

## МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ NMDA РЕЦЕПТОРОВ

### Обзор

© 2018 Д.А. Сибаров\*, С.М. Антонов

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: dsibarov@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.04.18

После доработки 04.06.18

Рецепторы глутамата выполняют функцию возбуждающей синаптической передачи в центральной нервной системе. Подтип рецепторов, селективно активируемых N-метил-D-аспаратом (NMDAR), имеет ионный канал, проницаемый для ионов натрия, калия и кальция, и экспрессируется в пре- и постсинапсе, а также – во внесинаптических областях плазматической мембраны нейронов. Вход кальция в шипики через каналы NMDAR критически важен для реализации таких явлений синаптической пластичности, как кратко- и долгосрочная потенциация и депрессия синаптической передачи. Считается, что эти феномены являются морфо-функциональным отражением процессов формирования памяти на клеточном уровне. Дисфункции NMDAR связаны с развитием эпилепсии, шизофрении, мигрени, деменций и других нейродегенеративных процессов. Длительная активация NMDAR внесинаптических областей вызывает кальциевую перегрузку нейронов и апоптоз. В обзоре обсуждаются современные представления и новые данные о молекулярных механизмах кальций-зависимой десенситизации NMDAR, которые осуществляют быструю модуляцию ионной проводимости этих рецепторов в центральной нервной системе, а также ограничивают вход кальция в нейроны при патологических состояниях. Представлены сведения о молекулярных детерминантах, определяющих кальций-зависимую десенситизацию NMDAR, новые сведения о локальных функциональных взаимодействиях NMDAR с другими ионными каналами и транспортерами, а также освещаются особенности ассоциации NMDAR с липидными микродоменами клеточной мембраны.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** NMDA рецепторы, десенситизация, кальций, натрий-кальциевый обменник, липидные плотники, микродомены.

DOI: 10.1134/S0320972518100032

### NMDA РЕЦЕПТОРЫ: ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Ионотропные рецепторы глутамата представляют собой лиганд-активируемые ионные каналы, включающие рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR),  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и каината.

Среди этих рецепторов наибольшей проницаемостью для ионов кальция обладают NMDAR, которые состоят из двух GluN1 субъединиц и двух GluN2 субъединиц или же вместо одной из GluN2 может находиться GluN3 субъединица. В дигетеромерных рецепторах одна из четырех

GluN2 (GluN2A, B, C или D) субъединиц формирует рецептор, в то время, как в тригетеромерных – разные GluN2 субъединицы участвуют в формировании функционального рецептора [1–3]. Многообразие молекулярных форм NMDAR обеспечивает разнообразие их функциональных и фармакологических особенностей [4, 5]. Для активации рецептора необходимо одновременное связывание GluN1 субъединицей молекулы глицина [6] или D-серина [7], а GluN2 субъединицей – молекулы глутамата или аспартата [8], что вызывает открывание поры канала, проницаемого для натрия, калия и кальция [9].

Кальций является одним из важнейших внутриклеточных мессенджеров, управляющих процессами синаптической пластичности, дифференцировки и эксайтотоксичности. Вход кальция в шипики через каналы NMDA рецепторов критически важен для реализации долгосрочной потенциации (LTP) и долгосрочной депрессии (LTD) синаптической передачи [10, 11].

Принятые сокращения: NMDAR – рецепторы N-метил-D-аспартата, AMPAR – рецепторы  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты, LTP – долгосрочная потенциация, LTD – долгосрочная депрессия, VGCC – потенциал-чувствительные кальциевые каналы, CaM – кальмодулин, NCX – натрий-кальциевый обменник, PMCA – кальциевый насос.

\* Адресат для корреспонденции.

Возникновение LTP наблюдается при высокочастотной синаптической активации, приводящей к деполяризации постсинаптической мембраны, снятию магний-зависимого блока каналов NMDA рецепторов, входу значительного количества  $\text{Ca}^{2+}$  через NMDAR в шипики, что приводит к активации кальмодулина. Это сопровождается связыванием кальций-кальмодулина (Ca-CaM) с кальмодулин-зависимой киназой (CaMKII), автофосфорилированием CaMKII и усилением ее активности, фосфорилированием AMPA-рецепторов (AMPA) и мобилизацией последних в мембрану. В конечном итоге встраивание дополнительных AMPA-рецепторов в мембрану шипиков приводит к увеличению амплитуды постсинаптического ответа [12, 13]. NMDAR-зависимая форма LTD индуцируется низкочастотной стимуляцией (<3 Гц) и вызывает некоторое возрастание концентрации постсинаптического  $\text{Ca}^{2+}$ , а также серин-треонинового сигнального каскада [14, 15]. Интересно, что NMDAR-зависимая индукция LTD может происходить и при отсутствии ионного тока через канал рецептора только за счет метаболитного эффекта, возникающего при связывании с лигандом GluN2 субъединицы. Последующие изменения конформации внутриклеточного домена рецептора снижают его ассоциацию с серин-треониновой фосфатазой PP1 и CaMKII, что вызывает фосфорилирование p38 MAPK, интернализацию AMPAR и «сжевивание» дендритных шипиков [16].

Функции NMDA рецепторов обязательны для реализации механизмов памяти [10, 12]. Однако, избыточный вход кальция через каналы NMDA рецепторов экспрессированных во вне-синаптической мембране нейронов, например, при ишемии и инсультах может вызывать гибель клеток [17, 18].

### ТИПЫ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ NMDA РЕЦЕПТОРОВ

Все рецепторы глутамата подвержены десенситизации. Десенситизация – это уменьшение ответа на стимул, при его постоянном воздействии на рецептор. Быстрее всего этот процесс происходит в AMPA и каинатных рецепторах. За время порядка 20 мс амплитуда токов может падать почти на 90%. Однако в NMDAR этот процесс происходит медленнее и со слабым уменьшением токов во времени, а в GluN2C- и GluN2D-содержащих рецепторах десенситизация практически отсутствует.

Десенситизация AMPA и каинатных рецепторов [4] связана с конформационными измене-

ниями белковой молекулы после связывания с лигандом, что приводит рецептор в одно из так называемых десенситизированных состояний [19]. Однако десенситизация NMDA рецепторов устроена сложнее и является результатом нескольких различных параллельно протекающих процессов. После активации NMDAR агонистами развиваются 2 типа десенситизации:

1) Связывание глутамата с GluN2 субъединицей вызывает отрицательную аллостерическую модуляцию, снижающую аффинность глицина к GluN1, что приводит к постепенному снижению тока через NMDA рецептор в присутствии агонистов. Увеличение концентрации глицина практически снимает этот эффект [20, 21]. Поскольку аффинность связывания глицина NMDAR в значительной степени модулируется подтипом GluN2 субъединицы [22, 23], отрицательная обратная связь между связыванием глутамата и глицина также зависит от субъединичного состава рецептора.

2) Кальций-зависимая десенситизация, которую также называют кальций-зависимой инактивацией, возникает в результате влияния на внутриклеточный сайт GluN1 субъединицы, вошедшего через пору NMDAR, кальция [24–27]. Кинетика десенситизации NMDAR зависит от субъединичного состава рецепторов (рис. 1) [28–35]. Например, в присутствии 2 мМ внеклеточного кальция токи рекомбинантных GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2B NMDAR, при активации глутаматом, постепенно снижаются на 42 и 24% соответственно [36]. Кальций-зависимая десенситизация сильнее всего выражена для NMDAR, содержащих GluN2A субъединицы, и практически отсутствует у GluN2C и GluN2D содержащих NMDAR [36, 37]. Функциональные особенности подтипов NMDAR определяют их различную роль в процессах синаптической пластичности [18]. Дигетеромерные GluN1/GluN2A NMDA рецепторы в ЦНС преимущественно концентрируются в постсинапсе, в то время как GluN1/GluN2B выполняют как синаптическую, так и экстрасинаптическую функции [38, 18]. Медленная кинетика деактивации и десенситизации GluN2C и GluN2D содержащих рецепторов облегчает суммацию постсинаптических токов, например, в мозжечке [39] и спинном мозге [40].

Уникальность дигетеромерных GluN1/GluN2A NMDA рецепторов состоит в быстрой деактивации, наиболее выраженной при кальций-зависимой, глицин-зависимой и глицин-независимой типах десенситизации среди всех подтипов NMDAR. Эти особенности определяют ключевое значение GluN1/GluN2A для процессов LTP [18]. При этом отклонения кинетики десенсити-



**Рис. 1.** Сравнение кинетики кальций-зависимой десенситизации рекомбинантных NMDAR различного субъединичного состава. *a* – Нормализованная по максимальной амплитуде форма входящих токов при активации NMDAR глутаматом с глицином при физиологических значениях внеклеточного кальция. *б* – Количественные параметры степени десенситизации (величина остаточного тока) [29], вероятности открытого состояния рецептора ( $P_{open}$ ) [4, 30, 31], постоянной времени деактивации ( $\tau$ ) [30, 33] и фракции кальциевого тока в общем токе через канал ( $C_{Ca}/C_{Na}$ ) [18, 35]

зации GluN1/GluN2A рецепторов в результате мутаций приводят к развитию разнообразных форм эпилепсии [41–43]. GluN1/GluN2B NMDA рецепторы менее подвержены кальций-зависимой десенситизации, чем GluN1/GluN2A, однако обладают высокой проводимостью для ионов натрия и кальция [28]. Это определяет вовлеченность GluN1/GluN2B в развитие феномена LTD [18], а также может способствовать кальциевой перегрузке нейронов при эксайтотоксическом стрессе.

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ Кальций-зависимой инактивации

Хорошо известно, что внутриклеточный кальций оказывает подавляющее действие на токи NMDAR [25, 27, 37, 44, 45]. В нейронах кальциевый вход через каналы NMDAR вызывает их кальциевую инактивацию более эффективно, чем кальциевый вход через потенциал-чувствительные кальциевые каналы (voltage gated calcium channels, VGCC) [25], что позволяет говорить о том, что сайт связывания кальция находится ближе к цитоплазматической части NMDAR.

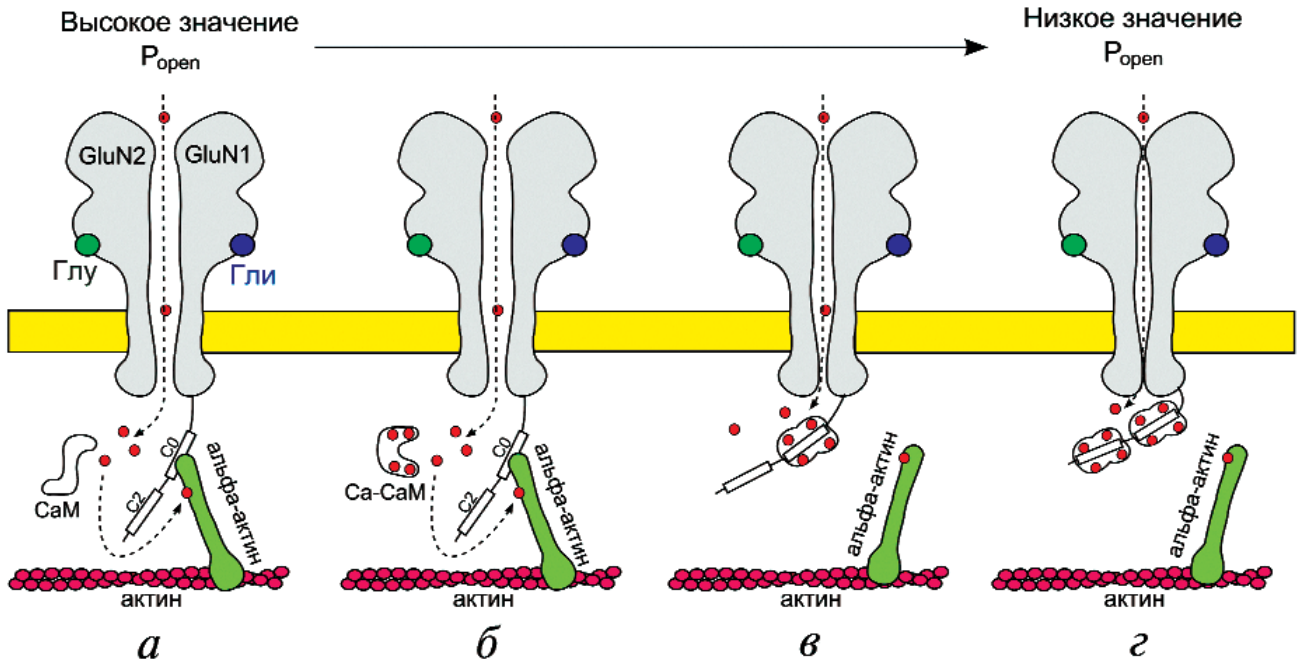
Универсальным внутриклеточным сенсором повышения свободного кальция в цитоплазме является многофункциональный кальций-связывающий белок кальмодулин-1 (CaM). CaM содержит четыре EF-hand мотива, соединенных петлями из 12 аминокислотных остатков. При повышении концентрации внутриклеточного свободного кальция до нижних значений микромолярного диапазона все четыре EF-hand связывают кальций, вызывая конформационные

изменения, делающие возможным связывание CaM с различными белками [46–48]. В отсутствие связанного кальция альфа спирали EF-hand находятся в «закрытой конформации» (параллельны). В присутствии кальция EF-hand находятся в «открытой конформации» (почти ортогональны) и могут схватывать белки-мишени.

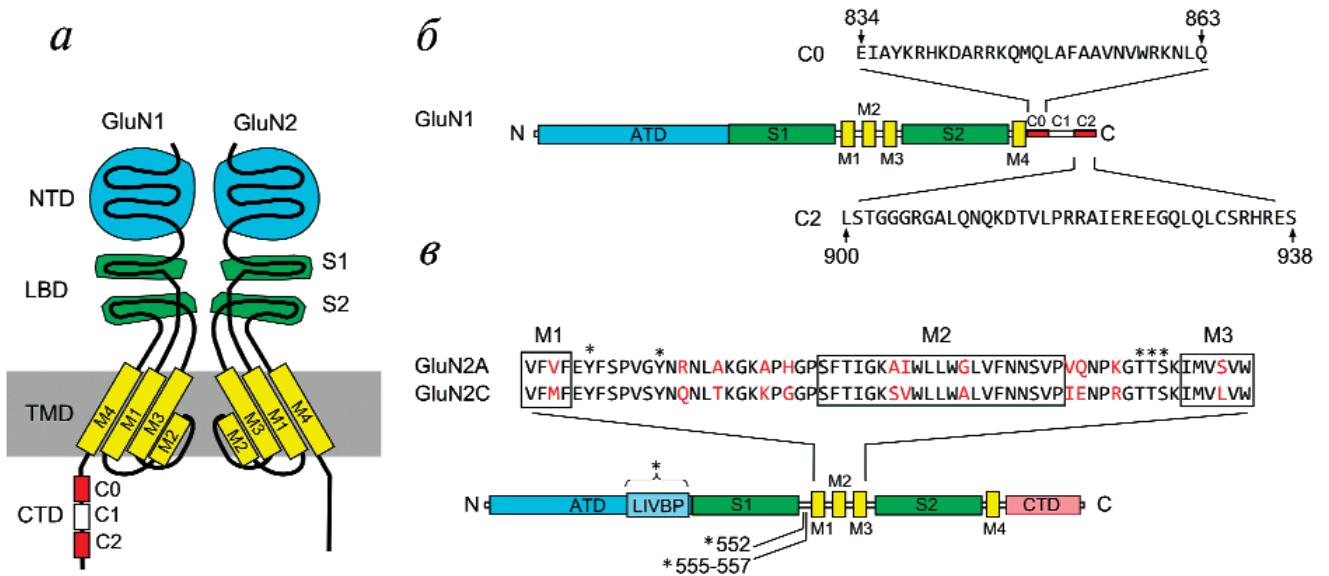
Ca-CaM связывается с внутриклеточным сайтом NMDAR, вызывает дозо-зависимую инактивацию последнего [49]. Ca-CaM связывается с двумя отдельными сайтами на C-конце GluN1 субъединицы. Результатом связывания Ca-CaM с NMDAR является снижение вероятности открывания канала и времени открытого состояния. Учитывая проницаемость NMDAR для кальция, вход последнего в клетку при открывании канала NMDAR глутаматом активирует CaM, делая возможным связывание Ca-CaM с двумя сайтами на C-конце GluN1 (рис. 2). Тем не менее конкретный механизм влияния такого связывания на открывание канала все еще неясен. Неизвестна также степень кооперативности между двумя сайтами связывания Ca-CaM.

Сходные по структуре сайты связывания Ca-CaM присутствуют и на других типах ионотропных рецепторов. Так, присоединение Ca-CaM в N-терминальном домене рецептора циклических нуклеотидов снижает активность катионного канала рецептора [50, 51]. VGCC также подвержены Ca-CaM-зависимой инактивации [52–54]. Вероятно, связывание кальмодулина является распространенным механизмом регуляции проницаемости ионных каналов.

Молекулярные детерминанты, определяющие кальций-зависимую десенситизацию NMDAR, приведены на рис. 3 [36, 55–58]. Связывающий



**Рис. 2.** Молекулярный механизм кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов. Влияние связывания GluN1 субъединицы с актином и кальмодулином на проводимость канала NMDAR. При активации рецептора глутаматом (Глу) и глицином (Гли) внутриклеточный домен исходно связан с альфа-актином (а), что сопровождается большей вероятностью открытого состояния рецептора ( $P_{open}$ ). Возрастание внутриклеточной концентрации кальция при возбуждении нейрона (б) вызывает отсоединение альфа-актина и присоединение кальмодулина (в), вызывающее снижение  $P_{open}$ , что отражает кальций-зависимую инактивацию NMDAR (г), наблюдаемую в виде снижения токов целой клетки и синаптических токов, что обеспечивает динамическую регуляцию активности NMDAR при синаптической передаче



**Рис. 3.** Структурные детерминанты GluN1 и GluN2 субъединиц, определяющие параметры кальций-зависимой десенситизации. а – Структура NMDA рецептора, состоящего из GluN1 и GluN2 субъединиц. б – Критически важные для развития десенситизации области C0 и C2 на C-конце GluN1, определяющие связывание актина (C0) и кальмодулина (C0, C2). в – Различия аминокислотной последовательности GluN2A и GluN2C субъединиц в промежутке между трансмембранными гидрофобными доменами M1 и M3. Аминокислотные замены в GluN2A в местах, обозначенных звездочкой, снижают кальций-зависимую десенситизацию рецептора [36, 55–58]. Обозначения: NTD – N-терминальный домен, LBD – лиганд-связывающий домен, включающий домены S1 и S2. TMD – трансмембранный домен, включающий домены M1–M4, CTD – C-терминальный домен. \* – обозначает аминокислотные остатки, замена которых приводит к исчезновению или значительному подавлению кальций-зависимой десенситизации

кальмодулин фрагмент из 37 аминокислотных остатков на С-конце GluN1 субъединицы NMDA рецепторов имеет существенное значение для регуляции функций канала. Этот фрагмент (область С1) (рис. 3, *a* и *b*) служит субстратом для фосфорилирования как протеинкиназой-С [59], так и протеинкиназой-А [60]. Домен С1 обеспечивает также агрегацию рецептора с цитоскелетом для формирования рецепторных кластеров [61]. Ehlers et al. [49, 62] идентифицировали два кальмодулин-связывающих региона на С-терминальном домене GluN1 (С0 и С2). При этом кальций-зависимая десенситизация NMDAR исчезает при делеции С-терминального домена GluN1 или при мутациях специфического кальмодулин-связывающего сайта в области С0. Введение в цитоплазму пептида, ингибитора кальмодулина, также снижает кальций-зависимую десенситизацию NMDAR [57].

Исследования Rosenmund и Westbrook [26] показали, что связь NMDAR с актиновым цитоскелетом может регулировать кальций-зависимую десенситизацию путем конкуренции кальций-связанного кальмодулина с элементами цитоскелета за сайт связывания в области С1. Кальций также может напрямую снижать аффинность альфа-актина к GluN1, путем взаимодействия EF-hands с кальций чувствительной формы альфа-актина [36, 63, 64] (рис. 2). Гиперэкспрессия альфа-актина снижает кальций-зависимую десенситизацию NMDAR. Это подтверждает конкуренцию кальмодулина с альфа-актином за сайт связывания на С-терминальном домене GluN1 после входа кальция в клетку [36, 57].

Таким образом, через GluN1 субъединицу, присутствующую во всех NMDAR, реализуется механизм кальций-зависимой десенситизации. Однако выраженность этого типа десенситизации в значительной степени зависит от подтипа GluN2 субъединицы (рис. 1). Были идентифицированы структурные детерминанты на N-конце GluN2C и GluN2D субъединиц [36, 65], которые определяют ничтожно малую кальций-зависимую десенситизацию последних [58, 66, 67] (рис. 3, *в*). Это аминокислотные остатки в позициях 555 и 556 между доменами S1 и M1 [64], а также фрагмент из 190 а.о. с гомологией к лейцин-изолейцин-валин связывающему белку (LIVBP) в домене S1 [4] (рис. 3, *a*). Обе структурные детерминанты оказывают кооперативный эффект на десенситизацию, т.к. удаление только одной из них не оказывает существенного эффекта. Интересно, что а.о. Ala-555 и Ser-556 важны для реализации десенситизации не только GluN2A содержащих NMDAR, но и определяют десенситизацию AMPA-рецепторов [68]. Замены аминокислот в 552 [55] и 557 [56] позициях (рис. 3, *a*) и

в промежутках между доменами M1/M2 и M2/M3 также модулируют кальций-зависимую десенситизацию [67].

### ПУТИ ВХОДА КАЛЬЦИЯ ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ ПРИМЕМБРАННУЮ ОБЛАСТЬ

Кальмодулин-зависимая инактивация канала NMDA рецепторов предоставляет отрицательную обратную связь для ограничения входа кальция в шипики при синаптической гиперактивации. Такое ограничение также, вероятно, защищает нейроны от эксайтотоксического стресса. Помимо NMDAR, синаптическая активность вызывает поступление кальция в цитоплазму через VGCC, кальций-проницаемые AMPAR и ряд других путей. Коэкспрессия в синапсе NMDAR и кальций-проницаемых AMPAR приводит к тому, что кальций, входящий через AMPAR при синаптической активации, усиливает кальций-зависимую десенситизацию NMDAR [69–71].

VGCC несколько уступают NMDAR по объему входящего в нейроны кальция при возбуждении. Однако VGCC также имеют внутриклеточный сайт связывания Ca-CaM, через который осуществляется их кальций-зависимая инактивация [52–54], что ограничивает потенциал-зависимый вход кальция в нейроны. TRPV1 широко экспрессированы в центральной нервной системе и также, как и NMDAR, вовлечены в реализацию LTD, в частности, в гиппокампе [72]. Будучи кальций-проницаемыми рецепторами TRPV1 также подвержены кальций-кальмодулин-зависимой десенситизации [73].

Помимо входа кальция через ионотропные рецепторы, синаптическая активность может мобилизовать выход кальция из внутриклеточных депо [74, 75]. Однако, выброс кальция из внутриклеточных депо не вносит существенного вклада в рост свободного внутриклеточного кальция при кратковременной аппликации глутамата [76].

### УДАЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ

Плазматическая мембрана содержит множество типов каналов, через которые ионы кальция могут проникать в цитоплазму по концентрационному градиенту. Способы поддержания кальциевого гомеостаза в различных отделах нейрона неодинаковы. Так в отростках большая часть кальция захватывается кальций-связывающими белками [77, 78] и удаляется из цитоп-

лазмы натрий-кальциевым обменником [77], в то время как в соме ведущую роль играет буферизация кальция во внутриклеточные депо [77]. Вероятно, это связано с тем, что дендриты, по сравнению с сомой, бедны внутриклеточными структурами, такими как митохондрии и эндоплазматический ретикулум.

Существует две системы активного удаления кальция из клетки. Это низкоафинный к кальцию натрий-кальциевый обменник (NCX) с высокой транспортной емкостью и высокоафинный к кальцию кальциевый насос (PMCA) — АТФаза с небольшой транспортной емкостью [79]. Соотношение NCX и PMCA в мембране существенно зависит от типа клетки. Афинность PMCA к кальцию ( $K_d$  составляет менее 0,5 мкМ) позволяет ей эффективно откачивать кальций из клетки даже в состоянии покоя, когда уровень свободного кальция в цитоплазме колеблется в диапазоне 0,05–0,1 мкМ. При этом низкая  $K_d$  PMCA (<1 мкМ) обеспечивается взаимодействием насоса с кальмодулином. PMCA, таким образом, поддерживает тонкую настройку уровня кальция.

NCX, напротив, требует для работы высокого уровня кальция для насыщения ( $K_d \sim 1\text{--}20$  мкМ) [79]. Несмотря на то, что транспортная емкость NCX велика (2000–5000 циклов/с), величина константы Михаэлиса ( $K_m(\text{Ca})$ ), измеренная для внутренней стороны мембраны значительно превышает 1 мкМ [80, 81]. Т.е. обменник не может понизить концентрацию кальция ниже  $K_m$ . Не исключено, что фосфорилирование NCX киназами или взаимодействие с другими факторами может снижать его  $K_m$ , но, наиболее вероятно, что концентрация свободного кальция, наблюдаемая в узкой примембранной области многократно превышает таковую для остальной цитоплазмы [79]. Процесс удаления кальция из примембранной области посредством NCX и PMCA должен, таким образом, ограничивать степень и продолжительность кальций-зависимой десенситизации NMDAR.

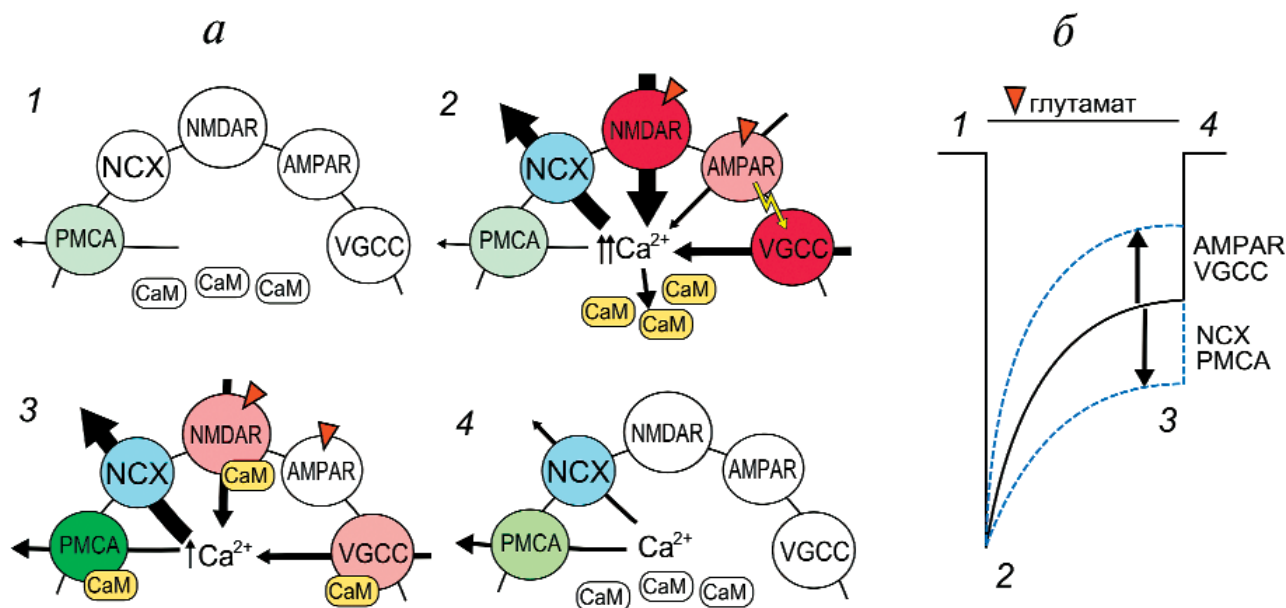
В присутствии внеклеточного кальция ингибирование NCX вызывает значительное усиление кальций-зависимой десенситизации NMDAR, выражающееся в падении токов в ответ на аппликацию NMDA [82]. Наблюдаемый в нейронах естественный уровень десенситизации NMDAR, при коротких аппликациях NMDA, ограничивается работой NCX. В свою очередь, блокирование обменника многократно усиливает кальций-кальмодулин-зависимую десенситизацию NMDAR [82]. Прямой режим работы NCX, таким образом, усиливает вход ионов через NMDAR, но, в силу высокой транспортной емкости обменника, ограничивает диффузию

кальция, вошедшего через NMDAR из примембранной области в другие части цитоплазмы. Градиент натрия, необходимый для работы NCX поддерживается Na/K-АТФазой, потенцирование которой субнанолярными концентрациями кардиотонического стероида убаина увеличивает эффективность работы NCX и удаление кальция из нейронов при длительном действии агонистов NMDAR [83] или AMPA-каинатных рецепторов [84].

В целом, уровень свободного внутриклеточного кальция в узкой примембранной области постсинапса контролируется функциональным взаимодействием NMDAR, AMPAR, VGCC и NCX (рис. 4). При этом вход кальция через NMDAR, кальций-проницаемые AMPAR и VGCC усиливают десенситизацию NMDAR, а удаление кальция NCX за счет градиента натрия, создаваемого Na/K-АТФазой, напротив, снижает десенситизацию NMDAR. Большое число участников в регуляции внутриклеточной концентрации кальция в постсинаптических зонах ставит вопрос об абсолютных значениях концентраций ионов, необходимых для кальций-зависимого функционального взаимодействия, а также о физическом размере компартментов, в которых они сосредоточены. Естественными структурными элементами, обеспечивающими тесные взаимодействия белковых молекул в мембране клетки, являются липидные микродомены (нанокластеры) или липидные плотиках.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ И ТРАНСПОРТЕРОВ В ЛИПИДНЫХ ПЛОТИКАХ

Было установлено, что агенты, взаимодействующие с холестерином плазматической мембраны, например, филиппин и метил-бета циклодекстрин, подавляют, вызываемый NMDA, вход кальция в нейроны [85] за счет 7× усиления десенситизации NMDA рецепторов и снижения токов целой клетки, вызываемых NMDA [86]. При этом поверхностная экспрессия, афинность к агонисту, проводимость канала и время открытого состояния NMDAR не страдают от экстракции мембранного холестерина [84]. В частности, в нейронах многие субъединицы GluN2B NMDA-рецептора ассоциированы с мембранными микродоменами и нерастворимы в Triton X-100. Разрушение липидных доменов путем экстракции холестерина переводит их в Triton X-100-растворимую фракцию [87]. Таким образом, NMDAR расположены в «липидных плотиках» богатых холестерином, а их динамические характеристики зависят от целостности липидных микродоменов.



**Рис. 4.** Схема кальций-зависимых локальных функциональных взаимодействий NMDA рецепторов с другими ионными каналами и транспортерами в пределах липидного микродомена. *a* – Схема взаимодействия NMDA рецепторов (NMDAR), AMPA рецепторов (AMPA), потенциал-зависимых кальциевых каналов (VGCC), натрий-кальциевого обменника (NCX) и кальциевого насоса (PMCA). В отсутствие активации рецепторов (1) PMCA поддерживает концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$  30–100 нМ. Активация NMDA и кальций-проницаемых AMPA рецепторов глутаматом (2) вызывает вход кальция и натрия, деполяризацию нейронов, активацию VGCC и дополнительный вход кальция. Кальмодулин связывает кальций с образованием Ca-CaM. Концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$  становится достаточной для связывания NCX. (3) AMPAR подвергаются лиганд-зависимой десенситизации. Ca-CaM вызывает десенситизацию NMDAR и VGCC, что ограничивает вход кальция. Достигается равновесие между входом и выведением кальция из клетки. (4) Деактивация NMDAR при удалении глутамата позволяет NCX вывести большую часть  $Ca^{2+}$ , а PMCA доводит концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$  до базового уровня. *б* – Снижение амплитуды тока через NMDA рецепторы в результате кальций-зависимой десенситизации усиливается при активации AMPAR и VGCC, но ослабляется в результате работы NCX и PMCA

Присутствие NMDA рецепторов в липидных нанодоменах было показано различными исследователями [88, 89]. Использование эффекта Ферстеровского переноса энергии (FRET) для выявления колокализованных флуоресцентных меток выявило ассоциацию NMDAR с L-VGCC содержащими липидными нанодоменами [90]. При этом расстояние от NMDAR до PMCA и NCX на несколько нанометров больше, чем от NMDAR до L-VGCC [91].

Липидные домены или плотки имеют динамически изменяющийся размер (10–200 нм) и содержат высокую концентрацию стерол- и сфинголипидов. Липидные плотки аккумулируют насыщенные жирные кислоты и окружены более жидкой фракцией ненасыщенных жирных кислот [92]. Сигнальные белки с афинностью к плоткам концентрируются в нанодоменах, что приводит к формированию белковых комплексов с особыми сигнальными путями [93]. Для формирования актин-зависимых липидных нанокластеров в мембране необходимы липиды с длинными насыщенными ацильными цепоч-

ками. Последние позволяют связать липиды внешнего слоя мембраны со сфинголипидами и ганглиозидами внутреннего слоя [94]. При этом холестерин стабилизирует жидкокристаллическую структуру кластеров и обеспечивает положительную обратную связь для вовлечения новых молекул в кластеры [95].

Аппроксимация токов нейронов, зарегистрированных в патч-кламп экспериментах, с использованием компьютерного моделирования диффузии ионов выявила, что кальмодулин чувствителен к кальцию, вошедшему через NMDAR, при условии их тесной пространственной колокализации в пределах десятков нанометров [96]. Моделирование показывает, что именно кинетика ассоциации кальмодулина с NMDAR точнее всего отражает параметры кальций-зависимой инактивации. Это может происходить только в случае близкой локализации молекулы CaM с C-терминальным концом GluN1 субъединиц NMDAR.

Кальциевые транспортеры плазматической мембраны, выбрасывающие кальций из цитозо-

ля, а именно, кальциевая АТФ-аза (PMCA) и натрий-кальциевые обменники также ассоциированы с мембранными доменами. Эти белки демонстрируют ко-иммунопреципитацию с кавеоллин-1 после обработки метил-бета-циклодекстрином (M $\beta$ CD), разрушающим липидные домены. Применение FRET указывает на их локализацию в доменах размером менее 200 нм с периферическим расположением PMCA и NCX [91].

Кальциевый вход через L-VGCC может создавать временные микромолярные локальные концентрации внутриклеточного кальция на расстоянии до 100 нм от канала, в зависимости от буферной кальциевой емкости микроокружения [97]. Это примерно соответствует размеру динамического липидного мембранного домена в 10–200 нм [92].

При этом L-VGCC, NMDAR колокализованы в богатых кавеоллин липидных доменах в пределах расстояния в 200 нм. На таком небольшом расстоянии активация, например, L-VGCC может временно повышать концентрацию свободного кальция вблизи NMDAR до 10–100 мкМ. При этом увеличение концентрации свободного кальция до 1 мМ может достигаться в пределах 100 нм от канала при низкой буферной емкости и в пределах 70–80 нм в присутствии 0,1 мМ кальциевого хелатора с  $K_d \sim 250$  нМ [90].

Различные дополнительные факторы могут контролировать ассоциацию аroCaM (кальмодулина не связанного с кальцием) с мишенями, например, в пределах дендритных шипиков высокие уровни кальций-связывающего белка нейрогранина (neurogranin) вызывают диссоциацию кальция от CaCaM, повышая фракцию аroCaM в микроокружении [98, 99].

Вероятно, сайты связывания аroCaM и CaCaM на NMDA рецепторе перекрываются [61], и нет селективности регуляции кальций-зависимой десенситизации относительно источника кальция. И действительно, кальций-зависимая десенситизация может развиваться в ответ на другие источники кальция [25, 97]. Однако согласно предлагаемой модели [96], при активации NMDAR все первичные каналы инактивируются, и дополнительный рост концентрации кальция из других источников вносит лишь минимальный вклад. Таким образом, первичная чувствительность рецептора к локальному кальцию доминирует, особенно в дендритных шипиках, где геометрия и буферное связывание кальция

исключают диффузию кальция на заметное расстояние от первичного источника.

В дендритах тормозных нейронов, не имеющих шипиков, кальций-связывающий белок парвальбумин ограничивает диффузию входящего через каналы кальция, что существенно ограничивает в пространстве постсинаптические кальциевые ответы [100]. Кальбиндин (calbindin-D28K) также связывает внутриклеточный кальций, однако является довольно «медленным» хелатором и по кинетике связывания ближе к EGTA. Таким образом, кальбиндин, вероятно, не влияет на кинетику кальциевого ответа, однако ограничивает предельное расстояние, на которое может диффундировать свободный кальций [101].

В отличие от AMPA рецепторов, присутствие которых может быстро меняться в результате интернализации, присутствие NMDAR в постсинаптической мембране довольно стабильно [66, 102]. Кальций-зависимая десенситизация NMDAR позволяет быстро изменять их вклад в синаптические процессы. Так в глутаматэргических синапсах вклад NMDA рецепторов в форму постсинаптических токов зависит, в частности, от входа кальция через кальций-проницаемые AMPA рецепторы и от кальциевой буферной емкости постсинаптической внутриклеточной среды. Системы удаления кальция из постсинапса или буферизация внутриклеточного кальция, напротив, увеличивают амплитуду и длительность NMDAR опосредованных постсинаптических токов [103]. Эффективность и быстродействие такого взаимодействия между NMDAR и другими модуляторами локального кальциевого гомеостаза определяется компартиментализацией ионных каналов, транспортеров и кальций-связывающих белков в липидных мембранных микродоменах. Нарушение структуры последних, при использовании статинов, может оказывать нейропротекторное действие при ишемии [102], однако нарушает NMDAR зависимые процессы синаптической пластичности при значительном снижении содержания холестерина в мембране [104].

#### Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pina-Crespo, J.C., and Gibb, A.J. (2002) Subtypes of NMDA receptors in new-born rat hippocampal granule cells, *J. Physiol.*, **541**, 41–64.
- Hansen, K.B., Ogden, K.K., Yuan, H., and Traynelis, S.F. (2014) Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors, *Neuron*, **81**, 1084–1096.
- Sibarov, D.A., Stepanenko, Y.D., Silantiev, I.V., Abushik, P.A., Karelina, T.V., and Antonov, S.M. (2018) Developmental changes of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor expression in rat cerebellar neurons *in vitro*, *J. Mol. Neurosci.*, **64**, 300–311.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 7–61.
- Glasgow, N.G., Sieglar Retchless, B., and Johnson, J.W. (2015) Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties, *J. Physiol.*, **593**, 83–95.
- Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes, *Science*, **241**, 835–837.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S.H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13409–13414.
- Patneau, D.K., and Mayer, M.L. (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors, *J. Neurosci.*, **10**, 2385–2399.
- Zarei, M.M., and Dani, J.A. (1994) Ionic permeability characteristics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel, *J. Gen. Physiol.*, **103**, 231–248.
- Bliss, T.V.P., and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361**, 31–39.
- Bear, M.F. (1995) Mechanism for a sliding synaptic modification threshold, *Neuron*, **15**, 1–4.
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory, *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 175–190.
- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999) Long-term potentiation – a decade of progress? *Science*, **285**, 1870–1874.
- Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches, *Neuron*, **44**, 5–21.
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2007) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms, *Neuropsychopharmacology*, **33**, 18–41.
- Dore, K., Aow, J., and Malinow, R. (2016) The emergence of NMDA receptor metabotropic function: insights from imaging, *Front. Synapt. Neurosci.*, **8**, 1–9.
- Choi, D.W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death, *Trends Neurosci.*, **18**, 58–60.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 383–400.
- Mayer, M.L., and Armstrong, N. (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 161–181.
- Mayer, M.L., Vyklícky, L., and Westbrook G.L. (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurons, *J. Physiol.*, **415**, 329–350.
- McBain, C.J., and Mayer, M.L. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function, *Physiol. Rev.*, **74**, 723–760.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., and Mishina, M. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel, *Nature*, **358**, 36–41.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., and Nakanishi, S. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits, *J. Biol. Chem.*, **268**, 2836–2843.
- Clark, G.D., Clifford, D.B., and Zorumski, C.F. (1990) The effect of agonist concentration, membrane voltage and calcium on N-methyl-D-aspartate receptor desensitization, *Neuroscience*, **39**, 787–797.
- Legendre, P., Rosenmund, C., and Westbrook, G.L. (1993) Inactivation of NMDA channels on hippocampal neurons by intracellular calcium, *J. Neurosci.*, **13**, 674–684.
- Rosenmund, C., and Westbrook, G.L. (1993) Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity, *Neuron*, **10**, 805–814.
- Vyklícky, L.J. (1993) Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurons, *J. Physiol. (London)*, **470**, 575–600.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function, *Pharm. Rev.*, **62**, 405–496.
- Hedegaard, M., Hansen, K.B., Andersen, K.T., Brauner-Osborne, H., and Traynelis, S.F. (2012) Molecular pharmacology of human NMDA receptors, *Neurochem. Int.*, **61**, 601–609.
- Dravid, S.M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., Almonte, A., Murray, E., Mosely, C., Barber, J., French, A., Balster, R., Murray, T.F., and Traynelis, S.F. (2007) Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block, *J. Physiol.*, **581**, 107–128.
- Wyllie, D.J., Behe, P., and Colquhoun, D. (1998) Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors, *J. Physiol.*, **510**, 1–18.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.A.H., Wolfe, B.B., and Grayson, D.R. (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors, *J. Neurophysiol.*, **79**, 555–566.
- Hansen, K.B., and Traynelis, S.F. (2011) Structural and mechanistic determinants of a novel site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors, *J. Neurosci.*, **31**, 3650–3661.
- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J.P., Gunther, W., Seeburg, P.H., and Sakmann, B. (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor, *Science*, **257**, 1415–1419.
- Pankratov, Y., and Lalo, U. (2014) Calcium permeability of ligand-gated Ca(2+) channels, *Eur. J. Pharmacol.*, **739C**, 60–73.
- Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (1999) Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of NMDA receptors, *J. Neurosci.*, **19**, 1165–1178.
- Medina, I., Filippova, N., Charton, G., Rougeole, S., Ben-Ari, Y., Khrestchatsky, M., and Bregestovski, P. (1995) Calcium-dependent inactivation of heteromeric NMDA receptor-channels expressed in human embryonic kidney cells, *J. Physiol.*, **482**, 567–573.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for

- neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 682–696.
39. Schwartz, E.J., Rothman, J.S., Dugue, G.P., Diana, M., Rousseau, C., Silver, R.A., and Dieudonne, S. (2012) NMDA receptors with incomplete Mg<sup>2+</sup> block enable low-frequency transmission through the cerebellar cortex, *J. Neurosci.*, **32**, 6878–6893.
  40. Hildebrand, M. E., Pitcher, G. M., Harding, E. K., Li, H., Beggs, S., and Salter, M. W. (2014) GluN2B and GluN2D NMDARs dominate synaptic responses in the adult spinal cord, *Sci. Rep.*, **4**, 4094.
  41. Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Lozovaya, N., Labalme, A., Boutry-Kryza, N., Salmi, M., Tsintsadze, T., Addis, L., Motte, J., Wright, S., Tsintsadze, V., Michel, A., Doummar, D., Lascelles, K., Strug, L., Waters, P., de Bellescize, J., Vrielynck, P., de Saint Martin, A., Ville, D., Ryvlin, P., Arzimanoglou, A., Hirsch, E., Vincent, A., Pal, D., Burnashev, N., Sanlaville, D., and Szepetowski, P. (2013) GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction, *Nat. Genet.*, **45**, 1061–1066.
  42. Burnashev, N., and Szepetowski, P. (2015) NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **20**, 73–82.
  43. Sibarov, D.A., Bruneau, N., Antonov, S.M., Szepetowski, P., Burnashev, N., and Giniatullin, R. (2017) Functional properties of human NMDA receptors associated with epilepsy-related mutations of GluN2A subunit, *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 155, doi:10.3389/fncel.2017.00155.
  44. Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1985) The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture, *J. Physiol.*, **361**, 65–90.
  45. Zorumski, C.F., Yang, J., and Fischbach, G.D. (1989) Calcium dependent, slow desensitization distinguishes different types of glutamate receptors, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **9**, 95–104.
  46. Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., and Cook, W.J. (1985) Three-dimensional structure of calmodulin, *Nature*, **315**, 37–40.
  47. Crivici, A., and Ikura, M. (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 85–116.
  48. Yap, K.L., Ames, J.B., Swindells, M.B., and Ikura, M. (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily, *Proteins*, **37**, 499–507.
  49. Ehlers, M.D., Zhang, S., Bernhardt, J.P., and Huganir, R.L. (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit, *Cell*, **84**, 745–755.
  50. Chen, T.Y., and Yau, K.W. (1994) Direct modulation by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons, *Nature*, **368**, 545–548.
  51. Liu, M., Chen, T.Y., Ahamed, B., Li, J., and Yau, K.W. (1994) Calcium calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel, *Science*, **266**, 1348–1354.
  52. Lee, A., Wong, S.T., Gallagher, D., Li, B., Storm, D.R., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels, *Nature*, **399**, 155–159.
  53. Peterson, B.Z., Lee, J.S., Mulle, J.G., Wang, Y., de Leon, M., and Yue, D.T. (2000) Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels, *Biophys. J.*, **78**, 1906–1920.
  54. Zrhlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W., and Reuter, H. (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels, *Nature*, **399**, 159–162.
  55. Thomas, C.G., Krupp, J.J., Bagley, E.E., Bauzon, R., Heinemann, S.F., Vissel, B., and Westbrook, G.L. (2006) Probing N-methyl-D-aspartate receptor desensitization with the substituted-cysteine accessibility method, *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1296–1303.
  56. Ogden, K.K., Chen, W., Swanger, S.A., McDaniel, M.J., Fan, L.Z., Hu, C., Tankovic, A., Kusumoto, H., Kosobucki, G.J., Schulien, A.J., Su, Z., Pecha, J., Bhattacharya, S., Petrovski, S., Cohen, A.E., Aizenman, E., Traynelis, S.F., and Yuan, H. (2017) Molecular mechanism of disease-associated mutations in the pre-M1 helix of NMDA receptors and potential rescue pharmacology, *PLoS Genetics*, **13**, e1006536.
  57. Zhang, S., Ehlers, M.D., Bernhardt, J.P., Su, C.T., and Huganir, R.L. (1998) Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors, *Neuron*, **21**, 443–453.
  58. Vissel, B., Krupp, J.J., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (2002) Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors, *Mol. Pharmacol.*, **61**, 595–605.
  59. Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K., and Huganir, R.L. (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain, *Nature*, **364**, 70–73.
  60. Raymond, L.A., Tingley, W.G., Blackstone, C.D., Roche, K.W., and Huganir, R.L. (1994) Glutamate receptor modulation by protein phosphorylation, *J. Physiol. Paris*, **88**, 181–192.
  61. Ehlers, M.D., Tingley, W.G., and Huganir, R.L. (1995) Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor, *Science*, **269**, 1734–1737.
  62. Ehlers, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J., and Huganir, R.L. (1998) Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments, *J. Neurosci.*, **18**, 720–730.
  63. Wyszynski, M., Kharazia, V., Shangvi, R., Rao, A., Beggs, A.H., Craig, A.M., Weinberg, R., and Sheng, M. (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain, *J. Neurosci.*, **18**, 1383–1392.
  64. Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., and Craig, A.M. (1998) Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors, *J. Neurosci.*, **18**, 2423–2436.
  65. Villarreal, A., Regalado, M.P., and Lerma, J. (1998) Glycine-independent NMDA receptor desensitization: localization of structural determinants, *Neuron*, **20**, 329–339.
  66. Krupp, J.J., Vissel, B., Heinemann, S.F., and Westbrook, G.L. (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific, *Mol. Pharmacol.*, **50**, 1680–1688.
  67. Wyllie, D.J., Behe, P., and Colquhoun, D. (1998) Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors, *J. Physiol. (London)*, **510**, 1–18.
  68. Stern-Bach, Y., Russo, S., Neuman, M., and Rosenmund, C. (1998) A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors, *Neuron*, **21**, 907–918.
  69. Rozov, A., and Burnashev, N. (2016) Fast interaction between AMPA and NMDA receptors by intracellular calcium, *Cell Calcium*, **60**, 407–414.
  70. Rycroft, B.K., and Gibb, A.J. (2004) Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells, *J. Physiol.*, **557**, 795–808.
  71. Medina, I., Filippova, N., Barbin, G., Ben-Ari, Y., and Bregestovski, P. (1994) Kainate-induced inactivation of NMDA currents via an elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in hippocampal neurons, *J. Neurophysiol.*, **72**, 456–465.

72. Gibson, H.E., Edwards, J.G., Page, R.S., Van Hook, M.J., and Kauer, J.A. (2008) TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons, *Neuron*, **57**, 746–759.
73. Vyklicky, L., Novakova-Tousova, K., Benedikt, J., Samad, A., Touska, F., and Vlachova, V. (2008) Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin, *Physiol. Res.*, **57** Suppl. 3, S59–68.
74. Emptage, N., Bliss, T.V., and Fine, A. (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines, *Neuron*, **22**, 115–124.
75. Kapur, A., Yeckel, M., and Johnston, D. (2001) Hippocampal mossy fiber activity evokes  $\text{Ca}^{2+}$  release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway, *Neuroscience*, **107**, 59–69.
76. Goldberg, J. H., Yuste, R., and Tamas, G. (2003)  $\text{Ca}^{2+}$  imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: contribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA and NMDA receptors to subthreshold  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, *J. Physiol.*, **551**, 67–78.
77. Kim, M.-H., Lee, S.-H., Park, K. H., Ho, W.-K., and Lee, S.-H. (2003) Distribution of  $\text{K}^+$ -dependent  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers in the rat supraoptic magnocellular neuron is polarized to axon terminals, *J. Neurosci.*, **23**, 11673–11680.
78. Komori, Y., Tanaka, M., Kuba, M., Ishii, M., Abe, M., Kitamura, N., Verkhatsky, A., Shibuya, I., and Dayanithi, G. (2010)  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis,  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and somatodendritic vasopressin release in adult rat supraoptic nucleus neurones, *Cell Calcium*, **48**, 324–332.
79. Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 107–260.
80. Hilgemann, D.W. (1990) Regulation and deregulation of cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches, *Nature*, **344**, 242–245.
81. Hilgemann, D.W., Nicoll, D.A., and Philipson, K.D. (1991) Charge movement during  $\text{Na}^+$  translocation by native and cloned cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, *Nature*, **352**, 715–718.
82. Sibarov, D.A., Abushik, P.A., Poguzhelskaya, E.E., Bolshakov, K.V., and Antonov, S.M. (2015) Inhibition of plasma membrane  $\text{Na}/\text{Ca}$ -exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in  $\text{Ca}$ -dependent NMDAR inactivation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **355**, 484–495.
83. Sibarov, D.A., Bolshakov, A.E., Abushik, P.A., Krivoi, I.I., and Antonov, S.M. (2012)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase functionally interacts with the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger to prevent  $\text{Ca}^{2+}$  overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **343**, 596–607.
84. Abushik, P.A., Sibarov, D.A., Eaton, M.J., Skatchkov, S.N., and Antonov, S.M. (2013) Kainate-induced calcium overload of cortical neurons in vitro: dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain, *Cell Calcium*, **54**, 95–104.
85. Frank, C., Giammarioli, A.M., Peponi, R., Fiorentini, C., and Rufini, S. (2004) Cholesterol perturbing agents inhibit NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture, *FEBS Lett.*, **566**, 25–29.
86. Korinek, M., Vyklicky, V., Borovska, J., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Krausova, B., Krusek, J., Balik, A., Smejkalova, T., Horak, M., and Vyklicky, L. (2015) Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors, *J. Physiol.*, **593**, 2279–2293.
87. Abulrob, A., Tauskela, J.S., Mealing, G., Brunette, E., Faid, K., and Stanimirovic, D. (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution, *J. Neurochem.*, **92**, 1477–1486.
88. Besshoh, S., Chen, S., Brown, I.R., and Gurd, J.W. (2007) Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1876–1883.
89. Delinte-Ramirez, I., Salcedo-Tello, P., and Bermudez-Rattoni, F. (2008) Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts, *J. Neurochem.*, **106**, 1658–1668.
90. Marques-da-Silva, D., and Gutierrez-Merino, C. (2012) L-type voltage-operated calcium channels, N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase form a calcium/redox nano-transducer within lipid rafts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **420**, 257–262.
91. Marques-da-Silva, D., and Gutierrez-Merino, C. (2014) Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling, *Cell Calcium*, **56**, 108–123.
92. Pike, L.J. (2006) Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function, *J. Lipid Res.*, **47**, 1597–1598.
93. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6460–6464.
94. Wolf, A.A., Jobling, M.G., Wimer-Mackin, S., Ferguson-Maltzman, M., Madara, J.L., Holmes, R.K., Lencer, W.I., Ruston, S., Madara, J.L., and Hirst, T. (1998) Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia, *J. Cell Biol.*, **141**, 917–927.
95. Raghupathy, R., Anilkumar, A.A., Polley, A., Singh, P.P., Yadav, M., Johnson, C., Suryawanshi, S., Saikam, V., Sawant, S.D., Panda, A., Guo, Z., Vishwakarma, R.A., Rao, M., and Mayor, S. (2015) Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins, *Cell*, **161**, 581–594.
96. Iacobucci, G.J., and Popescu, G.K. (2017) Resident calmodulin primes NMDA receptors for  $\text{Ca}$ -dependent inactivation, *Biophys. J.*, **113**, 2236–2248.
97. Parekh, A.B. (2008)  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains near plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels: impact on cell function, *J. Physiol.*, **586**, 3043–3054.
98. Petersen, A., and Gerges, N.Z. (2015) Neurogranin regulates  $\text{CaM}$  dynamics at dendritic spines, *Sci. Rep.*, **5**, 11135.
99. Hoffman, L., Chandrasekar, A., Wang, X., Putkey, J.A., and Waxham, M.N. (2014) Neurogranin alters the structure and calcium binding properties of calmodulin, *J. Biol. Chem.*, **289**, 14644–14655.
100. Goldberg, J. H., Tamas, G., Aronov, D., and Yuste, R. (2003) Calcium microdomains in aspiny dendrites, *Neuron*, **40**, 807–821.
101. Chard, P.S., Jordan, J., Marcuccilli, C.J., Miller, R.J., Leiden, J.M., Roos, R.P., and Ghadge, G.D. (1995) Regulation of excitatory transmission at hippocampal synapses by calbindin D28k, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 5144–5148.
102. Ponce, J., de la Ossa, N. P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J. F., Davalos, A., and Gasull, T. (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection, *Stroke*, **39**, 1269–1275.
103. Valiullina, F., Zakharova, Y., Mukhtarov, M., Draguhn, A., Burnashev, N., and Rozov, A. (2016) The relative contribution of NMDARs to excitatory postsynaptic currents is controlled by  $\text{Ca}^{2+}$ -induced inactivation, *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, doi: 10.3389/fncel.2016.00012.
104. Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., and D'Arcangelo, G. (2008) Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus, *Exp. Neurol.*, **212**, 407–414.

**CALCIUM-DEPENDENT DESENSITIZATION  
OF NMDA RECEPTORS****D. A. Sibarov and S. M. Antonov**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia;  
E-mail: dsibarov@gmail.com*

Received April 4, 2018

Revision received June 4, 2018

Glutamate receptors play the key role in excitatory synaptic transmission in central nervous system (CNS). N-methyl-D-aspartate-activated glutamate receptor subtype (NMDAR) is permeable to sodium and calcium and is expressed in pre- and post-synapse as well as in extrasynaptic area of neuronal membrane. Calcium entry into dendritic spines is critically important for long-term potentiation and long-term depression of synaptic transmission. These events are thought to represent morpho-functional changes of memory formation. NMDARs dysfunction is involved in epilepsy, schizophrenia, migraine, dementia and other neurodegenerative diseases. Prolonged activation of extrasynaptic NMDARs causes neuronal calcium overload and apoptosis. Here we review the contemporary findings concerning the molecular mechanisms of NMDARs calcium-dependent desensitization, which allows fast modulation of these receptors in CNS and limits calcium entry into cell in pathological conditions. Here we present the data on molecular NMDAR determinants related to calcium-dependent desensitization as well as new data on local functional interaction of NMDARs with other ion channels and transporters. We also describe association of NMDARs with membrane lipid microdomains.

**Keywords:** NMDA receptors, desensitization, calcium, sodium-calcium exchanger, lipid rafts, microdomains