

52. Whittaker V. P., Barker L. A. In: *Methods in Neurochemistry* (ed. R. Fried), M. Dekker, New York, 1972.
53. Dismukes R. K. *Behav. Brain Sci.*, v. 2, p. 409—448, 1979.
54. Boulton A. A. *Behav. Brain Sci.*, v. 2, p. 418, 1979.
55. Mackay W. P., Yates C. M., Wright A., Hamilton P., Davies P. J. *Neurochem.* v. 30, p. 841—848, 1978.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.25:[576.354.46+615.9]

БЕСКЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ НЕЙРОСЕКРЕЦИИ

ЛИШКО В. К., ТЕРЛЕЦКАЯ Я. Т., ГЕГЕЛАШВИЛИ Г. К.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Показана возможность моделирования процесса нейросекреции в бесклеточной системе, состоящей из очищенных фракций синаптических везикул, плазматических мембран синапсом и микромолярных концентраций Ca^{2+} . При исследовании эффекта латротоксина на такой бесклеточной системе установлено, что в среде без Ca^{2+} латротоксин вызывал слияние синаптических плазматических мембран с синаптическими везикулами и фосфатидилхолиновыми липосомами. Изучена зависимость скорости этого процесса от концентрации латротоксина. Фузогенный эффект латротоксина, связанного с синаптической мембраной, антитела к латротоксину не устраняли. Проведенные исследования позволяют предположить, что пресинаптический эффект латротоксина обусловлен не только его каналобразующими, но и фузогенными свойствами.

Согласно существующим представлениям, синаптическая передача нервного импульса осуществляется нейромедиаторами, которые высвобождаются из синаптических везикул слиянием с пресинаптической мембраной нервных окончаний. Процесс нейросекреции зависит от концентрации Ca^{2+} внутри синапсом и протекает по типу экзоцитоза. Механизм этот универсален для многих секреторных процессов, и общие закономерности его хорошо изучены [1, 2]. Однако до сих пор не известны ни молекулярные структуры, непосредственно принимающие участие в этом процессе, ни природа их взаимодействия. Поэтому необходимо более глубокое изучение взаимодействия отдельных компонентов механизма экзоцитоза *in vitro* в условиях моделирования. Такой методический подход расширяет экспериментальные возможности выяснения молекулярных механизмов нейросекреции.

Нами разработана система, состоящая из изолированных фрагмен-

тов плазматических мембран синапсом и синаптических везикул [3]. Показано, что эта модель может имитировать процесс выброса медиатора в синаптическую щель. На такой модели нейросекреции и были проведены исследования по выяснению пресинаптического эффекта α -латротоксина.

Материалы и методы

Фракции плазматических мембран синапсом и синаптических везикул получали, как описано ранее [3]. О слиянии синаптических везикул с фрагментами мембран судили по выходу радиоактивной метки $^{22}\text{Na}^+$ или $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул предварительно нагруженных. К суспензии синаптических везикул (1 мг белка/мл) добавляли $^{22}\text{Na}^+$ или $^{86}\text{Rb}^+$ ($5 \cdot 10^5$ имп/мин/мг белка) и инкубировали в течение 18—20 ч при 4° . Из суспензии нагруженных синаптических везикул во время эксперимента отбирали аликвоты (50—100 мкл) и к ним добавляли 9-кратный объем 5 мМ трис-HCl буфера, рН 7,4, содержащего 0,32 М сахарозу, 1 мМ ЭГТА, а также другие компоненты в зависимости от цели эксперимента. Через определенные промежутки времени аликвоты по 1 мл наносили на колонки с КМ-сефадексом G-25 (15×8 мм) и элюировали 0,5 мл используемого суспендирующего раствора при 22° [4]. При этом с катионообменником связывалась метка, локализованная во внешней среде, а элюат содержал синаптические везикулы с меткой, заключенной во внутреннем объеме. Радиоактивность измеряли на счетчике Delta 300 («Tracor Analytic», США) в сцинтилляционной жидкости ЖС-103. По убыли радиоактивности внутри везикул судили о количестве метки, вышедшей из синаптических везикул.

Концентрацию свободного Ca^{2+} в среде с ЭГТА определяли по методу Porzehl и соавт. [5]; концентрацию белка—по методу Markwell и соавт. [7], стандартную калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину.

Фосфатидилхолиновые липосомы диаметром около 10 нм получали методом обращенных фаз [6]. Для получения липосом с внутривезикулярной меткой изотопы $^{86}\text{Rb}^+$ ($5 \cdot 10^5$ имп/мин на 1 мл) вводили в буфер перед ультразвуковой обработкой. Экстравезикулярную метку удаляли гель-фильтрацией суспензии липосом на колонке с КМ-сефадексом С-25.

Латротоксин выделяли из цельного яда каракурта (*Latrodectus mactans tredescinguttatus*) на жидкостном хроматографе FPLC («Pharmacia», Швеция) на колонке Моно-Q элюцией 0,33 М NaCl. После рехроматографии был получен, по данным электрофореза в ПААГ и иммуноэлектрофореза, гомогенный белок с величиной M_r 130 кД.

Антисыворотку к латротоксину получали на кроликах повторными инъекциями латротоксина с адьювантом Фрейнда. Антилатротоксинные антитела получали методом высаливания сернокислым аммонием и характеризовали двойной иммунодиффузией по Оухтерлони и перекрестным иммуноэлектрофорезом. Титр препарата составлял 1:24.

Обработку синаптических мембран латротоксином проводили при 22° в течение 15 мин. При необходимости свободный латротоксин удаляли промыванием мембран 10-кратным объемом инкубационного раствора с последующим центрифугированием при 130000g, 30 мин.

Результаты и обсуждение

О процессе слияния синаптических везикул с мембранами синапсом судили по выходу радиоактивной метки, предварительно введенной во внутренний объем везикул. Как видно из данных, представленных на рис. 1, инкубация синаптических везикул с мембранами синапсом в среде без Ca^{2+} не оказывала влияния на выход $^{22}\text{Na}^+$. В то же время Ca^{2+} (10^{-4} М) инициировал взаимодействие синаптических везикул с

пресинаптической мембраной, что приводит к высвобождению содержимого везикул. Этот процесс зависит от концентрации Ca^{2+} ; так, при концентрации Ca^{2+} всего $5 \cdot 10^{-6}$ М наблюдали лишь полумаксимальный эффект (рис. 2). Приведенные результаты позволяют считать, что используемая модель имитирует процесс нейросекреции—*in vitro* происходило слияние синаптических везикул с фрагментами пресинаптической мембраны с одновременным выбросом содержимого везикул в среду.

Вызывало интерес изучение на данной модели механизма действия некоторых нейротоксинов, обладающих пресинаптическим действием. Среди них особое внимание привлекал латротоксин, который связывает-

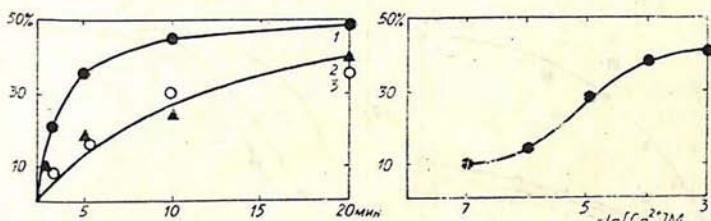


Рис. 1. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в зависимости от времени инкубации с мембранами синапсом. 1—везикулы, мембраны, 10^{-4} М Ca^{2+} , 2—то же в отсутствие Ca^{2+} , 3—везикулы, 10^{-4} М Ca^{2+} . В среде инкубации соотношение везикулы/мембрана 1:5 (по белку). По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

Рис. 2. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом в зависимости от концентрации Ca^{2+} . Соотношение в среде везикулы/мембрана 1:5 (по белку). Время инкубации 5 мин. По оси абсцисс—концентрация Ca^{2+} , по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

ся со специфическим рецептором на пресинаптической мембране [8] и стимулирует выход всех типов медиаторов [9]. Принято считать, что, присоединяясь к специфическому рецептору на пресинаптической мембране, латротоксин индуцирует вход Ca^{2+} в нервное окончание и таким образом стимулирует экзоцитоз—высвобождение нейромедиаторов. Однако экспериментально полученные данные не укладываются полностью в этот предполагаемый механизм нейротоксического эффекта латротоксина. Аналогичное действие латротоксина обнаруживается и в среде, не содержащей Ca^{2+} [10]. По-видимому, латротоксин усиливает процесс экзоцитоза не только благодаря своим ионофорным свойствам.

Действие латротоксина исследовали на предложенной нами бесклеточной модели нейросекреции. Было установлено, что латротоксин (10 нМ) в инкубационной среде, не содержащей Ca^{2+} , инициировал слияние синаптических везикул и мембран синапсом (рис. 3). Аналогичный результат был получен при наличии в среде одного лишь Ca^{2+} без латротоксина. При этом, как видно из рис. 3, латротоксин не оказывал

влияния на проницаемость синаптических везикул. Далее было установлено, что взаимодействие синаптических везикул и мембран синапсом зависит от концентрации латротоксина (рис. 4). При изучении этой зависимости в модельную систему вводили мембраны синапсом, обработанные латротоксином в разной концентрации. При этом обработку мембран проводили следующим образом. В одном случае весь латротоксин после предварительной инкубации с мембранами синапсом оставался в среде. При другом варианте удаляли ту часть латротоксина, которая, возможно, не связалась с мембранами синапсом. В обоих случаях, как следует из рис. 4, были получены практически одинаковые

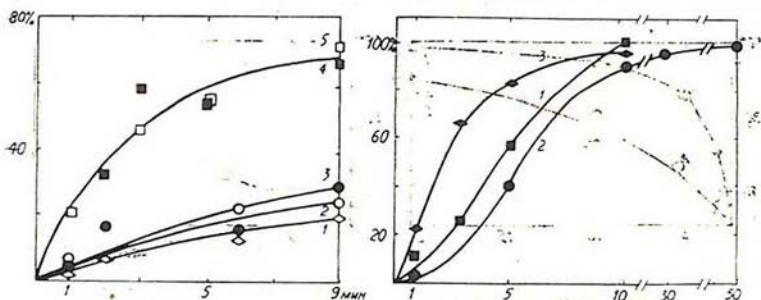


Рис. 3. Влияние латротоксина (10 нМ) на взаимодействие синаптических везикул и мембран синапсом. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул в среде, содержащей: 1—везикулы; 2—везикулы, мембраны; 3—везикулы, латротоксин; 4—везикулы, мембраны, латротоксин; 5—везикулы, мембраны, 10^{-4} М Ca^{2+} . По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ в %

Рис. 4. Зависимость взаимодействия синаптических везикул и мембран синапсом от концентрации латротоксина. Выход $^{22}\text{Na}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом, обработанных латротоксином в следующих условиях: 1—свободный латротоксин присутствует в среде; 2—свободный латротоксин удален; 3—обработка в присутствии 10^{-4} М Ca^{2+} ; после обработки свободный латротоксин и Ca^{2+} удалены. По оси абсцисс—концентрация латротоксина в нМ; по оси ординат—выход $^{22}\text{Na}^+$ в %

результаты. Полумаксимальный эффект взаимодействия мембранных структур достигался при концентрации латротоксина 5 нМ. В таких условиях введение Ca^{2+} в инкубационную среду не ускоряло процесса слияния. Однако, если обработку мембран латротоксином проводили в присутствии Ca^{2+} (10^{-4} М), полумаксимальный эффект латротоксина обнаруживается уже при концентрации 2,5 нМ, что свидетельствует об усилении связывания нейротоксина с мембранами синапсом.

Эти результаты указывают на то, что в осуществлении межмембранных взаимодействий участвует связанный с мембранами, а не свободный латротоксин. Такое предположение подтверждается результатами экспериментов, представленных на рис. 5. Обработанные латротоксином

(10 нМ), но не отмытые от несвязавшегося нейротоксина мембраны синапсом инкубировали с антителами против латротоксина в течение 20 мин при 22°, а затем использовали в модельной системе. Несмотря на такую обработку, эффект латротоксина проявлялся в полной мере, в то время как аналогичная обработка свободного латротоксина до инкубации с мембранами полностью ингибировала его действие. Поэтому представляется маловероятным участие свободного или адсорбированного на поверхности мембран латротоксина в инициации процесса слияния.

Интересно было выяснить, насколько специфичен обнаруженный фузогенный эффект латротоксина по отношению к синаптическим везикулам. Будет ли он проявляться, если вместо них в среду добавить липосомы?

На рис. 6 представлены данные, свидетельствующие о том, что

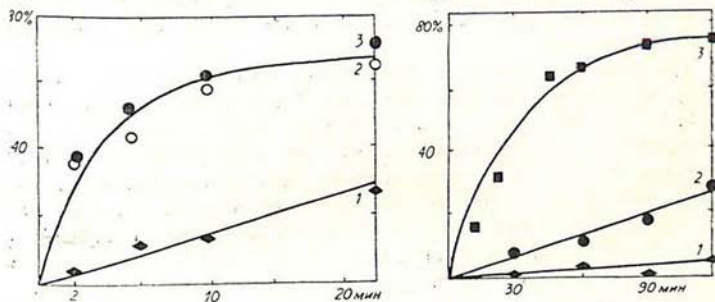


Рис. 5. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из синаптических везикул в присутствии мембран синапсом, обработанных: 1—латротоксином (10 нМ), предварительно проинкубированным с антителами к нему; 2—латротоксином; 3—латротоксином, а затем антителами к нему. По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ в %

Рис. 6. Взаимодействие фосфатидилхолиновых липосом с мембранами синапсом. Выход $^{86}\text{Rb}^+$ из липосом в среде, содержащей: 1—липосомы; 2—липосомы, мембраны синапсом; 3—липосомы, мембраны синапсом, обработанные латротоксином (10 нМ). По оси абсцисс—время в мин; по оси ординат—выход $^{86}\text{Rb}^+$ из липосом в %

в среде, не содержащей Ca^{2+} , нагруженные $^{86}\text{Rb}^+$ фосфатидилхолиновые липосомы активно взаимодействовали с мембранами синапсом, предварительно обработанными латротоксином. По-видимому, полипептидная часть латротоксина, проникающая через мембрану синапсом, имеет гидрофобную группировку, которая легко связывается с липидной мембраной липосом. Таким образом, латротоксин, встроенный в мембрану синапсом, придает ей способность взаимодействовать с другими мембранными структурами, как биологическими, так и искусственными.

На основании полученных нами экспериментальных данных на бесклеточной модели нейросекреции можно заключить, что латротоксин, помимо известной каналообразующей активности, обладает еще фузо-

генными свойствами. Именно фузогенной активностью латротоксина можно объяснить пресинаптический эффект его на нервных окончаниях в отсутствие Ca^{2+} . Обнаруженное новое свойство латротоксина в экспериментах с использованием бесклеточной модели нейросекреции расширяет методические подходы к выяснению механизма экзоцитоза и нейросекреции.

CELL-FREE MODEL OF NEUROSECRETION

LISHKO V. K., TERLETSKAYA YA. T., GEGELASHVILI G. K.

A. V. Palladin Institute of biochemistry Academy of Sciences,
Ukrainian SSR, Kiev

A cell-free model of neurosecretion consisting of purified fractions of synaptic vesicles, synaptic plasma membranes and micromolar amounts of Ca^{2+} is proposed.

The effect of latrotoxin—a protein of *Latrodectus mactans* *tredcinguttatus* venom—on this model was investigated. It was shown that in Ca^{2+} -free medium latrotoxin induced fusion of synaptic plasma membranes with synaptic vesicles as well as with phosphatidylcholine liposomes. The rate of this process versus latrotoxin concentration has been studied. It was established that effect of latrotoxin incorporated into synaptic membranes cannot be eliminated by latrotoxin antibodies. It was concluded that presynaptic effect of latrotoxin is due not to its channel-forming properties only but to fusogenic properties as well.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Burgoyne R. D. *Biochim. et biophys. acta*, v. 779, N2, p. 201—217, 1984.
2. Creutz C. E. *Metal Ions Biol. Syst.*, v. 17, p. 319—351, 1984.
3. Лшко В. К., Терлецкая Я. Т., Гегелашвили Г. К. *Биол. мембраны*, т. 3, № 2, с. 191—196, 1986.
4. Мудрак Н. Н., Колчинская Л. И., Лшко В. К. *Укр. биохим. журн.*, т. 55, № 2, с. 185—189, 1983.
5. Portzehl H., Caldwell P. C., Ruegg J. C. *Biochim. et biophys. acta*, v. 79, N3, p. 581—591, 1964.
6. Szoka E., Papahadjopoulos D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, N9, p. 4194—4198, 1978.
7. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert M. E. *Anal. Biochem.*, v. 87, N1, p. 206—210, 1978.
8. Scheer H., Meldolesi J. *EMBO J.*, v. 4, N2, p. 323—327, 1985.
9. Treng M. C., Cohen R. S., Siekevitz P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, N8, p. 4016—4020, 1978.
10. Hurlbut W. P., Ceccarelli B. *Adv. in Cytopharmacology* (eds. B. Ceccarelli, B. Clementi), Raven Press, N. Y., v. 3, p. 87—115, 1979.

Поступила 9. IX 1986