



УДК 577.112.(017+082.261)

НОВЫЙ ТИП ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 1996 г. М. М. Соловьев, Е. А. Барнард*, Е. В. Гришин[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Отделение молекулярной нейробиологии,

Медицинская школа Королевского свободного госпиталя, Лондон

Поступило в редакцию 05.02.96 г.

В подтверждение возможности существования иного типа ионотропных глутаматных рецепторов (кроме N-метил-D-аспаратного (NMDA) и не-NMDA) нами клонирована кДНК каналобразующей субъединицы глутаматного рецептора, обнаруженного в мозге лягушки *Xenopus laevis*, – XenNR1. Котрансфекция клеток HEK-293 с использованием кДНК XenNR1 и кДНК XenU1 (субъединица не-NMDA-типа рецептора из мозга *X. laevis*) приводит к образованию функционального гетеросубъединичного рецептора объединенного типа, состоящего из NMDA- и не-NMDA-субъединиц. Функциональная коэкспрессия кДНК субъединиц XenNR1 и XenU1 является первым прямым доказательством существования глутаматного рецептора нового типа.

Ключевые слова: глутаматный рецептор, NMDA-рецептор, не-NMDA-рецептор.

Общепринятая точка зрения о существовании различных ионотропных глутаматных рецепторов двух типов – N-метил-D-аспаратного (NMDA) и не-N-метил-D-аспаратного (не-NMDA) [1] – основана на принципиальных различиях их фармакологических свойств, что, в свою очередь, коррелирует со структурными особенностями отдельных субъединиц [2]. В настоящей работе с использованием методов молекулярного клонирования и функциональной экспрессии кДНК *in vivo* выявлено существование нового типа глутаматных рецепторов.

Центральная нервная система лягушки *Xenopus laevis* содержит большое число различных глутаматных рецепторов и является удобным объектом их исследования. Из библиотеки кДНК мозга *X. laevis*, используя в качестве зонда кДНК субъединицы NMDAR1 крысы [3], выделили клон XenNR1 (EMBL, X94081). кДНК клона XenNR1 гомологична кДНК NMDAR1 на ~60%. Кодированный белок состоит из 904 а. о. и имеет расчетную молекулярную массу ~102 кДа (рис. 1). Максимальные различия (~14%) в первичных структурах XenNR1- и NMDA-рецепторов млекопитающих (рис. 1) выявлены в первых 468 из 559 а.о. (без учета сигнального пептида) N-концевого участка, содержащего, в частности, участки связывания агониста и коагониста [2, 3]. Трансмемб-

ранные участки всех известных NMDA-субъединиц, включая XenNR1, практически совпадают [2]. XenNR1 соответствует образующейся в результате альтернативного сплайсинга форме G субъединицы NMDAR1 крысы [4]. Однако XenNR1 является основной формой субъединицы NR1 в отличие от G-формы, наименее представленной у крысы. Неодинаковая представленность альтернативных форм субъединицы NR1 у лягушки и крысы может свидетельствовать об их функциональном различии.

Для функциональной экспрессии кДНК XenNR1 использовали клетки млекопитающих HEK-293. Радиолигандный анализ выявил принципиальные различия в свойствах XenNR1 и других известных субъединиц глутаматных рецепторов NMDA-типа.

Как и в случае экспрессии кДНК субъединицы NMDAR1 крысы, при экспрессии кДНК XenNR1 в мембранной фракции трансфицированных клеток выявляется небольшое число (~0.025 пмоль/мг) участков связывания специфического лиганда NMDA-рецепторов – [³H]МК-801 [2]. Однако в нашем случае не удалось зарегистрировать специфическое связывание [³H]ДСКА – высокоаффинного ингибитора участка узнавания глицина, характерное для NMDA-рецепторов и наблюдаемое для мембранных белков при экспрессии кДНК субъединицы NMDAR1 [2].

Для дальнейшей характеристики субъединицы XenNR1 были проведены эксперименты по коэкспрессии кДНК XenNR1 и кДНК других известных субъединиц глутаматных рецепторов: NR2-субъединиц $\epsilon 1$, $\epsilon 2$ и $\epsilon 3$ NMDA-рецептора мыши

Использованные сокращения: NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота, МК-801 – (+)-5-метил-10,11-дигидро-5H-добензо(a,d)циклопентен-5,10-имин, ДСКА – 5,7-дихлоркинауреновая кислота.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-58-92; факс: (095) 330-73-01; e-mail: grev@ibch.siobc.ras.ru).

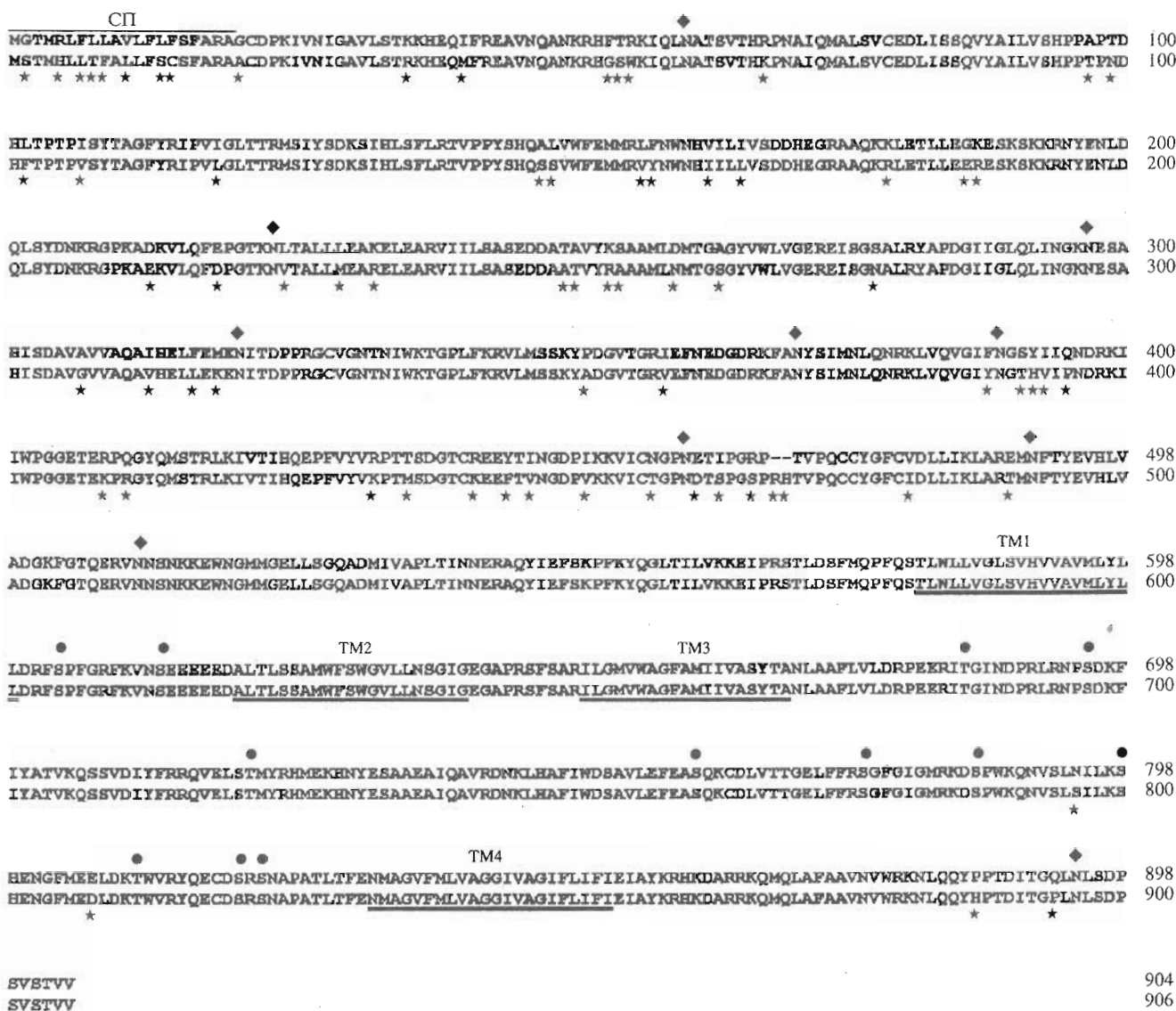


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей субъединиц глутаматных рецепторов XenNR1 *Xenopus laevis* (верхняя строка) и NMDAR1(G) мозга крысы (нижняя строка). Показаны сигнальный пептид (СП), потенциальные участки гликозилирования (♦) и фосфорилирования (●), трансмембранные участки (TM1–TM4). Звездочками отмечены различающиеся аминокислотные остатки двух белков.

[5, 6]. При коэкспрессии кДНК *XenNR1* и кДНК любой из перечисленных субъединиц заметно увеличивалось связывание мембранами клеток специфичных для NMDA-рецепторов агонистов и антагонистов. Так, связывание [³H]МК-801 при коэкспрессии кДНК субъединиц *XenNR1* и ε1 возросло по сравнению с контролем практически в 10 раз (рис. 2а).

При коэкспрессии кДНК субъединицы *XenNR1* и кДНК любой из субъединиц NR2 значительно возросло также связывание [³H]DСКА мембранными белками. Уровни специфического связывания [³H]DСКА слегка варьировали при использовании для коэкспрессии кДНК субъединиц ε1, ε2 или ε3, однако во всех случаях они зна-

чительно превышали уровень связывания в отсутствие субъединиц NR2. Сами по себе субъединицы NR2 не связывали [³H]DСКА. Влияние субъединицы NR2 на связывание [³H]DСКА субъединицей *XenNR1* свидетельствует о непосредственном взаимодействии субъединиц *XenNR1* и NR2 с образованием функционального гетеросубъединичного NMDA-рецептора. Таким образом, субъединица *XenNR1* отличается от всех известных субъединиц типа NR1 участком связывания глицина, формирующимся в ней лишь в присутствии субъединицы-партнера в гетеросубъединичном рецепторе.

В другой серии экспериментов кДНК субъединицы *XenNR1* коэкспрессировали с недавно

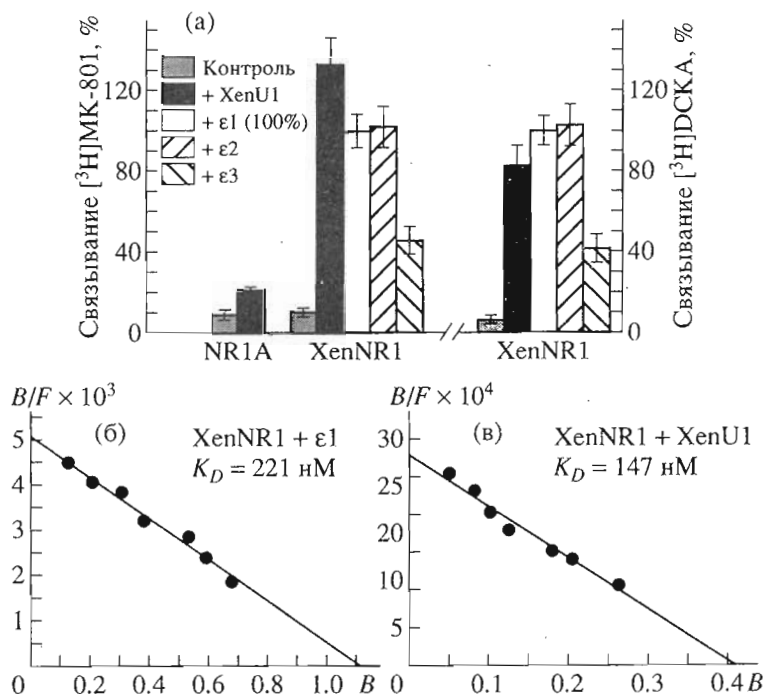


Рис. 2. Функциональная коэкспрессия кДНК субъединицы XenNR1 с кДНК субъединиц XenU1, ε1, ε2, ε3. (а) – специфическое связывание $[^3\text{H}]$ МК-801 (50 мкМ) и $[^3\text{H}]$ ДСКА (150 нМ) с мембранной фракцией трансфицированных клеток; контроль – результаты в отсутствие кДНК-партнера; (б, в) – специфическое связывание $[^3\text{H}]$ ДСКА в координатах Скэтчарда (B – специфическое связывание, пмоль/мг белка; F – концентрация свободного лиганда, нМ). Для трансфекции клеток использовали ДНК-содержащие липосомы. В каждой отдельной трансфекции использовали 3×10^6 клеток НЕК-293 и 10 мкг кДНК.

клонированной кДНК субъединицы не-NMDA-типа XenU1 *X. laevis* [7]. При этом в мембранной фракции клеток выявляются участки связывания как $[^3\text{H}]$ МК-801, так и $[^3\text{H}]$ ДСКА. Уровень специфического связывания $[^3\text{H}]$ МК-801 был в этом случае даже выше, а уровень связывания $[^3\text{H}]$ ДСКА оказался лишь ненамного ниже, чем при коэкспрессии кДНК субъединиц XenNR1 и ε1 (рис. 2а), причем связывание $[^3\text{H}]$ МК-801 и $[^3\text{H}]$ ДСКА отсутствовало в клетках при экспрессии по отдельности кДНК субъединиц ε1 или XenU1.

Среди глутаматных рецепторов функциональное взаимодействие с глицином характерно исключительно для NMDA-рецепторов. Параметры связывания ингибитора $[^3\text{H}]$ ДСКА клетками при коэкспрессии кДНК XenNR1 и XenU1 (рис. 2б) оказались даже лучше, чем при коэкспрессии кДНК субъединиц XenNR1 и ε1 (рис. 2в). Формирование высокоаффинного глицинового сайта при коэкспрессии кДНК субъединиц NMDA-типа (XenNR1) и не-NMDA-типа (XenU1) однозначно свидетельствует об образовании гетеросубъединичного глутаматного рецептора объединенного типа, состоящего из NMDA- и не-NMDA-субъединиц.

Полученные нами результаты являются первым прямым доказательством существования в

центральной нервной системе *X. laevis* и, возможно, у млекопитающих глутаматного рецептора нового типа. Уникальные свойства субъединицы XenNR1, а именно ее способность образовывать комплекс с субъединицей не-NMDA-типа XenU1 и формировать участок связывания глицина только в присутствии субъединицы-партнера, проливают свет на молекулярную организацию NMDA-рецепторов и заставляют пересмотреть сложившиеся представления о строении глутаматных рецепторов и их классификацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fagg G.E., Foster A.C. // Neurotransmitter Receptors / Ed. F. Hucho. Amsterdam; London; New York; Toronto: Elsevier, 1993. P. 267–296.
2. Hollmann M., Heinemann S. // Ann. Rev. Neurosci. 1994. V. 17. P. 31–108.
3. Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. // Nature. 1991. V. 353. P. 31–37.
4. Sugihara H., Moriyoshi K., Ishii T., Masu M., Nakanishi S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. V. 185. P. 826–832.
5. Meguro H., Mori H., Araki K., Kushiya E., Kutsuwada T., Yamazaki M., Kumanishi T., Arakawa M., Sakimura K., Mishina M. // Nature. 1992. V. 357. P. 70–74.

6. Kutsuwada T., Kashiwabuchi N., Mori H., Sakimura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumamishi T., Arakawa M., Mishina M. // *Nature*. 1992. V. 358. P. 36–41.
7. Ishimaru H., Kamboj R., Ambrosini A., Henley J.M., Soloviev M.M., Sudan H., Abutidze K., Rossier J., Usherwood P.N.R., Bateson A.N., Barnard E.A. // *Receptors & Channels*. 1996. V. 4. P. 33–52.

A New Type of Ionotropic Glutamate Receptors

M. M. Solov'ev*, E. A. Barnard**, and E. V. Grishin*¹

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

** *Department of Molecular Neurobiology, Medical School, Royal Free Hospital, London, Great Britain*

Abstract—The possibility of the existence of a new type of ionotropic glutamate receptor differing from NMDA and non-NMDA receptors was confirmed by cloning cDNA for XenNR1, a channel-forming subunit of the glutamate receptor from the *Xenopus laevis* brain. Cotransfection of the HEK-293 cells with the cDNAs for XenNR1 and XenU1 (a non-NMDA receptor subunit from *X. laevis* brain) resulted in the biosynthesis of a functionally active heterosubunit receptor composed of NMDA and non-NMDA subunits. The functional co-expression of the XenNR1 and XenU1 cDNAs is the first direct evidence for the existence of a new type of glutamate receptor.

Key words: glutamate receptor, NMDA receptor, non-NMDA receptor.

¹ To whom correspondence should be addressed; phone: (095) 330-5892; fax: (095) 330-7301; e-mail: grev@ibch.siobc.ras.ru.