



УДК 577.112(.088.3+017)

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИОТРОПНЫХ
ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ МЫШЦ САРАНЧИ**© 1998 г. П. В. Перестенко, И. В. Мошарова, Т. М. Волкова[#], Е. В. ГришинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемлякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 18.08.98 г. Принято к печати 27.08.98 г.

Из мышц саранчи выделен белковый комплекс, обладающий свойствами иотропного глутаматного рецептора. Для выделения использована одностадийная биоспецифическая хроматография на сорбенте с иммобилизованными полиаминными токсинами из яда паука (аргиопининами). Полученный препарат способен специфически связывать L -[^3H]Glu (K_d 0.47 мкМ, B_{max} 2300 пмоль/мг) и L -[^3H]Asp (K_d 0.65 мкМ, B_{max} 1870 пмоль/мг). Приведены данные, подтверждающие присутствие в выделенном препарате глутаматных рецепторов трех подтипов, характерных для мышечных тканей саранчи.

Ключевые слова: глутаматный рецептор; мышцы саранчи; биоспецифическая хроматография; аргиопинины; радиолигандный анализ.

Известно, что глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе (ЦНС) позвоночных животных. Постсинаптические иотропные глутаматные рецепторы (ГР), которые воспринимают сигнал этого нейромедиатора, широко изучаются. В то же время еще более 30 лет назад установлено, что у насекомых глутамат играет важнейшую нейромедиаторную роль как в ЦНС, так и в двигательной системе. С использованием информации о структуре генов ГР позвоночных осуществлено множество попыток получения генно-инженерными методами соответствующих субъединиц рецепторов насекомых и только некоторые из них оказались успешными. Так, были клонированы гены DGluR-II [1] из мышц, DGluR-I [2] и DNMDAR1 [3] из ЦНС *Drosophila*. Все эти субъединицы имели высокую структурную гомологию с соответствующими ГР позвоночных, но белки, продуцируемые при гетерологической экспрессии, не проявляли ожидаемого сродства к соответствующим агонистам. Кроме того, рекомбинантные субъединицы не давали биологического ответа на L -квисквалат, один из основных агонистов ГР насекомых. По-видимому, основной подтип ГР насекомых, имеющий столь отличные от ГР высших животных фармакологические и электрофизиологические свойства [4], может обладать также и необычной структурой.

Для изучения механизма функционирования ГР различных типов широко используются полиаминные токсины из яда паука *Argiope lobata* – аргиопинины, которые являются специфическими блокаторами ионных каналов глутаматных рецепторов [5–7]. Данная работа посвящена выделению и характеристике ГР из мышц саранчи с использованием биоспецифической хроматографии на иммобилизованных аргиопининах.

ГР мышц саранчи довольно хорошо охарактеризованы электрофизиологическими методами на уровне одиночных каналов. При этом показано, что катионселективные каналы, активируемые L -глутаматом, L -аспартатом, L -квисквалатом и иботенатом, обнаруживаются в плазматических мембранах как в области синаптических контактов, так и вне их. В данной работе для получения фракции плазматических мембран мышц саранчи *Schistocerca gregaria* препарировали мышечную ткань третьих ног и грудного отдела насекомых вместе с хитином. Ткани гомогенизировали в высокосолевым буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, отделяли хитин с помощью низкоскоростного центрифугирования и затем получали фракцию P_2 , содержащую везикулярные мембраны и митохондрии, как описано в работе [8]. Для выделения из нее фракции плазматических мембран далее была разработана методика ступенчатого центрифугирования с постепенным отделением митохондриальных продуктов и количественным удалением эндогенных лигандов. Все операции проводили в присутствии смеси ингибиторов протеиназ при 4°C. Фракцию P_2 гомогени-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-65-40; факс: (095) 330-73-01; e-mail: volkova@ibch.siobc.ras.ru).

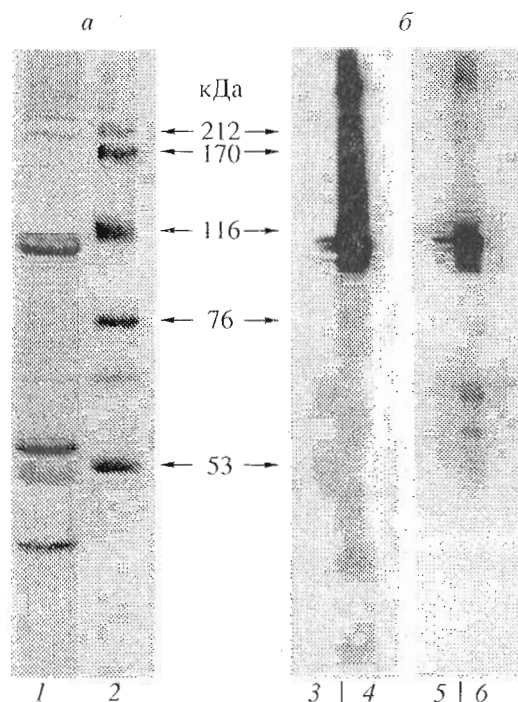
зировали в стекляннно-тефлоновом гомогенизаторе в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.6 в условиях осмотического шока и центрифугировали 30 мин при 36000g. Собирали верхний светлый рыхлый осадок фракции плазматических мембран, а нижний более плотный осадок тяжелых мембранных фракций отбрасывали. Процедуру переосаждения в низкосолеваемом буфере повторяли не менее 3–4 раз.

Полученную фракцию мембран анализировали с помощью радиолигандного метода, используя фильтрацию через GF/B-фильтры, пропитанные полиэтиленимином [9]. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин в присутствии меченого лиганда (L -[3 H]Glu и L -[3 H]Asp) в постоянной концентрации (200 нМ) и “холодного” лиганда в возрастающих концентрациях. Оказалось, что мембранная фракция обладает одним Na-независимым участком связывания для каждого из меченых лигандов, причем параметры их связывания очень близки (таблица).

Далее были подобраны условия солюбилизации мембранных белков в 1.5% холате натрия (1 ч при 4°C), при которых до 90% участков связывания глутамата переходят в раствор. Растворенные белки отделяли центрифугированием при 100000g.

Дальнейшую очистку ГР осуществляли биоспецифической хроматографией солюбилизованных мембранных белков на синтезированном сорбенте с иммобилизованными аргипопинами (8–10 мкмоль аргипопинов/мл сорбента) [10]. Специфическую элюцию рецепторной фракции проводили с помощью 10 мМ EDTA [10] или 1 мМ L -глутамата в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.6. Было показано, что в обоих случаях элюаты имели идентичный белковый состав и один и тот же уровень биологической активности. Как видно из таблицы, выделенный рецепторный препарат обладает сходной с мембранами аффинностью по отношению к обоим агонистам, а по числу участков связывания (B_{max}) можно сделать вывод, что в результате одностадийной аффинной хроматографии солюбилизованных мембран мышц саранчи удается достичь очистки ГР более, чем в 100 раз.

Для изучения фармакологических свойств выделенного рецепторного препарата исследовано связывание с ним глутамата в присутствии различных агонистов и антагонистов. Оказалось, что наиболее мощными ингибиторами этого связывания являются L -аспаратат, иботенат и L -квисквалат, тогда как каинат, АМРА, D -AP5 и NMDA не конкурировали с глутаматом за участки связывания (таблица). Эти результаты хорошо согласуются с данными электрофизиологических исследований о существовании в мышцах саранчи ГР



Анализ фракции плазматических мембран и выделенного рецепторного комплекса из мышц саранчи. *a* – Результаты электрофореза в 10% SDS-ПААГ: 1 – очищенный рецепторный комплекс, 2 – смесь маркерных белков (миозин, α_2 -макроглобулин, β -галактозидаза, трансферин, глутаматдегидрогеназа); *б* – результаты твердофазного иммуноферментного анализа: 3, 4 – мембранная фракция, 5, 6 – очищенный комплекс; для ИФА белковые дорожки на нитроцеллюлозе разрезали на две полоски и обрабатывали антителами IDA (3, 5) или R13 (4, 6).

как минимум трех подтипов, избирательно активируемых L -аспарататом, иботенатом или L -квисквалатом [4].

Выделенный рецепторный комплекс по результатам SDS-ПААГ-электрофореза [12] (рисунок, *a*) содержит в качестве основных компонентов триплет белков с M 94–97 кДа, а также белки с M 42, 51 и 54 кДа. Для более детальной характеристики отдельных полипептидов был осуществлен иммуноферментный анализ мембранного препарата и очищенного рецепторного комплекса после электропереноса на нитроцеллюлозу (рисунок, *б*) [13]. Для этого использовали полученные в данной работе кроличьи поликлональные антитела против выделенного комплекса (R13), а также антиидиотипические антитела против глутамата (IDA), которые способны взаимодействовать с ГР саранчи [14]. Из рисунка *б* видно, что антитела R13 (полосы 4, *б*) при взаимодействии с мембранами интенсивно окрашивают полипептиды триплета 94–97 кДа, а на очищенном препарате слабо взаимодействуют также и с белковыми полосами в области 60–67 кДа, которые, по-видимому, являются

Параметры связывания агонистов фракцией плазматических мембран и аффинно очищенным глутаматным рецептором из мышц саранчи*

Параметр	Фракция плазматических мембран		Аффинно очищенный ГР	
	<i>L</i> -[³ H]Glu	<i>L</i> -[³ H]Asp	<i>L</i> -[³ H]Glu	<i>L</i> -[³ H]Asp
K_d , (мкМ)	0.43	0.59	0.47	0.65
B_{max} , (пмоль/мг)	26	14	2300	1870
Коэффициент Хилла	0.97	0.96	0.98	0.94
K_i , (мкМ) для:**				
<i>L</i> -Asp			0.23	
иботената			29.6	
<i>L</i> -квисквалата			58	
<i>D</i> -Asp			184	
DNQX			391	
AMPA			>10000	
NMDA			>10000	
<i>D</i> -AP5			>10000	
каината			>10000	

* Все эксперименты проводили после реконструирования выделенного рецепторного комплекса в липосомах, содержащих холестерин и азоектин (1:9), по модифицированному методу [11].

** DNQX – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион; AMPA – 2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)пропионовая кислота; NMDA – *N*-метил-*D*-аспарагиновая кислота; *D*-AP5 – *D*-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота.

фрагментами белков 94–97 кДа. Результаты иммуноферментного анализа с антителами IDA (рисунк, б, полосы 3, 5) показывают, что все три белка в области 94–97 кДа содержат участки связывания глутамата и, следовательно, могут являться субъединицами ГР.

Протеолипосомы со встроенным выделенным препаратом, полученные по модифицированному методу [11], исследовали с помощью электрофизиологических методов. Было показано, что под воздействием глутамата в них активируются катионселективные каналы двух типов, причем один из них может быть также активирован *L*-квисквалатом, а другой – иботенатом (результаты будут опубликованы отдельно).

Таким образом, в данной работе впервые выделен с достаточно высокой степенью очистки рецепторный препарат из мышц саранчи, который обладает свойствами ГР трех подтипов, характерных [4] для этих животных. Дальнейшие исследования отдельных субъединиц этого рецептора позволят понять молекулярные основы функционирования этих рецепторных систем у насекомых.

Авторы выражают благодарность доктору Иану Дьюсу (Университет Ноттингема) за любезно предоставленные антитела IDA, а также проф. Ашервуду (Университет Ноттингема) за обеспечение работы биологическим материалом.

Работа финансировалась грантом № 95-1011 РФФИ-ИНТАС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schuster C.M., Ultsch A., Schloss P., Cox J.A., Schmitt B., Betz H. // Science. 1991. V. 254. P. 112–114.
2. Ultsch A., Schuster C.M., Laube B., Schloss P., Schmitt B., Betz H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 10484–10488.
3. Ultsch A., Schuster C.M., Laube B., Betz H., Schmitt B. // FEBS Lett. 1993. V. 324. P. 171–177.
4. Usherwood P.N.R. // Advances in Insect Physiology. 1994. V. 28. P. 309–341.
5. Гришин Е.В., Волкова Т.М., Арсеньев А.С., Решетова О.С., Оноприенко В.В., Магазаник Л.Г., Антонов С.М., Федорова И.М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 1121–1124.
6. Кускин Н.И., Крышталь О.А., Цындренко А.Я., Волкова Т.М., Гришин Е.В. // Нейрофизиология. 1989. Т. 21. С. 748–756.
7. Grishin E.V., Volkova T.M., Arseniev A.S. // Toxicon. 1989. V. 27. P. 541–549.
8. Briley P.A., Lunt G.G. // Investigation of membrane-located receptors / Eds E. Reid, G.M.W. Cook, D.J. Moore. Plenum Publishing Corporation, 1984. P. 461–468.
9. Bruns R.F., Lawson-Wendling K., Pugsley T.A. // Anal. Biochem. 1983. V. 132. P. 74–81.
10. Волкова Т.М., Аветисян Н.А., Галкина Т.Г., Куделин А.Б., Махмудова Е.М., Соловьев М.М., Таимур

- хамедов Б.А., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1022–1029.
11. Henley J.M., Ambrosini A., Rodrigues-Ithurralde D., Sudan H., Brackley P., Kerry C., Mellor I., Abutidze K., Usherwood P.N.R., Barnard E.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 4806–4810.
12. Lowry O.H., Roesbrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265 – 275
13. Towbin J., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
14. Duce I.R., Budd T.C., Richardson P.J. // Biochemical Society Transaction. 1991. V. 19. P. 143–146.

Isolation and Characterization of Ionotropic Glutamate Receptors from Locust Muscles

P. V. Perestenko, I. V. Mosharova, T. M. Volkova[#], and E. V. Grishin

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

A protein complex that exhibited properties of an ionotropic glutamate receptor was isolated from locust muscles. A one-step biospecific chromatography on a sorbent with the immobilized polyamine toxins from spider venom (argiopins) was used for its isolation. The resulting preparation was capable of specific binding of L -[^3H] glutamic (K_d 0.47 μM , B_{max} 2300 pmol/mg) and [^3H]- L -aspartic acids (K_d 0.65 μM , B_{max} 1870 pmol/mg). Three subtypes of glutamate receptors characteristic of the locust muscle tissues were found in the preparation.

Key words: glutamate receptor, locust muscles, biospecific chromatography, argiopins, radioligand analysis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-6540; fax: +7 (095) 330-7301; e-mail: volkova@ibch.siohc.ras.ru.