

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В. ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

ПОЗДНЯКОВА Наталія Георгіївна

***Механізм секретогенної дії
 α -латротоксина***

03.00.04 - Біохімія

**А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ - 1996

377.1
Дисертацією є рукопис.

Ab. 36.213

Робота виконана у відділі біохімії ЛННБ України ім.В.Стефаника
ім. О.В.Палладіна Національного наукового центру "Інститут біологічних наук"



00757178 (Z)

Науковий керівник -

Гімбельрейх Н.Г.

Офіційні опоненти - доктор медичних наук,
професор Скібо Г.Г.

доктор біологічних наук
Пархоменко Ю.М.

Провідна установа - Інститут фармакології та токсикології
АМН України.

Захист відбудеться "23" грудня 1996 р.

о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України
(252601, Київ-30, вул.Леонтовича,9)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії НАН України.

Автореферат розісланий "22" листопада 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О.В.Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Останнім часом механізм одного з найважливіших біологічних процесів - процесу нейросекреції є предметом особливої уваги в ряді лабораторій. Нейротоксини виявились найкориснішими інструментами його дослідження. Їх використання дозволило досягнути значного прогресу в цій галузі.

Пресинаптичний нейротоксин з отрути каракурта (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*) - α -латротоксин (LTX) взаємодіє з усіма типами синапсів хребетних та активує масивний викид нейромедіаторів. Відомо також, що він значно змінює кальцієву проникність пресинаптичної мембрани, але водночас його секретогенна активність може спостерігатися як в кальцієвому, так і в безкальцієвому середовищі (Baba A. et al., 1977, 1980; Gorio A. et al., 1978; Grasso A. et al., 1976-1980; Meldolesi J. et al., 1984; Nicholls R. et al., 1982). Тож цей токсин є унікальним інструментом дослідження процесу нейросекреції.

На теперішній час існують дві найбільш поширені гіпотези щодо механізму дії латротоксина (Petrenko A. et al., 1993). Перша гіпотеза передбачає кальцій-залежний механізм, який базується на іонофорних властивостях токсина. Специфічні рецептори пресинаптичної мембрани зв'язують LTX, після чого відбувається вбудовування токсина в плазматичну мембрану і формування ним іонних каналів. Зміна кальцієвої проникності плазматичної мембрани призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальція, яка і активує нейросекрецію. Альтернативна гіпотеза передбачає, що зв'язування LTX з його рецептором активує сам рецептор, внаслідок чого відбувається Ca^{2+} -незалежне вивільнення нейромедіатора. Але жодна з гіпотез не вирішує питання щодо зв'язку секретогенної дії

токсина з актом формування ним в мембрані іонного каналу.

В реалізації процесу нейросекреції, а саме його першого етапу - перерозподілу пулу синаптичних везикул за рахунок транспорту їх до активної зони пресинаптичної мембрани, критична роль належить периферичним мембранним білкам везикул - синапсинам, а саме синапсину I (Bahler M., Greengard P., 1987; Greengard P. et al., 1993). Певну роль в подальших етапах процесу екзоцитозу нейромедіаторів відіграють і інші білки, в тому числі синаптоагмін та динамін. Велику цікавість викликає той факт, що синаптоагмін виявився єдиним білком нервових закінчень, який специфічно взаємодіє з рецептором LTX (Petrenko A. et al., 1991; Surcova I., Grishin E., 1991; Nata Y. et al., 1993).

Основна мета роботи полягає в вивченні механізму токсичної дії латротоксину, при цьому особлива увага приділяється принциповому питанню щодо взаємозв'язку двох ефектів латротоксину - іонофорного та секретогенного, а також впливу токсина на процес фосфорилування/дефосфорилування синаптосомальних білків, процес, який має вирішальне значення в реалізації екзоцитозу в нервовій клітині. Відповідно до цього були поставлені такі **задачі**:

1. Дослідити роль низькомолекулярного компонента латротоксина в формуванні іонного каналу.
2. Вивчити натрієву проникність каналів, сформованих LTX та дослідити роль натрію в реалізації секретогенної дії латротоксину.
3. Дослідити спряженість іонофорної та секретогенної функцій латротоксину за допомогою моноклональних антитіл до LTX.
4. Дослідити вплив латротоксину на фосфорилування синаптосомальних білків.

Наукова новизна. 1. Показано, що низькомолекулярний пептид, присутній в високоочищених препаратах латротоксина, не приймає участі у формуванні токсином кальцієвого каналу в плазматичній мембрані нервових закінчень.

2. Виявлено, що секретогенна дія LTX не обумовлена змінами в натрієвому градієнті і не потребує змін в концентрації двовалентних катіонів в цитозолі нервових закінчень.

3. Вперше показано, що здатність токсина стимулювати вивільнення нейромедіатора не пов'язана і не залежить від формування токсином іонного каналу в пресинаптичній мембрані.

4. Вперше показано, що фосфорилування синапсину I може відбуватися за умов, коли рівень цитоплазматичного кальція не змінюється.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримана інформація щодо механізму нейросекреторної дії α -латротоксина має, поперед всього, фундаментальний інтерес, оскільки дозволяє суттєво розвинути уяву про механізми секреції нейромедіаторів.

Результати проведеної роботи можуть бути використані для вивчення механізму процесу нейросекреції, а також для створення фармакологічних препаратів, які специфічно впливають на процес передачі нервового імпульсу.

Основні положення, що вносяться на захист:

1. Активація нейросекреції α -латротоксином може відбуватися без зміни іонних градієнтів на плазматичній мембрані синапсом.

2. Іонофорна функція токсину не є спряженою з секретогенною.

3. Незалежно від рівня кальція в нервовому закінченні вивільнення нейромедіатора під впливом LTX супроводжується фосфорилуванням білку синапсину I.

Апробація роботи. Основні результати дисертації доповідалися на Міжнародній конференції "Механізми кальцієвого гомеостазу збудливих клітин" (Київ, 1993), на Міжнародному симпозіумі "Фізіологічні та біохімічні основи діяльності мозку" (Санкт-Петербург, 1994), на 23-му конгресі федерації Європейських біохімічних товариств (Базель, 1995) та наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 137 сторінках друкованого тексту. Робота складається із вступу, огляду літератури, результатів досліджень, обговорення результатів, висновків, списку літератури з 186 найменувань, 17 рисунків, 2 таблиць.

Особистий внесок автора полягає у виконанні експериментальної частини роботи, підборі та обробці літературних даних. Аналіз та обговорення проведено спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовані за безпосередньою участю автора.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

В експериментах були використані самці щурів масою 150г. У декапітованих тварин брали великі півкулі головного мозку та виділяли синаптосоми диференціальним центрифугуванням та центрифугуванням в градієнті концентрацій фіколла за методом Котмана (Cotman C., 1974). Синаптосоми ресуспендували у стандартному сольовому середовищі, яке містило : 126mM NaCl, 5mM KCl, 1.4mM MgCl₂, 1.0mM CaCl₂, 1.0mM NaH₂PO₄, 20mM HEPES-NaOH pH 7.4, 10mM d-глюкози. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі (Lowry O. et al., 1951) в модифікації Ларсона (Larson E., 1986).

α -Латротоксин із отрути каракурта виділяли фракціонуванням на хроматографі FPLC ("Pharmacia", Швеція) на колонці Mono Q.

Після рехроматографії, за даними імуноелектрофореза та електрофореза в ПААГ, був одержаний білок з М.м.130кДа (Гиммельрейх Н.Г. і др., 1987) Низькомолекулярну фракцію отрути каракурта одержували при гелі-фільтрації отрути на Sephacryl S-300 (Ушкарєв Ю., 1986).

Визначення кальцієвої проникності синапсом проводили в експериментах із застосуванням $^{45}\text{Ca}^{2+}$, використовуючи техніку іонообмінної хроматографії на мікроколонках з КМ-сефадексом С-50, або за допомогою флуоресцентного кальцієвого зонда фюра-2 (Brethes D., 1987). Вимірювання флуоресценції проводили на спектрофлуориметрі "Hitachi 650S" в термостатованій кюветі при 37°C і постійному перемішуванні. Довжина хвилі збудження та емісії була 340 і 490 нм відповідно.

Натрієву проникність синапсом визначали за допомогою $^{22}\text{Na}^{+}$. В експериментах по вивченню вивільнення [^{14}C]-ГАМК використовували фільтри GF/C (Англія)

Для фосфорилування білків синапсом використовували $^{32}\text{P}_i$ (0.5-1.0 мкі/1мл). Фосфорильовані білки піддавали електрофорезу в присутності SDS в 10% ПААГ за методом Леммлі (Laemmli U., 1970). Кількісно рівень фосфорилування визначали за радіоактивністю геля. Гель розрізали на фрагменти довжиною 2мм, керуючись радіоавтографами, та вимірювали радіоактивність в сцинтиляційній рідині ЖС-103 в лічильнику Delta 300 ("Tracor Analytic", USA).

Статистична обробка даних проводилась загальноприйнятими методами варіаційної статистики (Плохинский Д., 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Дослідження функціональної ролі фрагменту LTx з молекулярною масою 8 кДа.

В вивченні механізму токсичної дії латротоксину принципове

значення має з'ясування питання щодо взаємозв'язку двох ефектів латротоксину - іонофорного та секретогенного. Чи ці ефекти являють собою єдиний ланцюг подій при активації токсином процесу нейросекреції і вони є взаємозалежними в тому сенсі, що реалізація одного обов'язкова для реалізації іншого, чи кожен з них може мати місце незалежно від іншого?

Щоб відповісти на це питання, перш за все, необхідно було мати остаточну уяву щодо того, пов'язані ці два ефекти латротоксину виключно з молекулою токсину, чи в реалізації іонофорного ефекту належить певна роль низькомолекулярному пептиду (LMWP), який є неодмінним компонентом препаратів токсину незалежно від методу його одержання і специфічно взаємодіє з LTX (Kiyatkin N. et al., 1990, 1992, 1995; Volkova T. et al., 1995).

В наших дослідженнях функціональної ролі низькомолекулярного пептиду (LMWP) були застосовані поліклональні антитіла проти синтетичного пептиду, який мав структуру С-кінцевого фрагменту LMWP. Цей методичний підхід дав нам змогу оцінити, яким чином модифікація структури низькомолекулярного фрагменту впливає на дію LTX. Як джерело для виділення гомогенного LMWP була використана низькомолекулярна фракція отрути (LMWF; м.м. 5-10 кДа), яку одержували методами гель-фільтрації.

Одержані в цих експериментах результати показали, що очищений низькомолекулярний пептид не виявляє ефектів, властивих для LTX.

Але, якщо в експериментах використовували фракцію латротоксину, збагачену низькомолекулярним пептидом, то модифікація пептиду антитілами до синтетичного пептиду, який відповідає С-кінцевому фрагменту, викликає пригнічення здатності фракції стимулювати вхід кальцію в синапсоми (рис.1). Але поряд з цим спостері-

гається значне підсилення секретогенної дії фракції (рис.2).

Ми не мали змоги дослідити функціональну активність LTX, вільного від LMWP, тому, що виділити очищені препарати цих двох компонентів можливо лише за умов денатурації LTX. Але і ті дані, що ми одержали, свідчать на користь думки, що і іонофорний, і секретогенний ефекти - це прояви дії виключно молекули LTX. Можливо модифікація низькомолекулярного пептиду антитілами спричиняє певні зміни в конформаційному стані молекули латротоксину. Сам низькомолекулярний пептид не має каналоформерної властивості.

2. Вивільнення $[^{14}\text{C}]-\text{ГАМК}$ під впливом латротоксину

може відбуватися у вільному від Ca^{2+} та Na^+ середовищі.

Відомо, що не тільки кальцій, але і інші двовалентні катіони можуть транспортуватись до нервового закінчення по каналам, утвореним LTX, та підтримувати секретогенний ефект токсина в клітинах за умов відсутності кальція у середовищі (Misler S., Hurlbut W., 1979; Meldolesi J. et al., 1983; Липко В. и др., 1990). Деякі автори припускають, що індукція токсином секреції нейромедіаторних амінокислот може відбуватися або за рахунок зміни натрієвої проникності пресинаптичної мембрани, що веде до зміни натрієвого градієнту і обернення роботи натрієвого переносника медіаторних амінокислот, або в результаті неспецифічного витікання медіатора крізь мембранні пори, які формує LTX. (Deri Z. et al., 1993; McMahon H. et al., 1990).

Для вивчення можливості участі іонів натрія в процесі нейросекреції, який активує LTX, були проведені дослідження впливу токсина на натрієву проникність пресинаптичної мембрани та ролі іонів натрія у стимуляції токсином вивільненні $[^{14}\text{C}]-\text{ГАМК}$.

В дослідженні натрієвої проникності синапсом був використаний $^{22}\text{Na}^+$. Експерименти проводились як у середовищі з Ca^{2+} , так

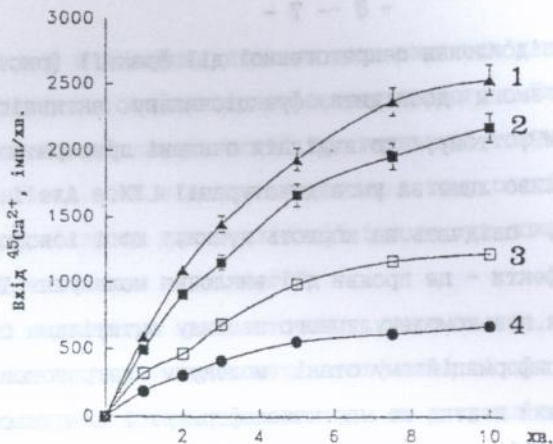


Рис.1 Вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синаптосоми під впливом LTX та низькомолекулярної фракції отрути.

- 1 - LTX (1.5мкг/мл);
- 2 - низькомолекулярна фракція отрути (40мкг/мл);
- 3 - низькомолекулярна фракція отрути, модифікована поліклональними антитілами проти С-кінцевого фрагмента LMW (молярне співвідношення 1:2);
- 4 - контроль.

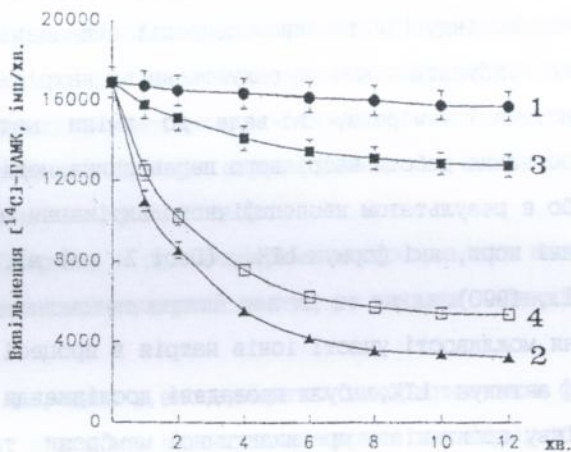


Рис.2 Вивільнення ^{14}C -ГАМК з синаптосом під впливом LTX та низькомолекулярної фракції отрути:

- 1 - контроль;
- 2 - LTX (0.4мкг/мл);
- 3 - низькомолекулярна фракція отрути (4мкг/мл);
- 4 - низькомолекулярна фракція отрути, модифікована поліклональними антитілами проти С-кінцевого фрагмента LMW (молярне співвідношення 1:2).

і у вільному від Ca^{2+} середовищі з 0.1мМ EGTA. Як показано на рис.3, навіть у присутності великої концентрації LTX (15нМ) швидкість потоку $^{22}\text{Na}^+$ не зростає. Аналогічні результати були одержані як в присутності, так і у відсутності кальція в середовищі.

Вивільнення [^{14}C]-ГАМК з синапсом головного мозку щурів досліджувалось: 1) в стандартному сольовому середовищі; 2) в такому ж середовищі, де немає Ca^{2+} , але доданий EGTA; 3) у вільному від Na^+ середовищі, де замість іонів натрія додана еквімолярна концентрація холін-хлориду; 4) в безкальцієвому середовищі з холін-хлоридом.

Виявилось, що LTX може викликати вивільнення [^{14}C]-ГАМК з синапсом, а кількість вивільненого нейромедіатора за 10 хвилин однакова в усіх експериментальних умовах (рис.4). Вартий уваги той факт, що відсутність Ca^{2+} та Na^+ в середовищі не вносить змін в контрольне вивільнення медіатора. Крім того, наші експерименти виявили, що процес екзоцитозу може відбуватися навіть за умов, коли обидва бівалентні катіони - Ca^{2+} та Mg^{2+} , не присутні у вільному від натрія середовищі.

Таким чином, одержані дані свідчили, що секретогенна дія LTX не обумовлена змінами в натрієвому градієнті і не потребує змін в концентрації двовалентних катіонів в цитозолі. Вірогідним є припущення, що взаємодія LTX з мембранним рецептором призводить до формування мультимерного білкового комплексу, адатного до ініціації нейросекреторного процесу.

3. Моноклональні антитіла - інструмент дослідження

взаємозв'язку основних токсичних ефектів латротоксину.

У вирішенні питання щодо взаємозв'язку каналоформерної і нейросекреторної функцій латротоксину необхідно розрізняти два фактори - сам процес каналоутворення і спричинена цим каналом

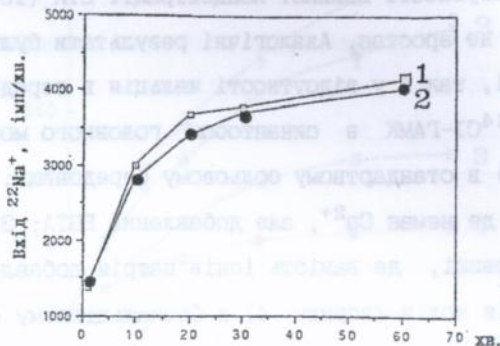


Рис. 3 Вхід $^{22}\text{Na}^+$ в синаптосоми під впливом LTX.

Вхід визначали при кімнатній температурі, LTX вносили до кінцевої концентрації 15 нМ одночасно з $^{22}\text{Na}^+$
 1 - контроль;
 2 - LTX.

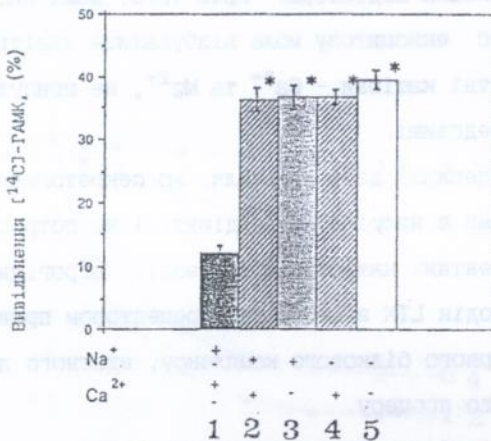


Рис. 4 Вивільнення $[^{14}\text{C}]$ -ГАМК з синаптосом мозку шурів під впливом LTX аз 10 хвилин.

1 - контроль;

2,3,4,5 - LTX (5 нМ)

"+" чи "-" вказує на наявність Ca^{2+} та Na^+ в середовищі інкубації.

* - $P < 0.05$

зміна мембранної проникності. Якщо попередні результати дали підставу для висновку, що стимулююча секреція дія токсина не є результатом зміни іонної проникності мембрани, то роль наявності структури каналу в мембрані не була ясна.

З метою вирішення цього питання були проведені дослідження по модифікації молекули LTX моноклональними антитілами (мАТ). Встановлення зв'язку між ділянками пізнавання антитіл та функціональними ефектами відкривало також можливість вивчення структурно-функціональних зв'язків в молекулі латротоксина. Ці дослідження були проведені з науковцями з Інституту біоорганічної хімії ім. М.М.Шемякіна та Ю.А.Овчинникова РАН. Керівником цих досліджень в Інституті біоорганічної хімії ім. М.М.Шемякіна та Ю.А.Овчинникова РАН був д.х.н. Є.В.Грішин.

В результаті проведення декількох незалежних гібридизацій спленоцитів імунних тварин з мієломними клітинами була одержана панель моноклональних антитіл проти латротоксину. Основні характеристики використаних нами 5 моноклональних антитіл подані в таблиці 1. Всі ці антитіла взаємодіяли з нативним латротоксином в розчині, але не змінювали його афінності до мембранного акцептора. Експериментально були підібрані умови, за яких досягалася оптимальна взаємодія LTX та моноклональних антитіл.

Модифікація LTX антитілами впливала по-різному на каналоформуючу і секретогенну функції LTX в синапсомах. При дослідженні адатності LTX підвищувати проникність синапсом для $^{45}\text{Ca}^{2+}$ було виявлено, що мАТ А4, А6 і А24 повністю нейтралізують каналоформерний ефект LTX. Латротоксин, модифікований мАТ А15 і А19, стимулював вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсоми з такою ж самою швидкістю, як і нативний токсин (рис.5).

Основні характеристики антитіл до латротоксина

МАТ	Клас	Зв'язування з нативним LTX в середовищі інкубації	Афінність до нативного LTX K _d (нМ)	Афінність комплексу LTX-МАТ до мембранного рецептора * K _d (нМ)
A4	IgG	+	300	0.14±0.03
A6	IgM	+	30	0.24±0.10
A15	IgG	+	80	0.21±0.08
A19	IgG	+	70	0.24±0.09
A24	IgG	+	30	0.19±0.09

* K_d нативного LTX складає 0.14±0.04 нМ

Подальші експерименти виявили, що А6 та А24 повністю нейтралізують здатність LTX спричиняти вивільнення [¹⁴C]-ГАМК із синапсом. Антитіла А15 і А19 не впливали на секретогенну функцію токсину (рис.6).

Але особливо цікаві властивості виявило МАТ А4. Незважаючи на повну нейтралізацію іонофорного ефекта токсина, секретогенний ефект LTX лише частково пригнічувався під впливом цього антитіла (рис.7). Модифікація латротоксину антитілом А19 не змінює подальшого ефекту А4 на здатність токсину стимулювати вивільнення [¹⁴C]-ГАМК. Аналогічно, модифікація латротоксину антитілом А4 не змінює впливу антитіла А24 на секретогенну дію LTX (рис.7). Таким чином, можна зробити висновок, що антитіла, які впливають на

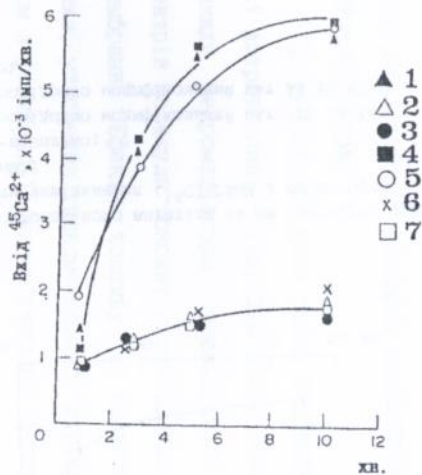


Рис.5 Вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синаптосоми під впливом нативного латротоксина та LTX, модифікованого монокліональними антитілами

1 - LTX (10нМ);	5 - LTX-A19-комплекс;
2 - контроль;	6 - LTX-A24-комплекс;
3 - LTX-A6-комплекс;	7 - LTX-A4-комплекс.
4 - LTX-A15-комплекс;	

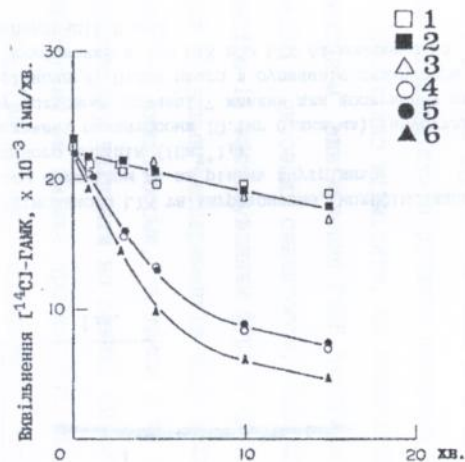


Рис.6 Вивільнення $[^{14}\text{C}]\text{-ГАМК}$ в синаптосом під впливом нативного латротоксина та LTX, модифікованого монокліональними антитілами

1 - контроль;	4 - LTX-A15-комплекс;
2 - LTX-A6-комплекс;	5 - LTX-A19-комплекс;
3 - LTX-A24-комплекс;	6 - LTX (5нМ).

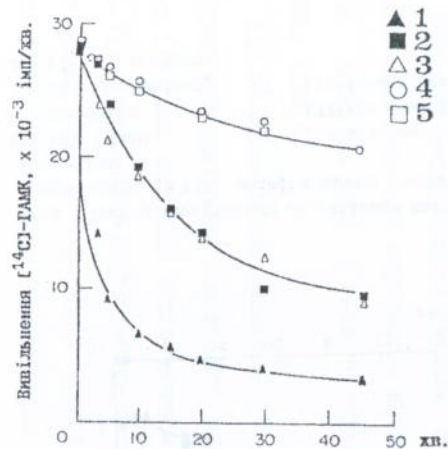


Рис. 7 Вплив моноклонального антитіла А4 на здатність латротоксина стимулювати вивільнення $[^{14}\text{C}]$ -ГАМК з синапсом.
 1 - LTX (5нМ);
 2 - LTX-A4-комплекс;
 3 - LTX, послідовно модифікований мАТ А19 та А4;
 4 - LTX, послідовно модифікований мАТ А4 та А24;
 5 - контроль.

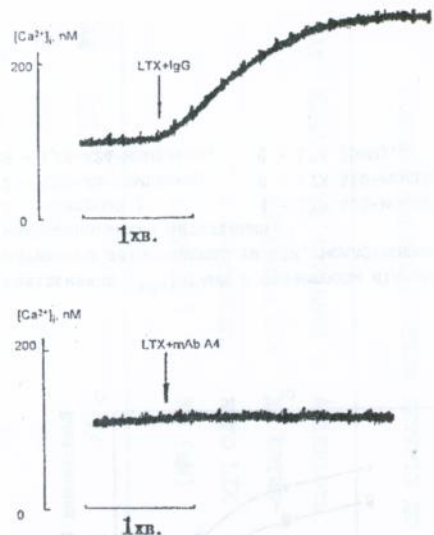


Рис. 8 Вплив немодифікованого LTX та латротоксина, модифікованого моноклональним антитілом А4 на рівень внутрішньо-синапсосомального кальція ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Фура-2-навантажені синапсосоми (0.1мг білка/мл) інкубували в стандартному сольовому розчині 7 хвилин для досягнення стагу динамічної рівноваги. Після цього в суспензію синапсом внесли преінкубований з IgG LTX або LTX-A4-комплекс до кінцевої концентрації 5 нМ.

здатність токсину стимулювати секрецію та формувати в мембрані канал взаємодіють з різними центрами молекули токсину.

Необхідно відмітити, що стимуляція модифікованим мАТ А4 латротоксином вивільнення ГАМК відбувалася за умов незмінного рівня кальцію в цитозолі синапсом, про що свідчать результати експериментів із застосуванням фури-2 (рис.8). Ці результати узгоджуються з даними експериментів щодо впливу комплексу А4-LTX на вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсом, а також є ще одним свідченням неадекватності латротоксину впливати на рівень цитозольного кальцію в умовах, коли токсин не змінює проникності плазматичної мембрани.

Скоріше всього, модифікація структури токсину цим типом моноклональних антитіл робить неможливим формування ним іонного каналу.

Таким чином, результати досліджень із застосуванням моноклональних антитіл дозволили виділити в молекулі LTX якнайменше три функціональні (а можливо і структурні) домени, які відповідають за: 1) токсин-рецепторну взаємодію; 2) зміну кальцієвої проникності плазматичної мембрани синапсом; 3) стимуляцію вивільнення нейромедіатора.

Ці результати дали також підставу для висновку, що дві функції латротоксину - індукція зміни іонної проникності і масивного викиду нейромедіатора, реалізуються за рахунок взаємодії різних центрів молекули токсину з мембранними акцепторами пресинаптичної мембрани. Ефекти токсину не являють собою єдиний ланцюг подій. Отже, утворення трансмембранної структури не є вирішальним фактором в реалізації секретогенного ефекту латротоксина.

4. Вплив LTX на фосфорилування білків синапсом.

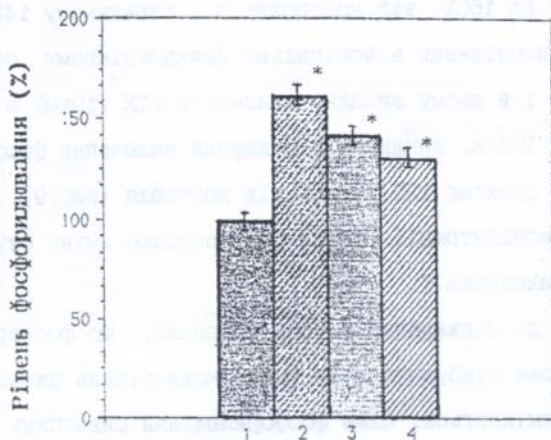
У зв'язку з наведеними результатами викликає цікавість досі не вирішене питання щодо механізму індукції токсином нейросекретор-

ного процесу за умов блокування його іонофорної функції, або в безкальцієвому середовищі, тобто за умов незмінного рівня клітинного кальція.

На теперішній час добре відомо, що для реалізації процесу екацитозу необхідно, щоб синаптичні везикули транспортувалися до центрів причалювання та злиття, розташованих в активній зоні пре-синаптичної мембрани. В транспорті синаптичних везикул критична роль належить їх периферичним мембранним білкам - синапсинам, а саме синапсину I. Виявлено, що деполаризація нервових закінчень в безкальцієвому середовищі не спричиняє як фосфорилування синапсину I, так і звільнення синаптичних везикул з сітки цитоскелету (Greengard P. et al., 1993; Tarelli F., et al., 1992). При дії латротоксина в безкальцієвому середовищі ми маємо ситуацію, коли рівень цитоплазматичного кальція не змінюється, однак відбувається стимуляція нейросекреції.

Вартий уваги і цитозольний білок нервових закінчень динамін, функція якого пов'язана з ендозитозом синаптичних везикул. Функціональна активність цих білків контролюється фосфорилуванням.

Дослідження фосфорилування білків синаптосом проводили в середовищі, яке містило 1мМ CaCl₂, або в номінально безкальцієвому середовищі, тобто в середовищі, в яке не додавали кальцій та EGTA. Адже відомо, що в номінально безкальцієвому середовищі не відбувається значного зниження рівня цитоплазматичного кальція, як в безкальцієвому середовищі, яке містить EGTA (Лішко В. и др., 1990). При роботі в кальцієвому середовищі паралельно досліджували вплив LTX та 50мМ KCl для порівняння ефектів цих двох агентів, що підвищують концентрацію цитоплазматичного кальція в синаптосомах. В обох випадках спостерігалось підвищення включення ³²P_i в синапсин I (рис. 9, 10). При 10-секундній калієвій деполаризації



Фиг.9 Зміна рівня фосфорильовання синапсина I під впливом калієвої деполаризації та латротоксина.

Преінкубовані з $^{32}\text{P}_i$ синапсосоми деполаризували KCl (кінцева концентрація 50мМ) чи піддавали впливу 10нМ латротоксина протягом 10 сек. Кількісно рівень фосфорильовання визначали за радіоактивністю геля. Гель розігали на фрагменти довжиною 2мм, керуючись радіоавтографами, та вимірювали радіоактивність в сцинтиляційній рідині ЖС-103.

Подані середні дані з 12 експериментів.

- 1 - контрольні синапсосоми;
- 2 - синапсосоми після деполаризації KCl в середовищі з 1мМ CaCl_2 ;
- 3 - синапсосоми після дії латротоксина в середовищі з 1мМ CaCl_2 ;
- 4 - синапсосоми після дії латротоксина в безкальцієвому середовищі.

* - $P < 0.05$

фосфорилування синапсина I зростало в межах 145%-175% від контролю та складало в середньому $158.9 \pm 12.6\%$. При 10-секундній взаємодії токсина (10нМ) з синаптосомами вхід кальція в синаптосоми призводить до дещо меншої зміни ступеня фосфорилування синапсина I - від 128 до 160% від контролю, а в середньому $142.5 \pm 8.2\%$. При проведенні досліджень в номінально безкальцієвому середовищі ми виявили, що і в цьому випадку взаємодія LTX (10нМ) з синаптосомами протягом 10сек. викликає підвищення включення фосфату в синапсин I, яке досягає $130.8 \pm 7.8\%$ від контролю (рис.9). В цих умовах підвищення концентрації LTX до 20нМ посилює зміну ступеня фосфорилування синапсина I.

Нашими дослідженнями вперше показано, що фосфорилування синапсину I може відбуватися за умов, коли рівень цитоплазматичного кальція не змінюється. Отже фосфорилування синапсину I обов'язкове для звільнення синаптичних везикул від зв'язку з цитоскелетом та транспорту до активної зони пресинаптичної мембрани, але, можна припустити, що в безкальцієвому середовищі фосфорилування синапсину I реалізується за рахунок протеїнінає, активність яких не регулюється рівнем цитоплазматичного кальція.

В зв'язку з цими даними викликають цікавість зміни в фосфорилуванні білка 96 кДа - динаміна. Наші дослідження виявили, що при калієвій деполаризації та дії LTX в кальцієвому середовищі відбувається дефосфорилування білка 96кДа - динаміна. Однак при дії токсина в номінально безкальцієвому середовищі зниження включення фосфата в динамін не спостерігалось (рис.10).

Результати наших досліджень щодо неможливості дефосфорилування динаміну у відсутності позаклітинного кальція, тобто за умов незмінного рівня цитоплазматичного кальція, свідчать на користь концепції, згідно з якою Ca^{2+} є необхідним для реалізації

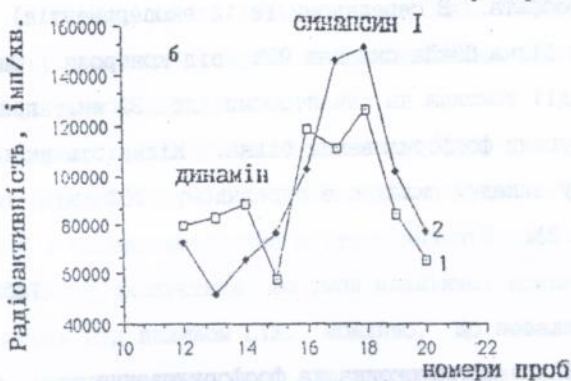
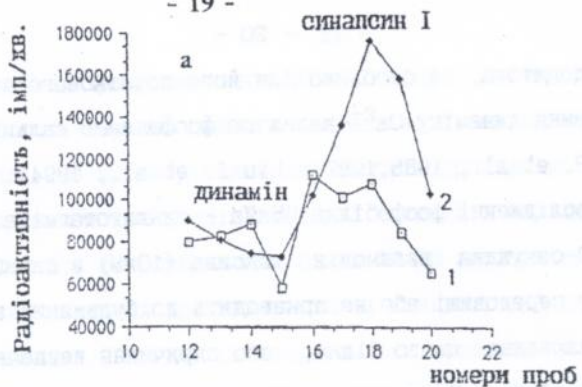


Рис.10 Включення $^{32}\text{P}_i$ в динамін та синапсин I під дією KCl та LTX.

- а) 1 - контрольні синаптосоми; 2 - після деполаризації KCl;
 б) 1 - контрольні синаптосоми; 2 - після дії латротоксина в середовищі з 1mM CaCl₂;
 в) 1 - контрольні синаптосоми; 2 - після дії латротоксина в безкальцієвому середовищі.

процеса ендоцитоза, а особливо для його початкового етапу - дефосфорилювання динаміну Ca^{2+} -залежною фосфатазою кальцінейрином. (Robinson P. et al., 1985,1987; Liu J. et al., 1994).

При дослідженні фосфобілка 65кДа - синаптотагміна ми виявили, що 10-секундна взаємодія токсина (10нМ) з синапсосомами в кальцієвому середовищі або не призводить до будь-яких змін в рівні фосфорилювання цього білка, або спричиняє незначне зниження включення фосфата. В середньому (з 12 експериментів) рівень фосфорилювання білка 65кДа складав 93% від контролю. Однак, збільшення часу дії токсина на синапсосоми до 30сек. призводить до зниження ступеня фосфорилювання білка. Кількість включеного фосфата у цьому випадку складає в середньому 70% від контрольного рівня (табл.2).

Таблиця 2

Вплив латротоксина на фосфорилювання
білка 65кДа - синаптотагміна (M±m, n=4-12)

Тривалість взаємодії	Номінально безкальцієве середовище	Середовище з 1мМ $CaCl_2$
10 сек	145,4±7,4*	93,4±11,8*
30 сек	143,3±8,1*	69,8±9,3*

* - $P < 0.05$ по відношенню до контролю

Дані подані у відсотках від контролю, який приймали за 100%.

В експериментах використовували LTX в концентрації 10нМ.

Дослідження фосфорилування білка 65кДа за умов взаємодії дитротоксина з синаптосомами в номінально безкальцієвому середовищі виявили, що зміни у включенні фосфата протилежні тим змінам, які реєструвалися при дослідженні дії токсина в кальцієвому середовищі. Ступінь фосфорилування білка 65кДа зростає в середньому до 145% від контролю при використанні концентрації токсина 10нМ. При використанні 20нМ LTX спостерігається незначне посилення цього ефекта (в середньому до 152% від контролю). Залежність ефекта від тривалості взаємодії токсина з синаптосомами (10 або 30 сек.) не спостерігається (табл.2).

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що білок 65кДа дефосфорилується, якщо взаємодія токсина з синаптосомами відбувається в середовищі, яке містить кальцій, або ступінь його фосфорилування підвищується за умов незмінної концентрації клітинного кальція під впливом LTX. Можливо, що незалежно від умов середовища перша реакція на дію токсина - це підвищення рівня фосфорилування білка 65кДа. Але за умов, коли відбувається вхід кальція в синаптосоми, швидкість його дефосфорилування надто велика, внаслідок чого через 10сек. цей рівень знижується до контрольного, а через 30сек. спостерігається суттєве дефосфорилування. Це припущення одержує підтримку в роботі P.Gomez-Puertas та співавт. (Gomez-Puertas P. et al., 1994), які відзначали надвичайно високу оновлюваність фосфата білку 65кДа в інтактних синаптосомах в стані спокою.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що низькомолекулярний пептид, присутній в високоочищених препаратах LTX, не приймає участі у формуванні токсинном кальцієвого каналу в плазматичній мембрані нервових закінчень.

2. Показано, що нативний α -латротоксин не впливає на вхід $^{22}\text{Na}^+$ в синапсосоми мозку щурів.

3. На підставі вивчення впливу LTX на вивільнення $[^{14}\text{C}]$ -ГАМК з синапсом встановлено, що секретогенна дія LTX може реалізуватися при відсутності натрію та бівалентних катіонів у позаклітинному середовищі.

4. За допомогою моноклональних антитіл доведена можливість блокування каналформуючої і секретогенної дії токсину при зберіганні в повному обсязі токсин-рецепторної взаємодії. Показана можливість одержання такої форми латротоксину, яка зберігає нейросекреторну активність при повній блокаді здатності формувати іонний канал в пресинаптичній мембрані.

5. Дія латротоксина на нервові закінчення головного мозку супроводжується підвищенням ступеня фосфорилювання синапсосомального білка 85кДа - синапсина I. Підвищення рівня фосфорилювання синапсина I спостерігається за умов взаємодії LTX з нервовими закінченнями як в кальцієвому, так і в безкальцієвому середовищі та складає в середньому $142.5 \pm 7.8\%$ та $130.8 \pm 7.8\%$ від контролю відповідно.

6. Під впливом LTX білок 65кДа - синаптотагмін або дефосфорильовується ($69,8 \pm 9,3\%$ від контрольного рівня за умов 30-секундної дії токсина), якщо взаємодія токсина з синаптосомами відбувається в середовищі, яке містить кальцій, або підвищує ступінь фосфорилування ($143,3 \pm 8,1\%$) за умов відсутності кальцію в середовищі взаємодії латротоксина з синаптосомами.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. E.V.Grishin, N.H.Himmelreich, K.A.Pluzhnikov, N.G.Pozdnyakova, L.G.Storchak, T.M.Volkova, P.G.Woll. Modulation of functional activities of the neurotoxin from black widow spider venom //FEBS Letters.-1993.- 336, N2.- P.205-207.
2. L.G.Storchak, V.N.Pashkov, N.G.Pozdnyakova, N.H.Himmelreich, E.V.Grishin. α -Latrotoxin-stimulated GABA release can occur in Ca^{2+} -free, Na^{2+} -free medium //FEBS Letters. - 1994.- 351, P.267-270.
3. L.G.Storchak, N.G.Pozdnyakova, N.H.Himmelreich Alpha-Latrotoxin as a tool study of Ca^{2+} -independent secretion of neurotransmitters // Abstracts Inter. Symp. "Physiological and Biochemical Basis of brain activity" (St.Petersburg, June 22-24). Russia, 1994.- P.69.
4. Н.Г.Позднякова, Л.Г.Сторчак, Н.Г.Гиммельрейх. Фосфорилирование белков синапсом головного мозга крыс, стимулируемое α -латротоксином // Биохимия.- 1996.- 61, Вып.9.- С.1596-1605.

Пошнякова Н.Г. "Механизм секретогенного действия α -латротоксина"

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04.- биохимия. Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 4 научных работы, посвященные изучению механизма процесса секреции нейромедиатора из нервных окончаний головного мозга крыс, стимулируемого пресинаптическим токсином из яда паука каракурта (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*) - α -латротоксином (LTX).

Исследовано участие низкомолекулярного пептида из яда каракурта в формировании LTX кальциевого канала в плазматической мембране нервных окончаний. Проанализировано влияние натрия и двувалентных катионов внеклеточной среды на нейросекреторное действие LTX. Впервые проанализирована взаимосвязь между двумя свойствами LTX: способностью формировать ионный канал в пресинаптической мембране и стимулировать освобождение нейромедиатора. Исследовано фосфорилирование нейрональных белков (синапсина I, синаптотагмина и динамина) при действии латротоксина на нервные окончания головного мозга.

Pozdniakova N.G. "Mechanism of secretogenic action of α -latrotoxin"

Dissertation on candidate degree in Biological Sciences, 03.00.04 - Biochemistry. A.V.Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science, Kiev, 1996.

The results, which were published in 4 papers, deal with neurosecretory process in rat brain synaptosomes induced by α -latrotoxin (LTX), the major protein component of the venom of black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus*.

It has been studied the role of low molecular weight protein of spider venom in formation by LTX of ionic channel in presynaptic membrane. It was established that LTX can induce the neurotransmitter release when divalent cations or sodium fluxes into nerve terminals are not occurred. For the first time the interdependence between two main functions of LTX - the ability to form the ionic channel and to stimulate the neurotransmitter release was shown. It was studied the effect of LTX on phosphorylation of synaptosomal proteins, particularly, synapsin I, synaptotagmin and dynamin.

Ключові слова: α -латротоксин, синаптосоми, нейросекреція, фосфорилування, синапсин I, синаптотагмін, динамін.



Подписано к печати 19.11.96г. Формат 60x84/16.
Объем: 1.0 усл.-печ.л., 1.0 уч.-изд.л.
Тираж 100. Заказ 84.

Типография во Флоровском монастыре
тел. 416-54-62

438091

AB 36.213