

ОБЗОРЫ

УДК 612.822.1:577.112.083

ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ЦНС: ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ

ДАМБИНОВА С. А.

В обзоре рассмотрены проблемы, касающиеся изучения структуры и функции глутаматных рецепторов (ГР) ЦНС, физико-химические и фармакологические свойства мембраносвязанных рецепторов глутамата. Обсуждены молекулярные характеристики выделенных и очищенных ГР и вопросы их реконструкции в искусственных липидных мембранах.

Предположено, что возникновение некоторых форм эпилепсии и паркинсонизма может быть связано с нарушением функции ГР в ЦНС.

Для выполнения высших психических (восприятие, эмоции, мышление) и сложных двигательных функций головного мозга человека необходимы бесперебойно работающие синапсы—межклеточные контакты. Химические процессы, происходящие на уровне синапсов, и особенности метаболизма нейромедиаторов в общих чертах изучены. Однако при длительном рассмотрении функций нейрона оказывается, что многие вопросы, касающиеся передачи и переработки сигналов, связаны с необходимостью исследования тонкой структуры и функции нейрональной мембраны, природы специфических мембранных белков нервных клеток. Возможно, что анализ свойств мембранных белков, в частности хеморецепторных комплексов, узнающих и связывающих нейромедиаторы, окажется тем ключом к пониманию интегративных функций нейрона, который позволит в дальнейшем установить взаимодействие нейронов и выяснить значения посылаемых ими сигналов.

Значительный интерес к медиаторной роли глутамата в последние годы обусловлен его выраженной способностью вызывать возбуждающий эффект у большинства нейронов позвоночных [1] и в первичных мышечных синапсах беспозвоночных [2].

Впервые возбуждающее действие глутамата на нейроны головного мозга было отмечено в 1956 г. Hayashi [3]. Позднее Krnjević и соавт. [4, 5], а затем и другие исследователи предположили, что глутамат является одним из естественных медиаторов в ЦНС, однако длительное время его роль в качестве природного нейромедиатора подвергали сомнению [6]. Основными причинами этого являлись, с одной стороны, отсутствие доказательств ферментативной деградации глутамата в синапсе, а с другой—кажущаяся «неспецифичность» действия этого медиатора. Впоследствии стало ясно, что ферментативное устранение глу-

тамата не имеет существенного значения в синапсах, и инактивация его происходит в основном за счет специфического обратного поглощения глутамата нейронами и глиальными клетками. Большое разнообразие нейронов, способных отвечать на действие глутамата возбуждением, обусловлено широким распространением глутаматергических путей в головном мозгу млекопитающих [7]. В настоящее время получены убедительные доказательства, свидетельствующие, что глутамат удовлетворяет всем основным требованиям, предъявляемым к классическим нейромедиаторам, и является одним из основных возбуждающих нейропередатчиков в ЦНС [8, 9]. Важнейшим из них явилось обнаружение специальных структур на постсинаптической мембране ГР.

Первыми исследователями, предположившими существование мембранных рецепторов для глутамата, управляющих электрической возбудимостью постсинаптических мембран, были Curtis и соавт. [10], которые показали, что только аппликация глутамата на поверхность клетки вызывала деполяризующий ответ нейрона. Введение же глутамата внутрь клетки не изменяло мембранный потенциал нейрона. Результаты последующих электрофизиологических исследований подтвердили реальность существования ГР и наличие их на мембранах нейронов моллюсков, мотонейронов, культивируемых срезах мозга и др. [11—14].

Основной функцией хеморецепторов, в частности ГР, является регуляция ионной проницаемости мембран нервных клеток и генерация возбуждающего или тормозного постсинаптического потенциала (ВПСП или ТПСР). При этом локальный электрический ток способен запустить общие механизмы электрогенеза нейрона [15]. Процесс генерации хемовозбудимого потенциала является многоступенчатым и сводится, по-видимому, к следующим элементарным актам [16]: 1) узнавание и связывание глутамата мембранным рецептором; 2) перестройка структуры рецептора, способствующая открытию ионного канала; 3) избирательный транспорт ионов в клетку.

При исследовании структуры и функции ГР возникает ряд вопросов: какова молекулярная природа и топография рецепторов на мембране; выполняются ли регулирующие функции рецептора единым комплексом или они сопряжены с разными мембранными структурами; какие механизмы лежат в основе активации рецептора и регуляции его синтеза; каковы, наконец, последствия нарушения функции ГР в головном мозгу позвоночных.

Исследование рецепторных свойств хемовозбудимых мембран включает, как правило, идентификацию молекулярной природы рецептора, изучение его физико-химических и фармакологических характеристик как в мембраносвязанном, так и в солюбилизованном, очищенном состоянии, реконструкцию его в искусственных липидных мембранах и изучение ионофорных функций рецептора.

Для никотиновых холинорецепторных подобных задач в основном решены, хотя и нуждаются в дополнительных исследованиях [17, 18].

Успешный анализ свойств холинорецепторов позволил разработать методологию исследования структуры и функций любых мембранных рецепторных белков, но для ГР ЦНС это сопряжено с особыми трудностями.

Сложности изучения структуры и функции ГР, прежде всего, связаны с отсутствием специфических блокаторов, способных необратимо связываться с рецептором и служить в качестве метки. Наличие таких меток, как, например α -бунгаротоксин для никотиновых холинорецепторов, предопределяет прогресс в изучении природы и свойств рецепторных белков [19]. Анализ хеморецепторных свойств глутаматсвязывающих мембранных белков осложняется высокой метаболической активностью глутамата, наличием большого числа глутаматутилизующих ферментов, в том числе и синаптических (глутаматдекарбоксилаза, глутаминаза и др.), а также существованием процессов поглощения и транспорта этой аминокислоты в синапсе.

Однако ряд закономерностей функционирования ГР позвоночных и беспозвоночных установлен на основе изучения обратного связывания самого L-глутамата, его аналогов и антагонистов.

1. Физико-химические свойства мембраносвязанных ГР ЦНС.

ГР представляют собой генетически детерминированные структуры, расположенные на поверхности постсинаптических мембран и состоящие, как полагают, из двух структурных компонентов: глутаматсвязывающего участка и ионфорной структуры, регулирующей избирательный транспорт ионов [20].

Изучение первой ступени активации ГР—узнавание-связывание глутамата—традиционно проводится с использованием электрофизиологических методов регистрации ответов нервной клетки на аппликацию нейромедиатора [21—23]. Лишь теоретическая и экспериментальная разработки биохимических методов связывания лиганда позволили расширить методические подходы к анализу взаимодействия глутамата с рецептором.

Связывание ^3H -L-глутамата с синаптическими мембранами нервных клеток. При изучении взаимодействия глутамата с мембранным рецептором важно разграничивать истинное (рецепторное) связывание от специфического (метаболического) поглощения нейромедиатора плазматическими мембранами. Возможность различия этих участков между собой показал Roberts [24]. По аналогии связывания с ГАМК-рецепторами он предположил, что процессы специфического связывания и поглощения глутамата могут различаться по чувствительности к наличию в инкубационной среде Na^+ , что и было подтверждено дальнейшими экспериментами [25, 26].

Принято считать, что истинное рецепторное связывание ^3H -L-глутамата является Na^+ -независимым процессом, в то время как поглощение и транспорт этой аминокислоты происходят в присутствии высоких концентраций Na^+ [27, 28]. Изучение связывания радиоактивного глутамата обнаружило наличие глутаматсвязывающих участков

на синаптических мембранах, изолированных из разных структур головного мозга позвоночных [29, 30]. Характеристики взаимодействия глутамата с рецептором, описанные во многих работах, часто неоднородны даже для одних и тех же структур головного мозга. Так, Shafiq, Roberts [31] и Baudry, Lynch [32] предполагают существование одного типа Na^+ -независимых участков связывания для глутамата. Однако эти авторы приводят разные значения констант связывания K_d и V_{\max} для синаптических мембран, выделенных из коры и гиппокампа головного мозга крыс. В наших исследованиях [33] обнаружено, что Na^+ -независимое рецепторное связывание имеет однородную популяцию участков связывания с K_d около 100–130 нМ и $V_{\max} = 1,8$ –2,5 пмоль/мг белка, которые существенно не различаются у синаптических мембран, выделенных из коры гиппокампа головного мозга крыс. С другой стороны, ряд исследователей, например Michaelis и соавт. [34, 35], Biziere и соавт. [36], склоняются в пользу наличия двух типов Na^+ -независимых участков связывания на этих мембранах. Численные значения K_d и V_{\max} , приведенные этими авторами, также отличаются друг от друга более чем на порядок.

При анализе кинетических зависимостей реакции связывания глутамата выявлены ее особенности в работах разных исследователей. Очевидно, что расхождения параметров связывания во многом определяются условиями выделения синаптических мембран и инкубации их с радиоактивным нейромедиатором. Кинетика связывания ^3H -L-глутамата с изолированными мембранами нервных клеток существенно зависела от состава инкубационной среды, времени и температуры инкубации, а также присутствия в среде одно- и двухвалентных катионов [37, 38], влияние которых на рецепторное взаимодействие глутамата с мембранами подробно рассмотрено в наших исследованиях и работах Baudry и соавт. [38–41].

Характер связывания радиоактивного глутамата в присутствии одновалентных катионов изменялся в зависимости от типа иона. Для Na^+ была обнаружена бифазная зависимость реакции связывания в широком диапазоне концентрации этого катиона [40]. Li^+ , Rb^+ , Cs^+ и K^+ обладали дозозависимым ингибирующим действием на связывание глутамата. Двухвалентные катионы, в частности Ca^{2+} и Mg^{2+} , оказывали стимулирующее действие на рецепторное связывание, причем Ca^{2+} в низких концентрациях заметно повышал количество связывающих участков без изменения константы сродства глутамата к рецептору [41]. Согласно предположению Baudry и соавт. [42, 43], Ca^{2+} регулирует активацию дополнительных участков связывания глутамата и участвует в повышении эффективности синаптической передачи в гиппокампе. Результаты наших экспериментов по изучению влияния двухвалентных катионов в целом совпадают с этими данными, что свидетель-

* K_d — константа диссоциации комплекса глутамат — рецептор; V_{\max} — количество связывающих участков

ствуется о необходимости добавления Ca^{2+} в инкубационную среду при исследовании взаимодействия глутамата с рецептором [37]. Обнаружено, что одно- и двухвалентные катионы в концентрации 5—10 мМ увеличивали специфическое связывание в 2,1—3,3 раза. Na^+ в концентрации 100—150 мМ более чем в 3 раза увеличивал специфическое связывание, в его присутствии активировался второй тип участков связывания $^3\text{H-L}$ -глутамата с K_d 1,8—2,0 мкМ и V_{max} 45—50 пмоль/мг белка. Предполагается, что Na^+ -зависимое связывание относится к системам активного транспорта глутамата.

Обнаружено, что связывание $^3\text{H-L}$ -глутамата значительно снижается при замораживании мембран и длительном хранении [37]. Было предложено использовать слабое ультразвуковое воздействие мембран с последующей их промывкой. Оказалось, что в указанных условиях связывание радиоактивной метки возрастало почти в 34 раза. Дополнительное промывание синаптических мембран вызывало увеличение Na^+ -независимого связывания глутамата практически на 400%. Авторы предположили, что этот эффект связан с возможным действием эндогенного ингибитора, существование которого было подтверждено в последующих исследованиях [44, 45]. В настоящее время проводят изучение его природы и свойств [35]. Выявлено, что эндогенный ингибитор ГР термостабилен, имеет пептидную природу [45]. Выяснение роли предполагаемого ингибитора ГР важно для изучения механизмов его активации и природы активного центра рецепторного белка.

Связывание $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами является обратимым и легко замещается структурными аналогами глутамата (антагонистами и агонистами) [46-49]. Установлено, что связывание радиоактивного глутамата в наибольшей степени происходит на плазматических мембранах, тогда как в основных субклеточных структурах (митохондриях, ядрах, миелине и др.) были обнаружены лишь незначительные величины радиоактивности. Однако нельзя не учитывать данные о Na^+ -независимом связывании $^3\text{H-L}$ -глутамата с плазматическими мембранами легких и печени [50]. Возникает вопрос: соответствуют ли эти Na^+ -независимые участки связывания глутамата физиологическим ГР [33]? Однозначно ответить на него пока не представляется возможным. Однако по ряду приведенных выше данных, касающихся, например, специфичности, насыщенности, обратимости и субклеточного распределения, глутаматсвязывающие участки синаптических мембран обладают свойствами физиологических ГР.

Ионофорные свойства ГР ЦНС. Было установлено, что действие глутамата как нейромедиатора активирует специфический компонент макромолекулы ГР, с помощью которого ионы, направляемые электрохимическим градиентом, проникают через постсинаптическую мембрану [10, 51]. Этот компонент является, вероятно, ионным каналом. Предполагают, что хемовозбуждаемый ионный канал представляет собой белковую пору атомного масштаба, выстланную изнутри гидрофильными группами [52, 53].

Хемовозбудимые ионные каналы могут существовать в трех регистрируемых состояниях: открытом, закрытом и инактивированном (или десенситизированном) [18]. Можно представить, что рецепторный участок молекулы ГР и ионный канал объединены между собой и взаимодействуют аналогично регуляторной и каталитической субъединице фермента, как это предложено для комплекса холлинорецептор—ионный канал. В этом случае сродство нейромедиатора к рецептору может изменяться в зависимости от состояния хемовозбудимого канала, возрастая от закрытого состояния ионного канала до инактивированного [18].

На основании анализа различных механизмов транспорта Na^+ в нейронах при индукции их глутаматом Teicheberg и соавт. [54, 55] предположили, что изменение ионной проницаемости, вызванное этим нейромедиатором, является слагаемым ряда процессов. С одной стороны, по-видимому, происходит индукция изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы и активация зависимых систем транспорта и поглощения глутамата, с другой, вероятно, вызывается активация потенциалзависимых Na^+ -каналов.

Использование синапсом и синаптических везикул в качестве удобных моделей изучения функции ГР предложили Chang, Michaelis [56, 57]. Они показали, что при действии низких концентраций глутамата синапсомы и синаптические везикулы способны поглощать Na^+ . Длительная экспозиция везикул с глутаматом вызывала десенситизацию, сходную с регистрируемой электрофизиологическими методами. Обнаружено, что стимуляция поглощения Na^+ происходит за счет активации комплекса ГР—ионный канал, а не транспорта глутамата [56]. Подтверждением этих данных служат результаты экспериментов, в которых показано, что возбуждающее действие глутамата не связано непосредственно с механизмами поглощения Na^+ или этой аминокислоты клетками [57].

Для выявления природы хемовозбудимого глутаматуправляемого канала особое внимание привлекают данные о том, что тетродотоксин—блокатор электровозбудимого Na^+ -канала—не влияет на процесс деполяризации, вызванный глутаматом [58]. Это свидетельствует о том, что глутаматуправляемые Na^+ -каналы значительно отличаются по структуре и свойствам от потенциалзависимых Na^+ -каналов. Подтверждением этому является ряд сведений о наличии избирательного блокирования тетродотоксином генерации потенциалов действия и отсутствии такого влияния на ВПСП, вызванного аппликацией глутамата [59].

Изучение типа ионов, проходящих через каналы активированного ГР, позволяет получить информацию не только о геометрии глутаматуправляемых каналов и их свойствах, но и предположить характер ионогенных групп белков и липидов, определяющих специфичность этих каналов. Сведения о том, что Ca^{2+} играет важную роль в продуцировании возбуждающей деполяризации, хотя и в меньшей степени, чем Na^+

[60], указывают на существование глутаматуправляемых Ca^{2+} -каналов. Обнаружение избирательной проницаемости, вызванной глутаматом для K^{+} и Cl^{-} , в случае гиперполяризации [61, 62] также предполагает наличие для них глутаматуправляемых каналов. Природа ионов, проходящих через каналы активированного ГР, очевидно, определяется типом нервных клеток и зависит от их функциональной специализации.

Существенный интерес для выяснения структуры и функции ГР вызывают результаты анализа изменений ионной проводимости мембран при взаимодействии одной молекулы глутамата с одним активным центром ГР [63]. Такой подход к оценке активного состояния хемовозбудимых ионных каналов применяется при исследовании «мембранного шума» [64]. Этот электрофизиологический подход позволяет определять интенсивность и временные характеристики проводимости одного ионного канала при аппликации глутамата [65, 66]. До сих пор кинетические параметры активации ионофорных каналов ГР описаны крайне недостаточно. Практически нет данных о стехиометрии глутамат-рецепторного взаимодействия. Имеются лишь сведения Barker, Ranson [67], которые показали, что величины соотношения глутамат:рецептор, вычисленные по кинетическим кривым доза—ответ, колеблются в пределах единицы, в то время как, по данным Oomiga и соавт. [63], это соотношение равняется 2:1. Эти авторы предполагают взаимодействие двух, а не одной, как в первом случае, молекул глутамата с единственным рецепторным участком плазматической мембраны нейрона.

Многие свойства ионных каналов ГР еще требуют специального исследования. Так, пока еще не представляется возможным количественно установить хемочувствительную плотность мембран нервных клеток к глутамату, оценить активацию специфических центров ГР и определить количество ионных каналов, необходимых для генерации ВПСП и др. Не исключено, что некоторые вопросы функциональной организации ГР ЦНС могут быть решены с помощью биохимических и иммунохимических подходов к анализу его свойств в модельных системах (мембранных везикулах, протеолипосомах и интактных нервных клетках).

Фармакологические свойства мембраносвязанных ГР

К агонистам глутамата относят вещества, способные оказывать возбуждающее действие при аппликации на плазматическую мембрану нейронов. Большинство анализированных соединений являлись структурными аналогами молекулы глутамата, которую модифицировали различными группами. [68]. Установлено, что подобные соединения обладают стереоспецифичностью действия, причем активность L-изомеров была существенно выше, чем D-форм [69]. Уменьшение углеродной цепи молекулы глутамата на 1, 2 или 3 углеродных атома резко снижало возбуждающее действие веществ. Метилирование α -углеродного атома не изменяло активности глутамата, в то время как метилирование β -уг-

леродного атома значительно снижало возбуждающий эффект. Введение гидроксильной или фенильной групп в β -положение также подавляло активность глутамата, по крайней мере, в 1000 раз [70].

На основании этих исследований был сделан вывод о том, что активный центр рецепторной молекулы может содержать две положительно заряженные группы, способные узнавать α - и γ -карбоксогруппы глутамата или α - и β -карбоксогруппы аспартата. Третьим участком узнавания рецептора может быть отрицательно заряженная группа, взаимодействующая специфически с NH_2 -группой нейромедиатора [35].

Наибольший интерес среди структурных аналогов глутамата привлекают производные иботеновой кислоты и каиновая кислота, обладающие значительно более высоким возбуждающим эффектом, чем сам нейромедиатор. Действие иботеновой кислоты практически равно действию глутамата и, как это было обнаружено, связано с гиперполяризацией мембраны нейрона [71, 72]. Недавно описан целый класс гетероциклических соединений, основанный на структурном компоненте иботеновой кислоты,—агентов, обладающих более мощным возбуждающим действием [73]. Однако при исследовании их конкуренции с радиоактивным глутаматом за узнающие участки ГР высокая специфичность этих производных иботеновой кислоты по отношению к ГР пока не подтвердилась.

Длительное время роль специфического агониста L-глутамата приписывали каиновой кислоте, которая является циклическим рестрицированным аналогом глутамата и обладает в 100 раз более высокой возбуждающей активностью. Анализу действия каиновой кислоты посвящено большое количество публикаций [74—76]. На основании этих работ стало ясно, что каиновая кислота не конкурирует с L-глутаматом за участки специфического связывания и имеет собственные узнающие участки на мембране нейрона [77—81].

С веществами, способными избирательно подавлять возбуждающее действие глутамата,—антагонистами—дело обстоит сложнее. Наиболее известные из антагонистов, такие, как NA 966, нуциферин, диэтиловый эфир глутаминовой кислоты и α -аминоадипат, не обладают высокой степенью селективности и проявляют слабый ингибирующий эффект [82—86].

Наиболее перспективными в плане изучения действия антагонистов на ГР являются производные фосфономасляной кислоты [87—89]. Так, например, высокополярные группы фосфатидилсерина, сходного по своей структуре с известным аналогом глутамата—2-амино-4-фосфономасляной кислотой, способны вызывать существенный ингибирующий эффект на функцию ГР [8, 90]. Немаловажный интерес в связи с этим представляют сведения о специфическом влиянии фосфолипидов А на функционирование ГР [90]. Эти данные в совокупности с результатами исследования химического состава очищенного ГР наводят на мысль о возможной регуляции активности ГР путем изменения содержания фосфолипидов.

Неоднозначность и разнонаправленность действия Тагонистов или антагонистов глутамата в разных структурах головного мозга, по-видимому, обусловлены возможностью существования различных типов рецепторов для глутамата. Не исключено, что плодотворный поиск высокоспецифических блокаторов связан с применением ряда нейротоксинов. Так, получены первые сведения о селективном блокирующем действии нейротоксина, выделенного из яда паука (*Nephila clavata*) на ВПСП, вызванный при аппликации глутамата на нервно-мышечный синапс [93]. Было обнаружено, что этот нейротоксин не действовал на аспаргатуиндуцированную деполяризацию. Авторы предполагают, что найден высокоспецифичный блокатор ГР для беспозвоночных.

Молекулярные характеристики ГР ЦНС. Выделение и очистка глутаматсвязывающих мембранных белков. Известно, что выделение, очистка и реконструкция функций рецепторных макромолекул из мембран нервных клеток является одной из основных возможностей их идентификации и четкого разграничения хеморецепторных процессов от ферментативного и транспортного метаболизма нейромедиаторных аминокислот [39].

К настоящему времени имеется лишь несколько удачных попыток выделить и очистить глутаматные рецепторы из синаптических мембран головного мозга крыс [33, 34]. Как уже неоднократно подчеркивалось, отсутствие соединений, пригодных для использования в качестве специфических меток, является основной причиной крайне недостаточного количества подобных исследований. В литературе представлены два основных подхода к выделению мембранных рецепторов для глутамата. Так, работами Michaelis и соавт. [34, 35, 94] было показано, что мягкая солиubilизация детергентами с последующей двухступенчатой аффинной хроматографией позволяет выделить глутаматсвязывающие мембранные белки. Согласно данным этих авторов, ГР представляет собой гликопротеид, возможно, субъединичной структуры, содержащий в активном центре металлическую группу Fe_2S_2 . Выделенный и очищенный белок имел $M 13,7$ кД и обладал способностью регулировать транспорт ионов. Были представлены доказательства, что глутаматсвязывающие белки являются интегральными внутренними белками [95]. Авторы показали, что чувствительность солиubilизированного рецепторного белка к ряду фармакологических препаратов остается практически одинаковой, как это выявлено для мембраносвязанного рецептора. Ни каиновая кислота, ни L-метил-D-аспарат не вызывали конкурентного подавления связывания 3H -L-глутамата с солиubilизированным рецептором даже в концентрации 10^{-4} M [34].

Иной путь выделения ГР использовали De Robertis, Fiszer de Plasas [96]. Им удалось методом экстракции в хлороформ-метаноле выделить из головного мозга крыс и мышц креветки протеолизид с $M 32$ кД, имеющий три участка связывания для глутамата. Такой метод экстракции мембранных белков не лишен недостатков, которые неоднократно обсуждали в литературе [17]. В настоящее время нет убедитель-

тельных доказательств в пользу рецепторной функции выделенных и очищенных протеолипидов [18].

Для сохранения наибольшей нативности ГР нами был использован метод солиubilизации в мягких ионных и неионных детергентах и все процедуры выделения и очистки были сведены к двум ступеням аффинной хроматографии [33, 97]. Одним из путей сохранения стабильности рецепторной макромолекулы явилось снижение окружающей температуры и добавление небольших количеств фосфолипидов на последней стадии очистки. Полученные результаты о гликопротеидной природе глутаматсвязывающих низкомолекулярных белков подтвердили данные Michaelis и соавт. [34]. Была подтверждена также гипотеза о субъединичной структуре рецепторного белка. Проводятся исследования по реконструкции функции ГР в липосомах.

Попытку реконструировать рецептор для глутамата, используя частично очищенные глутаматсвязывающие белки синаптических мембран, предприняли Кузнецов и соавт. [98] и Коломыткин и соавт. [99]. Они показали, что встроенные в бислойные липидные мембраны фрагменты мембран или глутаматсвязывающие белки способны к изменению проницаемости для ионов при добавлении глутамата в среду инкубации. Заслуживает внимания тот факт, что появление изменений ионной проницаемости при воздействии нейромедиатора наблюдалось лишь при обнаружении белковых фрагментов по обе стороны липидной мембраны. Предполагается, что сквозное внутрилипидное присутствие белка в обеих половинах искусственной мембраны необходимо для формирования функционально активного ионного канала.

Физико-химические характеристики очищенных глутаматсвязывающих мембранных белков. Исследование параметров связывания $^3\text{H-L}$ -глутамата с очищенной фракцией мембранных белков обнаружило изменение константы сродства нейромедиатора к рецептору— K_d и числа связывающих участков на макромолекуле белка. Так, Michaelis и соавт. [34] показали, что K_d в этом случае колеблется в пределах 650—800 нМ, в то время как мембраносвязанный рецептор имел K_d —200—300 нМ. Авторы предположили, что такое снижение параметров связывания $^3\text{H-L}$ -глутамата с солиubilизированной формой рецептора обусловлено, по-видимому, изменением микроокружения белка, в частности нарушением белок-липидного взаимодействия.

В наших экспериментах при анализе связывания нейромедиатора в координатах Scatchard оказалось, что солиubilизированный глутаматсвязывающий рецептор имеет K_d 800—1000 нМ и V_{max} 180—200 пмоль/мг белка, тогда как в мембраносвязанной форме глутаматсвязывающий рецептор имел K_d 80—100 нМ и V_{max} 1,5—2,5 пмоль/мг белка. Эти данные подтверждают ранее высказанное предположение Michaelis и соавт. [35]. Кроме того, снижение сродства глутамата к рецептору может быть также обусловлено нарушением стехиометрии субъединиц рецепторного комплекса в ходе выделения и очистки. Мы пытались выявить различные состояния агрегированности рецепторного глутаматсвязывающего белка. Обнаружено, что изучаемые препараты в

разных концентрациях имели различную степень диссоциации молекулы рецептора. При определении величины M этих форм рецептора оказалось, что диссоциированная форма мембранного белка, специфически связывающего глутамат, соответствует зоне градиента 15—20%-ной сахарозы 12—15 кД, в то время как ассоциированная форма белка обнаруживается в области 28—30 кД. Мономерный компонент рецепторного белка при электрофорезе в ПААГ соответствовал низкомолекулярной фракции белка с M 14 кД. Не исключено, что ГР—это комплекс, состоящий из низкомолекулярных субъединиц, наименьшая из которых представляет собой димер. Этот процесс, по-видимому, может оказаться многоступенчатым и приводит к образованию больших агрегатов, как в случае ферментов [100].

Гидродинамические параметры диссоциированной формы ГР существенно отличались от ассоциированной. Найдено, что при низких концентрациях очищенных мембранных белков расчетный коэффициент седиментации колебался в пределах 2.1 S, тогда как для агрегированной формы он соответствовал 3.5 S. Интересно, что в присутствии немеченого L-глутамата коэффициент седиментации глутаматсвязывающего белка соответствовал ассоциированной зоне, то есть 3.5 S, а это согласуется с данными Michaelis и соавт. [34], которые показали, что наибольшей глутаматсвязывающей активностью обладал белковый пик в зоне 3.5 S. Авторы предполагают, что во время выделения и очистки происходит спонтанное снижение дисульфидных связей, ведущих к образованию субъединиц с M 13.8 кД и коэффициентом седиментации около 2.5 S. Нельзя исключить возможность того, что макромолекула ГР состоит из несвязанных дисульфидными мостиками мономеров, которые ассоциируются под действием нейромедиатора. В этом случае механизмы ионной проницаемости мембран, по-видимому, представляют процессы ассоциации и диссоциации специфических рецепторов белков под влиянием молекулы L-глутамата.

Химический анализ очищенных глутаматсвязывающих белков, выделенных из синаптических мембран коры головного мозга крыс представлен в работах [33, 35]. Аминокислотный состав белковых фракций, как обнаружено нами, существенно отличается от результатов исследования, проведенного Michaelis и соавт. [34].

Выявлено большое количество гидрофобных аминокислот, что, возможно, свидетельствует о легкости образования гидрофобных взаимодействий между субъединицами и значительной липофильности макромолекулы рецептора. Было определено соотношение кислых и основных аминокислотных остатков, полярность молекулы, наличие общего положительного заряда, который определяет высокую степень сродства к кислым нейромедиаторам. Теоретический анализ относительной полярности молекулы рецептора позволил рассчитать возможный объем и форму рецептора для глутамата, которые согласуются с представлениями об олигомерной структуре, состоящей из гидрофобных глобул, близких по виду к эллипсоиду.

Содержание углеводов в макромолекуле ГР не превышает 2% от

содержания общего белка. Наибольшая доля в углеводном компоненте мембранного рецептора приходится на галактозу, маннозу, глюкозу и N-ацетилглюкозамин. Остальные углеводы и сиаловые кислоты представлены в незначительных количествах.

Важная роль липидных компонентов в поддержании структуры и функции ГР не вызывает сомнений: полная или частичная делипидизация мембранного белка ведет к полной инактивации рецептора и потере чувствительности к глутамату. Среди идентифицированных липидов, экстрагируемых из гликопротеин-липидных комплексов рецептора, были обнаружены холестерин и фосфолипиды, большинство из которых приходится на фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и фосфатидилсерин.

На основании вышеназванных данных можно представить, что хеморецепторный мембранный белок, специфически связывающий глутамат, является гликопротеин-липидным комплексом, состоящим из низкомолекулярных субъединиц, способных к ассоциации—диссоциации в присутствии нейромедиатора. Создается впечатление, что минимальная структурная единица рецептора может состоять из двух субъединиц, которые, находясь в определенной стехиометрии, составляют олигомерную макромолекулу рецепторного мембранного белка.

Проблемы восприятия и узнавания химических сигналов нервными клетками представляют собой одно из ведущих направлений современной нейробиологии. Особенность изучения хеморецепторных процессов, происходящих в ЦНС, на данном этапе касается механизмов функционирования регуляторных мембранных белков—рецепторов.

ГР являются важным классом этих мембранных белков, которые непосредственно вовлекаются в процессы передачи и обработки информации в головном мозгу млекопитающих. Совокупность представленных в обзоре данных, касающихся в основном биохимических аспектов функционирования ГР, показывает, что в настоящее время сделаны первые шаги к исследованию молекулярной и пространственной организации их в ЦНС.

Появление иммунохимических подходов к исследованию структуры и функции ГР ЦНС является одним из решений проблемы специфического маркирования этого класса мембранных белков.

Получение моноклональных антител к ГР может оказаться полезным для диагностики и оптимизации лечения некоторых форм тяжелых хронических заболеваний, в частности эпилепсии и паркинсонизма. Не исключено, что значительный нейротоксичный эффект глутамата и его рестрицированных аналогов обусловлен нарушением функции ГР в ЦНС. Возможно, что длительная деполяризация, вызванная этими аналогами глутамата, приводит к дегенерации мембраны нейрона, нарушению взаимосвязи структур, ответственных за выполнение сложных двигательных функций. Дальнейший анализ факторов, вызывающих системные изменения в организме и вовлекающихся в механизмы проявления судорожной активности, позволит выявить роль ГР в патогенезе ряда хронических неврологических заболеваний.

CNS GLUTAMATE RECEPTORS. STRUCTURE AND FUNCTIONS

DAMBINOVA S. A.

Institute of Experimental Medicine, USSR Academy of Medical
Sciences, Leningrad

The review deals with physical, chemical and pharmacological properties of membrane-bound glutamate receptors. The molecular characteristics of the purified glutamate receptors and their reconstruction in the artificial lipid membranes are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glutamic Acid. Adv. Biochem. Physiol., eds. L. J. Filler et al. N.-Y., Raven Press, 1979.
2. Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А. Нейрофизиология, 9, 532—536, 1977.
3. Hayashi T., Nagai K. Proc. XX Int. Physiol. Congress, 410, 1956.
4. Krnjevic K., Phillis J. W. J. Physiol., 165, 274—304, 1963.
5. Krnjevic K. Physiol. Rev., 54, 418—540, 1974.
6. Davies J. Evans R. H., Francis A. A., Jones A. W., Watkins J. C.—In: Neuro. transmitters and their receptors (ed. Littauer U. Z. et al., John Wiley Press N.-Y.), p. 333—348, 1980.
7. Briley P. A., Filbin M. T., Lunt G. G., Turner P. D. Mol. Cell. Biochem., 33/39, 347—356, 1981.
8. Glutamate as a transmitter, eds. Roberts P. J. et al., N. Y., John Milley Press, 1980.
9. Glutamate as a neurotransmitter, eds. Dichia G., Gessa G., N.-Y., Raven Press, 1980.
10. Curtis D. R., Watkins J. S. J. Physiol., 150, 656—682, 1960.
11. Nistri A., Constanti A. Progr. Neurobiol., 13, 117—235, 1979.
12. Freeman A. R. Progr. Neurobiol., 6, 137—153, 1976.
13. Duggan A. W. Brain Res., 19, 522—528, 1974.
14. Höslt A., Andrés P. F., Höslt E. Pflügers Arch. 363, 43—48, 1976.
15. Костюк П. Г., Крышталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки, М., Наука, 1981.
16. Levy W. B., Hauser J., Cotman C. W. J. Theor. Biol. 60, 109—130, 1976.
17. Вульфшус Е. А., Коваленко В. А.—В сб.: Биофизика, 8, М., ВИНТИ, 1978.
18. Heidmann T., Chanquex J. P. Ann. Rev. Biochem. 47, 317—354, 1978.
19. Cohen J. B., Chanquex J. P. Ann. Rev. Pharmacol. 15, 83—103, 1975.
20. Anwyl R. J. Physiol. 273, 367—388, 1977.
21. Bernardi G., Liegländsberger W., Herz A., Pull E. A. Brain Res., 39, 523—525, 1972.
22. Цыборенко А. Л., Врублевский С. В., Марченко С. М., Крышталь О. А. Материалы I Всес. биоф. съезда, 11, 103, 1982.
23. Johnston G. A. R., Curtis D. S., Davies J., McCulloch R. M. Nature. 248, 604—605, 1974.
24. Roberts P. J. Nature, 252, 399—401, 1974.
25. Foster A., Roberts R. J. J. Neurochem., 31, 1467—1477, 1978.
26. Sharif N. A., Roberts P. J. Biochem. Pharmacol., 30, 3019—322, 1981.
27. Baudry M., Lynch G. Nature, 282, 748—750, 1979.
28. Foster A., Menna E. E., Fagg G. E., Cotman C. W. J. Neurosci., 1, 620—625, 1981.
29. Baudry M., Lynch G. Mol. Cell. Biochem., 38, 5—18, 1981.

30. Lopez-Colome A. M. *Neurochem. Res.*, **6**, 1019—1025, 1981.
31. Sharif N. A., Roberts P. J. *Brain Res.*, **211**, 293—304, 1981.
32. Baudry M., Lynch G. J. *Neurochem.* **36**, 811—820, 1981.
33. Dambinova S. A., Gorodinsky A. I., Besedin V. I., Doemina M. N. III Soviet-Sweden Symp. Physico-Chemical Biology, Tbilisi, p. 181—182, 1981.
34. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Byarsky L. L. *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 338—348, 1974.
35. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Chang H. H., Grubbs R. D., Kuonen D. *Mol. Cell. Biochem.*, **38**, 163—179, 1981.
36. Biztere K., Thompson H., Coyle J. *Brain Res.*, **183**, 421—433, 1980.
37. Sharif N. A., Roberts R. J. *Neurochem.*, **34**, 779—784, 1980.
38. Baudry M., Lynch G. *Eur. J. Pharmacol.*, **57**, 283—285, 1979.
39. Baudry M., Bundman M., Smith E., Lynch G. *Science*, **212**, 937—938, 1981.
40. Baudry M., Oliver M., Creager R., Wieraszko A., Lynch G. *Life Sci.* **27**, 325—330, 1980.
41. Baudry M., Arst D. S., Oliver M., Lynch G. *Dev. Brain Res.* **1**, 37—48, 1981.
42. Baudry M., Arst D. S., Lynch G. *Brain Res.*, **223**, 195—199, 1981.
43. Baudry M., Lynch G. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 2298—2303, 1980.
44. Дамбинова С. А., Городинский А. И. *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **12**, 58—59, 1982.
45. Svennerholm L., Freedman P. *Biochim. Biophys. Acta.*, **617**, 97—119, 1980.
46. Toffano G., Guidotti A., Costa E. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 4024—4028, 1978.
47. Buu N. T., Pull E., Var Geder N. *Gen. Pharmac.*, **1**, 5—14, 1976.
48. Foster A. C., Fagg G. E., Menna E. E., Cotman C. W. *Brain Res.*, **229**, 246—250, 1981.
49. Vincent S. R., McGeer E. G. *Brain Res.*, **184**, 99—108, 1980.
50. Head R. A., Tunnicliff G., Matheson G. K. *Can. J. Biochem.*, **58**, 534—538, 1980.
51. Simon J. R., Contrera J. F., Kuhar M. J. *J. Neurochem.*, **26**, 141—147, 1976.
52. Ovchinnikov Y. A.—In: *New horizons in biological chemistry*, ed. by Koike et al., Jap. Scient. Soc. Press, Tokyo, p. 157—174, 1980.
53. В сб.: *Мембраны: ионные каналы* под ред. Юнзмаджева Ю. А., М., Мир, с. 25—94, 1981.
54. Luini A., Goldberg O., Teicheberg V. I. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 3250—3254, 1981.
55. Teicheberg V. I., Goldberg O., Luini A. *Mol. Cell. Biochem.*, **39**, 281—296, 1981.
56. Chang H. H., Michaelis E. K. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2411—2417, 1981.
57. Chang H. H., Michaelis E. K. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10084—10087, 1981.
58. Lieglgansberger W., Pull E. A. *Nature New Biol.*, **239**, 204—205, 1972.
59. Koo C. Y. *Fed. Proc.*, **40**, 30—35, 1981.
60. Onodera K., Takeuchi A. *J. Physiol.*, **252**, 295—318, 1975.
61. Yamamoto C., Yamashita H., Chujo T. *Nature*, **262**, 786—787, 1976.
62. Oomura Y., Ooyama H., Sawada M. *J. Physiol.*, **243**, 321—341, 1974.
63. Cull-Candy S. G., Miledi R., Parker I. J. *J. Physiol.*, **321**, 195—210, 1981.
64. Anderson C. R., Cull-Candy S. G., Miledi R. *J. Physiol.*, **282**, 219—242, 1978.
65. Cull-Candy S. G., Parker I. *Nature*, **295**, 410—412, 1982.
66. Cull-Candy S. G., Miledi R. *J. Physiol.*, **326**, 527—551, 1982.
67. Barker J. L., Ransom B. R. *J. Physiol.*, **280**, 331—354, 1978.
68. Краткий курс молекулярной фармакологии (под ред. П. В. Сергеева) М., 1975.
69. Davies J., Watkins J. C. *J. Physiol.*, **297**, 621—635, 1979.
70. Curtis D. R., Watkins J. C. *J. Physiol.*, **150**, 656—682, 1960.
71. Honore T., Lauridsen J., Krogsgaard-Larsen P. *J. Neurochem.*, **36**, 1302—1304, 1981.
72. McDonald J., Nistri A. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, **55**, 965—967, 1977.
73. Krogsgaard-Larsen P., Honore T., Hansen J. J., Curtis D. R., Lodge D. *Nature*, **284**, 64—66, 1980.

74. *Simon J. R., Contrera J. F., Kuhar M. J. J. Neurochem.*, 26, 141—147, 1976.
75. *Johnston G. A. R., Kennedy S. M., Twitchin B. J. Neurochem.*, 32, 121—127, 1979.
76. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*, eds, McGeer E. G., Olney J. K., McGeer P. L., N.-Y., Raven Press, p. 275, 1978.
77. *Hall J. G., Hicks T. P., McLennan H. Neurosci. lett.*, 8, 171—175, 1978.
78. *Robinson J. H., Deadwyler S. A. Brain Res.*, 221, 117—128, 1981.
79. *Krespan B., Berl S., Nicklas W. J. J. Neurochem.*, 38, 509—518, 1982.
80. *Foster A. C., Menna E. E., Monaghan D., Cotman C. W. Nature.*, 289, 73—74, 1984.
81. *London E. D., Coyle J. T. Mol. Pharmacol.*, 15, 495—505, 1979.
82. *Spencer H. J. Brain Res.*, 102, 91—101, 1976.
83. *McLennan H., Wheal H. V. Neuropharmacol.*, 15, 709—712, 1976.
84. *McDonald J. F., Nistri A., Padjen A. L. Can. J. Physiol. Pharmac.*, 55, 1387—1390, 1977.
85. *Bisco T. J., Davies J., Dray A., Evans R., Francis A., Martin M., Watkins J. Eur. J. Pharmacol.*, 45, 315—316, 1977.
86. *Григорьев В., Мандельштам Ю. Е., Медведь Т. Ю. Ж. эвол. биохим. и физиол.*, 15, 310—312, 1979.
87. *Watkins J. C., Curtiss D. R., Brand S. S. J. Pharmacol.*, 29, 324—329, 1977.
88. *Evans R. H., Jones A. W., Watkins J. C. Br. J. Pharmacol.*, 74, 907P—908P, 1981.
89. *Roberts P. J., Foster G. A., Shurif N. A., Collins J. D. Brain Res.*, 238, 475—479, 1982.
90. *Honore T., Lauridsen J., Krosggaard-Larsen P. J. Neurochem.*, 38, 173—178, 1982.
91. *Bionlac B., De Tinguy-Moreaud E., Vincent J., Nenzil E. Gen. Pharmacol.*, 10, 121—125, 1979.
92. *Lanthorn T., Cotman C. W. Brain Res.*, 225, 171—178, 1981.
93. *Nobufumi K., Akiko N., Takahashi A. Neurosci. Lett.*, 9, s72, 1982.
94. *Michaelis E. K. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 1004—1012, 1975.
95. *Michaelis E. K. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 87, 106—113, 1979.
96. *De Robertis E., Fliszer de Plazas S. J. Neurochem.*, 26, 1237—1243, 1976.
97. *Дамбинова С. А., Беседин В. Н. Нейрохимия*, 1, 143—148, 1982.
98. *Кузнецов В. Н., Коломыткин О. В., Ермишкин Л. Н.*—В сб.: Биофизика сложных систем и радиационных нарушений, М., Наука, 29—33, 1977.
99. *Коломыткин О. В., Абросимов Б. С., Чистяков Л. Г., Кузнецов В. Н. Материалы I Всесоюз. биофиз. съезда*, 1, 241, 1982.
100. *Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. ДАН СССР*, 260, 1477—1480, 1981.

Институт экспериментальной медицины
АМН СССР, Ленинград

Поступила 4. V 1983