

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. Палладіна

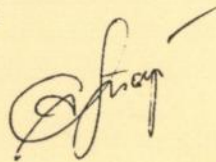
ТАРАСЕНКО Алла Сергіївна

УДК 577.352.332

**ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ МЕЛІТИНУ З
МОДЕЛЬНИМИ ТА ПРИРОДНИМИ МЕМБРАНАМИ**

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук



Київ - 1997

AB 38.5

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біофізики Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна Національної академії наук України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук

ДЕМЧЕНКО Олександр Петрович,

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
провідний науковий співробітник.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук

МАЛИШЕВА Маргарита Костянтинівна,

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольца НАН України
завідуюча відділом нейрохімії;

кандидат біологічних наук

КОЛЕСНІКОВА Ірина Миколаївна,

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України,
старший науковий співробітник.

Провідна організація - Кримський медичний інститут ім С.О.Георгієвського (лабораторія біотехнології) МОЗ України, м. Сімферополь.

Захист відбудеться " 27 " жовтня 1997 р.

о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01. 84. 01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії НАН України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розісланий " 26 " вересня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

КІРСЕНКО О.В.

ЛІННБ України ім.В.Стефаніка



00751492 (S)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Не виникає сумніву, що білок-ліпідні взаємодії контролюють функціонування біологічних мембран і тому їх дослідження протягом вже довгого часу залишаються актуальними. Велике значення в цих роботах надається вибору коректної моделі дослідження. Мелітин-ліпідні взаємодії привертають увагу вчених головним чином завдяки відносній, добре охарактеризованій різними методами структурній простоті пептиду та широкому спектру його біологічної дії. Мелітин - це літичний мембрано-активний пептид бджолоїної отрути, який здатний спонтанно вбудовуватись в природні та штучні мембрани і в мікромольних концентраціях впливати на стан фосфоліпідного бішару /Dempsey С. 1990/. Проте, навіть для такої простої моделі, як мелітин-фосфоліпідна мембрана, на більшість поставлених питань, зокрема, питань про механізм вбудовування пептиду в мембрану, конформацію та орієнтацію його по відношенню до бішару, немає однозначної відповіді. Відкритим залишається і питання про ступінь агрегації мембрано-зв'язаного мелітину. На цей час пропонуються як протилежні моделі організації пептиду в структурі сформованої ним пори (мономер або тетрамер) /Altenbach С. et al., 1988; Vogel Н. et al., 1986/, так і проміжні, які допускають різну ступінь його олігомеризації. Не ясною є і причина високої імуногенності мелітину, який викликає різноманітні алергічні реакції. Розуміння цього питання, можливо, дозволить пояснити природу біологічної дії пептиду.

Враховуючи високу мембранну активність мелітину, цікавим є не тільки теоретичне дослідження пептиду, але і можливість практичного його застосування. Так, на базі мелітину вже створені гібридні молекули, які мають поліпшені антибактеріальні та антимікробні властивості і водночас не є цитолітиками /Fernandez I. et al., 1994; Juvvadi Р. et al., 1996/. Зараз відкривається також перспектива використання пептиду як функціональної частини біфункціональних молекул цілеспрямованої дії. Такі молекули, що мають, з одного боку, літичну активність мелітину, а, з другого - вибірковість по відношенню до певних типів клітин, можуть бути використані в терапії ряду тяжких захворювань, до числа яких належать аутоімунні, онкологічні та СНІД.

Ступінь дослідженості тематики. Білок-ліпідні взаємодії, зокрема, мелітин-мембранні комплекси, досліджуються дуже активно /Benachir Т. et al., 1995; Ohki S. et al., 1994/. Проте, незважаючи на високий сучасний рівень експериментальної науки, для більшості поставлених питань існують неоднозначні, а часом і протилежні висновки. Це пов'язано як з недоліками та обмеженістю методичних підходів, так і з використанням препарату мелітину, що має залишкову фосфоліпазну активність. Останнє особливо важливо враховувати при дослідженні взаємодії мелітину з мембраною, так як фосфоліпаза та мелітин проявляють синергічну дію. Слід також враховувати, що фізико-хімічні властивості пептиду, а також його структура тісно пов'язані як із станом та складом самого ліпідного бішару, так і з умовами експерименту.

ЛІАБ ім. В. Стефанька
АН України

Мета роботи та завдання дослідження. Метою цієї роботи стало подальше поглиблення теоретичних знань про природу та характер взаємодії мелітину з фосфоліпідним бішаром, а також вивчення можливості практичного застосування пептиду шляхом створення на його основі біфункціональних молекул цілеспрямованої дії. Для вирішення цих питань були поставлені такі завдання:

- отримати високоочищений препарат мелітину, позбавлений залишків фосфоліпадної активності, шляхом створення високоспецифічного імуносорбенту на основі моноклональних антитіл проти пептиду;
- за допомогою полі- та моноклональних антитіл виявити локалізацію основної антигенної детермінанти мелітину, вбудованого в модельну мембрану;
- вивчити вплив первинного конформаційного стану мелітину та його синтетичних похідних на ступінь агрегації пептидів в структурі пори;
- дослідити вплив моноклональних антитіл на індуковану мелітином потенціалзалежну проникливість бішарової ліпідної мембрани;
- вивчити можливість створення на основі мелітину лікарської форми біфункціональних переадресованих токсинів, здатних завдяки селективній пептид-рецепторній взаємодії вибірково діяти на тимусзалежні лімфоцити та викликати їх специфічне руйнування.

Наукова новизна. Внаслідок проведених досліджень вперше отримані прямі докази того, що мелітин, взаємодіючи з мембраною, розташовується на її поверхні таким чином, що основна його антигенна детермінанта експонована в оточуюче середовище та доступна дії антитіл. Це пояснює природу високої імуногенності мелітину: зв'язування з мембраною перетворює пептид з розчинного антигену в клітинний, здатний довгий час циркулювати в крові. Показано, що зв'язування антигенної детермінанти пептиду з антитілом стає суттєвою перешкодою для вбудовування мелітину в фосфоліпідний бішар та формування ним каналоподібних структур.

Встановлена залежність між первинним конформаційним станом мелітину (та його синтетичних похідних) у розчині та ступенем їх агрегації в структурі пори, сформованої в мембрані. Показана можливість існування двох форм (димер та тетрамер) мембранозв'язаного пептиду.

Теоретичне та практичне значення роботи. Одержані результати поглиблюють уявлення про характер взаємодії мелітину з модельними та природними мембранами, пояснюють природу його біологічної дії, а також дозволяють ставити нові проблеми фундаментальної біохімії мембран. Практичне значення цієї роботи полягає в можливості використання мелітину для пошуку та створення гібридних біфункціональних молекул цілеспрямованої дії як фармакологічних агентів в терапії ряду тяжких патологічних станів організму.

Апробація роботи. Дисертаційні матеріали було викладено та обговорено на 20th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (Budapest, 1990); 16th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (New Delhi, 1994); 1-му Українському Біофізичному з'їзді (Київ, 1994); W.Mejbaum-katzenellenbogen's Seminars in Molecular Biology (Wrocław, 1996) та на наукових конференціях Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАНУ.

Публікації. За матеріалами дисертації було надруковано 3 статті та 6 тез.

Структура та об'єм роботи. Дисертаційна робота викладена на 123 сторінках друкарського тексту та складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, заключної частини, висновків, списку основної літератури, що містить 155 посилань на роботи вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота проілюстрована 20 рисунками та 1 таблицею.

Конкретний особистий внесок дисертанта. Експериментальна частина роботи, підбір та аналіз літературного огляду виконані дисертантом особисто. Обговорення результатів проведено спільно з науковим керівником та співробітниками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі дисертаційної роботи подано літературний огляд сучасних уявлень щодо структури, фізико-хімічних властивостей та механізму дії основного мембрано-активного пептиду бджолоїної отрути - мелітину. Обговорено основні протиріччя, які стосуються головним чином конформації мембранозв'язаного пептиду, ступені його агрегації та орієнтації відносно фосфоліпідного бішару.

У другому розділі висвітлюються останні літературні дані щодо біфункціональних преадресованих токсинів, які знайшли своє застосування у розвитку нетрадиційної терапії ряду тяжких захворювань. Розглядається можливість практичного використання мелітину у складі таких гібридних молекул.

Третій розділ описує матеріали та основні методи дослідження, а у четвертому - приведені основні результати та їх обговорення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Отримання високоочищеного препарату мелітину та його фрагментів. Грубу фракцію мелітину отримували з отрути медоносної бджоли шляхом гель-фільтрації та йоннообмінної хроматографії /Maulet Y. et al., 1980/. Заключну очистку мелітину проводили за допомогою високоспецифічного імуносорбенту, що містив моноклональні антитіла проти пептиду. Фрагменти мелітину отримували шляхом розділення в системі HPLC продуктів протеолізу пептиду.

Отримання F_{ab} та F_c -фрагментів моноклональних антитіл проти мелітину.

Моноклональні антитіла (мАт) проти пептиду виділяли шляхом афінної хроматографії з асцитної рідини мишей, імунізованих мелітином. Джерелом мАТ, які належали до класу IgG₁, була гібридома, отримана Єфетовим К.А. в лабораторії біотехнології Кримського медичного інституту. F_{ab} та F_c -фрагменти антитіл отримували шляхом папаїнового гідролізу, згідно /Брок І., 1979/. Активність антитіл та їх фрагментів, а також виявлення епітопів мелітину оцінювали в постановці ELISA за стандартною методикою.

Електронно-мікроскопічні дослідження. Взаємодію між антитілом та пептидом, вбудованим в модельну мембрану, досліджували методом негативного контрастування за допомогою антитіл, мічених колоїдним золотом /Голобородько В.Н. і др. 1986/. Як контроль, використовувались неспецифічні імуноглобуліни та антитіла проти фосфоліпази А₂.

Отримання фосфатидилхоліну та ліпосом. Фосфатидилхолін екстрагували з яєчних жовтків за методом /Bligh, Dyer, 1959/. Чистоту фосфоліпиду контролювали за допомогою двохмірної тонкошарової хроматографії /Латишев, 1980/. Моноамельярні ліпосоми з діаметром 80-100 нм отримували ультразвуковим дезінтегруванням суспензії ліпідів протягом 10 хвилин при 22 000 Гц на диспергаторі MSE-150 WT (Англія). В експериментах з флуоресцентним барвником кальцеїном дезінтегрування проводили в його присутності. Концентрацію ліпиду в ліпосомах визначали за загальним вмістом фосфору, згідно /Chen P., 1956/. Фракційно-дисперсний аналіз везикул за розміром проводили на інформаційно-обчислювальному комплексі Malvern Zetasizes 3 за допомогою методу спектроскопії оптичного змішування /Лебедев та інші, 1987/.

Вивчення літичної та гемолітичної активності мелітину та його синтетичних похідних. Синтетичні гібридні пептиди були отримані твердофазним методом Кауровим О.А. (ін-т ОЧБП, м. Санкт-Петербург) та люб'язно надані Наволоцькою О.В. (ін-т імунології, Любучани, Росія). Літичну активність пептидів вивчали методом концентраційного гасіння флуоресценції кальцеїну. Гемолітичну активність оцінювали, вимірюючи на спектрофотометрі СФ-26 оптичну густину гемоглобіну ($\lambda_{\text{погл}}=540$ нм), вивільненого з еритроцитів після їх інкубації (37°C, 30 хвилин) з пептидами.

Вимірювання провідності бішарової ліпідної мембрани (БЛМ), модифікованої мелітином та мАт. БЛМ формували з загальних ліпідів мозку бика (4% розчин ліпідів в н-октані) за методом Мюллера /Mueller, 1962/. Струм крізь мембрану реєстрували в режимі фіксації потенціалу при кімнатній температурі.

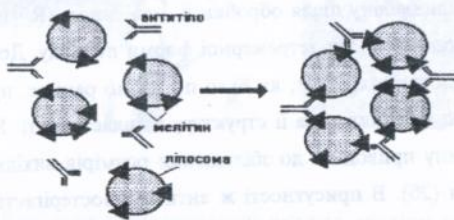
Радіорецепторний аналіз ^{125}I -мічених пептидів. Специфічне зв'язування ^{125}I -мічених пептидів із α_2 -інтерферону та інтерлейкіну-2 з тимоцитами мишей оцінювали згідно /Зайцев С.В., 1985/. Для визначення параметрів специфічного зв'язування мічених пептидів (K_d -константи дисоціації комплексу мічений ліганд-рецептор та K_i - константи інгібування) проводили аналіз графіку Скетчарда в модифікації Берсона та Ялоу /Гкачук В.А., 1983/.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримання високоочищеного препарату мелітину. Проблема отримання високоочищеного препарату мелітину полягає в тому, що виділений за стандартною методикою пептид завжди має залишки фосфоліпази A_2 , яка теж входить до складу бджолиної отрути та проявляє з мелітином синергічну дію на мембрану. Тому нами був синтезований високо-специфічний сорбент, в якому моноклональні антитіла проти пептиду були імібілізовані на гідразидну похідну сефакрілу S-1000 DAA через активовану карбоксигідратну компоненту F_c -фрагменту антитіл. Треба відзначити, що відбір клонів при отриманні мАт проводився за допомогою синтетичного мелітину і це виключало можливі перехрестні реакції антитіл з фосфоліпазою A_2 . В результаті проведених експериментів був виділений препарат мелітину, який не містив залишків фосфоліпази, і саме він був застосований для подальших досліджень взаємодії мелітину з природними та штучними мембранами.

Локалізація антигенних детермінант мелітину, вбудованого в модельну мембрану.

Відомо, що індукована бджолиним укусом реакція вивільнення гістаміну з тучних клітин пов'язана, поряд з іншими факторами, з цитотоксичними та алергічними властивостями мелітину /Гушні І.С., 1990/. Високу імуногенність пептиду можна пояснити, виходячи як із структури самого мелітину, так і з особливостей його взаємодії з клітиною. Можливо, що при зв'язуванні з фосфоліпідним бішаром, наприклад, з ліпосомами, яку ми вибрали як модель природної мембрани, пептид орієнтується в ній таким чином, що його антигенні детермінанти експоновані в оточуюче середовище та доступні дії антитіл. Тоді, завдяки двохвалентності антитіл, ліпосоми збільшаться за розміром, внаслідок взаємодії антитіл з молекулами антигенів, розташованих на різних везикулах, як це представлено на схемі:



Цей процес можна реєструвати як прямим методом електронної мікроскопії, так і непрямим - спектроскопії оптичного змішування, який дозволяє вимірювати розміри частинок. На рисунку 1 приведена гістограма розподілу за розмірами мелітин-ліпосомальних комплексів в залежності від концентрації в суміші мАт проти пептиду. R_1 - молярне співвідношення ліпід-пептид. Добре видно, що як при низькій (А), так і при високій (Б) йонній силі, тобто, при різному первинному конформаційному стані мелітину (мономер чи тетрамер), спостерігається загальна тенденція до збільшення розмірів частинок. Так, якщо середній діаметр вихідних ліпосом складав 103.3 нм (низька йонна сила), а в присутності мелітину ($R_1=100$) він досягав 147.7 нм, то додавання мАт (молярне співвідношення

антиген-антитіло 1:1) приводило до значного збільшення діаметру везикул - 420 нм. Мелітин, попередньо інкубований з надлишком чи еквімолярною кількістю антитіл при 37°C протягом 15 хвилин, не чинив суттєвого впливу на гідродинамічні параметри ліпосом, що вказувало на нездатність пептиду в складі імунного комплексу вбудовуватись в фосфоліпідний бішар. Враховуючи, що основна антигенна детермінанта мелітину локалізована на його С-кінцевій частині (постановка ELISA з фрагментами пептиду), можна припустити, що її зв'язування з молекулою антитіла стає перешкодою для первинного процесу закріплення мелітину в мембрану, яке обумовлене електростатичною взаємодією позитивно заряджених аміногруп пептиду з негативно зарядженими фосфатними голівками фосфоліпідів.

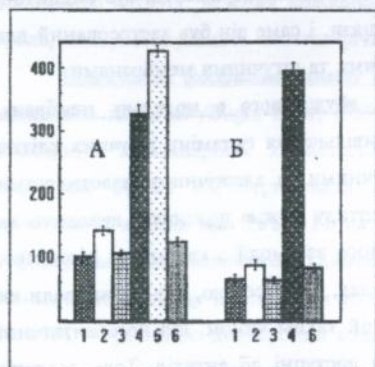


Рис. 1 Гістограма розподілу за розмірами ліпосом з фосфатидилхоліну (ФХ) під впливом мелітину-мономеру (А), тетрамеру (Б) та мАт проти пептиду:

1. Ліпосоми (ФХ);
2. ФХ + мелітин (М) ($R_1=100$);
3. ФХ + мАт;
4. (ФХ+М ($R_1=100$)) + мАт (1:0.25);
5. (ФХ + М ($R_1=100$)) + мАт (1:1);
6. ФХ + (М + мАт (1:0.25)), інкубація 15 хвилин, 37°C).

Отримані дані були підтверджені прямими електронно-мікроскопічними дослідженнями, в яких комплекси антиген-антитіло безпосередньо виявляли за допомогою антитіл, мічених колоїдним золотом. На рис. 2 приведені фотографії, які відображають стан ліпосом з димирістоїлфосфатидилхоліну після обробки їх мелітином ($R_1=100$), а потім міченими поліклональними антитілами проти тетрамерної форми пептиду. Дослідження проводилось при $R_1=100$, тобто, при умовах, коли, як було показано раніше, практично весь мелітин зв'язаний з мембраною та впливає на її структуру та властивості. Як видно з рисунку, вже саме додавання мелітину приводить до збільшення розмірів вихідних ліпосом (2а), за рахунок злиття їх мембран (2б). В присутності ж антитіл спостерігається подальше збільшення розмірів везикул та їх агрегація. При негативному контрастуванні на поверхні ліпосом виявляється значна кількість частинок колоїдного золота, причому, мічені антитіла, як правило, розташовуються уздовж кордону поверхні частинок (2в, локалізація золота вказана стрілками). Це можна пояснити лише, виходячи з міркувань про специфічну взаємодію антитіл з молекулами антигенів, розташованих на різних везикулах. Саме по собі додавання мічених антитіл до вихідної суспензії ліпосом не впливає на їх стан (2г).

Таким чином, застосування двох незалежних методів дозволило нам вперше отримати прямі докази того, що мелітин, взаємодіючи з мембраною, орієнтується в ній так, що основна антигенна детермінанта пептиду експонована в оточуюче середовище

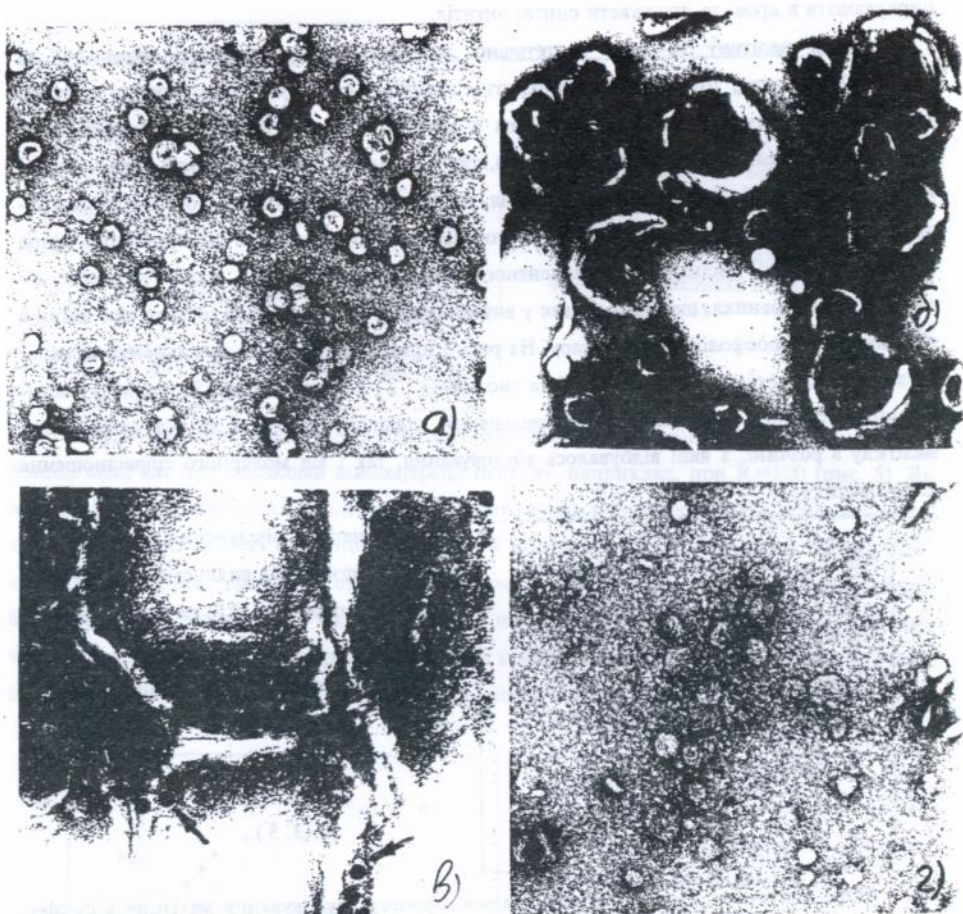


Рис. 2 Взаємодія поліклональних антитіл, мічених колоїдним золотом, з мелітіном, вбудованим в ДМФХ-ліпосоми:

- а) - суспензія вихідних везикул (зб. $\times 48\ 250$);
- б) - фузогенний ефект мелітіну (зб. $\times 93\ 150$);
- в) - агрегація ліпосом в результаті утворення комплексу мелітин-антитіло (зб. $\times 173\ 600$);
- г) - вихідні ліпосоми, інкубовані з міченими антитілами проти пептиду (зб. $\times 48\ 250$).

та доступна дії антитіл. Це пояснює природу високої імуногенності мелітину: зв'язування з мембраною перетворює пептид з розчинного антигену в клітинний, здатний довгий час циркулювати в крові та індукувати синтез антитіл.

Вплив мелітину та його синтетичних похідних на проникливість модельної та природної мембрани. До цього часу відкритим залишається питання про ступінь агрегації пептиду в структурі пори, утвореної ним в мембрані. В літературі обговорюються як протилежні моделі (мономер або тетрамер), так і проміжні, які допускають різну ступінь його олігомеризації. Вирішуючи це питання, ми вивчали вплив первинного конформаційного стану мелітину на процеси його вбудовування в ліпосому. Був використаний метод концентраційного гасіння флуоресцентного барвника кальцеїну, який дозволяє по вивільненню барвника, що знаходиться у внутрішньому об'ємі везикул, судити про зміни в проникливості фосfolіпідного бішару. На рис. 3 приведена кінетика вивільнення кальцеїну з ФХ ліпосом при низькій (1, 2, 3) та високій (1', 2', 3') йонній силі. Як видно з рисунку, швидкість та максимальний % вивільнення кальцеїну залежать як від конформації мелітину в розчині, з якої відбувалось вбудовування, так і від молярного співвідношення ліпід-пептид (R_1).

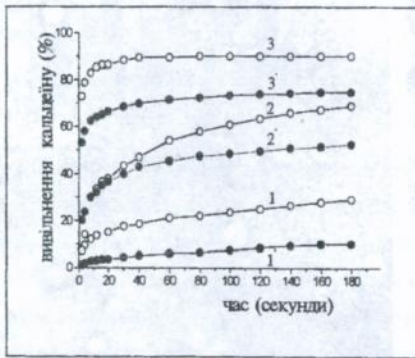


Рис.3 Кінетика вивільнення кальцеїну з ФХ-ліпосом під впливом мелітину в умовах низької (1;2;3) та високої йонної сили (1';2';3').

Молярне співвідношення ліпід-пептид складало:

200 (1, 1');

100 (2, 2');

50 (3, 3').

Якщо допустити, що лімітуючою стадією процесу вбудовування мелітину в фосfolіпідний бішар являється формування олігомерного каналу, то доцільно проаналізувати залежність величини граничного звільнення барвника із везикул від концентрації пептиду (рис. 4а). Добре видно, що отримані криві мають S-подібну форму і одним із можливих шляхів аналізу таких залежностей "доза-ефект" є їх лінеаризація в координатах Хілла, де тангенс куту нахилу прямих (коефіцієнт Хілла) в ідеальному випадку вкаже на кількість молекул мелітину, які приймають участь в створенні кінцевого продукту - водної пори. Використовуючи такий підхід, ми встановили (рис. 4б), що уявне значення коефіцієнта Хілла для мелітину, вбудованого в мембрану в умовах низької (1) та високої (2) йонної сили, відрізнялось майже в 2 рази та складало приблизно 2 та 4 відповідно. Це означає, що первинний конформаційний стан пептиду визначає ступінь його олігомеризації, достатню для формування водної пори. Іншими словами, мелітин, який знаходиться у розчині у

вигляді мономеру, повинен асоціювати на мембрані до димеру, в той час як тетрамер вже сам по собі являється самостійною провідною структурою.

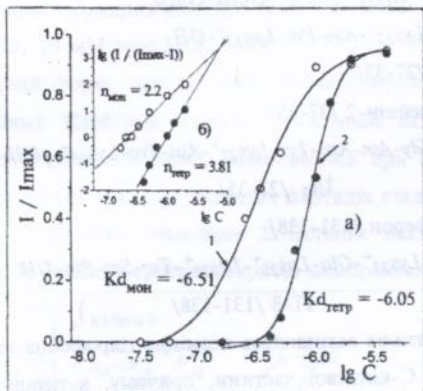


Рис. 4 Вплив різних концентрацій мелітину на величину граничного вивільнення кальцеїну в умовах низької (1) та високої (2) йонної сили - а) та його представлення в координатах Хілла - б)

Звідси стає зрозумілою різна швидкість вивільнення кальцеїну з ліпосом при різних йонній силі, але при однаковій концентрації пептиду, наприклад, при $R_1=100$ (рис. 5). Як видно з рисунку, швидкість вивільнення барвника вища при умовах високої йонної сили, тому що за одиницю часу крізь пору, створену 4 молекулами мелітину, вийде більша кількість кальцеїну, ніж через пору, створену димером. В той же час, максимальне вивільнення барвника (в % відношенні) буде вище при низькій йонній силі, бо при однакових концентраціях мелітин-мономер, вбудовуючись в мембрану, створить теоретично в 2 рази більше пор, ніж тетрамер, що і приведе до охоплення більшої кількості ліпосом.

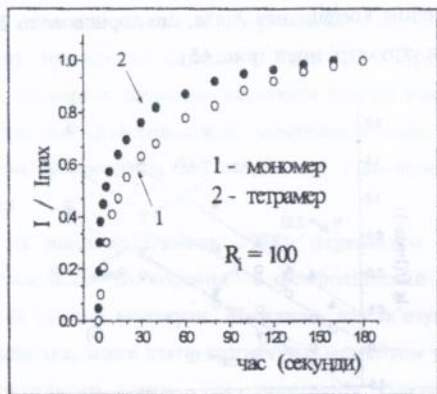
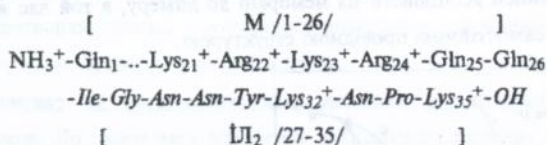


Рис. 5. Залежність відношення інтенсивностей флуоресценції від часу для мелітину-мономеру (1) та тетрамеру (2).

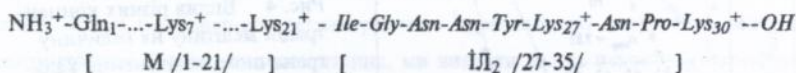
I - інтенсивність в даний момент часу;
 I_{max} - інтенсивність при насиченні.
 $R_1 = 100$

Підтвердженням цьому служить проведений нами порівняльний аналіз літичної активності синтетичних похідних мелітину, синтезованих твердофазним методом. Досліджувались похідні мелітину, в яких гідрофільна С-кінцева частина пептиду була заміщена функціонально активними фрагментами імуномодуляторів - α_2 -інтерферону та інтерлейкіну-2 :

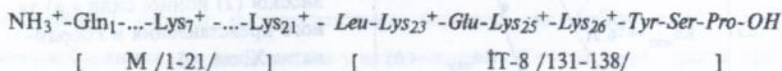
- **CM₁**: мелітин /1-26/ - інтерлейкін-2 /27-35/



- **CM₂**: мелітин /1-21/ - інтерлейкін-2 /27-35/



- **M-IT₈**: мелітин /1-21/- інтерферон /131-138/



Як видно, спільною для усіх цих пептидів залишилась незмінна гідрофобна частина мелітину, модифікація торкнулась тільки С-кінцевої частини, причому, в першу чергу величини позитивного заряду та його густини. Виходячи з структурних особливостей мелітину, можна припустити, що ці дві величини будуть мати суттєве значення для прояву літичної дії таких гібридних молекул. Дійсно, як свідчать дані, приведені на рисунку ба, найбільша активність спостерігалась у нативної молекули мелітину, яка мала локальний 4 (+)-заряджений кластер, на відміну від, наприклад, CM-2 та M-IT₈, які містили або менший заряд, або локально розподілений. Гібридна молекула CM-1, незважаючи на сумарний заряд 6(+), була менш активна, ніж мелітин, певно, тому, що заряд розподілений на більший відстані та його локальна густина нижча. Оскільки експеримент проводився в умовах низької йонної сили, при якій пептиди знаходились в мономерному стані, загальним показником для усіх гібридів стало значення коефіцієнта Хілла, що дорівнювало 2. Це вказувало на димерну організацію пептидів в структурі пори (рис. 6б).

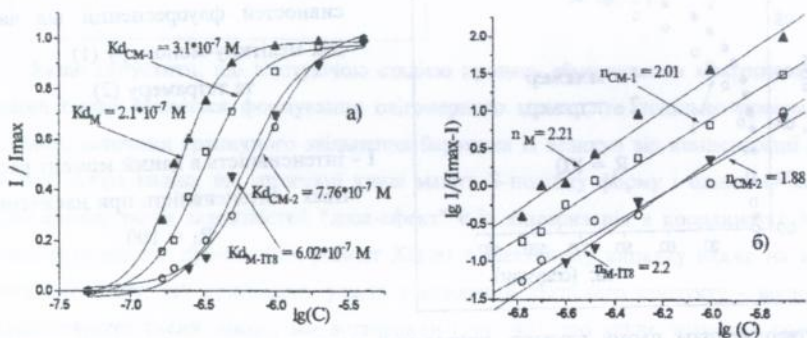


Рис 6. Порівняльний аналіз кривих "доза-ефект" нативного мелітину та його синтетичних похідних: CM-1, CM-2 та ME-IT₈ - а), а також його представлення в координатах Хілла - б)

Адекватність використання ліпосом, як моделі природної мембрани, підтвердив проведений нами порівняльний аналіз гемолітичної активності мелітину та його синтетичних гібридних молекул (рис. 7а). В умовах, які наближені до фізіологічних (140 mM NaCl, 10 mM тріс-НСl, 1 mM ЕДТА, рН 7.4), усі пептиди переважно знаходяться у мономерній формі, про що свідчать максимуми їх власної триптофанової флуоресценції ($\lambda_{\text{фл}} \approx 350\text{nm}$). Найбільш яскраво гемолітична активність виражена у нативної молекули мелітину, тоді як дія химер проявляється при більш високих концентраціях. Загальним показником для усіх використаних пептидів стало значення коефіцієнта Хілла, яке, як і в попередніх дослідях, становило 2. Останнє вказувало на те, що структурною одиницею гібридів, зв'язаних з еритроцитарною мембраною, є димер (рис. 7б).

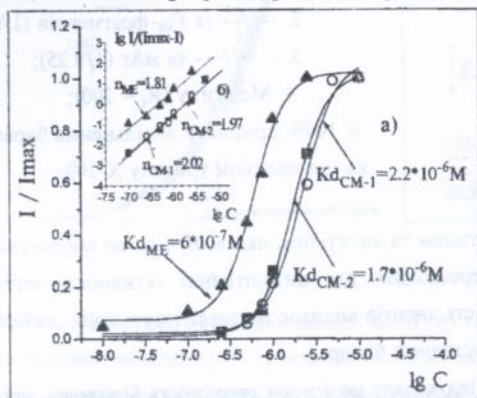


Рис. 7 Гемолітична активність мелітину, СМ-1 та СМ-2 - а) та її представлення в координатах Хілла - б)

Таким чином, дослідження літичної та гемолітичної активності мелітину та його синтетичних похідних дозволило сформулювати гіпотезу про вплив первинного конформаційного стану пептидів на ступінь їх агрегації в структурі пори, створеної в мембрані. Такий підхід, по-перше, дозволяє врахувати тісний взаємозв'язок між умовами експерименту та структурними властивостями мембранозв'язаного мелітину. По-друге, він пояснює ті численні суперечності, які виникають у дослідників, що використовують різні методичні підходи.

Як відомо, /Dawson, 1978/, первинним етапом взаємодії мелітину з мембраною являється його "заякорення" в фосфоліпідний бішар завдяки позитивно зарядженій С-кінцевій частині молекули. Можливо, що зв'язування цієї частини, наприклад, з молекулою антитіла, може стати критичним моментом у подальшому функціонуванні мелітину як цитотоксичного агенту. Так, реєстрація кінетики вивільнення кальцеїну із ліпосом в присутності мелітину та моноклональних антитіл проти нього виявила нездатність пептиду, зв'язаного з антитілами, змінювати проникливість фосфоліпідного бішару. При цьому суттєвим є як час предінкубації мелітину з антитілами, так і молярне співвідношення антиген/антитіло. Цікаво відмітити (рис. 8), що імунний комплекс, створений при 2-х кратному надмірі антигену [молярне співвідношення мелітин/антитіло = 1/0.25 чи 1/0.5 у

випадку F_{ab} -фрагментів; ($R_i=100$)], чинив такий же ефект, як і вільний пептид при $R_i=200$. Тобто, 50% молекул мелітину, які приймають участь в створенні комплексу, втрачають здатність зв'язуватись з мембраною і формувати каналоподібні структури. Це підтверджується експериментами, де було використано еквімолярне співвідношення мелітин/антитіло чи надлишок антитіла. В цьому випадку фосфоліпідний бішар не пошкоджувався та вивільнення кальцеїну не реєструвалось.

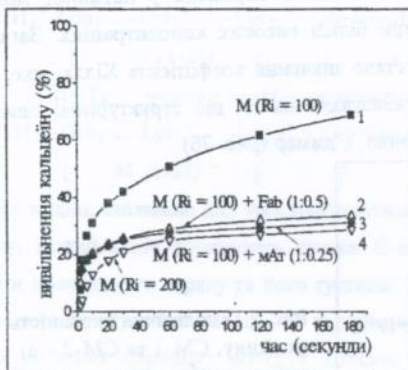


Рис. 8 Кінетика вивільнення кальцеїну із ФХ-ліпосом під впливом:

1. Мелітину ($R_i = 100$);
2. ---/-- та F_{ab} -фрагментів (1/0.5);
3. ----/-- та mAb (1/0.25);
4. Мелітину ($R_i = 200$);

За 100% прийнято вивільнення барвника під впливом тритону X-100.

Таким чином, взаємодія між мелітином та антитілом, яка відбулася до вбудовування пептиду в мембрану, стає суттєвою перешкодою для цитолітичної активності пептиду. Проте залишалось невідомо, як присутність антитіла впливає на властивості пори, створеної пептидом, який вже вбудувався в фосфоліпідний бішар.

Вплив моноклональних антитіл на індуковану мелітином провідність бішарової ліпідної мембрани (БЛМ). Згідно літературних даних /Tosteson M. et al., 1981; Pawlak M. et al., 1991/, мелітин змінює основні параметри БЛМ, зокрема, провідність, селективність та вольт-амперну характеристику (ВАХ). Оскільки антитіла проти пептиду можуть зв'язуватись з мелітином, вбудованим у ліпідний матрикс, важливо було з'ясувати, чи змінюються в присутності mAb властивості іонпровідних структур, створених мелітином в мембрані. Так, внесення антитіла з боку аплікації мелітину приводило до зупинки росту трансмембранного струму, індукованого пептидом, але при цьому його значення не зменшувалось, а залишалось постійним (рис. 9, А). Це вказує на те, що mAb впливають тільки на вільний, ще не зв'язаний з мембраною пептид, та не змінюють властивостей пор, створених вже вбудованим мелітином. У випадку попередньої інкубації пептиду з надлишком антитіла зміни у трансмембранному струмі не спостерігалися взагалі. Це ще раз підтверджує факт про нездатність мелітину у складі імунного комплексу вбудовуватись в мембрану та формувати іонпровідні структури.

Для характеристики властивостей мелітин-індукованої іонпровідної структури в БЛМ була знята її вольт-амперна характеристика. На рисунку 9, Б (1.) приведена найбільш типова її форма, яка являється нелінійною та асиметричною. Така поведінка ВАХ, у випадку БЛМ з нейтральних ліпідів, головним чином витікає із структури самого пептиду,

який має локальний (+)-заряджений кластер на С-кінцевій частині молекули. Оскільки антигенна детермінанта мелітину знаходиться на її С-кінцевій частині, то логічно було припустити, що її зв'язування з антитілом може привести до зміни ВАХ. Всупереч очікуваному, додавання мАТ до мембранозв'язаного пептиду практично не змінювало ВАХ (2.). Це означає, що взаємодія антитіл з мелітином, вбудованим у фосфоліпідний бішар, не приводить до екранування поля позитивних зарядів амінокислотних залишків Lys та Arg і властивості іонпровідних структур не змінюються.

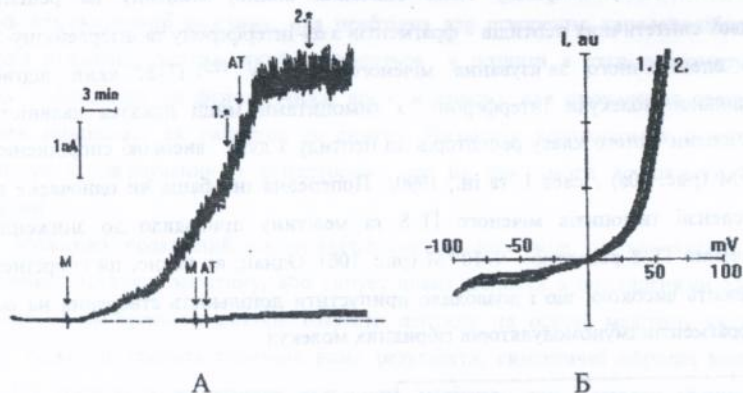


Рис. 9 Кінетика росту провідності БЛМ (А) та її вольт-амперна характеристика (Б) під впливом мелітину (М) та моноклональних антитіл (АТ) проти нього. Стрілками позначені моменти внесення пептиду та антитіл в цис-відсік ячєйки.

Таким чином, наші дані, отримані на іншій модельній системі, плоских ліпідних бішарах, по-перше, ще раз підтвердили факт нездатності мелітину, зв'язаного із своїми специфічними антитілами, вбудовуватись в мембрану та створювати каналоподібні структури. По-друге, вони показали, що іонпровідні властивості пори, створеної пептидом, не змінюються в присутності антитіл.

Дослідження властивостей біфункціональних переадресованих токсинів на основі мелітину та імунomodуляторів. Завдяки своїй унікальній структурі, характерними рисами якої є амфільна α -спіраль та (+)-заряджена С-кінцева частина, мелітин має неспецифічну активність, тобто, руйнує мембрани будь-яких типів клітин. Проте, якщо цю частину молекули пептиду замінити на який-небудь білковий ліганд, наприклад, фрагмент імунomodулятору, то це може забезпечити вибіркове зв'язування такої гібридної молекули тільки з відповідним рецептором. Така химерна молекула представляє практичний інтерес, бо може стати основою для створення так званих біфункціональних переадресованих токсинів, здатних, завдяки селективній пептид-рецепторній дії, цілеспрямовано діяти на клітинні мішені та викликати їх руйнування. Вони можуть бути використані з метою знищення клітин, які за якимись обставинами стали чужимим для організму та являються причиною

виникнення ряду тяжких захворювань, до числа яких належать онкологічні, аутоімунні та СНІД.

Природно, що такі химерні молекули повинні мати як літичну дію мелітину, який є функціональною частиною гібриду, так і рецепторні властивості імуномодуляторів, що виступають як адресні мітки та забезпечують доставку молекули до клітини-мішені.

Проте, перш ніж створювати біфункціональні агенти на основі мелітину, необхідно було з'ясувати доцільність його застосування як функціональної частини. Тому першим етапом роботи в цьому напрямку стало вивчення впливу мелітину на рецепторні властивості двох синтетичних пептидів - фрагментів з α_2 -інтерферону та інтерлейкіну-2.

Аналіз специфічного зв'язування міченого пептиду ^{125}I -ІТ-8, який відтворює властивості цільної молекули інтерферону, з тимоцитами миші показав наявність на поверхні цих клітин одного класу рецепторів до пептиду з дуже високою спорідненістю - $k_d = 4.2 \times 10^{-12} \text{M}$ (рис. 10а) /Ісаев І. та ін., 1990/. Попередня інкубація чи одночасне додавання до суспензії тимоцитів міченого ІТ-8 та мелітину приводило до зниження k_d комплексу мічений ІТ-8-рецептор - $9 \times 10^{-9} \text{M}$ (рис. 10б). Однак, як видно, ця спорідненість залишалась досить високою, що і дозволило припустити доцільність створення на основі мелітину та фрагментів імуномодуляторів гібридних молекул.

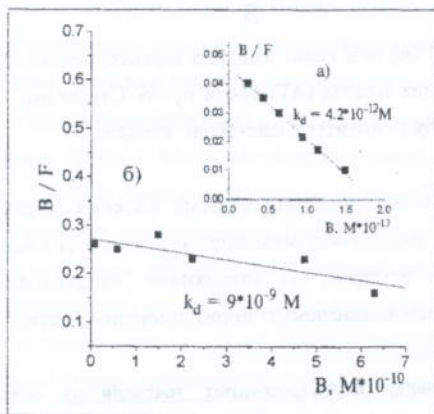


Рис. 10 Аналіз в координатах Скетчарда специфічного зв'язування ^{125}I -ІТ₈ з тимоцитами миші - а) та в присутності 3.3 мкМ мелітину - б). По осі абсцис - молярна концентрація ^{125}I -ІТ₈,

зв'язаного з тимоцитами; по осі ординат - відношення концентрацій зв'язаного та вільного ^{125}I -ІТ₈.

Такі молекули були синтезовані, і їх літичні властивості вже були розглянуті. Що стосується рецепторних властивостей, то ІТ-8, наприклад, у складі такого гібриду зберігав свої рецепторні властивості з $k_d = 1 \times 10^{-10} \text{M}$, тобто, мав досить високу спорідненість до свого рецептору, а фрагмент з інтерлейкіну зв'язувався дещо слабніше.

Висока афінність досліджуваних молекул до рецепторів на тимоцитах і відсутність такої у нативного мелітину дозволили припустити, що цитотоксичність гібридів проявиться при значно менших концентраціях, ніж у мелітину. Проте, токсичність химер по тесту з трипановим синім виявилась не тільки не вища, але навіть суттєво нижча. Так,

LD₅₀, яка відповідає концентрації пептидів, при якій спостерігається 50% загибель тимоцитів, для нативної молекули мелітину складала $5 \times 10^{-7} \text{M}$, а для химер близько $4 \times 10^{-6} \text{M}$. Але така концентрація виявляється літичною не тільки для тимоцитів, але і для будь-якого типу клітин, тобто мова йде про неспецифічний лізис. На перший погляд, в даному випадку не реалізується одна з головних вимог до біфункціональних переадресованих токсинів - їх висока токсичність до певного типу клітин-мішеней. Проте, такі результати можна було очікувати і далі пояснити, виходячи з запропонованої нами гіпотези про ступінь олігомеризації мелітину, яка необхідна для створення каналоподібної структури. Як було показано, пептид, який знаходиться у розчині в стані мономеру (а в даних умовах, наближених до фізіологічних, він є мономер), для проявлення своєї літичної дії повинен асоціювати як найменш до димеру. Низька ж концентрація химерних молекул забезпечує їх зв'язування з рецептором, але не дає змоги асоціювати на поверхні мембрани.

Можливо, подальший пошук експериментальних умов, які визначають димерну чи тетрамерну структуру мелітину, або синтез нових молекул з поліпшеними властивостями дозволять у майбутньому використовувати пептиди на основі мелітину як терапевтичні агенти. Адже, як свідчать отримані нами результати, синтетичні гібридні молекули CM-2 та M-IT₈ зберігають як літичну активність мелітину, так і високу афінність до своїх рецепторів з боку фрагментів імуномодуляторів.

ВИСНОВКИ

1. Досягнута висока ступінь очистки мелітину, позбавленого залишкової фосфоліпазної активності, завдяки використанню високоспецифічного імуносорбенту, створеного на основі моноклональних антитіл проти пептиду.

2. Вперше отримані прямі експериментальні докази того, що мелітин, взаємодіючи з модельною мембраною, розташовується в ній таким чином, що його основна антигенна детермінанта експонована в оточуюче середовище та може взаємодіяти з антитілами. Це пояснює високу імуногенність пептиду.

3. Показано, що зв'язування антигенної детермінанти мелітину з молекулою антитіла стає суттєвою перешкодою для вбудовування пептиду в мембрану та наступних процесів створення каналоподібних структур, злиття та фрагментації фосфоліпідного бішару.

4. Запропонована та обґрунтована гіпотеза про вплив первинного конформаційного стану пептиду на ступінь його агрегації в структурі пори, створеної в ліпідному бішарі мембран. Показана можливість існування двох форм (димер та тетрамер) мембранозв'язаного мелітину.

5. Проведено порівняльний аналіз літичної (по відношенню до ліпосом) та гемолітичної активності синтетичних похідних мелітину, що дозволяє досліджувати

взаємозв'язок між їх структурою та функцією. Показано, що величина та густина позитивного заряду на гідрофільній С-кінцевій частині молекули пептиду визначає ефективність взаємодії мелітину з мембраною.

6. Встановлено, що химерні біфункціональні молекули на основі мелітину та імуномодуляторів зберігають як літичну активність мелітину, так і високу афінність до свого рецептора з боку імуномодуляторів. Це робить можливим пошук та створення на їх основі терапевтичних агентів.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Костржевская Е.Г., Тарасенко А.С., Веклич Ю.И., Шербацкая Н.В. Определение антигенных детерминант мелиттина в модельной мембране // Укр. биохим. журн.- 1992.- 64, №1.- С. 22-29.

2. Тарасенко А.С., Костржевская Е.Г., Шербацкая Н.В. Взаимодействие мелиттина с модельной мембраною в присутствии антител // Укр. биохим. журн.- 1992.- 64, №4.- С. 29-33.

3. Костржевська О.Г., Тарасенко А.С., Курлянд Д.І., Шербацька Н.В., Петрина І.Д., акад. Терновий К.С. Вплив антитіл проти мелітину на його взаємодію з мембраною // ДАН України.- 1992.- 6.- С. 135-138.

4. Kostrzevska E.G., Veklich Yu.I., Shcherbatska N.V., Moskalenko A.S. (Tarasenko A.S.) Localization of antigenic determinants of melittin in model membrane // 20th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies: Abstr.- Budapest (Hungary).- 1990.- P. 287.

5. Tarasenko A., Kostrzhevska E., Navolotska E. Investigation of melittin-hybrids: binding with receptors of α -interferon and interleukin-2 of murine thymocytes // 16th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology: Abstr.- New Delhi (India).- 1994.- P. 216.

6. Petrina I., Tarasenko A. Analysis of interaction between melittin and model membranes by means of antibodies // 16th Internat. Congress of Biochem. & Molec. Biology: Abstr.- New Delhi (India).- 1994.- P. 422.

7. Тарасенко А.С., Костржевська О.Г., Петрина І.Д. Структурна організація мелітину в модельній мембрані // 1-й З'їзд Укр. біофіз. тов. -Тези.- Київ (Україна).- 1994.- С. 228-229.

8. Petrina I., Tarasenko A., Kostrzhevska E. The use liposomes for analysis of melittin properties in model membranes // W.Mejbaum-katzenellenbogen's Seminars in Molecular Biology: Abstr.- Wroclaw (Poland).- 1996.- P. 13.

9. Tarasenko A., Petrina I., Kostrzhevska E. Investigation of the aggregation state of melittin bound to phospholipid bilayer // W.Mejbaum-katzenellenbogen's Seminars in Molecular Biology: Abstr.- Wroclaw (Poland).- 1996.- P. 20.

Тарасенко А.С. Особливості взаємодії мелітину з модельними та природними мембранами.- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.- Інститут біохімії ім О.В.Палладіна НАН України, Київ, 1997.

Дисертацію присвячено дослідженню взаємодії літичного мембраноактивного пептиду мелітину з модельними та природними мембранами. Використання полі- та моноклональних антитіл проти мелітину дозволило вперше отримати прямі експериментальні докази, які пояснюють природу високої імуногенності цього пептиду: зв'язування з мембраною перетворює мелітин з розчинного антигену в клітинний з експонованою в водну фазу та здатну взаємодіяти з антитілами основною антигенною детермінантою. Встановлена залежність ступеня агрегації мембранозв'язаного мелітину та його синтетичних похідних від їх первинного конформаційного стану у розчині. Показана можливість існування двох форм пептиду (димер та тетрамер), зв'язаного з фосфоліпідним бішаром. Досліджені властивості гібридних молекул на основі мелітину та фрагментів імуномодуляторів - інтерлейкіну-2 та α_2 -інтерферону. Показана перспектива пошуку і створення на їх основі фармакологічних агентів цілеспрямованої дії, які мають як літичну активність мелітину, так і високу специфічність по відношенню до клітин-мішеней.

Ключові слова: пептид-ліпідні взаємодії, мелітин, ліпосома, біфункціональні переадресовані токсини.

Тарасенко А.С. Особенности взаимодействия мелиттина с модельными и природными мембранами.- Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия.- Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1997.

Диссертация посвящена изучению взаимодействия литического мембраноактивного пептида мелиттина с модельными и природными мембранами. Использование поли- и моноклональных антител против мелиттина позволило впервые получить прямые экспериментальные доказательства, объясняющие природу высокой иммуногенности этого пептида: связывание с мембраной превращает мелиттин из растворимого антигена в клеточный с экспонированной в водную фазу и способной взаимодействовать с антителами основной антигенной детерминантой. Установлена зависимость степени агрегации мембраносвязанного мелиттина и его синтетических производных от их первоначального конформационного состояния в растворе. Показана возможность существования двух форм пептида (димер и тетрамер), связанного с фосфолипидным бислоем. Исследованы свойства гибридных молекул на основе мелиттина и фрагментов иммуномодуляторов - интерлейкина-2 и α_2 -интерферона. Показана перспектива поиска и

создания на их основе фармакологических агентов целенаправленного действия, обладающих как литической активностью мелиттина, так и высокой специфичностью по отношению к клеткам-мишеням.

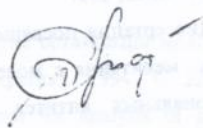
Ключевые слова: пептид-липидные взаимодействия, мелиттин, липосома, бифункциональные переадресованные токсины.

Tarasenko A. S. Peculiarities of the interaction of melittin with model and natural membranes.- Manuscript.

Thesis for a scientific degree of candidate of sciences by speciality 03.00.04 - biochemistry.- A.V. Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

The dissertation is devoted to the investigation of interaction of lytic membrane-active peptide melittin with model and natural membranes. Using poly- and monoclonal antibodies against melittin, the first direct experimental data explaining the nature of high immunogenicity of this small peptide were obtained. It was shown that the binding with membrane transforms melittin from soluble antigen to cellular one with main antigenic determinants exposed into aqueous phase and available to action of antibodies. The dependence of the aggregation state of melittin (and its synthetic derivatives) embedded into phospholipid bilayer on its primary conformational state in solution has been established. It was shown that membrane-bound peptide may exist in two different forms, which are dimer and tetramer. A special study focused on the possibility of the practical application of hybrid molecules based on melittin and fragment of immunomodulators (α_2 -interferon and interleukin-2) has been done. On the basis of obtained data, it was suggested that such molecules have prospects in developing the pharmacological agents possessing high specificity with respect to binding with specific target as well as cell lytic activity.

Key words: peptide-lipid interactions, melittin, liposome, bifunctional readdressed toxins.



Підписано до друку 24.09.97р. Формат 60х90/16.
Ум. друк. арк.1,0. Обл.-вид. арк. 0,8.
Наклад 100. Зам. 253.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

112 112 71

AB 38.578