток из мозжечка 8-дневных крыс получали по модифицированному нами методу описанному в (Novelli et al., 1988, *Brain Res.*, 451, 205; McCarthy and de Villis, 1980, *J. Cell. Biol.* 85, 890). Для электрофизиологических экспериментов использовали гранулярные нейроны и астроциты веретенообразной формы начиная с 8 до 13 дня *in vitro*. Культуральные астроциты веретенообразной формы, как полагают (Ortega et al., 1991, *Neuroscience*, 41, 335), представляют собой клетки Бергмановской глии.

Растворы.

Составы основных растворов, использованных в наших экспериментах, приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Композиции использованных в работе вне- и внутриклеточных растворов (в мМ).

Растворы	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	CsCl	EGTA	HEPES
Наружные:							
"нормальный"	135	5,4	1	1,8			5
"натриевый"	140		1				5
"кальциевый"				110			5
"магниевый"			110				5
Внутриклеточный			1		140	10	10

В ряде случаев было необходимо варьировать концентрацией двухвалентных катионов в "нормальном" и "натриевом" растворах.

Всякого рода изменения в составе основных растворов оговорены в соответствующем месте. pH всех растворов 7,2. Все агонисты и блокаторы растворялись в соответствующих концентрациях в наружных растворах. Опыты проводили при комнатной температуре 20-23 °C.

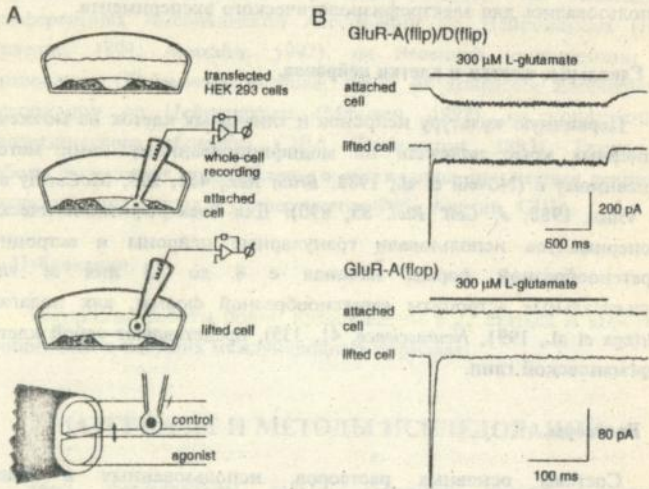


Рис.1 А. Схематическое представление экспериментальной процедуры быстрой подачи агониста. Для оптимальной смены раствора клетка должна быть оторвана от дна камеры.

В. Примеры ответов на подачу глутамата клеток лежащих на дне камеры и после их поднятия. В первом случае быстрый компонент тока не регистрируется.

Электрофизиология.

Трансфектированные клетки на подложке переносили в рабочую камеру, помещенную на предметном столике инвертированного микроскопа. Камера постоянно перфузировалась "нормальным" раствором. Регистрацию ионных токов проводили от одиночных клеток мет дом локальной фиксации мембранного потенциала в конфигурации "whole-cell" (Hamill et al., 1981, *Pflugers Archiv*, 391, 85), используя усилитель EPC-7 (List Electronics, Darmstadt, ФРГ).

Агонисты, растворенные в одном из наружных растворов подавались с помощью системы быстрой смены раствора, основанной на двойной пипетке приводимой в движение пьезо-элементом (Рис. 1). Перед подачей агониста, клетки выдерживались по крайней мере 30 с в контрольном растворе (соответствующий наружный раствор без агониста). Время полной смены раствора, измеренное при переключении растворов с 140 мМ NaCl на 140 мМ KCl составляло 2 мс для открытой пипетки и 10 мс для конфигурации "whole-cell".

Сбор и обработка данных.

Вольт-амперные характеристики (ВАХ) получали измерением амплитуды тока либо при дискретных значениях мембранного потенциала, либо при пилообразном изменении потенциала в диапазоне ± 100 мВ в течение 2 с. В последнем случае результирующая ВАХ получалась вычитанием ВАХ, полученной в отсутствие агониста из ВАХ полученной во время постоянной составляющей тока, активированного агонистом. Оцифрованные кривые усреднялись через 4 мВ и эти усредненные значения использовались для аппроксимации кривых полиномиальными функциями. Эти полиномиальные функции использовались для определения потенциалов реверсии и хордовых проводимостей при заданных потенциалах. Активированные агонистами токи оцифровывались и хранились в компьютерной системе VME-bus и анализировались после эксперимента. Перед оцифровкой (с частотой 10 кГц) токи фильтровали с частотой 1-2 кГц (-3дБ). Временной ход десенситизации тока аппроксимировали экспоненциальной функцией используя Симплекс метод. Для определения потенциалозависимости проводимости каналов применяли ступенчатое изменение потенциала. Ступенька потенциала длительностью 50 мс подавался от поддерживаемого потенциала 0 мВ до заданного значения. Токи, измеренные в ответ на ступеньку потенциала в отсутствие агониста вычитались из ответов на ступеньку потенциала, зарегистрированных во время стационарной составляющей активированного агонистом тока. Токи в течение импульса потенциала аппроксимировались выражением

$$I = I_0 e^{-t/T} + B,$$

где t -время, T -постоянная времени, I_0 -экстраполированная амплитуда тока к началу импульса потенциала (мгновенное значение тока), B -

амплитуда тока в конце импульса. I_0 использовали для построения мгновенной ВАХ, В - для построения стационарной ВАХ. В данной серии экспериментов токи фильтровали с частотой 4 кГц. Наличие тока утечки и емкостной составляющей не позволило провести точных измерений тока в пределах 1 мс от начала ступеньки потенциала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

КЛАССИФИКАЦИЯ СУБЪЕДИНИЦ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.

К настоящему времени клонировано более 14 субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов (Hollman et al., 1989, *Nature*, 342, 643; Keinanen et al., 1990, *Science*, 249, 556; Bettler et al., 1990, *Neuron*, 5, 583; Egebjerg et al., 1991, *Nature*, 351, 745; Bettler et al., *Neuron*, 8, 257; Werner et al., 1991, *Nature*, 351, 742; Herb et al., 1992, *Neuron*, 8, 775; Moryoshi et al., 1991, *Nature*, 354, 31; Monyer et al., 1992, *Science*, 256, 1217; Meguro et al., 1992, *Nature*, 357, 70). Согласно гомологичности их структуры и функциональным свойствам их можно разделить на три семейства: AMPA рецепторы, Каинатные рецепторы и NMDA рецепторы (Рис.2). Семейство AMPA рецепторов включает в себя 4 субъединицы обозначенные здесь как GluR-A, -B, -C, -D (по другой номенклатуре GluR1, 2, 3, 4). Рецепторы этого семейства имеют высокую афинность к AMPA, активируются также глутаматом и каинатом. Характерной особенностью каналов, образованных из этих субъединиц является быстро десенситизирующий ответ при аппликации глутамата или AMPA и недесенситизирующий каинатный ответ. Анализ молекулярных и функциональных свойств субъединиц этого типа выявил, что каждая из субъединиц имеет участок из 38 аминокислот между предполагаемыми трансмембранными сегментами ТМ3 и ТМ4, который может иметь два варианта аминокислотной последовательности, контролируемых альтернативным "сплайсингом".

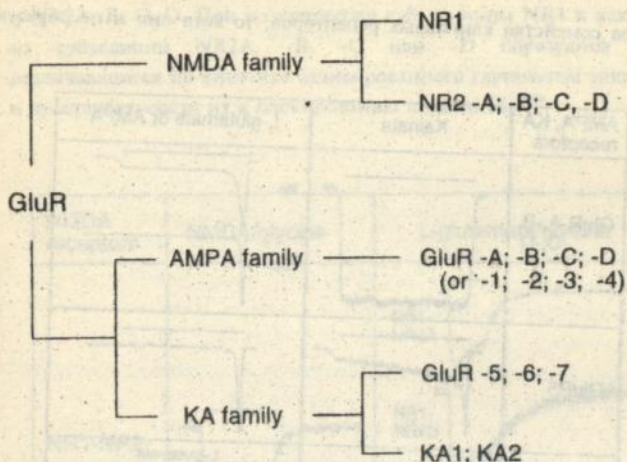


Рис.2. Классификация глутаматных рецепторов. Справа указан процент гомологичности структуры субъединиц внутри каждого семейства. Гомологичность структуры между семействами составляет 20-45%.

Эти два варианта были названы "flip" и "flop" (1*). Основное функциональное различие между этими двумя вариантами заключается в том, что активируемый глутаматом ток в первом случае десенситизирует до некоего постоянного уровня, в то время как "flop" субъединицы десенситизируют до уровня нулевого тока.

В семейство Каинатных рецепторов входят субъединицы GluR-5, -6, -7 и KA1 и KA2. Все они характеризуются высокой аффинностью к каинату. При этом только субъединицы GluR-5 и GluR-6 способны образовывать функциональные каналы. Каналы образованные из этих субъединиц (Рис.3) характеризуются десенситизирующим каинатным ответом (4,5,10). Важно отметить также, что GluR-6 каналы не отвечают на аппликацию AMPA. Что касается остальных

* Номера в скобках соответствуют собственным публикациям приведенным в конце работы

членов семейства кинатных рецепторов, то хотя они и не образуют

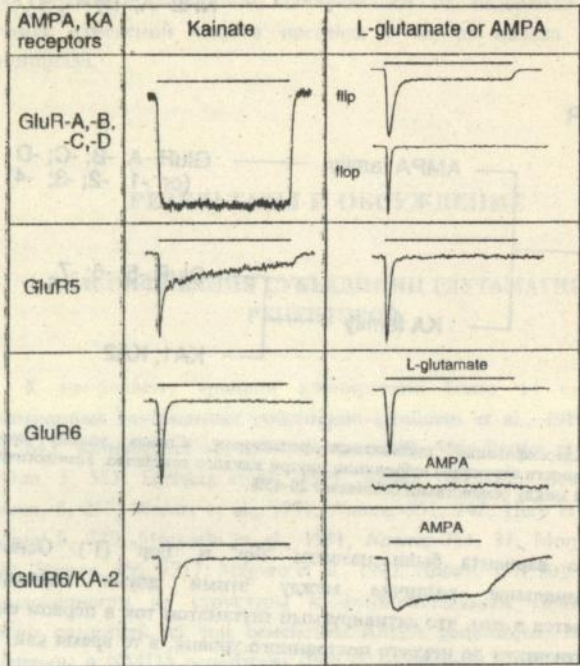


Рис.3. Записи токов в ответ на быструю подачу агонистов различных глутаматных рецепторов AMPA и кинатного типов. Линии над каждой записью указывают на продолжительность аппликации агонистов. Мембранный потенциал -60 мВ.

каналов сами по себе, однако при коэкспрессии с субъединицами GluR-5 и GluR-6 они модифицируют свойства последних (5). Следует отметить, что KA1 и KA2 субъединицы образуют гетеромерные каналы только с GluR-5 и GluR-6. Поэтому мы объединили эти два типа субъединиц в одно семейство кинатных рецепторов.

Семейство NMDA рецепторов включает в себя субъединицы NR1 и NR2A, B, C, D. При коэкспрессии субъединицы NR1 и какой либо из субъединиц NR2A, -B, -C или -D образуются каналы различающиеся по кинетике активированного глутаматом тока (Рис.4) и чувствительности их к блокированию ионами Mg^{2+} .

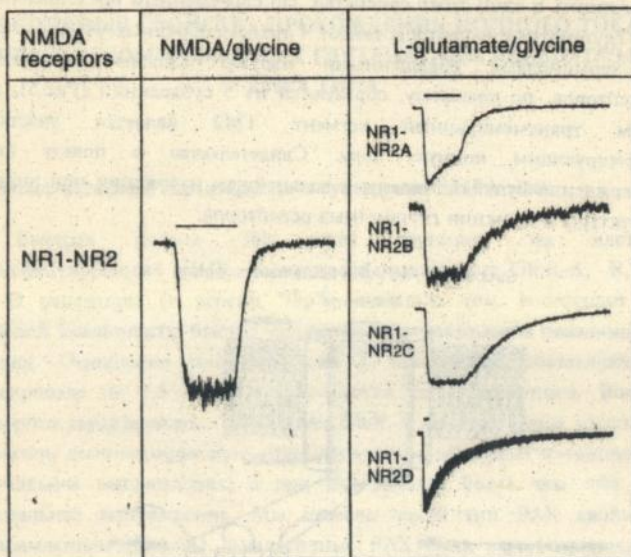


Рис. 4. Записи токов через различные комбинации субъединиц NMDA рецепторов.

Однако основные характерные свойства NMDA рецепторов, а именно, медленная кинетика активированного глутаматом тока, высокая проницаемость для ионов Ca^{2+} , чувствительность к глицину и потенциалозависимость магниевого блока сохраняются для всех комбинаций субъединиц (7). Следует отметить, что из всех субъединиц NMDA типа, только NR1 формировала гомомерные каналы при только экспрессии в ооцитах (Moriyoshi et al, 1991, *Nature*, 354, 31). Субъединицы NR2 экспрессировались только в

сочетании с NRI как в ооцитах так и в фибробластах. Это указывает на то, что нативные NMDA рецепторы, по-видимому, являются каналами гетеромерной структуры, причем субъединица NRI является обязательным компонентом.

При всем многообразии субъединиц глутаматных рецепторов и различии их свойств, структурно все глутаматные рецепторы можно объединить в одно супер семейство. По современным представлениям все глутаматные рецепторы имеют 4 трансмембранных участка с N и C терминалами обращенными наружу. Каналы глутаматных рецепторов, по-видимому, образуются из 5 субъединиц (Рис.5), при этом трансмембранный сегмент TM2 является участком, формирующим ионную пору. Свидетельства в пользу этого утверждения будут приведены в дальнейшем изложении при анализе структуры и функции глутаматных рецепторов.

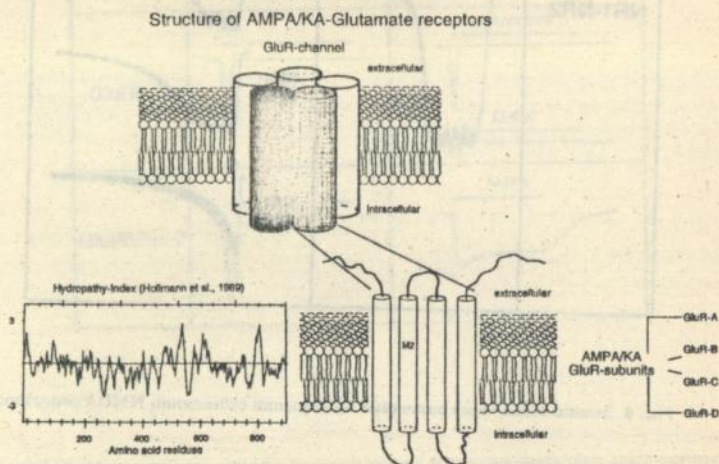


Рис.5. Схематическое представление структуры каналов глутаматных рецепторов и расположение в мембране трансмембранных участков отдельной субъединицы (на примере субъединиц AMPA-каннатного типа). Количество трансмембранных участков и их взаимное расположение предполагается на основе анализа индекса гидропатии.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОХОЖДЕНИЯ ИОННОГО ТОКА ЧЕРЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ AMPA ТИПА.

Вольт-амперные характеристики субъединиц AMPA типа.

Быстрая подача 300 мкМ глутамата на клетки, трансфектированные сДНК, кодирующей гомомерные GluR-A, -B, -C и -D рецепторы (в версии "flp"), вызвала ток, состоящий из пиковой компоненты быстро спадающей до некоторого постоянного уровня. Отношение пикового тока к постоянной составляющей варьировало от 2,5 до 8 в зависимости от субъединицы. Вольт-амперная характеристика (ВАХ) для GluR-A каналов имела сложный характер, демонстрируя при отрицательных мембранных потенциалах аномальное выпрямление, а при потенциалах более чем +60 мВ нормальное выпрямление. Мы назвали такой тип ВАХ двойным выпрямлением (Рис.6А). Аналогичные ВАХ были зарегистрированы для двух других субъединиц GluR-C и -D (Таблица 2). Однако для GluR-B каналов ВАХ имела характер нормального выпрямления в диапазоне потенциалов ± 80 мВ (Рис.6В). Для каждой из субъединиц характер ВАХ для пиковый и постоянной составляющих тока был одинаков. Это обстоятельство позволило в дальнейшем для определения ВАХ использовать пилообразную стимуляцию.

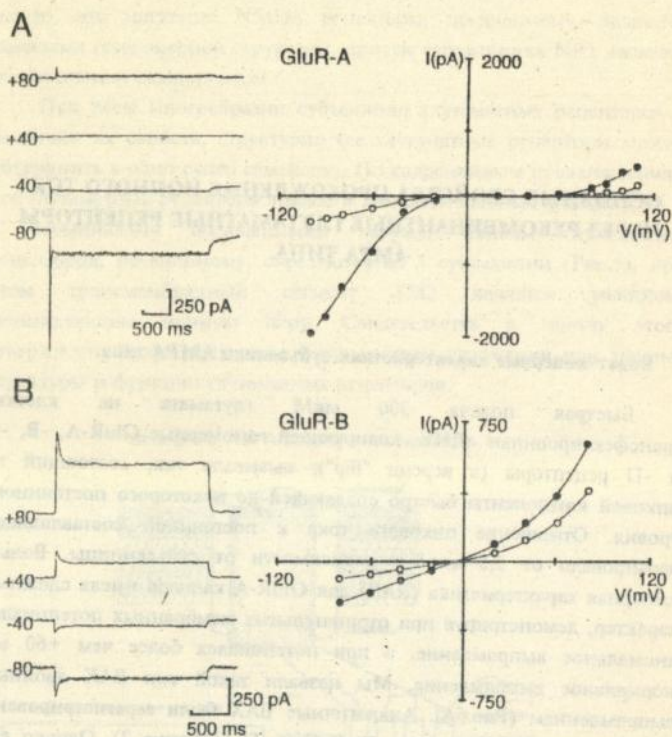


Рис.6. Зависимость характера ВАХ от типа субъединиц глутаматных рецепторов. Данные из экспериментов на клетках трансфектированных одиночными субъединицами GluR-A (A) и GluR-B (B). ВАХ были получены при быстрой подаче 300 мкМ глутамата при различных значениях поддерживаемого мембранного потенциала. В каждой секции записи токов показаны слева, а соответствующие ВАХ для пиковых (●) и постоянных (○) компонент тока - справа. Сплошными линиями показаны полиномиальные функции, экстраполирующие соответствующие экспериментальные точки. В каждом случае аналогичные данные получены на 3-4 других клетках.

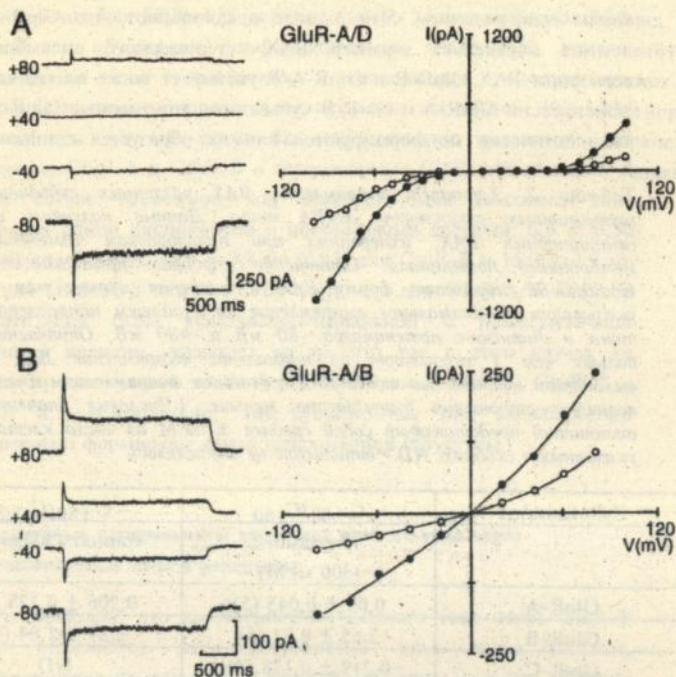


Рис.7. Записи токов и соответствующие ВАХ для пиковых (●) и постоянных (○) компонент тока для комбинаций субъединиц GluR-A/D (A) и GluR-A/B (B). Экспериментальные условия такие же как и на Рис.3.

Козэкспрессия GluR-A и -D субъединиц приводила к формированию гетеромерных каналов GluR-A/D, демонстрирующих ВАХ с двойным выпрямлением, аналогичную ВАХ гомомерных составляющих (Рис.7А). Однако гетеромерные каналы, сформированные из субъединиц GluR-A и GluR-B (GluR-A/B) имели ВАХ подобную той что и GluR-B (Рис.7В). Эксперименты, проведенные с помощью пилообразной подачи мембранного потенциала показали, что при совместной экспрессии двух субъединиц результирующие гетеромерные каналы имеют простую ВАХ с нормальным выпрямлением только если GluR-B является частью рецептора (Таблица 2). В противном случае имеют место ВАХ

с двойным выпрямлением. Эти данные предполагают, что GluR-B субъединица определяет характер ВАХ гетеромерного ансамбля. Схожесть форм ВАХ GluR-B и GluR-A/B указывает также на то, что при коэкспрессии GluR-A и GluR-B субъединиц гомомерные GluR-A каналы практически не формируются или их образуется слишком мало.

Таблица 2. Характер выпрямления ВАХ различных субъединиц глутаматных рецепторов AMPA типа. Данные получены из стационарных ВАХ, измеренных при пилообразном изменении мембранного потенциала. Отношение хордовых проводимостей G_{+80}/G_{-80} отражает форму ВАХ. Отношения меньше чем 1 указывают на аномальное выпрямление во входящем направлении тока в диапазоне потенциалов -80 мВ и +80 мВ. Отношения больше чем 1 указывают на нормальное выпрямление ВАХ в выходящем направлении тока. ВАХ с двойным выпрямлением имели величину отношения существенно меньше 1. Числовые значения отношений представляют собой среднее \pm SEM из числа клеток указанных в скобках. ND - отношение не вычислялось.

Субъединица	G_{+80}/G_{-80}	G_{+80}/G_{-80}
	Глутамат (300 мкМ)	Каинат (300мкМ)
GluR-A	0,07 \pm 0,045 (5)	0,206 \pm 0,125 (7)
GluR-B	2,65 \pm 0,51 (5)	2,87 \pm 1,04 (4)
GluR-C	0,219 \pm 0,138 (4)	ND
GluR-D	0,125 \pm 0,034 (5)	0,122 \pm 0,048 (5)
GluR-A/B	2,02 \pm 0,27 (5)	1,9 \pm 0,14 (9)
GluR-A/C	0,45 (1)	ND
GluR-A/D	0,108 \pm 0,037 (4)	0,09; 0,1 (2)
GluR-B/C	1,5 \pm 0,46 (4)	ND
GluR-B/D	2,2 \pm 0,16 (9)	2,28 \pm 0,46 (4)

В отличие от гомомерных каналов ВАХ пиковой и постоянной компонент для комбинации GluR-A/B отличались друг от друга. Для количественного описания этого различия мы вычислили отношение хордовых проводимостей, измеренных при потенциалах +80 мВ и -80 мВ (G_{+80}/G_{-80}), что является мерой потенциалозависимости активируемого агонистом тока. В 5 клетках, экспрессирующих GluR-A/B каналы это отношение составляло $1,77 \pm 0,26$ (среднее \pm S.E.M.) для пиковых значений тока и $2,72 \pm 0,4$ для постоянной составляющей ($P < 0,05$, парный t-тест). Такое различие предполагает,

что в гетеромерных GluR-A/B каналах быстро десенситизирующий пиковый ток обусловлен конформационным состоянием канала, отличающимся от состояния, проводящего постоянную составляющую тока. Степень десенситизации вызванной 300 мкМ глутамата при -60 мВ также была существенно различной для гомомерных GluR-A и GluR-B и гетеромерных GluR-A/B каналов. В каждом случае временной ход десенситизации пикового тока описывался одной экспонентой с постоянными времени: $6,5 \pm 0,56$ мс ($n=9$) для GluR-A; $35,9 \pm 9,8$ мс ($n=3$) для GluR-B и $16,9 \pm 2,3$ мс ($n=6$) для GluR-A/B каналов. Тот факт, что для GluR-A/B каналов десенситизация была моноэкспоненциальной с промежуточной постоянной времени указывает на то, что ток в этом случае не является просто суммой токов через гомомерные каналы GluR-A и GluR-B, и, следовательно, эти субъединицы при коэкспрессии действительно формируют канал гетеромерной структуры.

Структурные детерминанты характера ионного тока через рекомбинантные AMPA рецепторы.

Мы показали, что характеристики ионного тока через GluR-B каналы отличаются от характеристик тока через каналы, сформированные из субъединиц GluR-A, -C или -D, и что наличие GluR-B определяет ВАХ гетеромерных каналов. Анализируя первичную структуру рецепторов, мы обнаружили, что трансмембранный участок TM2, который предположительно (по аналогии с ацетилхолиновыми рецепторами) может участвовать в формировании ионной поры, идентичен для каждой из четырех субъединиц по всей длине за исключением одного места. В позиции 586 аминокислотной последовательности GluR-B(R586) содержит положительно заряженную аминокислоту аргинин (R), в то время как в субъединицах GluR-A, -C или -D, в гомологичных позициях находится нейтральная аминокислота глутамин (Q) GluR-A(Q582), -C(Q590) и -D(Q587) (Рис.8А). Используя технику точечной мутации, для субъединиц GluR-B и GluR-D нам удалось получить субъединицы мутанты, в которых соответственно аргинин был заменен на глутамин GluR-B(R586Q) и наоборот GluR-D(Q587R). Форма ВАХ для субъединиц мутантов при такой замене обратимо изменилась (Рис.8В и С). Теперь мутированные каналы GluR-B(R586Q) имели ВАХ с

двойным выпрямлением, в то время как мутированные каналы GluR-P(Q587R) имели ВАХ с нормальным выпрямлением.

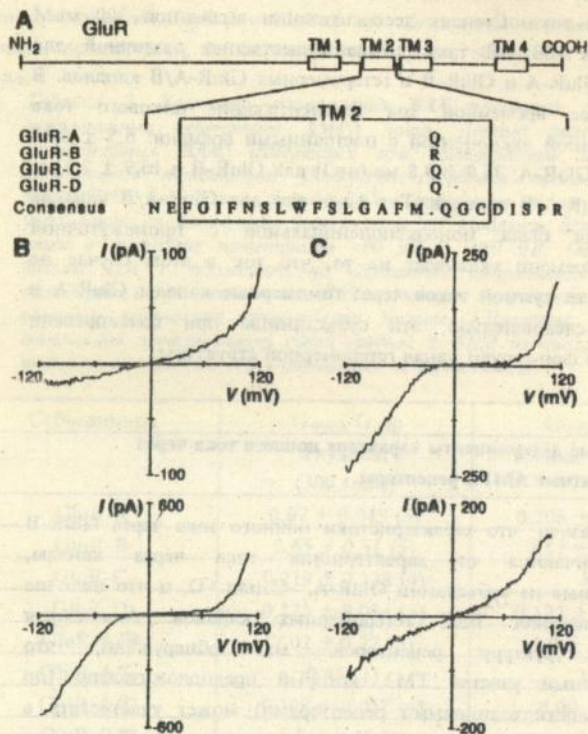


Рис.8. Отличие в одной аминокислоте в трансмембранном сегменте TM2 изменяет ВАХ. (А) Наверху показана схематическая диаграмма первичной структуры субъединиц глутаматных рецепторов AMPA типа, показывающая взаимное расположение трансмембранных участков. Внизу раскрыта последовательность аминокислот в сегменте TM2. Различие между субъединицами GluR-B и остальными, только в одной аминокислоте (полная последовательность аминокислот для всех субъединиц приведена в работе Keinanen et al.; 1990, Science, 49, 556)

(А) Влияние на форму вольт-амперной характеристики мутации субъединицы GluR-B (верхняя ВАХ) в субъединицу мутант GluR-B(R586Q) (нижняя ВАХ). Каждая ВАХ получена при пилообразном изменении мембранного потенциала на одиночной клетке.

(С) Данные эксперимента аналогичного показанному в (А) с немутированной субъединицей GluR-P (верхняя ВАХ) и мутантом GluR-D(Q587R) (нижняя ВАХ). В каждом из экспериментов в качестве агониста применялся глутамат (300 мкМ). Эти и аналогичные кривые были использованы для вычисления отношений хордовой проводимостей, приведенных в Таблицах 2 и 3.

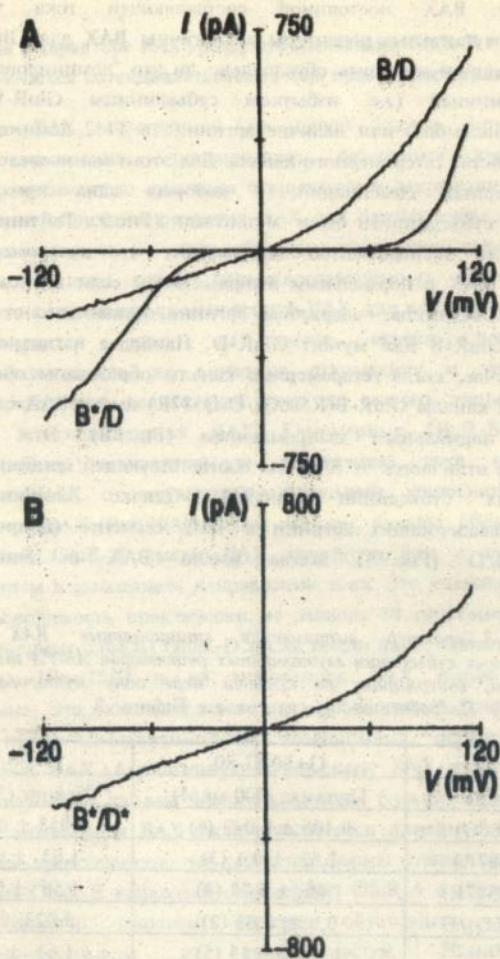


Рис.9. Аргинин в трансмембранном участке TM2 доминирует в поведении гетеромерных каналов.

(A) Наложенные ВАХ, полученные с помощью пилообразного изменения мембранного потенциала на двух разных клетках, экспрессирующих либо GluR-B/D либо GluR-B(R586Q)/D (GluR-B*/D) каналы.

(A) ВАХ, полученная на клетке, экспрессирующей гетеромерную комбинацию мутантов GluR-B(R586Q) и GluR-D(Q587R) (GluR-B*/D*). Эта комбинация также содержит аргинин, привнесенный мутантом GluR-D(Q587R).

Поскольку ВАХ постоянной составляющей тока через гетеромерные глутаматные рецепторы аналогичны ВАХ для GluR-B каналов, мы решили выяснить обусловлено ли это "доминирование" самой субъединицей (т.е. избытком субъединицы GluR-B в гетеромерном ансамбле) или наличие аргинина в ТМ2 доминантно определяет свойства гетеромерного канала. Для этого мы исследовали ВАХ гетеромерных комбинаций, в которых одна или обе составляющие субъединицы были мутантами (Рис.9, Таблица 3). Результаты этих экспериментов показывают, что гетеромерные каналы имеют ВАХ с нормальным выпрямлением если в ансамбле присутствует субъединица, содержащая аргинин, независимо от того будет ли это GluR-B или мутант GluR-D. Наиболее наглядно это показано в случае, когда гетеромерные каналы образованы обоими мутантами. Так каналы GluR-B(R586Q)/D(Q587R) имели ВАХ с ярко выраженным нормальным выпрямлением (Рис.9В). Эта ВАХ практически не отличается от ВАХ для соответствующей комбинации немутированных субъединиц (Рис.9А). Однако комбинации субъединиц, не содержащих аргинин в ТМ2 сегменте (например, GluR-B(R586Q)/D (Рис.9А) всегда имели ВАХ с двойным выпрямлением.

Таблица 3. Характер выпрямления стационарные ВАХ для мутированных субъединиц глутаматных рецепторов АМРА типа и комбинаций, содержащих по крайней мере одну мутированную субъединицу. Подробнее смотри описание к Таблице 2.

	G+80/G-80	G+80/G-80
Субъединицы	Глутамат (300 мкМ)	Каинат (300мкМ)
GluR-B(R586Q)	0,106 ± 0,042 (6)	0,055 ± 0,031 (4)
GluR-D(Q587R)	1,52 ± 0,1 (3)	1,63 ± 0,13 (5)
GluR-B/D(Q587R)	1,65 ± 0,28 (3)	1,56 ± 0,18 (3)
GluR-B(R586Q)/D	0,058; 0,83 (2)	0,023; 0,31 (2)
GluR-B(R586Q)/D(Q587R)	1,44 ± 0,15 (5)	1,61 ± 0,2 (5)
GluR-A/B(R586Q)	0,27 ± 0,1 (3)	0,12 ± 0,06 (4)
GluR-A/D(Q587R)	1,08 ± 0,08 (3)	1,59 ± 0,15 (3)
GluR-B/B(R586Q)	2,32 ± 0,28 (3)	2,35 ± 0,14 (3)
GluR-D/D(Q587R)	1,14 ± 0,08 (4)	1,86 ± 0,05 (4)

Различия в характере ВАХ между субъединицами GluR-B и GluR-D определяются потенциалозависимостью проводимости каналов.

Форма ВАХ, измеренной на целой клетке определяется потенциалозависимостью проводимости одиночных каналов и потенциалозависимостью кинетики открывания и закрывания канала. Для выяснения причины различия ВАХ для разных субъединиц мы провели эксперименты со скачкообразным изменением мембранного потенциала. В этом случае потенциалозависимость проводимости канала должна определяться мгновенной ВАХ, для которой амплитуда тока измеряется сразу же после скачка потенциала, потенциалозависимость же кинетики открывания и закрывания канала определяется релаксацией тока до нового стационарного состояния и стационарной ВАХ. Гомомерные GluR-B каналы демонстрировали незначительную релаксацию тока и имели мгновенную ВАХ с несущественно меньшей кривизной чем у стационарной ВАХ (Рис.10А). Таким образом, каналы, образованные субъединицей GluR-B имеют ВАХ линейную или с небольшим выпрямлением в выходящем направлении тока. Это указывает на то, что их проводимость практически не зависит от потенциала. Токи через гомомерные каналы GluR-D также имели лишь незначительную релаксацию (Рис.10В) и их мгновенная ВАХ имела двойное выпрямление. Это указывает на то, что проводимость этих каналов является потенциалозависимой и, по-видимому, определяет вид стационарной ВАХ. Аналогичную мгновенную ВАХ имели GluR-A каналы. GluR-B/D каналы демонстрировали большую релаксацию тока и их мгновенная ВАХ была практически линейной (Рис.10С). Эти данные предполагают, что различие формы стационарных ВАХ гомомерных GluR-B каналов и гомомерных GluR-A и -D, а также и GluR-C каналов главным образом обусловлено различием потенциалозависимости их проводимостей. Доминирование субъединицы GluR-B в гетеромерных каналах может быть связано с ее доминированием в определении потенциалозависимости проводимости канала. Однако, в виду того, что ВАХ для одиночных каналов не была построена, из-за малой проводимости одиночных каналов (~ 1 пС), существует возможность наличия быстрой релаксации (< 1 мс), которая не могла быть измерена в наших экспериментальных условиях.

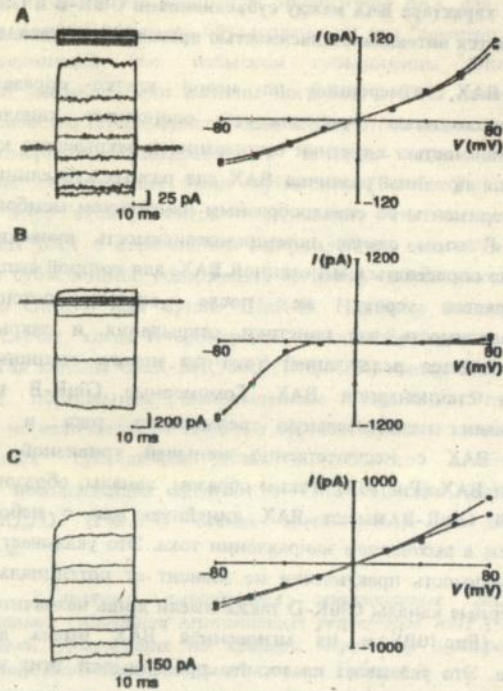


Рис.10. Потенциалозависимая проводимость каналов определяет различие в форме стационарных ВАХ между GluR-B и GluR-D каналами. Вольт-амперные кривые были построены с использованием скачкообразного изменения мембранного потенциала (A) для GluR-B, (B) для GluR-D и (C) для GluR-B/D каналов. Слева показаны записи токов в ответ на скачки потенциала (схематически показанные выше записей тока) от 0 мВ до ± 80 , ± 60 , ± 40 и ± 20 мВ. Результирующие мгновенные (●) и стационарные (○) ВАХ показаны справа. Сплошными линиями показаны кривые полиномиальных функций, экстраполирующих экспериментальные точки. Для GluR-B и GluR-B/D каналов стационарные ВАХ имеют более ярко выраженное выпрямление в выходящем направлении тока чем мгновенные ВАХ. Степень выпрямления (G_{+80}/G_{-80}) для GluR-B в данном случае составляла 1,85 для стационарного тока и 1,55 для мгновенного тока. Для GluR-B/D эти величины были соответственно 1,72 и 1,2. Для GluR-D это отношение было практически одинаковым в обоих случаях и составляло 0,08. Аналогичные результаты были получены на 2-3 других клетках для каждой из комбинаций субъединиц.

Приведенные данные показывают, что ионный транспорт через рекомбинантные глутаматные рецепторы AMPA типа критически зависит от аминокислотной последовательности трансмембранного сегмента TM2. Аргинин, размещенный внутри этого сегмента ближе к внеклеточному концу определяет форму ВАХ с нормальным выпрямлением как для гомомерных, так и гетеромерных каналов. Выпрямление проводимости в никотиновых ацетилхолиновых рецепторах зависит от различных аминокислотных остатков в M2 трансмембранном сегменте их субъединиц (Imoto et al., 1988, *Nature*, 335, 6191; Villaroej et al., 1991, *Proc. R. Soc London, Ser. B*, 243, 69). При этом если свободный заряд кольца из аминокислот на внешней стороне M2 сделать более положительным, отрицательный участок ВАХ для одиночных каналов становится менее крутым. Полученные нами результаты могут быть интерпретированы аналогичным образом. Изменение заряда сегмента TM2 на более положительный путем замены определенных аминокислот (глутамин на аргинин), приводит к менее крутой ВАХ при отрицательных потенциалах. Таким образом, наши данные подтверждают точку зрения о том, что сегмент TM2 глутаматных рецепторов AMPA типа пронизывает мембрану и формирует часть поры ионного канала. Большинство нативных AMPA рецепторов имеют линейную ВАХ или ВАХ с нормальным выпрямлением (Mayer and Westbrook, 1987, *Progr. Neurobiol.*, 28, 197). Наши данные предполагают, что эти рецепторы должны содержать субъединицу GluR-B. Однако не исключено, что может быть найдена другая субъединица, имеющая аналогичные свойства. С другой стороны в субпопуляции культивированных нейронов гиппокампа активируемый каинатом ток имел ярко выраженное аномальное выпрямление (Iino et al., 1990, *J. Physiol. (London)*, 424, 151). Эти глутаматные рецепторы, по-видимому, не содержат GluR-B. Свойства рекомбинантных гетеромерных глутаматных рецепторов (содержащих GluR-B) сравнимы со свойствами нативных глутаматных рецепторов не-NMDA типа, например в нейронах гиппокампа. В пирамидальных нейронах гиппокампа крысы в участке CA3 ВАХ для пиковых значений тока имеет меньшую кривизну чем ВАХ постоянной составляющей, временной ход десенситизации быстрого тока аналогичен таковому для гетеромерных GluR-A/B каналов (12). Возбужденный постсинаптический ток (ВПСТ) в пирамидальных нейронах участков CA1 и CA3 также демонстрируют линейную ВАХ

(Sah et al., 1990, *J. Physiol. (London)*, 430, 605). Представляется весьма вероятным, что потенциалозависимые свойства ВПСТ, пропускаемого не-NMDA рецепторами, определяются субъединицей GluR-B.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ АМРА РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ РЕДАКТИРОВАННОЙ ФОРМОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ.

Редктированные и нередктированные варианты субъединицы GluR-B.

В гетеромерных ансамблях из субъединиц АМРА рецепторов, GluR-B субъединица определяет свойства прохождения моновалентных ионов наличием аргинина в определенном месте трансмембранного сегмента TM2. Как оказалось, аргинин в этой позиции не кодируется GluR-B геном, а вводится путем редактирования мРНК для GluR-B и заменяет кодируемый геном глутамин (Sommer et al., 1991, *Cell* 67, 11). Анализ сДНК, сконструированной с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по РНК из эмбрионального мозга показал, что это редактирование регулируется возрастными изменениями. На ранних стадиях развития (Э 14 и П 0) небольшой процент GluR-B мРНК не претерпевает редактирования (Рис.11А) и, следовательно, в эмбриональном мозге экспрессированы GluR-B субъединицы с TM2 сегментом идентичным таковому субъединиц GluR-A, -С и -D и они сосуществуют вместе с редактированной формой.

Проницаемость гомомерных АМРА рецепторов для двухвалентных ионов.

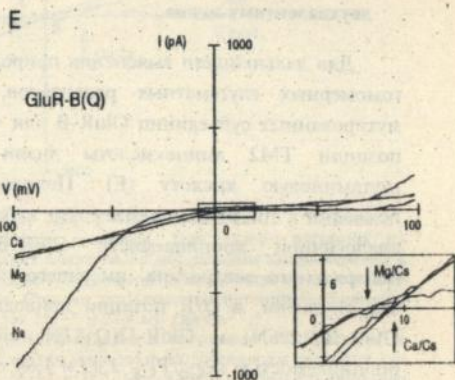
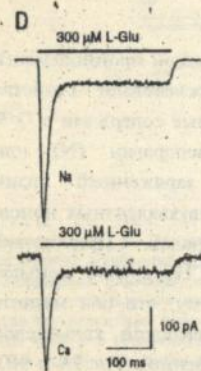
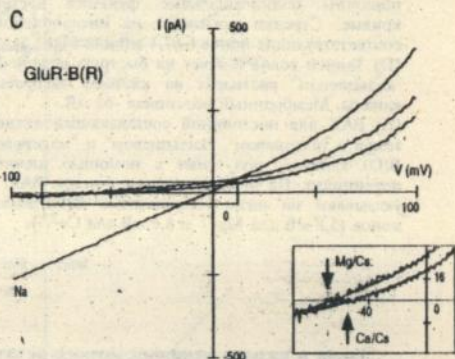
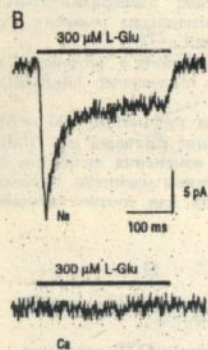
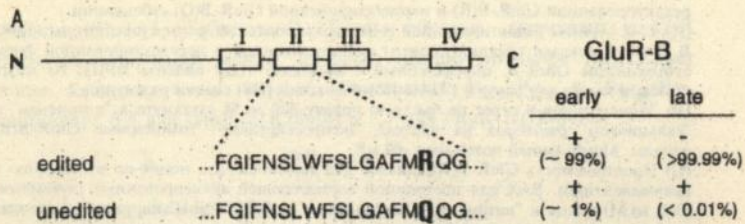
Проницаемость гомомерных каналов, образованных из редактированной и нередктированной субъединиц GluR-B

иллюстрирована на Рис.11В-11Е. На Рис.11В и 11D показаны записи токов, активированных глутаматом при мембранном потенциале -60 мВ в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах. На клетках, экспрессирующих редактированную GluR-B(R) субъединицу входящий ток регистрируется в "натриевом" растворе и не регистрируется в "кальциевом" (Рис.11В). В то же время на клетках, экспрессирующих нередактированную GluR-B(Q) субъединицу входящий ток может быть зарегистрирован как в "натриевом" так и в "кальциевом" растворах (Рис.11D). Соответственно клетки, экспрессирующие эти два типа GluR-B каналов имеют существенно различную проницаемость для двухвалентных ионов по отношению к моновалентным ионам. Это видно из различия в сдвиге потенциалов реверсии тока при изменении наружного раствора с "натриевого" на "кальциевый" или "магниевый". Например, в клетках экспрессирующих GluR-B(R) субъединицу потенциал реверсии сдвигался с $-1,24 \pm 1,8$ мВ к $-50,8 \pm 1,9$ мВ ($n=3$) в "кальциевом" растворе и даже к более отрицательным значениям в "магниевом" растворе (Рис.11С; Таблица 4), указывая на то, что этот гомомерный канал имеет низкую проницаемость для двухвалентных катионов по отношению к моновалентным (P_{Ca}/P_{Cs} : 0,05; P_{Mg}/P_{Cs} : 0,018; 0,025). В отличие от этого, в клетках, экспрессирующих гомомерный GluR-B(Q) канал, имеющих ВАХ с двойным выпрямлением в "натриевом" растворе, потенциал реверсии сдвигался с $-9,3 \pm 5$ мВ ($n=7$) к $+10,3 \pm 2,9$ мВ ($n=6$) при изменении наружного раствора с "натриевого" в "кальциевый" (Рис.11Е). Это указывает на то, что гомомерные каналы, образованные нередактированной субъединицей GluR-B(Q) характеризуются высокой проницаемостью двухвалентных ионов по отношению к моновалентным (P_{Ca}/P_{Cs} : 1,2; P_{Mg}/P_{Cs} : 0,8) (Таблица 4). Подобное соотношение проницаемостей наблюдалось в клетках, экспрессирующих гомомерные GluR-A и GluR-D каналы (Таблица 4). При этом введение аргинина вместо глутамина в позиции Q/R сегмента ТМ2 в GluR-D(Q587R) канале полностью изменяло такое поведение, приводя к низкой проницаемости для двухвалентных ионов в мутированной субъединице (Таблица 4). Сравнимая форма ВАХ, измеренных в "кальциевом" и "магниевом" растворах для субъединиц GluR-B(Q), GluR-A, GluR-D с одной стороны и GluR-B(R) и GluR-D(Q587R) с другой стороны, подтверждает тот факт, что гомомерные каналы образованные из субъединиц AMPA рецепторов,

не имеющих аргинин в TM2 сегменте имеют высокую проницаемость для двухвалентных ионов. Таким образом, в глутаматных рецепторах AMPA типа аминокислотный остаток (аргинин или глутамин) в позиции Q/R трансмембранного участка TM2 является основным детерминантом проницаемости для двухвалентных ионов. Наши данные расширяют результаты предыдущих работ, демонстрирующих, что в ооцитах Ca^{2+} ток пропускается через гомомерные GluR-A каналы и не проходит через гетеромерные каналы, содержащие субъединицу GluR-B(R) (Hollmann et al., 1991; Science 252, 851 Hume et al., 1991, Science, 253, 1028). Однако, гомомерные GluR-B каналы не были охарактеризованы, кроме того в ооцитах точное определение Ca^{2+} проницаемости затруднено влиянием нативного хлорного тока, активируемого ионами Ca^{2+} проходящими через глутаматные рецепторы.

Таблица 4. Потенциалы реверсии активируемого глутаматом (300 мкМ) тока в "кальциевом" (110 мМ Ca^{2+}) и "магниево" (110 мМ Mg^{2+}) наружных растворах. В шпелтке внутриклеточный раствор (140 мМ Cs^+). Величины представляют среднее \pm SEM для числа клеток, указанного в скобках. ND - величина не измерялась.

	Потенциал реверсии (мВ)	Потенциал реверсии (мВ)
Субъединица	Ca^{2+}/Cs^+	Mg^{2+}/Cs^+
GluR-B(R)	$-50,8 \pm 1,9$ (3)	-74; -67 (2)
GluR-B(Q)	$10,3 \pm 2,9$ (6)	1,9; 5,8 (2)
GluR-A	$13,0 \pm 5,0$ (9)	2,1; 6,4 (2)
GluR-D	$12,7 \pm 2,3$ (8)	$4,9 \pm 0,7$ (3)
GluR-D(Q587R)	-48,4 (1)	-44 (1)
GluR-B(R586N)	$21,6 \pm 1,5$ (3)	$-8,6 \pm 3,6$ (3)
GluR-D(Q587N)	$17,0 \pm 2,5$ (7)	$-17,3 \pm 5,6$ (5)
GluR-B(R)/D	$-50,7 \pm 2,6$ (8)	$-51,5 \pm 9,8$ (4)
GluR-B(Q)/D(Q587R)	-58,6; -48,9 (2)	-55; -48,9 (2)
GluR-B(R)/B(Q)	$-53,4 \pm 3,4$ (7)	ND



8-6426

Рис.11. Расположение позиции Q/R в ТМ2 сегменте и различие в проводимости и проницаемости для двухвалентных ионов гомомерных каналов, образованных из редактированной GluR-B(R) и нередитированной GluR-B(Q) субъединиц.

(А) ТМ2 сегмент редактированной и нередитированной форм субъединицы GluR-B. Справа показан средний процент редактированной форм субъединицы GluR-B, определенный с помощью ПЦР анализа мРНК из мозга крысы и мышцы для ранней (Э14 и П0) и поздней (П8) стадии развития.

(В) Записи токов в ответ на быструю подачу 300 мкМ глутамата в "натриевом" и "кальциевом" растворах на клетках, экспрессирующих гомомерные GluR-B(R) каналы. Мембранный потенциал -60 мВ.

(С) Проницаемость GluR-B(R) каналов для двухвалентных ионов по отношению к моновалентным. ВАХ для постоянной составляющей активированных глутаматом (300 мкМ) токов в "натриевом", "кальциевом" и "магнеливом" наружных растворах получены с помощью пилообразного изменения мембранного потенциала.

На вставке показан участок ВАХ в увеличенном масштабе. Гладкими линиями показаны полиномиальные функции экстраполирующие экспериментальные кривые. Стрелки указывают на интерполированные потенциалы реверсии для соответствующих ионов (-67,1 мВ для Mg^{2+} и -52,6 мВ для Ca^{2+}).

(D) Записи токов в ответ на быструю подачу 300 мкМ глутамата в "натриевом" и "кальциевом" растворах на клетках, экспрессирующих гомомерные GluR-B(Q) каналы. Мембранный потенциал -60 мВ.

(E) ВАХ для постоянной составляющей активированных глутаматом (300 мкМ) токов в "натриевом", "кальциевом" и "магнеливом" наружных растворах для GluR-B(Q) каналов, полученные с помощью пилообразного изменения мембранного потенциала. На вставке показан участок ВАХ в увеличенном масштабе. Стрелки указывают на интерполированные потенциалы реверсии для соответствующих ионов (5,8 мВ для Mg^{2+} и 8,8 мВ для Ca^{2+}).

Заряд и размер аминокислотного остатка в позиции Q/R сегмента ТМ2 определяет проницаемость AMPA рецепторов для двухвалентных ионов.

Для дальнейшего выяснения природы катионной проницаемости гомомерных глутаматных рецепторов, мы исследовали свойства мутированных субъединиц GluR-B или -D, которые содержали в Q/R позиции ТМ2 аминокислоты лизин (K), аспарагин (N) или глутаминовую кислоту (E). Положительно заряженный лизин приводил к низкой проницаемости канала для двухвалентных ионов, аналогичной проницаемости GluR-B(R) каналов. Присутствие нейтрального аспарагина, имеющего на одну CH_2 группу меньше, чем глутамин, в Q/R позиции приводило к тому, что оба мутанта GluR-B(R586N) и GluR-D(Q587N) обладали высокой кальциевой проницаемостью (P_{Ca}/P_{Cs} : 2,49 и 1,84 соответственно) (Рис.9А и 9В). Эти величины немного больше отношений для немутированных GluR-A и GluR-D и нередитированных GluR-B(Q) каналов (Таблица 4). В то же время проницаемость для ионов Mg^{2+} была существенно

меньше (Рис.12, Таблица 4). Таким образом, аспарагин в Q/R позиции производит канал, который предпочитительнее пропускает ионы кальция, а не магния. Отношение P_{Ca}/P_{Cs} к P_{Mg}/P_{Cs} составило 6,4 для GluR-B(R586N) и 7,7 для GluR-D(Q587N).

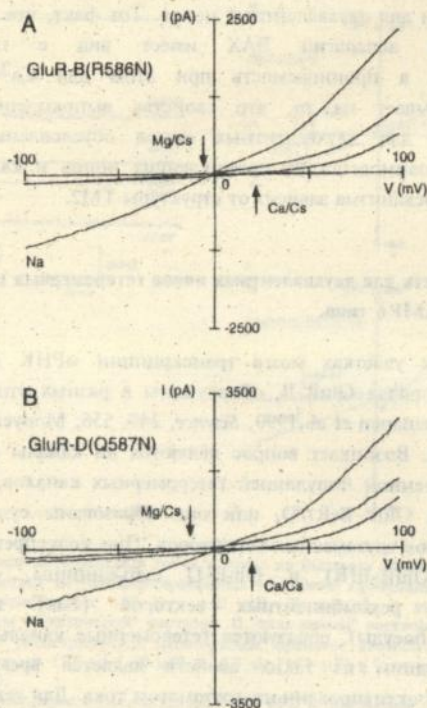


Рис.12. (А) ВАХ для гомомерных GluR-B(R586N) каналов в "натриевом", "кальциевом" и "магниевом" наружных растворах. При замене аргинина на аспарагин в субъединице GluR-B канал имеет ВАХ с нормальным выпрямлением в "натриевом" растворе, обладает высокой кальциевой проницаемостью и меньшей проницаемостью для ионов магния. Стрелки указывают на потенциалы реверсии для двухвалентных ионов (-5,1 мВ для Mg^{2+} и 22,6 мВ для Ca^{2+}). (В) ВАХ для гомомерных GluR-D(Q587N) каналов в "натриевом", "кальциевом" и "магниевом" наружных растворах. Стрелки указывают на потенциалы реверсии для двухвалентных ионов (-13,3 мВ для Mg^{2+} и 21,2 мВ для Ca^{2+}). Обратите внимание на практически одинаковую форму ВАХ для обоих мутированных каналов.

Введение глутаминовой кислоты в Q/R позицию в GluR-B и GluR-D ингибировало экспрессию функциональных каналов. Таким образом, эти эксперименты показывают, что проницаемость для

двухвалентных ионов по отношению к моновалентным в гомомерных AMPA рецепторах определяется как зарядом, так и размером аминокислотного остатка в Q/R позиции трансмембранного сегмента TM2. Положительный заряд аргинина делает канал практически непроницаемым для двухвалентных ионов. Тот факт, что при замене глутамина на аспарагин ВАХ имеет вид с нормальным выпрямлением, а проницаемость при этом для Ca^{2+} остается высокой, указывает на то, что свойства выпрямления ВАХ и проницаемость для двухвалентных ионов обусловлены разными механизмами взаимодействия проникающих ионов и каналов. При этом оба этих механизма зависят от структуры TM2.

Проницаемость для двухвалентных ионов гетеромерных глутаматных рецепторов AMPA типа.

Во многих участках мозга транскрипции мРНК для разных субъединиц, включая GluR-B, обнаружены в разных относительных количествах (Keinanen et al., 1990, *Science*, 249, 556; Моруер et al., 1991, *Neuron*, 6, 799). Возникает вопрос являются ли каналы в нативных нейронах гомогенной популяцией гетеромерных каналов, например, каналами типа GluR-B(R)/D, или они образованы суперпозицией нескольких типов глутаматных рецепторов. При коэкспрессии сДНК, кодирующих GluR-B(R) и GluR-D субъединицы, с высокой концентрацией рекомбинантных векторов (1мкг на ячейку культуральной посуды), образуются гетеромерные каналы с новыми свойствами. Одним из таких свойств является временной ход десенситизации активированного глутаматом тока. Для гетеромерного канала временной ход спада пикового тока описывался одной экспонентой с постоянной времени $14,9 \pm 0,7$ мс ($n=17$). Эта величина существенно отличалась от значений постоянных времени как для GluR-B(R) ($32 \pm 5,6$ мс ($n=5$), так и для GluR-D ($8 \pm 0,7$ мс ($n=7$)). В отличие от десенситизации тока через гетеромерные GluR-B(R)/D каналы, которая отражает наличие новых свойств, присущих этому типу каналов, проводимость и проницаемость для двухвалентных ионов этих каналов были практически идентичными таковым для GluR-B(R) каналов. В клетках экспрессирующих гетеромерные GluR-B(R)/D каналы, в "натриевом" растворе глутамат активировал как входящий так и выходящий токи, в то время как в

"кальциевом" растворе активировался только выходящий ток (Рис.13А).

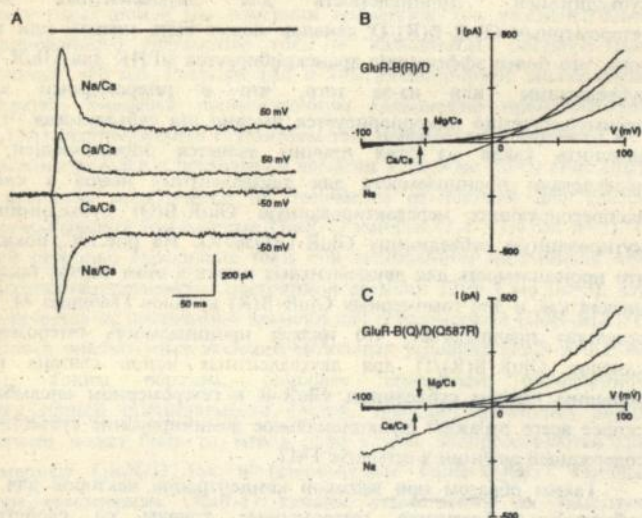


Рис.13. (А) Записи интегральных токов в ответ на быструю аппликацию 300 мкМ глутамата на клетках котрансфектированных векторами субъединиц GluR-B(R) и GluR-D при потенциалах -50 и +50 мВ. Входящий и выходящий токи зарегистрированы в "натриевом" растворе. В "кальциевом" растворе входящий ток практически не регистрируется. Постоянные времени десенситизации тока в "натриевом" растворе 13,8 мс (-50 мВ) и 14,3 мс (+50 мВ) в "кальциевом" растворе 12,3 мс (+50 мВ).

(В) ВАХ для комбинации субъединиц GluR-(B) R/D в "натриевом", "кальциевом" и "магниево" растворах. Соответствующие потенциалы реверсии 1,5 мВ, -53,7 мВ (отмечен стрелкой) и -49,8 мВ (отмечен стрелкой).

(С) ВАХ для комбинации субъединиц GluR-(Q)D(Q587R) в "натриевом", "кальциевом" и "магниево" растворах. Соответствующие потенциалы реверсии -0,4 мВ, -58,6 мВ (отмечен стрелкой) и -55 мВ (отмечен стрелкой).

При смене раствора с "натриевого" на "кальциевый", потенциал реверсии тока в клетках экспрессирующих эти каналы сдвигался с $-1,9 \pm 1,9$ мВ ($n=8$) к $-50,7 \pm 2,6$ мВ ($n=8$) и к $-51,5 \pm 9,8$ мВ ($n=4$) в

"магниево" растворе (Рис.13В; Таблица 4). Таким образом, низкая проводимость и проницаемость для двухвалентных ионов гетеромерных GluR-B(R)/D каналов определяется GluR-B(R) субъединицей. Проницаемость для двухвалентных ионов гетеромерных GluR-B(R)/D каналов может быть низкой или из-за того, что более эффективно транскрибируется мРНК для GluR-B(R) субъединицы, или из-за того, что в гетеромерный канал преимущественно инкорпорируется именно эта субъединица. Чтобы выяснить какая из этих причин является определяющей, мы исследовали проницаемость для двухвалентных ионов в клетках экспрессирующих неотредактированную GluR-B(Q) субъединицу и мутированную субъединицу GluR-D(Q587R). На рис.10С показано, что проницаемость для двухвалентных ионов в этом случае такая же низкая как и для гомомерных GluR-B(R) каналов (Таблица 4). Этот результат предполагает, что низкая проницаемость гетеромерных каналов GluR-B(R)/D для двухвалентных ионов связана не с большим числом субъединиц GluR-B в гетеромерном ансамбле, а скорее всего отражает функциональное доминирование субъединицы содержащей аргинин в сегменте TM2.

Таким образом при высокой концентрации векторов для двух субъединиц образуются гетеромерные каналы со свойствами, отличающимися от таковых для гомомерных каналов, образованных из составляющих их субъединиц.

Совместная экспрессия гомомерных GluR-D и гетеромерных GluR-B(R)/D каналов в одной клетке.

В клетках трансфектированных с использованием меньшей концентрации вектора для субъединиц GluR-B(R) и GluR-D (500 нГ или 100 нГ/на ячейку) наблюдалась промежуточная проницаемость для двухвалентных ионов. Из 35 тестированных клеток приблизительно половина демонстрировала низкую проницаемость для ионов кальция (потенциал реверсии в "кальциевом" растворе $-49,9 \pm 1,4$ мВ ($n=19$)). Однако в 16 клетках потенциал реверсии варьировал в пределах от -37 мВ до $+8$ мВ, со средним значением $-20,4 \pm 2,9$ мВ ($n=16$), указывая на промежуточную между гомомерными субъединицами GluR-B(R) и GluR-D проницаемость для двухвалентных ионов. Наличие клеток с промежуточной

проницаемостью может объясняться экспрессией гетеромерного канала нового типа. С другой стороны это может быть связано с различной степенью экспрессии проницаемых гомомерных GluR-D каналов и непроницаемых GluR-B(R) и GluR-B(R)/D каналов. Для выявления вклада GluR-D каналов в проницаемость для двухвалентных ионов мы измерили временной ход десенситизации активированного глутаматом тока в "кальциевом" растворе при потенциале -50 мВ. Рисунки 14А и 14В иллюстрируют эксперимент на клетке, имеющей промежуточную кальциевую проницаемость (Рис.14А). Активируемый глутаматом ток, переносимый ионами Ca^{2+} десенситизировался с постоянной времени $8 \pm 0,6$ мс ($n=3$) (Рис.14В). Эта величина практически не отличается от таковой для клеток экспрессирующих гомомерные GluR-D каналы ($7,4 \pm 1,4$ мс $n=3$). С другой стороны, выходящие токи при мембранном потенциале $+50$ мВ десенситизировались с постоянной времени 12 ± 1 мс ($n=3$), что не отличается от постоянной времени для гетеромерных GluR-B(R)/D каналов в аналогичных экспериментальных условиях ($12,5 \pm 1,2$ мс ($n=6$)). Таким образом, наиболее вероятным объяснением промежуточной проницаемости клеток, трансфектированных двумя векторами может быть то, что в этом случае экспрессируются как гомомерные GluR-D так и гетеромерные GluR-B(R)/D каналы, причем гомомерные GluR-D каналы ответственны за заметную проницаемость для двухвалентных ионов.

Коэкспрессия редактированной и неотредактированной форм субъединицы GluR-B в одной клетке.

Для выяснения основы функционального доминирования редактированной GluR-B субъединицы при условии приблизительно одинакового количества двух субъединиц, одной содержащей аргинин, а другой не содержащей аргинина в TM2 сегменте, мы определили проницаемость для двухвалентных ионов клеток трансфектированных векторами для GluR-B(R) и GluR-B(Q) субъединиц при одинаковой концентрации векторов (1мкГ или 100 нГ на ячейку). Во всех тестируемых клетках ($n=7$), кальциевая проницаемость была низкой (P_{Ca}/P_{Cs} : $0,04$) и несущественно отличалась от таковой для гомомерных GluR-B(R) каналов (P_{Ca}/P_{Cs} : $0,05$) (Рис.14С; Таблица 4). Это предполагает, что количество

гомомерных рецепторов, проницаемых для двухвалентных ионов очень мало.

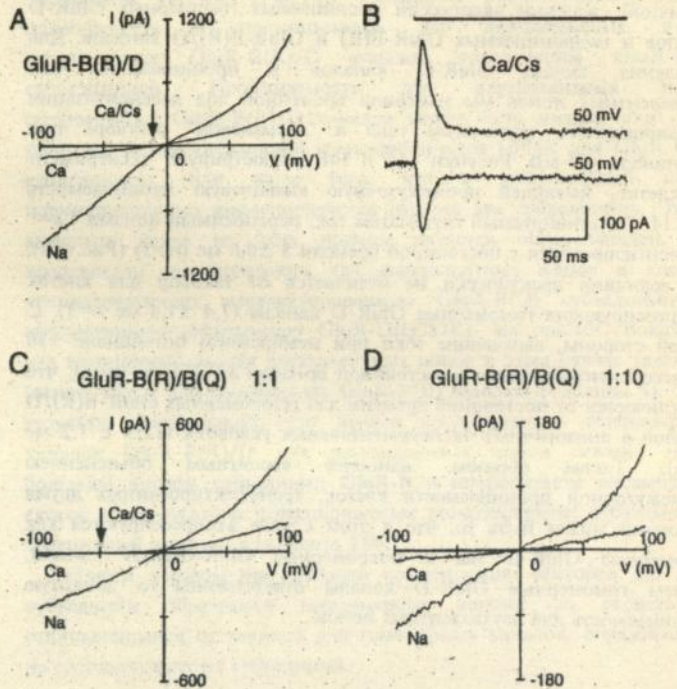


Рис.14. Промежуточная кальциевая проницаемость клеток трансфектированных векторами для двух субъединиц, одна из которых содержит аргинин в ТМ2 сегменте.

(A) ВАХ для клеток трансфектированных векторами, несущими сДНК для GluR-B(R) и GluR-D субъединиц в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -2,2 мВ и -13,9 мВ (указан стрелкой).

(B) Записи активированных глутаматом токов с той же клетки, что и на (A), в "кальциевом" растворе при потенциалах -50 и +50 мВ. Постоянные времени десенситизации тока 7,2 при -50 мВ и 11,1 при +50 мВ.

(C) ВАХ для клеток трансфектированных одинаковой концентрацией векторов, для GluR-B(R) и GluR-B(Q) субъединиц (100 нГ на ячейку) в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -1,7 мВ и -49,6 мВ (указан стрелкой).

(D) ВАХ для клеток трансфектированных высокой концентрацией вектора для GluR-B(Q) (1 мкг на ячейку) и низкой для GluR-B(R) субъединицы (100 нГ на ячейку) в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -2,3 мВ и -1,1 мВ.

Клетки демонстрировали заметную кальциевую проницаемость только когда концентрация GluR-B(R) вектора была уменьшена в 10 раз по сравнению с GluR-B(Q) (100 нг и 1мкг на ячейку соответственно). Однако даже при таком, существенно сниженном уровне GluR-B(R) только половина клеток (4 из 8 тестируемых) имели промежуточную кальциевую проницаемость.

Потенциал реверсии в "кальциевом" растворе варьировал от -31 до +6,1 мВ (усредненное значение потенциала реверсии составляло $-5,2 \pm 10,1$ мВ ($n=4$), P_{Ca}/P_{Cs} : 0,47). На рис.14D показаны ВАХ для клеток с промежуточной кальциевой проницаемостью. ВАХ в "натриевом" растворе по форме напоминает таковую для клеток, экспрессирующих гомомерные GluR-B(R) каналы, в то время как кальциевая проницаемость является промежуточной.

Таким образом, различная степень экспрессии редактированной субъединицы GluR-B может приводить к разнообразию формы ВАХ активируемых глутаматом токов и разной проницаемости клеток для двухвалентных ионов. В большинстве нейронах экспрессированы каналы AMPA типа имеющие ВАХ с нормальным выпрямлением и низкую проницаемость для двухвалентных ионов. Наши данные предполагают, что это обусловлено экспрессией редактированной формы субъединицы GluR-B. Это подтверждается данными *in situ* гибридизации. Однако субпопуляция культивированных нейронов из гиппокампа крысы характеризуется высокой проницаемостью для двухвалентных ионов вызванной каинатом (Iino et al., 1990 *J.Physiol. (London)*, 242, 151; Ozawa et al., 1991, *J.Neurophysiol.*, 66, 2). И хотя эти клетки в целом имеют ВАХ с аномальным выпрямлением, в диапазоне потенциалов от +10 до +50 мВ имеется участок демонстрирующий выпрямление в выходящем направлении тока. Биполярные клетки сетчатки саламандры также содержат AMPA рецепторы с высокой проницаемостью для двухвалентных ионов и их ВАХ имеет вид с нормальным выпрямлением (Gilberston et al., 1990; *Science*, 251, 1613). Эти данные сравнимы с поведением клеток трансфектированных с низкой концентрацией векторов для GluR-B(R) и GluR-D или GluR-B(Q) и могут означать, что интегральный ток в этих клетках обеспечивается мозаикой непронускающих и пропускающих ионы Ca^{2+} каналов AMPA типа.

АМРА РЕЦЕПТОРЫ С ВЫСОКОЙ Ca^{2+} ПРОНИЦАЕМСТЬЮ В КЛЕТКАХ БЕРГМАНОВКОЙ ГЛИИ

Наиболее наглядно роль экспрессии редактированной формы субъединицы GluR-B(R) выявилась на клетках Бергмановской глии из мозжечка крысы. Эксперименты *in situ* гибридизации показали, что в клетках Бергмановской глии экспрессированы только субъединицы GluR-A и GluR-D и не экспрессирована субъединица GluR-B. Для выяснения вопроса будет ли такая специфическая экспрессия субъединиц в этих клетках функционально коррелировать со свойствами рекомбинантных каналов мы приготовили культуру глиальных клеток из мозжечка и исследовали характер ВАХ и проницаемость для Ca^{2+} при активации их специфическими агонистами глутаматных рецепторов.

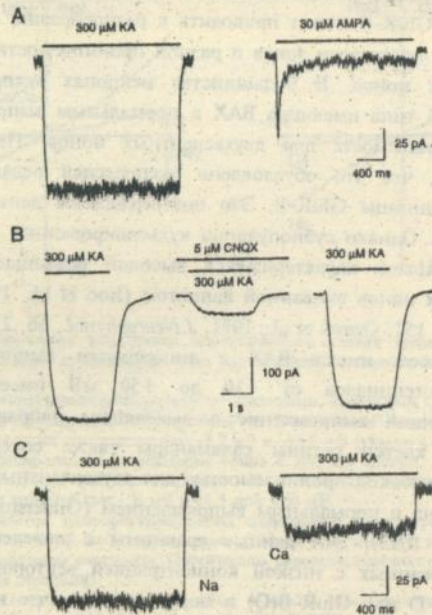


Рис.15. Свойства глутаматных рецепторов АМРА типа в клетках Бергмановской глии.

(А) Записи токов на глиальных клетках в ответ на быструю подачу 300 мкМ каината (КА, левый пробег) и 30 мкМ АМРА (правый пробег). Длительность подачи агонистов указана линиями над каждым пробегом. Клетка была оторвана от дна камеры для более быстрой смены растворов.

(В) Блокирование каинатного тока специфическим блокатором рецепторов АМРА-каинатного типа CNQX. Слева на право показаны записи токов в ответ на подачу 300 мкМ каината соответственно, в контрольном растворе, в присутствии 5 мкМ CNQX и через 20 с после отмывки.

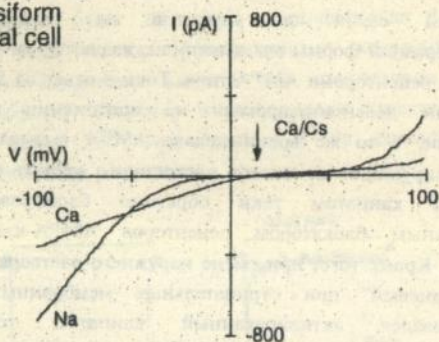
(С) Записи токов на глиальных клетках в ответ на быструю подачу 300 мкМ каината в "натриевом" растворе (140 мМ Na^+ , левый пробег) и в "кальциевом" растворе (110 мМ Ca^{2+} , правый пробег). В пипетке 140 мМ Cs^+ . Для всех записей мембранный потенциал -60 мВ.

В первой серии экспериментов на глиальных клетках веретенообразной формы мы выяснили, являются ли их глутаматные рецепторы рецепторами АМРА типа. Токи в ответ на быструю подачу каината не десенситизировали на протяжении всего времени аппликации, в то же время подача АМРА вызывала ток быстро десенситизирующий до некоего постоянного уровня ток (Рис. 15А). Вызванные каинатом токи обратимо блокировались CNQX, избирательным блокатором рецепторов АМРА-каинатного типа (Рис. 15В). Кроме того, при смене наружного раствора с "натриевого" на "кальциевый" при отрицательных мембранных потенциалах регистрировался активированный каинатом ток (Рис. 15С), указывающий на высокую Ca^{2+} проводимость глутаматных рецепторов в этих клетках. Все эти данные указывают на то, что нативные глутаматные рецепторы в глиальных клетках веретенообразной формы сформированы из субъединиц АМРА типа и не содержат субъединицу GluR-В.

Сравнение стационарных ВАХ, измеренных в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах также подтверждает это утверждение. В "натриевом" растворе ВАХ активированного каинатом тока, измеренная при пилообразном изменении мембранного потенциала имела вид с двойным выпрямлением (Рис. 16А). Потенциал реверсии тока при этом составлял 3.5 ± 2.6 мВ ($n=4$). В "кальциевом" растворе потенциал реверсии сдвигался в положительном направлении и составлял 13.3 ± 1.9 мВ ($n=4$) (Таблица 5). Эти данные предполагают величину отношения проницаемостей $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Cs}}$ порядка 1,44 и указывают на то, что нативные глутаматные рецепторы в клетках Бергмановской глии более проницаемы для ионов Ca^{2+} чем для ионов Cs^+ . Следует отметить, что наши данные согласуются с результатами, полученными

на культуральных глиальных клетках веретенообразной формы, демонстрирующих вход в эти клетки меченого кальция $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Ortega et al., 1991, *Neuroscience*, 41, 335). Таким образом, характер выпрямления ВАХ и проницаемость для двухвалентных ионов глутаматных рецепторов в клетках Бергмановской глии очень похожи на аналогичные свойства каналов рекомбинантных глутаматных рецепторов, образованных из субъединиц GluR-A и GluR-D AMPA-типа, транзиторно экспрессированных в фибробласты (Таблица 5).

A

fusiform
glial cell

B

granule cell

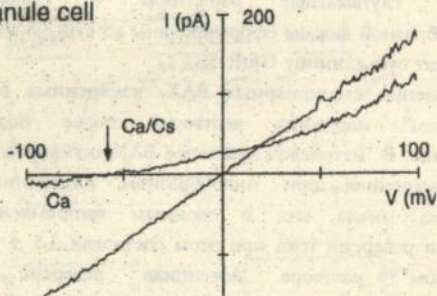


Рис.16. Высокая проницаемость для ионов Ca^{2+} глутаматных рецепторов AMPA типа в глиальных клетках веретенообразной формы и низкая Ca^{2+} проницаемость в гранулярных нейронах. ВАХ для глиальных клеток (А) и нейронов (В) в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах получены при пидообразном изменении мембранного потенциала. В качестве агониста использовался каннат (300 мкм). Стрелками указаны потенциалы реверсии в "кальциевом" растворе (13.5 мВ и -61 мВ соответственно в А и В).

Следовательно, форма ВАХ с двойным выпрямлением и высокая Ca^{2+} проницаемость глутаматных рецепторов в веретенообразных глиальных клетках могут служить ключом для идентификации субъединиц составляющих нативные каналы глутаматных рецепторов в клетках Бергмановской глии.

Таблица 5. Сравнение потенциалов реверсии и степени выпрямления ВАХ нативных каналов АМРА типа в клетках мозжечка и рекомбинантных глутаматных рецепторов экспрессированных в клетки линии НЕК 293. Экспериментальные условия во всех случаях одинаковы.

Cell/subunit	Vrev (mV) Ca/Cs	G_{+80}/G_{-80} Kainate (300 μM)
glia	13.3 \pm 1.9 (4)	0.3 \pm 0.06 (4)
neuron	-52.4 \pm 4.7 (3)	1.0 \pm 0.1 (4)
GluR-A	13.0 \pm 5.0 (9)	0.21 \pm 0.12 (7)
GluR-D	12.7 \pm 2.3 (8)	0.12 \pm 0.05 (5)
GluR-A/D	3.5 \pm 1.5 (6)	0.12 \pm 0.04 (6)

Наши данные предполагают, что, по-видимому, нативные каналы глутаматных рецепторов в клетках Бергмановской глии состоят из гомомерных субъединиц GluR-A и GluR-D или гетеромерных субъединиц GluR-A/D. Чтобы убедиться в том, что в культивированных клетках сохраняется клеточная специфичность свойств глутаматных рецепторов, мы провели аналогичные эксперименты на культуральных гранулярных нейронах. ВАХ глутаматных рецепторов активированных кайнатом в "натриевом" растворе была практически линейной с потенциалом реверсии $-1,1 \pm 3$ мВ ($n=4$) (Рис.16В). В "кальциевом" растворе потенциал реверсии сдвигался в отрицательном направлении и составлял $-52,4 \pm 4,7$ мВ ($n=3$) (Таблица 5). Этот сдвиг предполагает величину отношения проницаемостей $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Cs}}$ порядка 0,05 и указывает на низкую проницаемость глутаматных рецепторов в гранулярных нейронах из мозжечка. Эти данные согласуются с опубликованными ранее результатами (Wyllie et al., 1991, *J. Physiol. (London)* 432, 235; Wyllie &

Cull-Candy, 1992, *J. Physiol. (London)*, 446, 598P). Хотя мы не можем полностью исключить, что композиция субъединиц в каналах глутаматных рецепторов глиальных клеток не меняется в культуральных условиях, одно из свойств каналов глутаматных рецепторов, не имеющих субъединицы GluR-B, а именно ВАХ с двойным выпрямлением, было показано в клетках Бергмановской глии на интактных срезах мозга (Muller et al., 1992, *Science*, 256, 1563).

Таким образом наши данные демонстрируют строгую корреляцию между свойствами нативных каналов глутаматных рецепторов и рекомбинантных каналов, сконструированных из субъединиц, идентифицированных методом *in situ* гибридизации.

ДЕТЕРМИНАНТЫ Ca^{2+} ПРОНИЦАЕМОСТИ В ТМ1 И ТМ2 СЕГМЕНТАХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ КАИНАТНОГО ТИПА: ВЛИЯНИЕ РЕДАКТИРОВАНИЯ мРНК.

Различные варианты аминокислотной последовательности сегмента ТМ1 в GluR-6 субъединице.

Анализ усиленного с помощью ПЦР фрагмента сДНК субъединицы GluR-6 содержащего трансмембранные участки ТМ1, ТМ2 и ТМ3 выявил различие в трех нуклеотидных позициях. Во всех трех позициях в кодирующей последовательности размещается либо аденозин (А) либо гуанозин (G). Одна позиция в которой происходит замена А на G, соответствует подверженному редактированию Q/R участку в ТМ2 сегменте субъединицы GluR-6, а также субъединиц GluR-B и GluR-5 (Sommer et al., 1991, *Cell*, 67, 11). Две другие позиции расположены в ТМ1 сегменте и предполагают замену изолейцина I (кодон АТТ) на валин V (кодон GTT) и тирозина Y (ТАС) на цистеин С (ТГС) (Рис.17). При этом имели место все возможные комбинации аминокислотной последовательности сегмента ТМ1, в которых претерпевали изменение либо один, либо оба, либо ни один из кодонов, что указывает на наличие в мозге четырех различных конфигураций ТМ1 субъединицы GluR-6. Анализ геномного ДНК показал, что в аминокислотной последовательности ТМ1 сегмента в изменяемых позициях находятся АТТ (изолейцин) и

ТАС (тирозин) кодоны (Рис.17). Таким образом, в этих позициях, как и в Q/R участке TM2, наличие кодонов, не обнаруженных в геноме GluR-6, требует перехода от А к G. Это указывает на то, что как и для аргинина в Q/R участке, замена аминокислот в TM1 субъединицы GluR-6 осуществляется редактированием РНК.

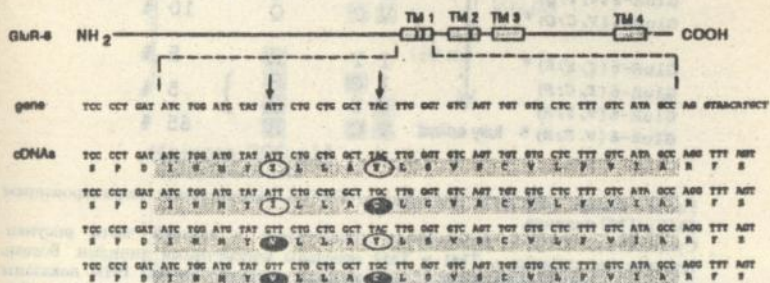


Рис. 17. Сравнение кодонов геномного и клонированного ДНК для аминокислотной последовательности сегмента TM1 субъединицы GluR-6. Сверху схематически показана субъединица GluR-6 с четырьмя трансмембранными сегментами (TM1-TM4). Как TM1 так и TM2 имеют изменяемые кодоны в позициях отмеченных поперечными линиями. Участок, кодирующий сегмент TM1 показан в развернутом виде внизу и демонстрирует геномную последовательность сегмента TM1. Два аденозина (A) в этой последовательности отмеченные стрелками заменяются на гуанозин (G) в процессе редактирования РНК, что приводит к измененной последовательности сДНК показанной ниже геномной последовательности. Аминокислоты, получающиеся в результате редактирования РНК отмечены в черных овалах.

Восемь вариантов сДНК субъединицы GluR-6.

При наличии трех мест в последовательности аминокислот TM1 и TM2, подверженных редактированию, возможно существование восьми различных вариантов субъединицы GluR-6. Анализ генерированных ПЦР сДНК с использованием специфических олигонуклеотидов показал, что в мозге крысы и мыши встречаются

все восемь вариантов: один, кодируемый геном и семь, полученных в результате редактирования РНК. Относительная частота появления этих вариантов (в %) показана на Рис.18.

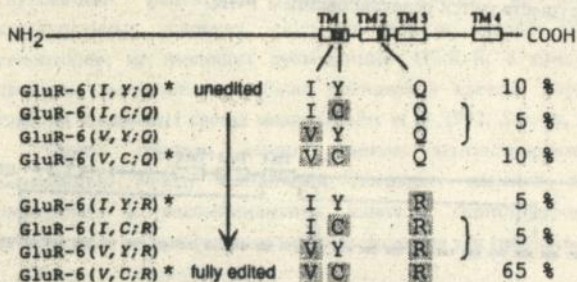


Рис.18. Восемь вариантов субъединицы GluR-6, генерируемых редактированием TM1 и TM2 кодонов.

Субъединица GluR-6 схематически представлена в верхней части рисунка. Изменяемые позиции в TM1 и TM2 отмечены поперечными линиями. Восемь вариантов субъединицы GluR-6, генерируемых редактированием РНК показаны ниже. Амино кислотные остатки в изменяемых позициях указаны в скобках. Для каждого из вариантов показана локализация этих остатков в трансмембранных сегментах. Звездочками отмечены субъединицы, которые анализировались в этой работе. Справа показана относительная частота появления каждой из форм сДНК (в процентах).

Задачей данной части исследования было выяснить влияет ли редактирование в Q/R участке сегмента TM2 субъединицы GluR-6 на характер ионной проницаемости каналов в той же степени, как это имеет место в каналах из субъединиц AMPA типа. И имеет ли функциональное значение редактирование в сегменте TM1.

На Рис.19 показаны записи токов через каналы, образованные наиболее часто встречающимся вариантом субъединицы GluR-6(V,C;R), редактированном во всех трех позициях, при быстрой аппликации различных агонистов. Глутамат и каинат вызывали ток, быстро десенситизирующийся до нулевого уровня. В ответ на подачу домоата пиковый ток спадал до некоего стационарного уровня. При отмывании домоата ток достигал нулевого уровня относительно медленно. Подача 1 мМ AMPA не вызывала детектируемого тока. Аналогичные свойства наблюдались при активации каналов, образованных из субъединиц GluR-6(V,C;Q), GluR-6(I,Y;Q), GluR-6(I,Y;R) и их гетеромерных комбинаций. В дальнейших экспериментах в качестве агонистов использовали глутамат или

домоат в насыщающих концентрациях для измерения ВАХ, соответственно, для пиковых или стационарных значений тока.

GluR- 6(Q) TM1 edited

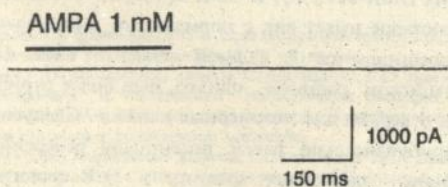
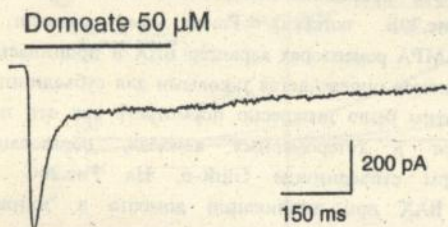
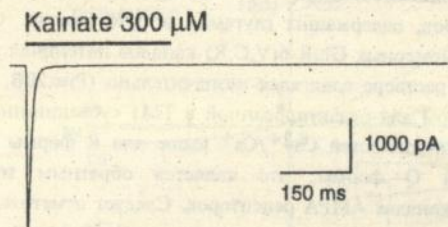
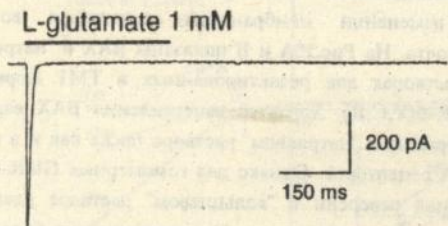


Рис.19. Записи интегральных токов через каналы образованные из полностью редактированной субъединицы GluR-6(V,C;R), экспрессированной в клетки лин"и 293 при быстрой подаче 1 mM глутамата (A), 300 мкМ кайната (A), 50 мкМ домоата (C) и 1мМ AMPA (D). Величина мембранного потенциала -60 мВ.

Кальциевая проницаемость редактированных и неотредактированных каналов субъединицы GluR-6.

Изменение проницаемости для ионов Ca^{2+} измеряли при пилообразном изменении мембранного потенциала во время аппликации домоата. На Рис.20А и В показаны ВАХ в "натриевом" и "кальциевом" растворах для редактированных в ТМ1 форм GluR-6(V,C;Q) и GluR-6(V,C;R). Характер выпрямления ВАХ варьировал между Q и R формами в "натриевом" растворе также как и в случае Q и R форм AMPA рецепторов. Однако для гомомерных GluR-6(V,C;Q) каналов потенциал реверсии в "кальциевом" растворе сдвигался в сторону отрицательных потенциалов. Это указывает на более низкое отношение проницаемостей $\text{Ca}^{2+}/\text{Cs}^{+}$ по сравнению с таковым для AMPA рецепторов, содержащих глутамин в Q/R участке. С другой стороны для гомомерных GluR-6(V,C;R) каналов потенциал реверсии в "кальциевом" растворе сдвигался незначительно (Рис.20В, Таблица 6). Таким образом для редактированной в ТМ1 субъединицы GluR-6 отношение проницаемостей $\text{Ca}^{2+}/\text{Cs}^{+}$ выше для R формы сегмента ТМ2, чем для Q формы, что является обратным тому, что наблюдалось в каналах AMPA рецепторов. Следует отметить, что для R формы входящий ток, переносимый ионами Ca^{2+} был больше чем натриевый ток. Это справедливо как для пиковой так и стационарной компонент (Рис.20В, вставка). Ранее мы показали, что в гетеромерных AMPA рецепторах характер ВАХ и проницаемость для двухвалентных ионов определяется таковыми для субъединицы GluR-V. В связи с этим было интересно посмотреть как эти параметры модифицируются в гетеромерных каналах, образованных из различных форм субъединицы GluR-6. На Рис.20С показаны стационарные ВАХ при аппликации домоата в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах полученные на клетках, экспрессирующих GluR-6(V,C;Q) и GluR-6(V,C;R) субъединицы. ВАХ в "натриевом" растворе имеет вид с нормальным выпрямлением, как если бы она доминируется R формой сегмента ТМ2. Потенциал реверсии в "кальциевом" растворе, однако, был более отрицательный чем потенциалы реверсии для гомомерных каналов. Следует отметить, что он был приблизительно равен потенциалу реверсии каналов AMPA рецепторов, содержащих аргинин в Q/R участке. Таким образом, в отношении Ca^{2+} проницаемости Q/R участок в

субъединице GluR-6 не является эквивалентным своему гомологу в GluR-A - GluR-D субъединицах.

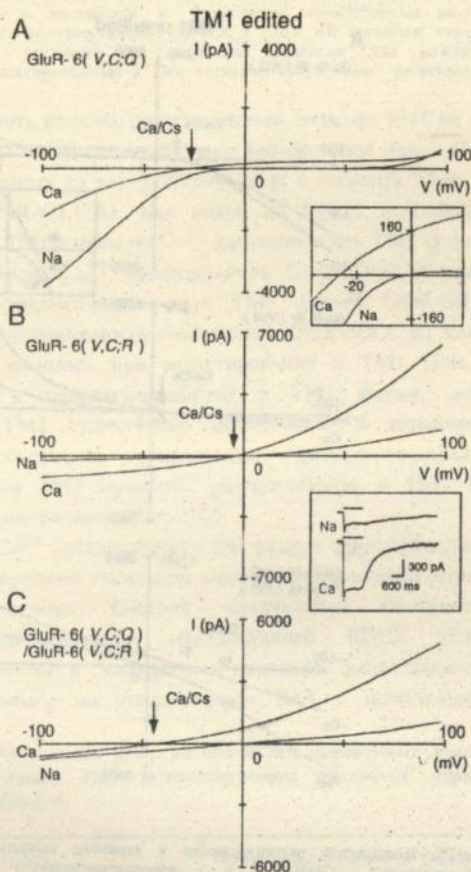


Рис.20. Кальциевая проницаемость и характер выпрямления ВАХ вариантов субъединицы GluR-6 с полностью редактированным ТМ1 сегментом.

(А): GluR-6(V,C;Q) гомомерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домоеата (50 мкМ) в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -4,1 мА и -27 мА (отмечен стрелкой). На вставке показан участок ВАХ вблизи потенциалов реверсии в увеличенном масштабе.

(В): GluR-6(V,C;R) гомомерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домоеата в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -1,5 мА и -4,4 мА (отмечен стрелкой). На вставке показаны записи токов активированных домоеатом при потенциале -60 мВ в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах.

(С): GluR-6(V,C;Q)/GluR-6(V,C;R) гетеромерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домоеата в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -1,8 мА и -43,6 мА (отмечен стрелкой).

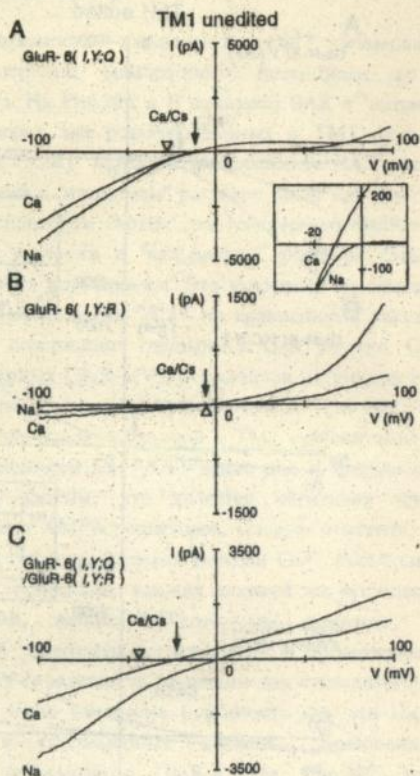


Рис.21. Кальциевая проницаемость и характер выпрямления ВАХ вариантов субъединицы GluR-6 с нерадктированным TM1 сегментом. (А): GluR-6(I,Y;Q) гомомерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домюата (50 мкМ) в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -1,2 мВ и -11,3 мВ (отмечен стрелкой). Белый треугольник указывает на потенциал реверсии для соответствующей редактированной в TM1 сегменте субъединицы представленной на Рис.17А. На вставке показан участок ВАХ вблизи потенциалов реверсии в увеличенном масштабе. (В): GluR-6(I,Y;R) гомомерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домюата в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно 2,5 мВ и -5,8 мВ (отмечен стрелкой). Белый треугольник указывает на потенциал реверсии для соответствующей редактированной в TM1 сегменте субъединицы представленной на Рис.20В.

(С): GluR-6(I,Y;Q)/GluR-6(I,Y;R) гетеромерные каналы. Стационарные ВАХ при аппликации домоеата в "натриевом" и "кальциевом" внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно 1,6 мВ и -21,3 мВ (отмечен стрелкой). Белый треугольник указывает на потенциал реверсии для комбинации соответствующих редактированных в ТМ1 сегменте субъединиц, представленной на Рис.20С.

Чтобы выяснить влияние редактирования сегмента ТМ1 на Ca^{2+} проницаемость мы измерили потенциалы реверсии для ионов Ca^{2+} в каналах, образованных из неотредактированных в сегменте ТМ1 форм GluR-6(I,Y;Q) GluR-6(I,Y;R). Как видно из Рис.21 и Таблицы 6 редактирование в ТМ1 влияет на Ca^{2+} проницаемость ТМ2 Q формы. Относительно низкая Ca^{2+} проницаемость GluR-6(V,C;Q) каналов увеличилась в неотредактированной в ТМ1 форме, GluR-6(I,Y;Q) (Рис.21А). Ca^{2+} проницаемость гомомерных GluR-6(V,C,R) каналов существенно не менялась при редактировании в ТМ1 (Рис.21В). Таким образом в неотредактированной в ТМ1 форме, эффект редактирования ТМ2 существенно ослабляется. В гетеромерной комбинации субъединиц, содержащей редактированный и неотредактированный ТМ2 сегменты, редактирование в ТМ1 также снижает Ca^{2+} проницаемость (Рис.21С)

Различие в Ca^{2+} проницаемости для разных форм субъединицы GluR-6 было обнаружено также при анализе ВАХ пиковых значений токов, активированных быстрой аппликацией глутамата, в экспериментальной ситуации моделирующей ВПСТ (Рис.22). Потенциалы реверсии в "кальциевом" растворе были аналогичны таковым, измеренным по стационарным ВАХ с использованием домоеата.

Таблица 6. Потенциалы реверсии токов активированных домоеатом в клетках линии 293, экспрессирующих различные варианты субъединицы GluR-6.

Каналы	Потенциал реверсии (мВ) Ca^{2+}/Cs^{+}
GluR-6(V,C;Q)	-24,6 ± 1,4 (8)
GluR-6(V,C;R)	-4,2 ± 0,6 (8)
GluR-6(I,Y;Q)	-12,5 ± 0,8 (9)
GluR-6(I,Y;R)	-5,6 ± 2,3 (6)
GluR-6(V,C;Q)/GluR-6(V,C;R)	-42,3 ± 2,3 (3)
GluR-6(I,Y;Q)/GluR-6(I,Y;R)	-24,2 ± 1,9 (5)

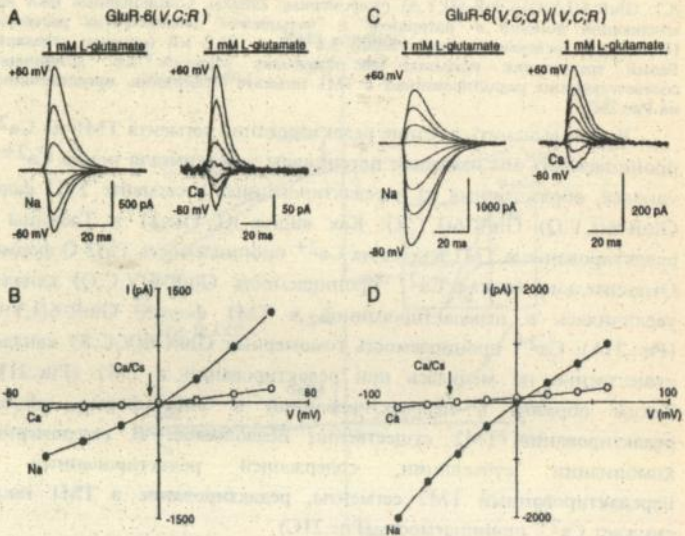


Рис.22. ВАХ пиковых значений токов, активированных быстрой аппликацией глутамата для каналов образованных из наиболее часто встречающихся форм субъединицы GluR-6 в "натриевом" и "кальциевом" растворах.

(А): GluR-6(V,C;R) гомомерные каналы. Семейство интегральных токов регистрируемых в ответ на 100 мс аппликацию глутамата при разных мембранных потенциалах в "натриевом" (слева) и в "кальциевом" (справа) внеклеточных растворах.

(В): ВАХ пиковых значений токов, показанных в А в "натриевом" (черные кружочки) и в "кальциевом" (белые кружочки) внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно 0,4 мВ и -5,4 мВ (отмечен стрелкой).

(С): GluR-6(V,C;Q)/GluR-6(V,C;R) гетеромерные каналы. Семейство интегральных токов регистрируемых в ответ на 100 мс аппликацию глутамата при разных мембранных потенциалах в "натриевом" (слева) и в "кальциевом" (справа) внеклеточных растворах.

(D): ВАХ пиковых значений токов, показанных в С в "натриевом" (черные кружочки) и в "кальциевом" (белые кружочки) внеклеточных растворах. Потенциалы реверсии соответственно -0,4 мВ и -45 мВ (отмечен стрелкой).

Таким образом, в субъединице GluR-6 три позиции в последовательности ТМ1 и ТМ2 заняты аминокислотными остатками, не кодируемыми соответствующими генами. Эти аминокислотные остатки участвуют в контроле Ca^{2+} проницаемости каналов. Следовательно, редактирование мРНК в совокупности с

возможностью образования гетеромерных ансамблей из различных комбинаций субъединиц могут быть использованы в качестве механизма, регулирующего вход ионов кальция в клетку.

Данные по физиологическим свойствам GluR-6 каналов предполагают, что Q/R позиция в сегменте TM2 определяет характер выпрямления ВАХ таким же образом как и в AMPA рецепторах. Однако проницаемость для двухвалентных ионов в гомомерных GluR-6 каналах изменяется редактированием в TM2 сегменте в противоположном направлении по сравнению с субъединицей GluR-V. При этом в гетеромерном ансамбле, образованном из Q и R вариантов GluR-6 проницаемость для двухвалентных ионов очень низкая, меньше чем таковая для гомомерных каналов, образованных каждой субъединицей в отдельности. В этом контексте интересно отметить, что мутирование TM1 сегмента в субъединице GluR-D(I,Y;D) из семейства AMPA рецепторов в его "редактированную" форму GluR-D(V,C;Q) не влияет на Ca^{2+} проницаемость. Этот результат и различное влияние Q/R участка на Ca^{2+} проницаемость указывает на различие в структуре каналов AMPA и каинатных рецепторов несмотря на то, что субъединицы этих двух типов глутаматных рецепторов имеют высокую степень идентичности в аминокислотной последовательности, особенно в предполагаемых трансмембранных сегментах TM1, TM2 и TM3. В частности, эти два типа каналов могут иметь разную топологию. Можно предположить, что аминокислотные остатки сегмента TM1 субъединицы GluR-6 участвуют в формировании поры ионного канала. В этой связи следует отметить, что два аминокислотных остатка в TM1, подверженных редактированию лежат на одной стороне TM1 сегмента (в предположении его вторичной структуры в виде α -геликса) ровно на один виток друг от друга.

КОНТРОЛЬ Ca^{2+} И Mg^{2+} ПРОНИЦАЕМОСТИ NMDA РЕЦЕПТОРОВ.

Одной из важнейших характеристик NMDA рецепторов является их высокая проницаемость для ионов Ca^{2+} . Для рецепторов AMPA и каинатного типа мы показали, что структурным детерминантом Ca^{2+}

проницаемости является Q/R участок в предполагаемом трансмембранном сегменте TM2. При этом для AMPA рецепторов введение аспарагина в этот критический участок приводило к образованию канала с более высокой проницаемостью для ионов Ca^{2+} по сравнению с ионами Mg^{2+} (см. Рис. 12). Анализ структуры клонированных NMDA рецепторов показал, что для всех субъединиц характерно наличие аспарагина в предполагаемом сегменте TM2 в участке гомологичном таковому для рецепторов AMPA и каинатного типа (Рис.23А). Таким образом представляло интерес выяснить приведет ли замена аспарагина в этой позиции к изменению Ca^{2+} и Mg^{2+} проницаемости NMDA рецепторов. Для выяснения этого вопроса мы провели серию экспериментов в "натриевом", "кальциевом" и "магниевом" наружных растворах, аналогичных описанным ранее для AMPA и каинатных рецепторов. Для каналов образованных комбинацией субъединиц NR1 и NR2A потенциал реверсии тока в "кальциевом" растворе составлял около 20 мВ (Рис.23В, отмечен стрелкой). В клетках, экспрессирующих комбинацию мутированной NR1(N598Q) и NR2A субъединиц потенциал реверсии сдвигался в среднем к величине -6 мВ (Рис.23С). Отличие в величине потенциала реверсии для двух этих случаев указывает на то, что мутированные каналы имеют существенно меньшую Ca^{2+} проницаемость и, следовательно, Ca^{2+} проницаемость NMDA рецепторов критически зависит от аспарагина NR1(N598) в TM2 сегменте. Уменьшение Ca^{2+} проницаемости при замене аспарагина на глутамин в субъединице NR1 наблюдалось также при коэкспрессии мутированной и немутированной форм этой субъединицы с субъединицей NR2С (Таблица 7). Далее мы исследовали вопрос имеет ли аспарагин в гомологичной позиции в субъединицах NR2 такое же функциональное значение в контроле Ca^{2+} проницаемости гетеромерного ансамбля. Однако, для NR1-NR2A(N595Q) и NR1-NR2C(N593Q) каналов потенциалы реверсии в "кальциевом" растворе не отличались существенно от таковых для немутированных каналов (Таблица 7).

В отличие от мутации в субъединице NR1, которая не изменяла низкую проницаемость для ионов Mg^{2+} , мутация в субъединицах NR2 приводила к образованию каналов с большей Mg^{2+} проницаемостью. Потенциал реверсии в "магниевом" наружном растворе при этом составлял -12 мВ (Рис.23D, Таблица 7). Для

немутированных каналов эта величина была более отрицательной чем -50 мВ (Рис.23В, Таблица 7).

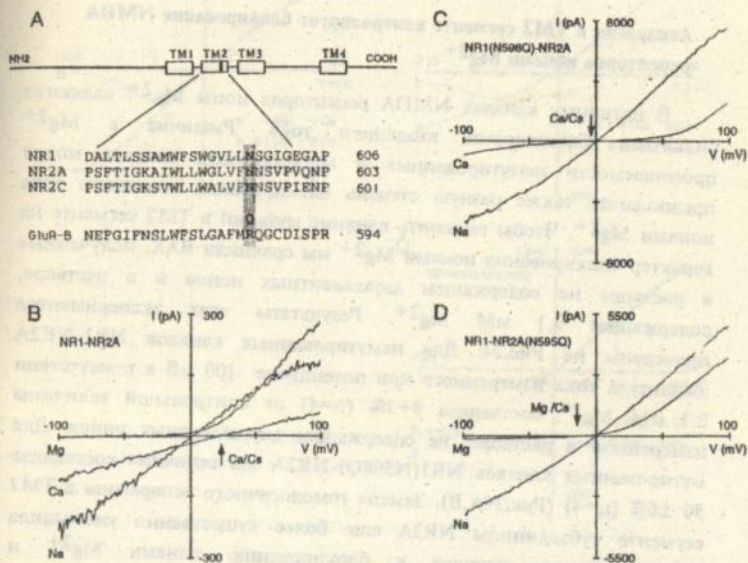


Рис.23. Различие в Ca^{2+} и Mg^{2+} проницаемости между немутированными и мутированными каналами NMDA рецепторов. (A) Сверху представлена схематическая диаграмма первичной структуры субъединиц глутаматных рецепторов NMDA типа, показывающая взаимное расположение трансмембранных участков. Внизу раскрыта последовательность аминокислот в сегменте TM2 для субъединиц NMDA рецепторов и редактированной и нередитированной форм субъединицы GluR-B AMPA типа. (B) ВAX активированного глутаматом тока в "натриевом", "кальциевом" и "магниевом" наружных растворах для комбинации немутированных субъединиц NR1-NR2A. Стрелкой указан потенциал реверсии для ионов Ca^{2+} (22,3 мВ). В "магниевом" растворе входящий ток не детектировался вплоть до -100 мВ. (C) ВAX активированного глутаматом тока в "натриевом" и "кальциевом" наружных растворах для комбинации мутированной NR1(N598Q) и немутированной NR2A субъединиц. Стрелкой указан потенциал реверсии для ионов Ca^{2+} (-3 мВ). (D) ВAX активированного глутаматом тока в "натриевом" и "магниевом" наружных растворах для комбинации немутированной NR1 и мутированной NR2A(N595Q) субъединиц. В "магниевом" растворе потенциал реверсии составлял -11 мВ (указан стрелкой). Во всех экспериментах с NMDA рецепторами "натриевый" раствор не содержал ионов магния. Глутамат (100 мкМ) подавался совместно с глицином (10 мкМ).

Аспарагин в TM2 сегменте контролирует блокирование NMDA рецепторов ионами Mg^{2+} .

В нативных каналах NMDA рецепторов ионы Mg^{2+} являются сильными блокаторами входящего тока. Различие в Mg^{2+} проницаемости немутированных и мутированных каналов может предполагать также разную степень блокирования входящего тока ионами Mg^{2+} . Чтобы выяснить влияние мутаций в TM2 сегменте на характер блокирования ионами Mg^{2+} мы сравнили ВАХ, полученные в растворе не содержащем двухвалентных ионов и в растворе, содержащем 0,1 мМ Mg^{2+} . Результаты этих экспериментов приведены на Рис.24. Для немутированных каналов NR1-NR2A амплитуда тока измеренного при потенциале -100 мВ в присутствии 0,1 мМ Mg^{2+} составляла $9 \pm 3\%$ ($n=4$) от контрольной величины измеренной в растворе, не содержащем двухвалентных ионов. Для мутированных каналов NR1(N598Q)-NR2A эта величина составляла $30 \pm 6\%$ ($n=4$) (Рис.24А,В). Замена гомологичного аспарагина в TM2 сегменте субъединицы NR2A еще более существенно уменьшила чувствительность каналов к блокированию ионами Mg^{2+} и практически устраняла потенциалозависимость магниевого блока. Амплитуда тока измеренного при потенциале -100 мВ в присутствии 0,1 мМ Mg^{2+} для каналов NR1-NR2A(N595Q) составляла $71 \pm 4\%$ ($n=4$) от контрольной величины Рис.24С. Качественно похожие изменения в характере блокирования ионами Mg^{2+} наблюдались в клетках, экспрессирующих мутированные NR1(N598Q)-NR2C и NR1-NR2C(N593Q) комбинации субъединиц.

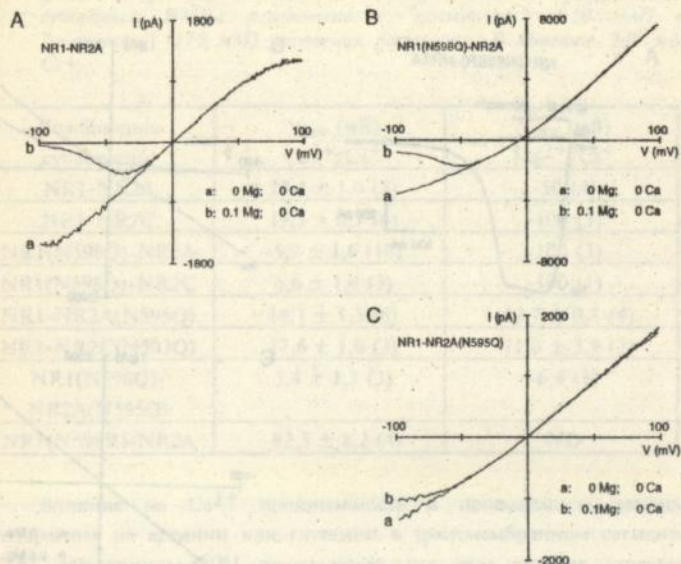


Рис.24. Различие в степени блокирования внеклеточным магнием каналов образованных из мутированных и немутированных субъединиц. (А) Каналы, состоящие из субъединиц NR1 и NR2A. ВАР активированного глутаматом тока в растворе, не содержащем двухвалентных ионов (а) и в растворе с 0,1 мМ Mg^{2+} (b). (В) Аналогичные ВАР для каналов NR1(N598Q)-NR2A. (С) ВАР для каналов NR1-NR2A(N595Q).

Замена аспарагина на аргинин в NR1(N598R)-NR2A комбинации приводила к образованию каналов, имеющих низкую Ca^{2+} проницаемость (потенциал реверсии в "кальциевом" растворе составлял в среднем около -80 мВ (Рис.25А,В; Таблица 7.). Кроме того в клетках, экспрессирующих NR1(N598R)-NR2A рецепторы, форма ВАР активируемого глутаматом тока была нечувствительна к внеклеточной концентрации ионов Mg^{2+} .

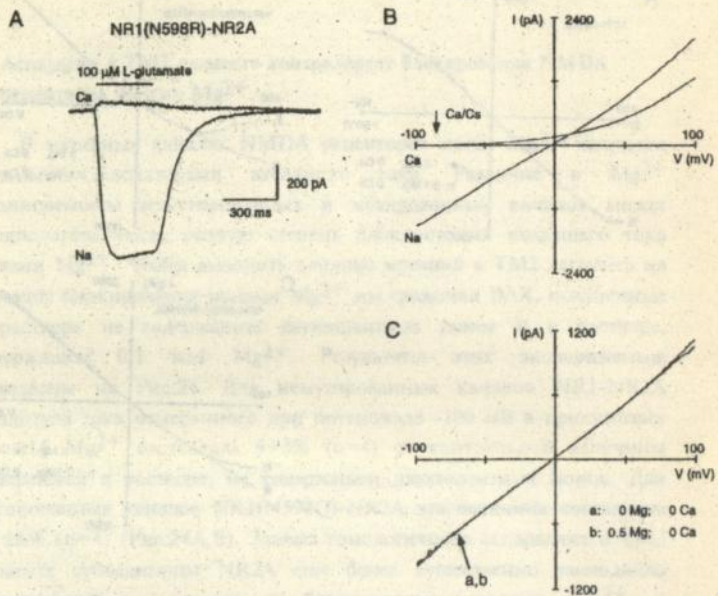


Рис.25. Уменьшение Ca^{2+} проницаемости и степени блокирования ионами Mg^{2+} мутированных каналов с аргинином вместо аспарагина в TM2 сегменте субъединицы NR1. (A) Записи токов, вызванных аппликацией 100 мкМ глутамата при потенциале -60 мВ в "натриевом" растворе (входящий ток направлен вниз) и в "кальциевом" растворе (выходящий ток направлен вверх). (B) ВАХ активированного глутаматом тока в "натриевом" и "кальциевом" растворах. Потенциалы реверсии соответственно 0 и -87 мВ (отмечен стрелкой). (C) ВАХ активированного глутаматом тока в растворе, не содержащем двухвалентных ионов (a) и в растворе с 0,5 мМ Mg^{2+} (b). Обе кривые практически совпадают.

Входящий ток, измеренный в растворе не содержащем двухвалентных ионов не был блокирован при добавлении 0,5 мМ Mg^{2+} (Рис.25C). Таким образом, в том случае когда положительно заряженный аргинин расположен в критической позиции в TM2 субъединицы NR1, двухвалентные катионы, по-видимому не могут войти в устье канала.

Таблица 7. Потенциалы реверсии активированного глутаматом тока для разных комбинаций немутированных и мутированных субъединиц NMDA рецепторов в "кальциевом" (110 мМ) и "магниевом" (110 мМ) наружных растворах. В пипетке 140 мМ Cs⁺.

Комбинация субъединиц	V _{rev} (мВ) Ca ²⁺ /Cs ⁺	V _{rev} (мВ) Mg ²⁺ /Cs ⁺
NR1-NR2A	23,4 ± 1,6 (5)	-50 (4)
NR1-NR2C	19,5 ± 0,7 (6)	-100 (3)
NR1(N598Q)-NR2A	-5,9 ± 1,6 (10)	-100 (3)
NR1(N598Q)-NR2C	6,6 ± 1,0 (3)	-100 (1)
NR1-NR2A(N595Q)	18,1 ± 1,3 (6)	-12,7 ± 0,8 (4)
NR1-NR2C(N593Q)	17,6 ± 1,0 (3)	-11,0 ± 3,9 (3)
NR1(N598Q)- NR2A(N595Q)	3,4 ± 1,3 (3)	-6,4 (1)
NR1(N598R)-NR2A	-82,5 ± 2,2 (4)	ND

Влияние на Ca²⁺ проницаемость и проводимость замены аспарагина на аргинин или глутамин в трансмембранном сегменте TM2 субъединицы NR1 предполагает, что этот сегмент является частью поры ионного канала рецепторов NMDA типа. Аспарагины в субъединицах NR2, размещенные в гомологичной позиции, по-видимому, также участвуют в формировании поры, так как их замена на глутамин влияет на магниевую проницаемость и блокирование каналов ионами Mg²⁺. Влияние мутации на проницаемость и блокирование канала может предполагать, что аспарагины двух субъединиц формируют, по крайней мере, часть селективного фильтра NMDA рецепторов для ионов Mg²⁺ и Ca²⁺. Гомологичное расположение аспарагинов в двух субъединицах, выявленное при сопоставлении аминокислотных последовательностей, однако, не обязательно должно означать их эквивалентное расположение в сформированном канале. Различные субъединицы NMDA рецепторов могут по-разному влиять на свойства гетеромерного канала вследствие их асимметричного расположения, как это имеет место для других типов каналов (Unwin et al., 1988, *J. Cell Biol.* 107, 1123).

Высокая кальциевая проницаемость и потенциалозависимое блокирование ионами Mg²⁺, как полагают, играют важную роль в такой функции NMDA рецепторов как поддержание долговременных

изменений в синаптической активности клеток, а также в цитотоксическом эффекте глутамата в условиях гипоксии (Collingridge and Bliss, 1987, *Trends Neurosci.* 10, 288; Nicoll et al., 1988, *Neuron* 1, 97; Choi, 1988, *Neuron* 1, 623). Мы показали, что как Ca^{2+} проницаемость так и блокирование ионами Mg^{2+} критически зависят от одного аминокислотного остатка аспарагина в трансмембранном сегменте TM2 субъединиц NR1 и NR2. Следовательно, мутации воздействующие на этот остаток в любой из субъединиц могут вызвать дисфункции в синаптической передаче вследствие нарушения потенциалозависимого входа ионов Ca^{2+} в постсинаптическую клетку.

ВЫВОДЫ

1. Используя комбинацию методов регистрации ионных токов и точечной мутации, проведен детальный анализ функциональных характеристик всех типов рекомбинантных ионотропных глутаматных рецепторов. Произведена классификация субъединиц глутаматных рецепторов на основе анализа структуры и функциональных характеристик (1,2,4,5,7,18).
2. Установлено, что субъединицы глутаматных рецепторов, принадлежащие одному классу могут образовывать гетеромерные каналы с новыми свойствами, отличающимися от свойств составляющих субъединиц (1,2,3,5,7).
3. Установлено, что предполагаемый трансмембранный сегмент TM2 участвует в формировании ионной поры каналов глутаматных рецепторов (2,3,9,10).
4. Идентифицирован участок в аминокислотной последовательности трансмембранного сегмента TM2 (Q/R участок), ответственный за контроль ионной проводимости AMPA рецепторов. Установлено, что изменение одного аминокислотного остатка в этой позиции приводит к изменению потенциалозависимости ионной проводимости (2).
5. Исследованы структурные детерминанты проницаемости глутаматных рецепторов для двухвалентных ионов. Для рецепторов AMPA типа показано, что низкая проницаемость для ионов кальция определяется наличием положительно заряженного аминокислотного

остатка аргинина в Q/R участке, внесенного в этот участок вследствие редактирования мРНК на более поздней стадии развития. Показано, что различная степень экспрессии редактированной формы субъединицы GluR-B определяет Ca^{2+} проницаемость гетеромерных каналов (3).

6. Идентифицирована структурная композиция нативных глутаматных рецепторов AMPA типа в клетках Бергмановской глии, на основе сравнения их свойств со свойствами рекомбинантных глутаматных рецепторов. Установлено, что функциональные каналы глутаматных рецепторов в этих клетках образованы из субъединиц AMPA типа GluR-A и GluR-D, имеющих высокую кальциевую проницаемость (8,14).

7. Для субъединицы GluR-6 показано существование восьми вариантов субъединицы, обусловленных редактированием мРНК в трансмембранных участках TM2 и TM1. Установлено, что редактирование как в TM2 так и в TM1 является одним из генетических механизмов, контролирующих Ca^{2+} проницаемость глутаматных рецепторов AMPA- и каинатного типа (10,15,19).

8. Для NMDA рецепторов идентифицирован участок в TM2, ответственный за контроль кальциевой и магниевой проницаемости и потенциалозависимого блока ионами магния этого типа рецепторов. Показано, что как кальциевая (магниевая) проницаемость, так и блокирование NMDA рецепторов ионами магния критически зависят от одного аминокислотного остатка аспарагина в трансмембранном сегменте TM2 субъединиц NR1 и NR2 (9,16,17,20).

9. В результате исследования удалось выявить общий для разных типов глутаматных рецепторов элемент первичной структуры, Q/R/N участок в трансмембранном сегменте TM2, определяющий характеристики их ионной проницаемости.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. Sommer B, Keinänen K, Verdoorn T, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B & Seeburg P (1990). Flip and Flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
2. Verdoorn T, Burnashev N, Monyer H, Seeburg P & Sakmann B (1991). Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718.
3. Burnashev N, Monyer H, Seeburg P & Sakmann B (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of single subunit. *Neuron* 8:189-198.
4. Sommer B, Burnashev N, Verdoorn T, Keinänen K, Sakmann B & Seeburg P (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO Journal* 11:1651-1656.
5. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W & Seeburg P (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly-related subunits. *Neuron* 8:775-785.
6. Sommer B, Monyer H, Wisden W, Verdoorn T, Burnashev N, Sprengel R, Sakmann B & Seeburg P (1992). Glutamate-gated ion channels in the brain-genetic mechanisms for generating molecular and functional diversity. *Arzneimittel-Forschung/Drug research* 42-1(N2A):209-210.
7. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B & Seeburg P (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.

8. Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg P & Sakmann B (1992). Calcium-permeable AMPA-Kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256:1566-1570.
9. Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg P & Sakmann B (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257:1415-1419.
10. Kohler M, Burnashev N, Sakmann B & Seeburg P (1993). Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high-affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron* 10: 491 - 500.
11. Schoepfer R, Monyer H, Sommer B, Wisden W, Sprengel R, Kuner T, Lomeli H, Herb A, Kohler M, Burnashev N, Gunther W, Ruppersberg JP, & Seeburg P (1993). Molecular biology of glutamate receptors. *Progress in Neurobiology* (in press).
12. Jonas P, Burnashev N, Verdoorn T, Wisden W, Seeburg P & Sakmann B (1991). Molecular identification of glutamate receptors in CA3 hippocampal neurones. *Pflügers Archiv* 418 (Supplement I), R15.
13. Verdoorn T, Burnashev N, Jonas P, Seeburg P & Sakmann B (1991). Comparison between the functional properties of glutamate receptors native to CA3 hippocampal neurones and recombinant glutamate receptors. *Society for Neuroscience Abstracts* 17:335.
14. Khodorova A & Burnashev N (1992). Glutamate receptor channels with high Ca^{2+} permeability in fusiform glial cells in rat cerebellar cultures. Proceedings of the Physiological Society. *Journal of Physiology* 446:516P.
15. Burnashev N, Kohler M, Seeburg P & Sakmann B (1992). Conductance rectification and Ca^{2+} permeability of edited and unedited forms of recombinant glutamate receptor GluR-6 subunit channels. *European Journal of Neuroscience*, Supplement 5, 171.

16. Burnashev N, Monyer H, Schoepfer R & Seeburg P (1992). Ca^{2+} permeability of recombinant NMDA receptor channels. *Society for Neuroscience Abstracts* 18, 395
17. Schoepfer R, Seeburg P, Kuner T, Burnashev N, Gunther W & Ruppersberg JP (1992). Single channel analysis of a mutant NMDA receptor with altered ion-channel properties for magnesium block. *Society for Neuroscience Abstracts* 18, 395
18. Burnashev N & Sakmann B (1993). Differential desensitization behaviour of recombinant AMPA and kainate receptors. *Pflügers Archiv*, v. 422, Supplement 1, p. R42.
19. Kohler M, Burnashev N, Sommer B, Sprengel R, Sakmann B & Seeburg P (1993). Functional determinants in TM1 and TM2 of kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Journal of cellular biochemistry*, Supplement 17D.
20. Ruppersberg P., Burnashev N. Gunther W., Kuner T., Monyer H., Sakmann B., Seeburg P., Schoepfer R. (1993) Mechanisms of magnesium block identified by single-channel recording from mutated NMDA-receptor channels. *Proceeding of Biophysical Society*, 37, A115.
21. Burnashev N. (1993) Recombinant ionotropic glutamate receptors: Functional distinctions imported by different subunits. *Cellular Physiology and Biochemistry* (in press).
22. Burnashev N. (1993) Molecular biology of NMDA receptors. In: The NMDA receptor, eds J.C.Watcins & G.L.Collingridge, IRL Press; Oxford, University Press.

Подл. к печ. 15.11.93

Формат 60×84^{1/16}.

Бумага тип. № 3. Способ печати офсетный. Услови. печ. л. 3,49.

Услови. кр.-отт. 3,6. Уч.-изд. л. 2,0.

Тираж 100. Зак. № 6428. Бесплатно.

Фирма «ВИПОЛ»

252151, г. Киев, ул. Вольнская, 60.

463194

Бесплатно.

AV 28.714

AV 28.714