

УДК 612.822

М.В.Николаев (5 курс, каф. ФХБК), К.В.Большаков, к.б.н., с.н.с. ИЭФБ им. Сеченова РАН

ЭКСПРЕССИЯ Глур1 АМПА РЕЦЕПТОРОВ В ООЦИТАХ XENOPUS LAEVIS

Возбуждающие глутаматергические синапсы широко распространены в ЦНС. Связывание глутамата с узнающими участками рецепторов переводит их ионные каналы в открытое состояние и приводит к генерации большинства возбуждающих постсинаптических токов. Глутаматные ионотропные рецепторы делятся на три подтипа: АПМА, НМДА и каинатные (по преимущественной чувствительности к агонистам). Все ионотропные глутаматные рецепторы построены из набора субъединиц, состав которых определяет различия в их строении, физиологических и фармакологических свойствах.

Эффективным подходом к изучению строения каналов глутаматных рецепторов является сопоставление блокирующей активности в гомологических рядах органических соединений. С помощью этого подхода в нашей лаборатории были найдены избирательные каналоблокаторы АМПА рецепторов, не имеющих в своем составе субъединицу Глур2. Было показано, что для эффективной блокады каналов этих рецепторов необходимо наличие гидрофобной группировки и положительно заряженной группировки, разделенных расстоянием ~ 10 Å. Самым активным в ряду дикатионных производных адамантана оказалось соединение с 6 метиленовыми группами между гидрофобной группировкой и положительно заряженным концевым атомом азота ИЭМ-1460. Увеличение или уменьшение количества метиленовых групп приводило к падению активности соединения на порядок.

К сожалению, цитированные выше данные были получены на нативных АМПА рецепторах гигантских интернейронов стриатума, которые неоднородны по субъединичному составу.

Целью настоящей работы было получение рекомбинантных АМПА рецепторов, для выявления влияния субъединичного состава рецепторов на их чувствительность к действию каналоблокаторов. Задачей работы было получение и очистка плазмидной ДНК (пДНК) для последующей инъекции и экспрессии глутаматных рецепторов в ооцитах *Xenopus laevis* (*X.laevis*).

Проведено сравнение эффективности экспрессии плазмидной ДНК pсDNA3.1+, выделенной методами грубой и мембранной очистки. Для мультиплицирования плазмид производилась трансформация клеток *E.coli* с помощью термошока и кальциевой преципитации. Компетентные клетки, выращенные в среде с высоким содержанием кальция, размораживались на льду. К 100 мкл компетентных клеток добавлялось 4 мкл 0.5 М ДМСО и 20 пг пДНК. После инкубации полученной смеси на льду 1 мин, клетки переносились на 45° С на 45 сек, после чего вновь помещались на лед на 10 сек. Затем к смеси бактерий добавлялась богатая среда SOC (триптон 2%, дрожжевой экстракт 1.1%, NaCl 20 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Глюкоза 20 mM), и клетки инкубировались 45 мин. при интенсивном перемешивании и температуре 37° С, а затем высевались на твердую среду LB(агар 1%, триптон 1%, дрожжевой экстракт 0.5%, NaCl 170 mM, pH 7.0) с ампициллином. Трансформированные бактерии, образовавшие колонии на селективной среде (плазмиды имели ген устойчивости к ампициллину), переносили в жидкую среду LB (триптон 1%, дрожжевой экстракт 0.5%, NaCl 170 mM, pH 7.0), где выращивались при температуре 37 °С и

интенсивном перемещивании до концентрации $OD_{585}=0.6$. Плазмиды выделялись с помощью щелочного гидролиза. Последующая очистка проводилась 2 методами. В первом случае к полученному после лизиса бактерий и обработки спиртом осадку добавляли раствор 2М NH_4OAc , растворяя таким образом плазмидную ДНК и оставляя в осадке длинные фрагменты рРНК; пДНК выделялась из полученного супернатанта с помощью осаждения спиртом и последующего растворения осадка в воде.

Во втором случае полученный после лизиса и центрифугирования бактерий супернатант переносился на спин-колонки для очистки пДНК на силико-мембранах. Данный способ, кроме очистки пДНК от РНК позволяет в значительной мере избавиться от эндотоксинов, липополисахаридов бактерий, являющихся токсичными для ооцитов *X. laevis*. Эффективность очистки проверялась по результатам гель-электрофореза, анализу рестрикционных фрагментов и экспрессии глутаматных рецепторов в ооцитах.

Полученную после очистки пДНК инъецировали в ооциты *X. laevis*. Для разделения ооцитов выделенные из наркотизированной лягушки фрагменты яичников инкубировались в течение 2 часов в растворе следующего состава (в мМ): NaCl- 96, KCl- 2, Hepes- 5, $MgCl_2$ - 2, коллагеназа тип 1А (0.2 мг/мл), pH 7.5. Затем ооциты 5-6 стадий развития переносились в такой же раствор, где отсутствовала коллагеназа и были добавлены $CaCl_2$ - 1 мМ и гентамицин 0.1 мг/мл, и инкубировались при температуре 14-16° С.

На следующий день после выделения в ооциты инъецировали с помощью микроинъектора Nanoject2000 (WPI Inc.) 20 нг. плазмидной ДНК pcDNA3.1+, кодирующей субъединицу Глур1i АМПА рецепторов. Для электрофизиологических экспериментов ооциты помещались в раствор (в мМ): NaCl 116, KCl 2.5, $CaCl_2$ 1.8, pH 7.5. Для регистрации трансмембранных токов использовалась методика двух-электродной фиксации потенциала (усилитель Axon Instr.). Микроэлектроды изготавливались из боросиликатного стекла и при наполнении 3М KCl имели сопротивление 2-4 МОм.

Выделенная разными способами пДНК была в одинаковой степени чувствительна к действию рестриктаз.

Показано, что выделенные первым способом плазмиды были токсичны для ооцитов, большая часть которых погибала через 1-3 дня после инъекции. По всей видимости, при подобной очистке пДНК имеет высокую примесь эндотоксинов, губительных для ооцитов. Напротив, ооциты, инъецированные плазмидами, очищенными на спин-мембранах, были пригодны для электрофизиологических экспериментов в течении 1-2 недель. Через 3-5 дней на них можно было зарегистрировать токи, вызываемые аппликацией раствора каината.

В работах нашей лаборатории на основании сравнения действия блокаторов каналов АМПА рецепторов на нативных и рекомбинантных рецепторах показано, что их действие качественно не различается. В настоящий момент предстоит проверка действия блокаторов ИЭМ-2062 и ИЭМ-2063 на Глур1 рецепторах, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*.