

РЕКОНСТРУКЦІЯ ІОННИХ КАНАЛІВ, УТВОРЕНИХ ПРОТЕЇНОВИМИ НЕЙРОТОКСИНАМИ У БІШАРОВИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАНАХ, ЯК ІНСТРУМЕНТ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ ЕКЗОЦИТОЗУ

О. Я. ШАТУРСЬКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Безпосередній транспорт неорганічних іонів та біомолекул через нативні мембрани, за допомогою специфічних протеїнів — іонних каналів, забезпечує функціонування низки важливих біохімічних процесів (деполяризація, вивільнення Ca^{2+} , екзоцитоз), що відбуваються у нервових або м'язових клітинах під час передачі збудження. Дослідження будови і іонпровідних властивостей утворених нейротоксинами каналів та впливу на них чинників, що також діють на нервово-м'язову передачу, відіграє особливу роль у разі вивчення патологій, які можуть виникати в нервових тканинах тварин унаслідок ураження нейротоксинами. Оскільки взаємодія протеїнових нейротоксинів отрути павука каракурта *Latrodectus tactans* (α -латротоксин, α - і δ -латроінсектотоксин) зі специфічними рецепторами плазмалеми хребетних або комах сприяє утворенню іонних каналів, що збільшує кальцієву проникність пресинаптичних закінчень і призводить до масового вивільнення нейромедіаторів із пресинаптичних везикул, основну увагу в огляді приділено реконструкції каналів цих латротоксинів. Роль реконструкції протеїнових каналів для визначення участі власне клітинних протеїнів у регуляції екзоцитозу хребетних розглядається на прикладі латротоксинподібного L-протеїну із цитоплазми нервових клітин мозку, який зв'язується з антитілами до α -латротоксину.

К л ю ч о в і с л о в а: безпосереднє транспортування Ca^{2+} , α -латротоксин, α -латроінсектотоксин, δ -латроінсектотоксин, латротоксинподібний протеїн, бішарові ліпідні мембрани.

Незважаючи на збільшення кількості нових нейротоксинів, одержаних за останні десятиріччя із отрути павука каракурта *Latrodectus tactans* [1, 2], найбільш вивченою компонентою цієї отрути залишається α -латротоксин (α -LT), який взаємодіє із нервово-м'язовими сполученнями та з синапсами центральної нервової системи ссавців, а також стимулює екзоцитоз у нейросекреторних клітинах і β -клітинах підшлункової залози. Дія α -LT на нервову систему реалізується двома шляхами: через формування у плазматичній мембрані катіонних каналів, які серед інших фізіологічно важливих іонів найбільш селективні до Ca^{2+} , а також через стимулювання масової нейросекреції в нервових терміналах усіх типів, незалежно від присутності Ca^{2+} в позаклітинному середовищі. Можливо, що останній шлях також опосередкований спроможністю α -LT до утворення каналів [1–3], тому від початку 80-х років попереднього сторіччя і дотепер реконструкція

α -LT залишається одним із ефективних методичних прийомів непрямого дослідження механізму його токсичної дії та впливу штучних або природних чинників (іонного складу середовища, що оточує мембрану, ліпідного складу бішару мембрани, температури, блокувальників безпосереднього транспортування іонів тощо) на процес інтоксикації шляхом каналоутворення.

Спорідненість структури і схожість фізіологічної дії α -LT на пресинаптичні мембрани хребетних з іншими протеїновими компонентами отрути каракурта, такими як α -латроінсектотоксин (α -LIT) та δ -латроінсектотоксин (δ -LIT) на збудливі мембрани комах [1, 2, 4], дозволяє ефективно використовувати і латроінсектотоксини як інструмент дослідження механізмів індукованої нейросекреції та процесів утворення і функціонування іонних каналів. Реконструкція зазначених нейротоксинів набуває особливої ваги, оскільки через обмежені відомості про

структуру складових іонних каналів дотепер залишаються нез'ясованими низка таких ключових моментів будови і функціонування окремих типів каналів: конформаційна перебудова розчинного протеїну у разі проникнення в ліпідний бішар мембрани і формування іонного каналу; структура водної порожнини каналів; регуляція переходу каналів між відкритими і закритими станами або станами низької провідності; визначення ролі каналів у процесах, пов'язаних із безпосереднім транспортуванням іонів і органічних молекул крізь біологічні мембрани і факторів впливу на утворення каналів та їхню іонну провідність. Причому використання саме плоских бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ) для реконституції іонних каналів дозволяє широко змінювати умови проведення експериментів з окремим типом каналів (що не завжди можливо під час роботи з нативними мембранами) шляхом створення особливих умов. Наприклад, таких як симетричність ліпідного складу і водно-сольового оточення по обидва боки ліпідного бішару, заданий склад мембрани, постійний мембранний потенціал, відсутність інших інтегральних протеїнів мембрани, що зменшують кількість неврахованих чинників впливу на об'єкти дослідження і індуковану ними провідність мембрани. Значення іонних каналів для біохімічних процесів, які залежать від пасивного транспортування речовин *in vivo*, підтверджується порівняльним аналізом властивостей каналів у штучних ліпідних бішарах із пасивним транспортом речовин та зв'язаними з ним процесами на різних рівнях структурної організації живих організмів.

Подібність етапів онтогенезу каналних протеїнів: додавання протеїну у водно-сольовий розчин оточуючий БЛМ (утворення протеїну усередині клітини) → вбудовування у мембрану → формування трансмембранного іонпровідного каналу, також дозволяє порівнювати дію схожих за іонпровідними властивостями каналів токсинів і власне клітинних протеїнів, реконструйованих у штучних мембранах. Тому для досліджень на бімолекулярних ліпідних мембранах застосовували і латротоксинподібний L-протеїн із цитоплазми нервових клітин мозку бика, що зв'язувався з антитілами проти α -LT, дію якого вже давно пов'язують з утворенням Ca^{2+} -селективних каналів у пресинаптичних закінченнях хребетних [5].

Треба відзначити, що за останні 10–15 років все більше уваги приділяється безпосередньому транспортуванню іонів через ка-

нали мембранних протеїнів АТР-аз [6, 7], відоміших як системи активного транспорту іонів [7] або АТР-залежні посередники злиття біологічних мембран [6, 8]. З огляду на те, що для L-протеїну також була показана АТР-азна активність [6], виявлення участі цього протеїну в пасивному транспорті Ca^{2+} через плазмалему нервової клітини і спонтанному вивільненні нейромедіаторів привертає особливу увагу. Мета огляду — розглянути механізми утворення і властивості реконструйованих каналів протеїнів, які можуть впливати на вивільнення нейромедіаторів, беручи за основу велику кількість експериментальних даних щодо участі іонних каналів у процесах екзоцитозу.

Загальні властивості каналоформуючих нейротоксинів із отрути павука каракурта *Latrodectus mactans* та водорозчинного L-протеїну нервових клітин мозку

Високоочищені препарати α -LT складаються із двох поліпептидів з молекулярною масою 8 і 130 кДа, високомолекулярний поліпептид є активною компонентою. Низькомолекулярна складова (8 кДа) не виявляє значної біологічної активності, хоча високоспецифічні до неї антитіла знижують надходження Ca^{2+} у синапсоми та вивільнення гальмівного нейромедіатору — γ -аміномасляної кислоти [9, 10]. Показано, що препарати рекомбінантного α -LT, без низькомолекулярного поліпептиду (8 кДа), не змінюють своєї біологічної активності, яка лишається ідентичною нативному α -LT [11]. Високомолекулярний поліпептид (130 кДа) складається із чотирьох основних доменів: сигнального пептиду, що відщеплюється; N-термінального консервативного домену з чотирма залишками цистеїну; основного домену із 22 повторів, гомологічних протеїну анкірину; короткого C-термінального домену. Заміна трьох цистеїнів на серин у N-термінальному домені призводить до втрати здатності α -LT зв'язуватися з рецептором. Рецептори α -LT загалом поділяються на групи Ca^{2+} -залежних і Ca^{2+} -незалежних рецепторів, до яких належать α - і β -нейрексини та латрофіліни відповідно. Зв'язок між N-термінальним доменом і доменом, який складається із повторів анкірину, має важливе значення для секреторної активності α -LT [11]. Стимуляція процесу нейросекреції за допомогою α -LT відбувається як Ca^{2+} -залежний і Ca^{2+} -незалежний процеси. Враховуючи переважну селективність каналів, утворених α -LT у ліпідному бішарі

мембран, на сьогодні загально визнаним є припущення, що Ca^{2+} -залежна стимуляція екзоцитозу відбувається внаслідок збільшення концентрації Ca^{2+} в цитозолі після надходження зовнішньоклітинного Ca^{2+} усередину клітини через канали α -LT. На підставі біохімічних досліджень також можна припустити, що α -LT сприяє вивільненню нейромедіаторів за відсутності Ca^{2+} в зовнішньому середовищі клітини [12]. Таким чином, зв'язування α -LT з мембранними рецепторами та формування каналного олігомера, який пронизує товщу ліпідного бішару мембрани, активують процеси екзоцитозу. Незважаючи на те, що α -LT може існувати у вигляді димера і тетрамера у водно-сольовому розчині, тільки тетрамер спроможний утворювати іонний канал у ліпідному бішарі плазматичної мембрани. У цьому разі, процес формування тетрамерного олігомеру залежить від присутності катіонів Ca^{2+} та Mg^{2+} в оточуючому середовищі. За даними криоелектронної мікроскопії асиметричний димер, який утворює половину тетрамера, складається з тих же доменів, що і тетрамер в дещо відмінній від молекули тетрамера відносній орієнтації, що свідчить про те, що формування тетрамера супроводжується конформаційними змінами четвертинної структури α -LT [1]. Молекулярна маса тетрамера дорівнює 520 кДа. Найважливішою особливістю тетрамера є наявність іонного каналу всередині, утвореного внаслідок зв'язування димерів. Діаметр отвору каналу складає 2,5 нм з одного боку та 1,0 нм з протилежного боку тетрамеру. Внутрішня порожнина каналу α -LT утворює розширення з діаметром 3,6 нм. Формування каналу α -LT відбувається як у нативній мембрані, після взаємодії з латрофіліновими або нейрексиновими рецепторами, так і в штучній мембрані, де зв'язування з ліпідним бішаром не потребує участі рецепторів. Процес Ca^{2+} -залежного і Ca^{2+} -незалежного вивільнення нейромедіаторів має місце після зв'язування α -LT з мембраною, тому можна вважати, що канал α -LT формується в ліпідному бішарі в обох випадках і, подібно зв'язуванню з рецепторами, також є ключовим в загальному механізмі токсичної дії, хоча деякі шляхи екзоцитозу, спровоковані α -LT, не потребують прямої участі його каналів [1–3, 13].

Іншими каналоформуючими складовими отрути каракурта протеїнової природи є латроінсектотоксини α - і δ -LIT, які утворюють іонпровідний канал та стимулюють вивільнення нейротрансмітерів із нервових

закінчень безхребетних [2,4]. Специфічність обох латроінсектотоксинів до нервових терміналей безхребетних пояснюється наявністю високоафінних рецепторів [2]. Згідно з існуючими даними [4] механізм пресинаптичної дії всіх каналоформуючих латротоксинів α -LT, α -LIT та δ -LIT схожий, хоча завдяки специфічним рецепторам α -LT не виявляє активності на нервових терміналях безхребетних, а латроінсектотоксини на збудливих мембранах хребетних. Наприклад, α -LIT не впливає на процес екзоцитозу у нервових закінченнях жаби у досить високій концентрації (50 нМ) в середовищі, але починає активувати масове збільшення виходу нейромедіаторів із моторних нервових закінчень м'ясної мухи вже у концентрації 4 нМ.

Недавно було ідентифіковано первинні структури обох латроінсектотоксинів [4, 14]. Показано, що α -LT і α -LIT є поліпептидами, які вміщують більше ніж 1300 амінокислот та мають близько 34% залишків ідентичних амінокислот. Досить значна відмінність амінокислотного складу і послідовностей α -LT і α -LIT виявлена у збагачених цистеїновими залишками ділянках, які належать домену з повторюваними послідовностями протеїну анкирину [4]. Молекулярна маса α -LIT становить приблизно 120 кДа, а δ -LIT – 130 кДа. Загальна будова δ -LIT схожа на інші латротоксини α -LT і α -LIT. Вона також вміщує чотири структурні домени: сигнальний пептид за яким розміщується N-термінальний домен, що має найвищу ступінь ідентичності з аналогічним доменом α -LT і α -LIT, центральна ділянка, яка складається з 15 повторів анкирину та C-термінального домену. Подібність доменної організації каналоформуючих латротоксинів α -LT, α -LIT та δ -LIT свідчить про їхню належність до спорідненого сімейства протеїнів. Показано, що рекомбінантний δ -LIT, який має повну довжину поліпептидного ланцюга, не виявляє токсичності, а іонні канали, сформовані ним у штучних мембранах, втрачають характерну селективність до іонів кальцію на відміну від нативного δ -LIT, з меншою молекулярною масою. Видалення C-термінального домену шляхом точкового мутагенезу повертає втрачену спроможність рекомбінантного протеїну спричинювати масове вивільнення нейромедіаторів та формувати Ca^{2+} -селективні канали в мембранах [4]. Можливо, що посттрансляційні зміни, яких зазнає α -LT, мають схожий характер, чим пояснюється менша молекулярна

маса виділеного із отрути токсину, порівняно з теоретичною, обчисленою за допомогою кДНК [3]. Висловлено припущення про можливість посттрансляційного процесингу і для продукту первинної трансляції α -LIT. Показано, що такі зміни можуть відбуватися в N- і C-термінальних доменах перед появою зрілої форми цього інсектотоксину [14].

Таким чином, очевидна спорідненість структури і схожа фізіологічна дія α -LT, α -LIT та δ -LIT на збудливі мембрани хребетних і безхребетних тварин дозволяє ефективно використовувати всі каналоформуючі латротоксини як інструмент для дослідження механізмів індукованої нейросекреції та процесів утворення і функціонування іонних каналів.

Для дослідження можливої ролі клітинних протеїнів у регуляції природного екзоцитозу шляхом каналоутворення, із цитоплазми нервових клітин мозку бика було виділено латротоксинподібний L-протеїн, що зв'язувався з антитілами проти α -LT. Вперше, L-протеїн був ідентифікований як нейрональний протеїн із подібними до α -LT епітопами за допомогою моноклональних антитіл проти α -LT із отрути павука каракурта. Потім його ідентифікували з використанням поліклональних антитіл до α -LT [5]. Показано, що цей водорозчинний протеїн (90 кДа) знаходиться в кортексі цитоплазми клітин головного мозку, має не тільки структурну подібність до α -LT, але і характерні для α -LT властивості, які можливо дозволяють йому брати участь у процесі синаптичної передачі. Відомо, що процес хімічної синаптичної передачі є основною формою міжклітинного сполучення в нервовій системі. Вивільнення нейромедіаторів відбувається внаслідок регульованого екзоцитозу у відповідь на підвищення концентрації Ca^{2+} в клітині. Цей процес є результатом низки рухових реакцій синаптичних везикул, які опосередковані узгодженою роботою багатьох протеїнів. За даними літератури відомо, що в пресинаптичному закінченні існує велика кількість протеїнів, які виконують роль посередників у процесі злиття мембран [8, 15–17]. Ці протеїни належать до так званої родини AAA АТР-аз-NSF, що зумовлюють злиття мембран синаптичних везикул із плазматичними мембранами. Існує також окремий протеїн р97 — посередник злиття мембран в апараті Гольджі і ендоплазматичному ретикулумі та деякі інші [8]. Їхня основна роль полягає в тому, що вони забезпечують дисоціацію протеїнового комплексу SNARE, який зв'язує мембрани синаптичних везикул

із пресинаптичними мембранами в активній зоні, наближаючи їх одну до одної так, щоб в умовах усунення запобіжного механізму могло б відбутися їхнє спонтанне злиття [18]. Проведені з L-протеїном дослідження свідчать, що він може бути ще одним посередником злиття мембран. L-Протеїн підвищував АТР-ініційоване злиття мембран синаптичних везикул [6] і це можна пояснити тим, що злиття протеїнового комплексу, який формується між синаптичними везикулами, дещо відрізняється за структурою від комплексу злиття активної зони [19]. Імовірно, що це є визначальним для здатності L-протеїну активувати злиття мембран. Наявність фузогенної активності L-протеїну цілком збігається з виявленою раніше здатністю α -LT до активації процесу злиття штучних ліпідних мембран [20].

Показано, що L-протеїну притаманна АТР-азна активність, характерна для протеїнів AAA родини АТР-аз, які згідно з аббревіатурою, пов'язані з різноманітними типами клітинної активності [6]. L-протеїн здатний викликати злиття переважно гомотипових мембран. Ця його функція може модулюватися процесами фосфорилування—дефосфорилування та зміною рН середовища. Як відомо з даних літератури, саме цими факторами модулюється функціональна активність синаптичних протеїнів [6, 21]. Таким чином, одержані результати свідчать про те, що L-протеїн може змінювати свою активність за рахунок ендогенних модуляторних факторів за тих самих умов, за яких модулюється функціонування інших протеїнів активної зони.

Беручи до уваги подібність L-протеїну до α -LT, було зроблено припущення, що L-протеїн також може впливати на процес трансмембранного транспортування Ca^{2+} , що у разі з α -LT зумовлює масове вивільнення нейромедіаторів. На експериментальній моделі Ca^{2+} -каналів L- і Р-типу було показано, що L-протеїн дійсно впливає на роботу Ca^{2+} -каналів, причому його дія на Р-тип більш специфічна порівняно з L-типом [22]. Завдяки впливу L-протеїну на Ca^{2+} -канали активної зони пресинаптичного закінчення, L-протеїн має ще один додатковий шлях активації спонтанного вивільнення нейромедіатору. Аплікація L-протеїну призводила до майже 10-кратного зростання частоти спонтанних постсинаптичних відповідей. Подібність структури та низки властивостей L-протеїну і α -LT дозволяє зробити припущення, що вплив L-протеїну відбувається за рахунок механізмів, які опосередковують дію α -LT такими шляха-

ми: 1 — зв'язування з високоспецифічними α -LT рецепторами — нейрексином і латрофіліном [23, 24]; 2 — безпосередній вплив на злиття синаптичних везикул; 3 — формування катіон-селективних пор у плазматичній мембрані. Для перевірки цього припущення було використано реконструкцію очищеного L-протеїну на штучних ліпідних мембранах [5].

Механізм дії латротоксинів та латротоксинподібного L-протеїну

Оскільки в основу токсичної дії α -LT покладена стимуляція процесу екзоцитозу нервової клітини хребетних тварин, можна окремо виділити два основних напрями її реалізації: Ca^{2+} -залежна і Ca^{2+} -незалежна стимуляція нейросекреції. Причому досить переконливим вважається припущення, що обидва шляхи є наслідком роботи різних механізмів активації секреції нейромедіаторів у нервових закінченнях.

Відомо, що в середовищі, що містить Ca^{2+} спостерігається значне збільшення надходження Ca^{2+} усередину клітини внаслідок взаємодії α -LT із пресинаптичною мембраною нервових терміналей. Ця властивість α -LT є настільки характерною, що іноді її навіть використовують як тест під час виділення α -LT із суміші протеїнів суцільної отрути каракурта [25].

На сьогодні досить переконливим вважається припущення, що стимуляція екзоцитозу і формування α -LT каналу в збудливих мембранах є наслідком взаємодії токсину з мембранним рецептором. Виділяють два основних типи рецепторів: Ca^{2+} -залежні, до яких належать нейрексини, що експресовані переважно в первинних тканинах, і Ca^{2+} -незалежні рецептори, серед яких ідентифіковано два латрофіліни, які експресовані не тільки в нервовій тканині, але також і в мозку, серці, нирках та селезінці. Отже, α -LT виявився єдиним токсином, для якого на одній клітині можуть існувати два типи рецепторів, які різняться за структурою і функціями. Для пояснення цього феномену припускають, що характер відповіді на вплив α -LT лімітується густиною рецепторів на нервовій терміналі або на плазмалемі нейроендокринних клітин. Так, наприклад, клітини РС 12 (лінія клітин, що походять від пухлини хромафінної тканини мозкової речовини надниркової залози) вміщують ендogenousний рецептор α -LT — латрофілін, але кількість таких рецепторів недостатня для відповіді на низькі концентрації токсину. Натомість, збільшення кількості будь-якого рецептора (нейрексина чи латрофіліна) призводить до підвищення

інтенсивності відповіді клітини-мішені на взаємодію α -LT з рецептором. В обох випадках, для Ca^{2+} -залежного і Ca^{2+} -незалежного шляхів, α -LT індукує вивільнення нейромедіатору із багатьох (а можливо і усіх) типів синапсів хребетних [26, 27]. Стимульований дією токсину екзоцитоз зумовлює значне виснаження вмісту синаптичних везикул і блокування нервово-м'язової передачі [29]. Зважаючи на те, що α -LT не має фосфоліпазної або протеолітичної активності, його токсичну дію неможливо пояснити неспецифічними ушкодженнями структури мембран. Таким чином, механізм токсичної дії α -LT в основному можна вважати лише результатом високоспецифічної взаємодії зі збудливими мембранами нервових закінчень, яка відбувається завдяки зв'язуванню токсину з мембранними рецепторами з наступним його вбудовуванням у мембрану. В умовах блокування останнього етапу здатність α -LT формувати канал не реалізується [3].

Було показано, що підвищення Ca^{2+} -провідності мембрани нервової клітини, індуковане α -LT, відрізняється від роботи ендogenousних Ca^{2+} -каналів збудливих мембран [2, 3]. Вхід Ca^{2+} усередину клітини-мішені не інгібувався жодним із відомих блокаторів Ca^{2+} -каналів. Крім того, відомо, що також може бути неопосередкований вхід Ca^{2+} шляхом взаємодії з рецептором [3]. У зв'язку з цим припускається можливість існування альтернативних механізмів транспортування Ca^{2+} у клітини під дією α -LT.

Більшість дослідників вважають, що вхід Ca^{2+} відбувається через канал, утворений α -LT у клітинній мембрані [3], хоча спорідненість α -LT до мембран у цьому разі недостатня для того, щоб взяти її до уваги у разі пояснення фізіологічної дії токсину без участі специфічних рецепторів. Тому були зроблені навіть припущення про існування спеціального типу ще досі невідомих каналів, що активуються α -LT, і значно відрізняються від уже відомих Na^+ - або Ca^{2+} -каналів.

Можливо, що α -LT здатний зумовлювати спонтанне вивільнення нейромедіатору шляхом взаємодії з Ca^{2+} -каналами N- або L- і P-типів, експресованих у збудливих мембранах [22, 29], минаючи основний шлях, опосередкований формуванням α -LT каналів. Припускається також існування комбінованої дії α -LT, яка спричинює вхід Ca^{2+} в нерве закінчення через утворення цим протеїном іонних каналів та одночасну активацію верапаміл- і Ca^{2+} -чутливих каналів клітин-мішеней [2, 3]. Надходження Ca^{2+} у клітину

зумовлює каскад протеїн-протеїнових взаємодій, що приводять до активації транспортування синаптичних везикул до пресинаптичної мембрани, «причалування» везикул до неї і наступне злиття, в процесі якого вміст везикул вивільняється у пресинаптичну щілину. Транспортування везикул до пресинаптичної мембрани відбувається завдяки везикулярним протеїнам, які називаються синапсинами. Залежне від Ca^{2+} фосфорилування синапсинів зменшує спорідненість цих протеїнів до актину і вивільнення везикул із цитоскелета. Крім синапсинів до фосфопроїнів також належать протеїни-рецептори, які формують фузогенний комплекс і розміщуються на мембранах синаптичних везикул і пресинаптичних закінчень. До протеїнів-рецепторів належать протеїн синаптичних везикул синаптобrevін і асоційований із синаптосомами протеїн плазмалемі SNAP-25, з молекулярною масою 25 кДа. Показано, що фосфорилування синаптобrevіну і SNAP-25 має регуляторний вплив на процес злиття везикул із плазмалею [30, 31]. Висловлено припущення, що рівень фосфорилування нейрональних протеїнів може бути модулятором екзоцитозу, індукованого α -LT, хоча не виключена можливість існування альтернативних механізмів реалізації цього процесу [3].

Механізм Ca^{2+} -незалежного стимулювання нейросекреції α -LT є найбільш суперечливим. Вважається, що α -LT у безкальцієвому середовищі також може активувати злиття синаптичних везикул із плазмалею, що зумовлює вивільнення нейромедіаторів. На основі біохімічних досліджень, автори висловили припущення, що α -LT у відсутності Ca^{2+} сприяє екзоцитозу нейромедіаторів із цитозольного пулу, а не із синаптичних везикул. Вивільнення нейромедіаторів із цитозолу може відбуватися внаслідок зміни напрямку їхнього транспортування Na^+ -залежним переносником [32] або через неселективні канали у плазматичній мембрані нервових клітин, формування яких спостерігалось під час трансфекції латрофіліном клітин лінії COS, що походять від клітин із нирок африканської зеленої мавпи [33]. Було також показано, що α -LT значно менше стимулює нейросекрецію в безкальцієвому середовищі. Крім того, Ca^{2+} -незалежний ефект α -LT, на відміну від Ca^{2+} -залежного, нечутливий до дії ботулінових і правцевого токсинів, що ставить під сумнів можливість вивільнення нейромедіатору із синаптичних везикул [3, 32, 33]. На сьогодні, беручи до уваги наявність Ca^{2+} -залежного і Ca^{2+} -

незалежного шляхів стимуляції нейросекреції α -LT, важко зробити остаточний висновок щодо того, чи реалізується цей механізм незалежно від присутності Ca^{2+} в середовищі або ж надходження Ca^{2+} усередину нервової клітини (під дією токсину) активує сигнальний каскад, що спричиняє подальший розвиток токсичної дії α -LT альтернативним шляхом. Залишається відкритим також питання подібності і відмінності між механізмом дії токсину і механізмом, який ініціюється Ca^{2+} , що надходить у синаптосоми через потенціалозалежні кальцієві канали. Було показано, що канали, утворені α -LT в плоских бішарових мембранах, за своїми основними іонпровідними властивостями, такими як потенціалозалежність транспортування іонів і переважна селективність до Ca^{2+} серед інших фізіологічно важливих іонів, схожі на потенціалозалежні Ca^{2+} -канали збудливих мембран [2, 3]. Тому досить вірогідним вважається припущення, що α -LT спроможний сам виконувати функції каналу, через який відбувається специфічний транспорт Ca^{2+} усередину нервової клітини. Беручи до уваги, що за відсутності Ca^{2+} у середовищі, реконструйовані в ліпідних бішарах канали α -LT лишаються ідеально селективними до катіонів, порівняно з аніонами, а також переважно селективними до K^+ , порівняно з іншими одновалентними катіонами [2, 3], можна припустити, що в умовах відсутності Ca^{2+} в зовнішньоклітинному середовищі, канал α -LT пропускає струм одновалентних катіонів, які можуть спричинювати вивільнення внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Цей Ca^{2+} стимулює наступні нейросекреторні процеси у такий самий спосіб, як і у разі, коли Ca^{2+} надходить у клітину через канал, утворений α -LT.

За допомогою експериментів з α -LT, реконструйованим у штучних ліпідних мембранах, було показано, що дія цього токсину в безкальцієвому середовищі може реалізовуватись за зовсім іншим, несхожим на відомі механізми, пов'язаним із фузогенними властивостями α -LT [20]. Відомо, що каналний олігомер α -LT вбудовується в ліпідний бішар орієнтовано. Цим деякі дослідники пояснюють специфічний вплив фузогенного, тобто проникаючого на певний бік мембрани сайту токсину, зв'язаного з мембраною [20]. Тому є всі підстави припустити, що під час вбудовування α -LT у нативну мембрану частина його молекули може проникати усередину нервового закінчення і приводити до злиття синаптичних везикул із плазмалею без участі Ca^{2+} . Останнє припущення підтверджується

даними щодо досить високої фузогенної активності латротоксинподібного L-протеїну, одержаного із мозку бика, який вважається схожим на α -LT за структурою та функціями [22]. Для пояснення фузогенної дії α -LT використовують сталкерний механізм утворення триламінної структури, який базується на тому, що токсин, вбудований в мембрану може призводити до локальних дефектів у матриксі її ліпідного бішару. Водночас, відбувається розрив одного із моношарів мембрани і його внутрішня гідрофобна фаза експонується у водне середовище навколо мембрани. Потім, коли дефекти зникають, між бішарами взаємодіючих мембран утворюється так званий «сталк», із якого формується спільна для цих мембран триламінна структура. Наступне руйнування проміжного моношару спричинює злиття мембран. Можна припустити, що під час вбудовування α -LT у мембрану везикули зливаються із плазматичною мембраною за рахунок проникнення в них частини мембранозв'язаного олігомера токсину, яка виступає за товщу мембрани усередину нервової клітини, що полегшує утворення контакту між взаємодіючими поверхнями мембран.

Відомо, що крім α -LT отрута павука каракурта вміщує ще два каналоформуючі латротоксини, α -LIT і δ -LIT, які схожі за структурою та функціями з α -LT [4, 14]. На відміну від α -LT, обидва латроінсектотоксини вражають нервові закінчення безхребетних [2,4]. Зв'язування міченого препарату α -LIT з нервовими тканинами комах описується кривою насичення Ленгмюра і є високоспецифічним [2]. α -LIT спричинює підвищення частоти мініатюрних збудливих постсинаптичних потенціалів у нервових закінченнях личинки м'ясної мухи *Callipora vicina* в кількості лише 4 нМ, тоді як введення α -LIT у концентрації 50 нМ зовсім не впливає на процес вивільнення нейромедіатору із нервових закінчень жаби. Подібно до α -LT, стимуляція екзоцитозу α -LIT є наслідком його взаємодії з мембранними рецепторами з подальшим включенням у мембрану. Блокування процесу вбудовування α -LIT у мембрану за допомогою попередньої обробки препарату токсину конкаваліном А робило повністю неможливим як пресинаптичний ефект α -LIT, так і його зв'язування зі збудливими мембранами комах. Наявність Ca^{2+} -залежного шляху екзоцитозу, індукованого α -LIT, було підтверджено експериментами, в яких вивільнення нейромедіатору під впливом α -LIT залежало від присутності Ca^{2+} у зовнішньоклітинному

середовищі, тоді як саме зв'язування α -LIT з мембраною не обов'язково потребувало присутності Ca^{2+} . На користь існування альтернативного Ca^{2+} -незалежного шляху активації α -LIT-вивільнення нейромедіаторів у нервових закінченнях комах свідчать експерименти, в яких екзоцитоз, індукований цим токсином, відбувався в безкальцієвому середовищі [2]. Таким чином, можна вважати, що феномен токсичної дії α -LIT на збудливих мембранах комах загалом схожий з дією α -LT на пресинаптичних мембранах хребетних. Тканинну специфічність α -LT і α -LIT можна пояснити розбіжностями у структурі рецепторів цих токсинів у нервових закінченнях хребетних і безхребетних тварин [2, 3, 14].

Експерименти із клонування і структурний аналіз δ -LIT підтвердили наявність у нього структурних доменів, подібних до α -LT і α -LIT, що разом зі схожою первинною послідовністю цих каналоформуючих протеїнів дозволило дослідникам передбачити токсичний ефект δ -LIT схожий з α -LT і α -LIT [3]. Причому нативний і рекомбінантний δ -LIT зумовлювали спонтанне вивільнення нейромедіаторів у кальцієвому і безкальцієвому середовищах, хоча підвищення частоти мініатюрних постсинаптичних потенціалів у відповідь на введення δ -LIT у безкальцієвому середовищі було нижче, порівняно з таким у середовищі з Ca^{2+} . Таким чином, ці експерименти дають можливість припустити існування альтернативних джерел і шляхів екзоцитозу, індукованого δ -LIT, подібно тим, які описано для α -LT [3].

Порівняльний аналіз даних, одержаних після реконструкції δ -LIT (ізолюваного з цільної отрути каракурта) у нативних і штучних мембранах, дозволяє зробити висновок, що внаслідок взаємодії цього токсину з мембраною утворюються трансмембранні каналні олігомери, які є переважно селективними до Ca^{2+} . У відсутності Ca^{2+} в середовищі утворені δ -LIT канали можуть проводити струм одновалентних катіонів. Канали, утворені δ -LIT, подібно до каналів α -LT, також виявляли залежність від мембранного потенціалу і вбудовувались у матрикс ліпідного бішару орієнтовано [4], що дозволило припустити участь δ -LIT не тільки в процесах Ca^{2+} -залежного екзоцитозу, індукованого транспортуванням катіонів через канал δ -LIT, але також і в альтернативному фузогенному механізмі [20].

Ще одним протеїном, який має структурну і функціональну подібність до α -LT, визнано латротоксинподібний L-протеїн, експресований в цитоплазмі нервових клітин хребетних

[22]. З огляду на це, було зроблено припущення, що L-протеїн здатний здійснювати екзоцитоз через Ca^{2+} -залежний шлях, характерний для α -LT. Оскільки активація ендogenous Ca^{2+} -каналів вважається одним із можливих механізмів реалізації Ca^{2+} -залежного екзоцитозу, індукованого α -LT, було досліджено вплив L-протеїну на P- і L-типи Ca^{2+} -каналів збудливих мембран щура [34]. Показано, що L-протеїн дійсно впливає на роботу Ca^{2+} -каналів. Аплікація L-протеїну зумовила значне зростання частоти спонтанної активності і збільшення амплітуди Ca^{2+} -струмів. Це дозволило припустити, що L-протеїн може впливати на спонтанне вивільнення нейромедіатора із пресинаптичного закінчення завдяки дії на Ca^{2+} -канали активної зони екзоцитозу. Таким чином, одержані результати підтвердили гіпотезу щодо впливу L-протеїну на екзоцитоз за механізмами, що опосередковують дію α -LT [35]. Подібно до α -LT, L-протеїн також збільшує частоту та амплітуду мініатюрних потенціалів кінцевої платівки [34]. Серед інших механізмів, за рахунок яких L-протеїн може впливати на екзоцитоз, відзначено дію цього протеїну через високоспецифічні рецептори α -LT — нейрексин та латрофілін [23, 24] шляхом формування катіонселективних каналів у плазматичній мембрані [36, 37] та за рахунок злиття синаптичних везикул із плазмалемою [38, 39]. Останній шлях може реалізовуватися за допомогою фузогенного механізму, описаного для α -LT [20].

На відміну від α -LT, для L-протеїну характерною є АТР-азна активність, величина якої дорівнює 6 мкмоль Р/год на 1 мг протеїну [6, 22]. Було показано, що L-протеїн належить до родини AAA АТР-аз — протеїнів, які спроможні опосередковувати злиття мембран синаптичних везикул із плазматичними мембранами. Активність цього процесу регулюється такими факторами як фосфорилювання L-протеїну та зміна рН середовища інкубації [22].

Дослідження іонних каналів нейротоксинів пресинаптичної дії і L-протеїну та їхньої можливої ролі в екзоцитозі за допомогою реконструкції у штучних ліпідних бішарах

Дія нейротоксинів із отрути павука каракурта *Latrodectus mactans tadeicimguttatus* може бути пов'язаною з утворенням катіонселективних каналів в збудливих мембранах безхребетних і хребетних тварин, тому для перевірки цього припущення і визначення впливу низки фізіологічно важливих

факторів на вбудовування та функціонування іонпровідних каналів цих токсинів було досліджено їхню взаємодію із штучними ліпідними бішарами [1, 2]. З огляду на те, що утворення Ca^{2+} -каналів у ліпідному бішарі нервової клітини є одним із необхідних етапів, які передують природному та індукованому токсинами екзоцитозу, особливий інтерес викликає дослідження іонселективних властивостей реконструйованих у штучних мембранах каналів латротоксинів і L-протеїну. Для цього більшість дослідників використовує пласку бімолекулярну ліпідну мембрану — БЛМ, яка є простою й інформативною технікою визначення властивостей каналоформуючих протеїнів. Під час дослідження взаємодії з очищеними каналоформерами часто використовують БЛМ, сформовані з розчину фосфатидилхоліну у суміші з холестеролом. Суміш ліпідів розчиняють у неполярному розчиннику, наприклад у декані або н-гептані, а потім наносять на отвір діаметром 0,18–0,60 мм у тefлоновій або делриновій склянці, розміщеній у комірці із скла чи плексигласу [40]. Крім зазначеного типу БЛМ дослідники також використовують так звану «суху» БЛМ, сформовану за методом [41] із двох ліпідних моношарів по різні боки отвору склянки. Для запобігання ефекту поляризації у водно-сольових розчинах провідність мембрани вимірюють хлор-срібними електродами, які занурені у водний розчин 2М КСІ з агаровими містками, розміщеними з різних боків БЛМ. Потенціал зовні тefлонової або делринової склянки (цис-сторона) зазвичай задається відносно потенціалу внутрішнього об'єму (транс-сторона), який приймають рівним віртуальному 0 мВ [40]. Для досліджень фузогенних властивостей α -LT та L-протеїну також використовують штучний бішар ліпосом, що утворюються шляхом обробки ультразвуком або пропусканням суміші ліпідів через мембранні фільтри з певним розміром шпарин, що зумовлює уніфікований розмір одержаних на ньому ліпосом [22].

Фактори впливу на вбудовування іонних каналів у пласких бішарових мембранах. Показано, що після введення нейротоксинів або L-протеїну в цис-відділення комірки з мембраною спостерігалось ступінчасте зростання провідності БЛМ, яке свідчить про утворення поодиноких іонпровідних каналів у ліпідному бішарі мембрани. Реконструкція поодиноких каналів показала спроможність цих протеїнів утворювати канали різної провідності під час взаємодії з ліпідним бішаром біологічної мемб-

рани. Причому двовалентні катіони значно прискорюють підвищення трансмембранного струму для усіх зазначених протеїнів переважно за рахунок збільшення швидкості вбудовування каналів. Отже, впливом двовалентних катіонів на каналоутворення можна пояснити Ca^{2+} -залежність пресинаптичного ефекту α -LT і α -LIT [2, 3], а також подібність L-протеїну до α -LT, що як і α -LT зазнавав активуючого впливу Ca^{2+} і інших двовалентних катіонів на каналоутворення, починаючи з 1 мМ [5].

Іншим фактором, який міг впливати як на швидкість вбудовування поодиноких каналів, так і на їхню провідність, є мембранний потенціал. Незважаючи на досить близьку структурну і функціональну спорідненість каналоформуючих латротоксинів, лише α -LT піддавався впливу потенціалу, суттєво збільшуючи швидкість каналоутворення за його позитивних значень, тоді як вбудовування α -LIT і δ -LIT майже не залежало від величини та знака потенціалу. Те, що частота каналоутворення α -LT в БЛМ залежала від прикладеного до мембрани потенціалу, дало змогу припустити існування позитивно заряджених груп у трансмембранному домені його каналного олігомеру, від яких залежить процес вбудовування в БЛМ [4, 42].

На відміну від латротоксинових каналів, вбудовування каналів L-протеїну було активнішим при негативних потенціалах, прикладених з боку додавання L-протеїну до мембрани. Аналіз впливу знака мембранного потенціалу на вбудовування каналів α -LT і L-протеїну дозволяє вважати, що потенціал спокою збудливої мембрани може полегшувати утворення каналів α -LT із зовнішньої, а для L-протеїну із внутрішньої сторони нервової клітини, що цілком відповідає природному розташуванню цих протеїнів перед утворенням іонпровідних каналів [5].

Серед факторів, що виявляють значний вплив на швидкість процесу утворення іонних каналів для всіх латротоксинів, крім наявності двовалентних катіонів (Ca^{2+} , Mg^{2+}), можна виділити концентрацію протеїну в середовищі, що оточує мембрану. Результати титрування БЛМ різними концентраціями α -LT і α -LIT дозволяють припустити, що адсорбція цих протеїнів на поверхні бішару подвоює ступінь їхньої агрегації порівняно з існуючою у водно-сольовому розчині [43]. З огляду на те, що іонпровідний олігомер α -LT утворюється тетрамером [1], а також враховуючи високу гомологічність структур α -LT, α -LIT і δ -LIT [1, 2] і те, що всі ці протеїни спроможні

створювати в розчині асоціати у вигляді димерів і тетрамерів, можна зробити висновок, що іонпровідні канали латротоксинів утворюються завдяки агрегації димерів у матриксі ліпідного бішару в тетрамер. Відзначений вище активуючий вплив двовалентних катіонів з боку додавання латротоксинів на швидкість утворення іонних каналів [1, 2, 43] можна пояснити прискоренням процесу формування іонпровідного тетрамеру в ліпідному матриксі мембрани із непровідних мембранозв'язаних димерів.

Фактори впливу на іонпровідні властивості реконструйованих каналів. Відомо, що механізм дії багатьох каналоформуючих токсинів залежить від іонпровідних властивостей каналів, утворених цими токсинами в плазматичній мембрані клітин-мішеней. Тому наступним етапом досліджень після реконструкції іонпровідних каналів у ліпідному бішарі є визначення їхніх властивостей під час безпосереднього транспортування іонів за різних факторів середовища і штучних чинників впливу.

Провідність каналів, реконструйованих в БЛМ, підвищувалась у разі збільшення температури в комірці з мембраною. Енергія активації (E_a) провідності каналів α -LIT у розчині 100 мМ KCl ($18,90 \pm 2,11$ кДж/моль), була менше ніж у розчині 10 мМ CaCl_2 ($28,537 \pm 1,678$ кДж/моль) [42]. Можливо, що різниця між E_a провідностей каналів α -LIT в зазначених розчинах є результатом більшої специфічності цих каналів до іонів кальцію. Крім цього, зростання E_a в розчині CaCl_2 можна пояснити впливом розміру каналу, утвореного α -LIT, на проходження через нього іонів більшого гідродинамічного радіуса. Треба відзначити, що E_a провідності α -LIT каналів у розчині 10 мМ CaCl_2 також вища за ту, що була визначена для провідності α -LT каналів в аналогічних умовах, що добре узгоджується з даними про меншу провідність α -LIT каналів і, можливо, є наслідком їхнього меншого розміру або різної будови каналних люменів. E_a необхідні для транспортування Ca^{2+} через α -LT і L-протеїнові канали в БЛМ мало відрізняються одна від одної, що може свідчити про схожі розміри отворів і переважну вибірковість цих каналів до Ca^{2+} [44].

Усі досліджені латротоксини та L-протеїн утворюють потенціалозалежні канали в БЛМ, що свідчить про орієнтоване вбудовування цих протеїнів у ліпідний бішар мембрани [5, 42, 43]. Оскільки потенціалозалежність трансмембранного струму виражалась у тому,

що при позитивних мембранних потенціалах з боку додавання токсину канали, утворені α -LT, α -LIT і δ -LIT, проводили більше струму, ніж у разі негативних, можна вважати, що потенціал спокою нервової клітини може впливати не тільки на вбудовування, але і на функціонування каналів латротоксинів, сприяючи вхідному струму Ca^{2+} через них із позаклітинного боку плазмалеми. На відміну від каналів латротоксинів, вбудовування каналів L-протеїну і транспорт Ca^{2+} і Mg^{2+} через них відбувалися активніше під час негативних потенціалів, прикладених з боку додавання L-протеїну до мембрани [5]. Отже, як і у разі із вбудовуванням, реверсію форми залежності безпосереднього переносу іонів крізь бішарові мембрани, модифіковані L-протеїном, від знака мембранного потенціалу, порівняно з латротоксинами (α -LT, α -LIT і δ -LIT), можна пояснити вбудовуванням латротоксинів із протилежного (зовнішнього) боку збудливої мембрани.

Шляхом послідовної заміни розчинів у *цис*-відділенні комірки з модифікованою мембраною, було визначено вибірковість для каналів низки фізіологічно важливих одно- та двовалентних катіонів. В умовах 10-кратного градієнта Ca^{2+} , реверсія трансмембранного струму каналами латротоксинів і L-протеїну відбувається при мембранному потенціалі близько 30 мВ, що збігається з величиною потенціалу Нернста, передбаченого для Ca^{2+} -селективної провідності [2, 4, 5, 42, 43]. Крім цього у селективних послідовностях, визначених для усіх каналів латротоксинів і L-протеїну в бішарових умовах, коли з протилежних боків мембрани порівнювали різні одно- та двовалентні катіони, показано переважну вибірковість до Ca^{2+} . Причому, незважаючи на деякі відмінності ступеня блокування, виявлені для різних каналів, загалом, Cd^{2+} і Zn^{2+} досить ефективно знижували безпосередній транспорт Ca^{2+} у всіх випадках [4, 42, 43, 45], що також свідчить на користь того, що латротоксини (α -LT, α -LIT і δ -LIT) і L-протеїн утворюють у ліпідному бішарі катіонселективні канали, переважно вибіркові до Ca^{2+} . Отже, вбудовування каналів латротоксинів у збудливі мембрани хребетних або безхребетних має підвищувати їхню кальцієву проникність, що є складовою пресинаптичної дії латротоксинів [2]. Беручи до уваги близьке розташування Ca^{2+} і Mg^{2+} у селективних послідовностях реконструйованих каналів латротоксинів і L-протеїну, можна вважати, що ці іони є взаємозамінними в

процесі пермеабілізації латротоксинами збудливих мембран [4, 5, 42, 43], а канали, утворені L-протеїном, можуть бути функціонально подібними до α -LT, α -LIT і δ -LIT та брати участь у спонтанному вивільненні нейромедіаторів шляхом підвищення проникності нервової клітини до двовалентних катіонів (Ca^{2+} або Mg^{2+}) [5, 22].

Треба відзначити, що струм K^{+} через канали α -LT і α -LIT також піддавався значній редукції у присутності субмікромолярних концентрацій Ca^{2+} , введених з боку вбудовування токсинів у мембрану, що дозволяє припустити наявність високоафінного сайту зв'язування Ca^{2+} в каналах α -LT і α -LIT, локалізованого ближче до зовнішнього боку плазмалеми. Титування каналів, утворених α -LIT у БЛМ, більш високими концентраціями Ca^{2+} показало, що максимальне зростання провідності спостерігалось за концентрації кальцію 3,5 мМ [42], що свідчить про існування ще одного Ca^{2+} -зв'язуючого центру з низькою спорідненістю до Ca^{2+} ($K_d = 10^{-2.4}$ М) аналогічного, знайденому в каналах α -LT з константою дисоціації $10^{-1.7}$ М. Коефіцієнт Хілла, визначений для α -LIT ($n = 5,95$), дозволяє вважати, що низькоафінний сайт в каналному олігомері токсину утворений з 12 карбоксильних груп [42]. Із результатів досліджень взаємодії α -LIT з БЛМ можна дійти висновку, що цей протеїн, подібно до α -LT, утворює в ліпідному бішарі штучної мембрани іонпровідні структури, аналогічні іонним каналам, які за їхньою селективністю до катіонів і потенціалозалежністю транспортування іонів схожі на потенціалозалежні кальцієві канали збудливих мембран. Незважаючи на різні провідності поодиноких каналів та деякі розбіжності у вибірковості до різних іонів, іонпровідні властивості каналів δ -LIT в БЛМ також свідчать про те, що вони є потенціалозалежними і переважно селективними до Ca^{2+} [43].

Залежність провідності поодиноких нейротоксिनних каналів від розмірів молекул неелектролітів. Оскільки формування протеїнового каналу може бути одним із спільних етапів в механізмах дії всіх зазначених каналоформерів, можливо, що різні геометричні розміри люменів каналів є причиною певних розбіжностей у селективних послідовностях і провідностях цих каналів у БЛМ. Тому, вивчення впливу різних речовин органічної і неорганічної природи на безпосереднє транспортування іонів реконструйованими каналами є важливим не тільки

для дослідження спонтанного та індукованого екзоцитозу, але також і для визначення геометрії водних порожнин іонних каналів.

Вимірювання внутрішніх радіусів каналів, утворених нейротоксинами з обох боків бішарової мембрани, проводили за методом, який базується на визначенні ступеня заповнення порожнини каналу молекулами неелектролітів. Показано, що додавання низки неелектролітів із різними гідродинамічними радіусами в розчин, що омиває мембрану (100 мМ KCl) змінювало іонний струм, який проходив через канал. Так, у присутності легкопроникаючих неелектролітів з низькою молекулярною масою з обох боків БЛМ порожнина каналу α -LT заповнювалась незарядженими молекулами, що зменшувало струм K^+ через канал [46]. Порівняно з тим, провідність поодиноких каналів зростала, внаслідок наближення гідродинамічного радіуса неелектролітів до величини внутрішнього радіуса каналу. Трансмембранний струм іонів калію змінювався несуттєво в розчинах, що мали молекули неелектролітів із гідродинамічними радіусами, які перевищували розмір отвору каналу. Найменший за розміром неелектроліт, який не впливав на провідність поодиноких каналів, мав найближчий розмір до отвору каналу [46]. Вимірювання провідностей поодиноких каналів у розчині KCl з однаковим неелектролітом по обидві сторони бішарової мембрани дало підстави для започаткування нового методичного підходу до визначення розміру більшого отвору, який знаходився з боку вбудовування каналу α -LT [46, 47]. Поліетиленгліколь 1000 (ПЕГ 1000) виявився першим неелектролітом, який не зменшував провідності α -LT після того, як його добавили з обох боків мембрани. Враховуючи те, що ефективний (внутрішній) радіус іонного каналу близький до мінімального розміру непроникаючої молекули неелектроліту, радіус отвору каналу α -LT визначали в зоні переходу від обмеженої проникності ПЕГ 600 до повної непроникності у разі нульового заповнення каналної порожнини неелектролітом. Радіус отвору каналу α -LT з боку вбудовування в БЛМ (*цис*-сторона), визначений шляхом екстраполяції графічної залежності заповнення каналу від розміру неелектроліту, становив $0,9 \pm 0,05$ нм [40, 46].

Для того, щоб визначити заповнення α -LT каналу із *транс*-входу, розчин з ПЕГ 1000, був розміщений із *цис*-сторони мембрани, в той самий час із *транс*-сторони знаходились неелектроліти з гідродинамічними розмірами для вимірювання розмірів каналу. Водночас,

зниження провідності на 23% відбувалось тільки у разі, коли із *транс*-сторони був прикладений етиленгліколь [40]. Найвірогідніша провідність поодинокого каналу α -LT знизилася до 131 пСм порівняно з 170 пСм для всіх інших досліджених неелектролітів. Таким чином, етиленгліколь виявився першим проникаючим із усіх неелектролітів, що були використані для вимірів із *транс*-сторони. Виходячи з того, що ефективний радіус каналу α -LT вважається близьким до мінімального розміру першої непроникаючої молекули неелектроліту після проникаючого етиленгліколю, можна припустити, що очікуваний розмір *транс*-входу α -LT близький до розміру молекули гліцеролу у водно-сольовому розчині (0,308 нм). Величина ефективного радіуса *транс*-входу каналу α -LT має знаходитись у проміжку між обмеженою проникністю етиленгліколю і непроникністю за відсутності заповнення неелектролітом порожнини каналу. Враховуючи те, що різниця між гідродинамічними радіусами гліцеролу і етиленгліколю нижча за найменшу стандартну похибку методу (0,046 і 0,05 нм відповідно) [46], було запропоновано вважати середнє арифметичне значення між гідродинамічними радіусами молекул гліцеролу та етиленгліколю ($0,28 \pm 0,02$ нм) за величину ефективного радіуса *транс*-входу каналу, утвореного α -LT [40].

Визначення окремих заповнень каналів α -LIT різними неелектролітами із *цис*- або *транс*-входу і симетричного заповнення з обох боків залежно від величини гідродинамічних радіусів неелектролітів також дозволило виміряти геометрію водної порожнини цього каналу [48]. Показано, що отвори каналу α -LIT мають однакові ефективні радіуси (0,55–0,58 нм) з обох боків модифікованої БЛМ. Причому, мала провідність каналу α -LIT ($23,5 \pm 3,7$ пСм), визначена в симетричному розчині 100 мМ KCl, може бути результатом звуження порожнини каналу з радіусом 0,37 нм, яке знаходиться на відстані 32,5% загальної довжини люмена від його вхідного отвору із *цис*-сторони БЛМ.

Таким чином, визначення розміру отворів каналів α -LT і α -LIT у БЛМ підтверджує зроблене раніше припущення про можливість вивільнення нейромедіаторів невеличкого пулу у пресинаптичну щілину безпосередньо крізь водну порожнину нейротоксичних каналів [1, 2].

Оцінка розміру вузької частини каналу α -LT, зроблена за допомогою кріоелектронної мікроскопії дозволяє вважати, що звуження

цього каналу ширше за те, яке було визначено для α -LIT (0,5 і 0,37 нм відповідно) [1, 48]. В той же час, розмір отвору каналу α -LT, визначений на БЛМ, показав, що ефективний радіус порожнини каналу із *транс*-сторони був навіть менший за радіус звуження каналу α -LIT (0,28 нм).

Очевидна схожість іонпровідних властивостей α -LIT і α -LT [1, 2] та близькі за значеннями радіуси звужень їхніх каналів лишають мало шансів на те, що приблизно 7-кратну різницю провідностей каналів α -LIT і α -LT в БЛМ можна просто пояснити різними фізичними розмірами отворів або електростатичним впливом катіонселективних центрів на іонні струми, які протікають через ці канали [46–48]. Хоча більший за розміром *цис*-вхід до каналу α -LT (0,90–1,25 нм) [1, 46, 48] порівняно з α -LIT (0,56–0,58 нм) і розширення з радіусом 1,8 нм усередині каналу α -LT [1] можуть полегшувати процес проходження іонів через цей канал.

Використання органічних блокаторів безпосереднього переносу іонів каналами латротоксинів для дослідження властивостей іонних каналів та впливу на екзоцитоз. Було показано, що низка тіазолієвих похідних вітаміну B₁ (тіамін) пригнічує спонтанне і індуковане квантове вивільнення нейромедіатору в холінергічних синапсах скелетних м'язів хребетних [49, 50]. Незважаючи на переконливі докази того, що аплікація найефективнішої із таких речовин — 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β -гідроксиетил)тіазолій хлориду (ДМГТ) — повністю ліквідувала вивільнення нейромедіатору, індуковане α -LT, загальний механізм фармакологічної дії тіазолієвих похідних на збудливу мембрану залишається невизначеним. Було зроблено припущення, що тіазолієвий цикл, який присутній у всіх похідних тіазолія, зв'язується зі специфічними мембранними структурами [50]. Також можливо, що спричинене ДМГТ блокування пресинаптичної дії α -LT було результатом його прямої взаємодії з каналами, сформованими α -LT у збудливих мембранах хребетних [49]. Оскільки структура та іонпровідні властивості каналформуючих латротоксинів α -LT і α -LIT схожі, було зроблено припущення, що ДМГТ також буде взаємодіяти з каналами α -LIT, реконструйованими в бішарових мембранах [40]. Згідно з даними, одержаними на реконструйованих каналах нейротоксинів, аплікація ДМГТ інгібувала Ca²⁺-струм через катіонселективні канали, α -LT у БЛМ. Введення 0,1 мМ ДМГТ з боку вбудовування токсину — *цис*-сторони

БЛМ, яка знаходилася у розчині 10 мМ CaCl₂, знижувало α -LT-індукований струм на $31,6 \pm 3,0\%$, а із *транс*-сторони БЛМ — на $61,8 \pm 3,0\%$ [40, 50]. Додавання 0,1 мМ ДМГТ із *цис*-сторони БЛМ, оточеної розчином 10 мМ CaCl₂, також знижувало струм катіонів, індукований α -LIT. Порівняльний аналіз ефективних радіусів каналів α -LT і α -LIT з *цис*-сторони БЛМ (0,9 і 0,55 нм відповідно) та каналу α -LT з протилежної *транс*-сторони (0,28 нм) з інтенсивністю інгібуючої дії ДМГТ, одержаною на них (31,6; 52 і 61,8% відповідно) дозволяє заключити, що блокувальний ефект ДМГТ зростає на отворах меншого розміру. Хоча зниження трансмембранного струму через канал α -LT відбувається з обох боків мембрани, ДМГТ блокує вдвічі більше струму після введення із *транс*-сторони. Цей результат дозволяє вважати, що центр зв'язування ДМГТ має більшу доступність із *транс*-сторони каналу, утвореного α -LT. Також можливо, що ДМГТ проявляє інгібуючу дію завдяки проникненню в каналну порожнину. Тому основною причиною асиметричної дії ДМГТ на канал α -LT можуть бути різні діаметри отворів каналу з протилежних боків мембрани.

Аплікація 5 мМ розчину тетрабутиламонію (ТБА), відомого як блокатор іонних каналів з діаметром отвору 1,1 нм, знижувала індукований α -LT струм іонів калію лише на $12 \pm 2\%$ з боку вбудовування α -LT у мембрану. Стаціонарні залежності вхідного струму K⁺ через канали α -LT від мембранного потенціалу також виявляли незначне зменшення струму при позитивних потенціалах після додавання ТБА з того ж боку БЛМ, що підтверджує зроблене вище припущення про залежність ступеня блокуючої дії ДМГТ від розміру отвору каналу [40]. Незначний вплив ТБА і ДМГТ на трансмембранний струм через канали α -LT у цьому разі може бути результатом того, що ефективний радіус каналу із *цис*-сторони значно більший за гідродинамічний радіус молекул обох блокаторів. Ці дані підтверджуються результатами обробки реконструйованих у БЛМ каналів α -LT поліклональними антитілами, згідно з якими отвір каналу вужчий із *транс*-сторони, порівняно з отвором на протилежному боці, що стало причиною більш значного зниження провідності каналів після аплікації антитіл із *транс*-сторони мембрани (50% від початкової провідності, визначеної до введення антитіл), порівняно з провідністю після додавання антитіл із *цис*-сторони [45]. Отже, хоча більшість α -LT зв'язується антитілами ще до утворення іонпровідного каналу, що

підтверджується відсутністю будь-якого зростання провідності БЛМ після одночасного додавання токсину і поліклональних антитіл з того ж самого боку ліпідного бішару, подальше безпосереднє транспортування Ca^{2+} через канали плазмалемі, що утворюються залишком незв'язаного з антитілами α -LT, ефективно блокується тими ж антитілами з боку вужчого отвору каналу.

Кінетика інгібування ДМГТ струму через канали α -LT не виявляє кооперативності і дозволяє вважати, що зв'язуючий сайт токсину сформований лише однією зарядженою групою. Схожі рК інгібування (5,4 із *транс*-сторони і 5,7 із *цис*-сторони) також свідчать на користь одного і того ж центра зв'язування ДМГТ у каналі, що взаємодіє з інгібітором із будь-якої сторони мембрани [40].

Незважаючи на зростаючу кількість експериментальних результатів, підтверджуючих, що екзоцитоз у нервових тканинах може проходити альтернативними шляхами [3, 51], існують досить вагомі підтвердження того, що α -LT і α -LIT формують іонпровідні канали у збудливих тканинах мембран, чим провокують біохімічні процеси в нервових закінченнях, які згодом приводять до масового вивільнення нейротрансмітерів [1, 2]. Це означає, що пригнічення α -LT-індукованого вивільнення ацетилхоліну в нервових тканинах хребетних за допомогою ДМГТ або поліклональних антитіл може бути наслідком інгібування входу Ca^{2+} через канали, які утворені α -LT у пресинаптичних мембранах. З огляду на те, що звуження каналу α -LT знаходиться із *транс*-сторони БЛМ до протилежної вбудовування токсину у мембрану (*цис*-сторона), можна зробити припущення, що вузька частина каналу, утвореного після специфічного зв'язування токсину з рецепторами плазмалемі, розташована на зовнішньому боці нервової клітини [1, 2], що дозволяє поліклональним антитілам або ДМГТ усувати розвиток пресинаптичної дії токсину шляхом блокування пасивного транспортування Ca^{2+} усередину нервової клітини каналами α -LT. У цьому разі, кількість Ca^{2+} , що проходить каналами α -LT буде незначною, оскільки потенціал спокою збудливої мембрани буде заважати збільшенню трансмембранного струму будь-якого із фізіологічно важливих катіонів. Натомість, та частка каналів α -LT, що згідно з даними, одержаними на БЛМ, також може утворювати іонпровідний канал у ліпідному бішарі плазматичної мембрани нервової клітини хребетних без попередньої взаємодії з рецептором буде проводити значно

більший струм Ca^{2+} у клітину через протилежну орієнтацію каналів токсину *цис*-доменом назовні.

Беручи до уваги зроблені висновки здається вірогідним, що індуковане α -LIT вивільнення нейротрансмітерів, яке відбувається у тканинах безхребетних, також може зменшуватися внаслідок застосування ДМГТ до каналів, утворених цим токсином, а блокування спонтанного ДМГТ – вивільнення ацетилхоліну виникає через блокування безпосереднього транспорту Ca^{2+} ендogenous каналами нервової клітини [40, 50].

Таким чином, реконструкція у БЛМ протеїнових каналоформуючих нейротоксинів із отрути каракурта та L-протеїну цитоплазми нервових клітин мозку надала можливість визначити механізми утворення цими протеїнами каналів у ліпідному бішарі мембрани та вірогідну роль безпосереднього транспортування іонів каналами, що утворилися у перебігу біохімічних процесів, які впливають на нервово-м'язову передачу. Крім цього, використання ДМГТ й інших органічних речовин, таких як антитіла або тетраалкіламоній, у такого типу дослідженнях дозволило створити необхідні передумови для розробки засобів запобігання розвитку пресинаптичної дії латротоксинів α -LT, α -LIT та інших зі схожим радіусом отвору ($\sim 0,3$ нм) шляхом блокування пасивного транспортування Ca^{2+} через канали, утворені цими токсинами.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ ПРОТЕИНОВЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ЭКЗОЦИТОЗА

О. Я. Шатурский

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Непосредственный транспорт неорганических ионов и биомолекул через нативные мембраны посредством специфических интегральных протеинов – ионных каналов, обеспечивает функционирование ряда важных биохимических процессов (деполяризация, высвобождение Ca^{2+} , экзоцитоз), происходящих в нервных или мышечных клетках при передаче возбуждения. Исследование структуры и ионпроводящих свойств нейротоксинами каналов и влияния на них разных

факторов, которые также действуют на нервно-мышечную передачу, играет особую роль при изучении патологий, возникающих в нервных тканях организма при поражении пороформирующими нейротоксинами. Поскольку взаимодействие протеиновых нейротоксинов из яда паука каракурта *Latrodectus mactans* (α -латротоксин, α - и δ -латроинсектотоксин) со специфичными рецепторами плазмалеммы позвоночных или насекомых приводит к образованию ионных каналов, что увеличивает кальциевую проницаемость пресинаптических окончаний и вызывает массовое высвобождение нейромедиаторов из пресинаптических везикул, основное внимание в обзоре уделяется реконструкции каналов этих латротоксинов. Роль реконструкции протеиновых каналов для определения участия собственно клеточных протеинов в регуляции экзоцитоза позвоночных рассматривается на примере латротоксинаподобного L-протеина из цитоплазмы нервных клеток мозга, который связывается с антителами к α -латротоксину.

Ключевые слова: транспорт Ca^{2+} , α -латротоксин, α -латроинсектотоксин, δ -латроинсектотоксин, латротоксинподобный белок, бислоидная липидная мембрана.

THE RECONSTRUCTION OF IONIC CHANNELS CREATED BY PROTEIN NEUROTOXINS IN BILAYER LIPID MEMBRANES AS A RESEARCH TOOL FOR EXOCYTOSIS PROCESSES

O. Ya. Shatursky

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Summary

The direct transport of inorganic ions and much highly organized biomolecules across native membranes by the specific membrane proteins – ionic channels provides the functioning of a number of important biochemical processes like depolarization, Ca^{2+} -release and exocytosis in nerve or muscle cells at the synaptic transmission. Therefore, the investigation of the structure and ion-conducting properties for neurotoxin channels and different factors affecting channels themselves and neuro-muscular transmission plays an important role in the research of pathologies that appear in intoxicated nerve tissues. As the massive release of neurotransmitters resulting from toxin-induced increase in Ca^{2+} -permeability of the nerve endings

occurs after the interaction of pore-forming neurotoxins α -latrotoxin, α - and δ -latroinsectotoxin from black widow spider venom with the specific receptors located on plasma membrane of the vertebrate or invertebrate nerve cells most attention in the review is paid to the reconstitution of above toxins channels. The part the pore-forming proteins reconstruction research takes to determine the exocytosis regulation endogenous cell proteins may participate has been observed on the example of latrotoxin-like L-protein from bovine brain nerve cells cytoplasm capable of binding with antibodies against α -latrotoxin.

Key words: Ca^{2+} -transport, α -latrotoxin, α -latroinsectotoxin, δ -latroinsectotoxin, latrotoxin-like protein, bilayer lipid membranes.

1. Orlova E. V., Rahman M. A., Gowen B. et al. // Nat. Struct. Biol. – 2000. – 7, N 1. – P. 48–53.
2. Rohou A., Nield J., Ushkaryov Y. A. // Toxicon. – 2007. – 49, N 4. – P. 531–549.
3. Гиммельрейх Н. Г. // Укр. біохім. журн. – 2000. – 72, № 4–5. – С. 26–34.
4. Dulubova I. E., Krasnoperov V. G., Khvotchev M. V. et al. // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, N 13. – P. 7535–7543.
5. Zhukareva V. A., Shatursky O. Ya., Lishko V. K. et al. // FEBS Lett. – 1992. – 300, N 3. – P. 219–221.
6. Glyvuk N. V., Kolchinskaya L. I., Malyshcheva M. K. // Neurophysiology. – 2002. – 34, N 1. – P. 1–4.
7. MacLennan D. H., Abu-Abed M., Chulhee Kang // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2002. – 34, N 8. – P. 897–918.
8. Meyer H. H., Shorter J. G., Seemann J. et al. // EMBO J. – 2000. – 19, N 10. – P. 2181–2192.
9. Grishin E. V., Himmelreich N. H., Pluzhnikov K. A. et al. // FEBS Lett. – 1993. – 336, N 2. – P. 205–207.
10. Volkova T. M., Pluzhnikov K. A., Woll P. G., Grishin E. V. // Toxicon. – 1995. – 33, N 4. – P. 483–489.
11. Ichchenko K., Khvotchev M., Kiyatkin N. et al. // EMBO J. – 1998. – 17, N 21. – P. 6188–6199.
12. Storchak L. G., Pashkov V. N., Pozdnyakova N. G. et al. // FEBS Lett. – 1994. – 351, N 2. – P. 267–270.
13. Pashkov V., Grico N., Tsurupa G. et al. // Neuroscience. – 1993. – 56, N 3. – P. 695–701.
14. Kiyatkin N., Dulubova I., Grishin E. // Eur. J. Biochem. – 1993. – 213, N 1. – P. 121–127.
15. Meyer H. H., Kondo H., Warren G. // FEBS Lett. – 1998. – 437, N 3. – P. 255–257.

16. *Barnard R. J., Morgan A., Burgoyne R. D.* // *J. Cell. Biol.* — 1997. — **139**, N 4. — P. 875–883.
17. *Hanson P. I., Heuser J. E., Jahn R.* // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 1997. — **7**, N 3. — P. 310–315.
18. *Mayer A., Wickner W., Haas A.* // *Cell.* — 1996. — **85**, N 1. — P. 83–94.
19. *Weber T., Parlanti F., McNew J. A. et al.* // *J. Cell. Biol.* — 2000. — **149**, N 5. — P. 1063–1072.
20. *Ushkaryov Y. A., Rohou A., Sugita S.* // *Handb. Exp. Pharmacol.* — 2008. — **184**. — P. 171–206.
21. *Greengard P., Valtorta F., Czernik A. J. et al.* // *Science.* — 1993. — **259**, N 5096. — P. 780–785.
22. *Гливу́к Н. В.* Дослідження функціональних властивостей латротоксинподібного білка як можливого учасника процесу нейросекреції. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К. 2002. — 13 с.
23. *Geppert M., Khvotchev M., Krasnoperov V. et al.* // *J. Biol. Chem.* — 1998. — **273**, N 3. — P. 1705–1710.
24. *Bittner M. A., Krasnoperov V. G., Stuenkel E. L. et al.* // *J. Neurosci.* — 1998. — **18**, N 8. — P. 2914–2922.
25. *Grasso A., Mastrogiacomo A.* // *FEMS Microbiol. Immunol.* — 1992. — **5**, N 1–3. — P. 131–137.
26. *Grishin E.* // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — **264**, N 2. — P. 276–280.
27. *Ushkaryov Y. A., Volynski K. E., Ashton A. C.* // *Toxicon.* — 2004. — **43**, N 5. — P. 527–542.
28. *Crowley J. J., Carter A. G., Regehr W. G.* // *J. Neurosci.* — 2007. — **27**. — P. 5448–5460.
29. *Bennett M. K., Calakos N., Scheller R. H.* // *Science.* — 1992. — **257**, N 5067. — P. 255–259.
30. *Nielerand H. B., Onofri F., Valtorta F. et al.* // *J. Neurochem.* — 1995. — **65**, N 4. — P. 1712–1720.
31. *Shimazaki Y., Nishiki T., Omori A. et al.* // *J. Biol. Chem.* — 1996. — **271**, N 24. — P. 14548–14553.
32. *Adam-Vizi V.* // *J. Neurochem.* — 1992. — **58**, N 2. — P. 395–405.
33. *Davletov B. A., Meunier F. A., Ashton A. C. et al.* // *EMBO J.* — 1998. — **17**, N 14. — P. 3909–3920.
34. *Glyvuk N. V., Storozhuk M. V.* // *Neurophysiology.* — 2002. — **34**, N 2–3. — P. 135–137.
35. *Capogna M.* // *Pharmacol. Ther.* — 1998. — **77**, N 3. — P. 203–223.
36. *Mironov S. L., Richter D. W.* // *Brain Res.* — 2000. — **869**, N 1–2. — P. 166–177.
37. *Khvotchev M., Südhof T. C.* // *EMBO J.* — 2000. — **19**, N 13. — P. 3250–3262.
38. *Malysheva M. K., Kolchinskaya L. I., Terletskaya Ya. T. et al.* // *Neurophysiology.* — 1998. — **30**, N 4–5. — P. 235–237.
39. *Trikash I. O., Terletskaya Ya. T., Kolchinskaya L. I. et al.* // *Ibid.* — N 2. — P. 72–74.
40. *Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Romanenko O. V. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2007. — **1768**. — P. 207–217.
41. *Montal M.* // *Toxicon.* — 2009. — **54**, N 5. — P. 565–569.
42. *Shatursky O. Ya., Pashkov V. N., Bulgacov O. V. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1995. — **1233**. — P. 14–20.
43. *Шатурський О. Я., Волкова Т. М., Гришин Е. В.* // *Біол. мембрани.* — 2004. — **21**, № 3. — С. 255–264.
44. *Afonin S. E., Malysheva M. K., Shatursky O. Ya.* // *FEBS Special Meeting “Biological Membranes”/ Helsinki/Espoo (Finland), June 26 - July 1 1994. - Helsinki: FEBS, 1994.* — P. 185.
45. *Chanturia A. N., Nikolaenko A. N., Shatursky O. Ya. et al.* // *Toxicon.* — 1996. — **34**, N 10. — P. 1157–1164.
46. *Sabirov R. Z., Krasilnikov O. V., Ternovsky V. I. et al.* // *Gen. Physiol. Biophys.* — 1993. — **12**, N 2. — P. 95–111.
47. *Krasilnikov O. V., DaCruz J. B., Yuldasheva L. N. et al.* // *J. Membrane Biol.* — 1998. — **161**, N 1. — P. 83–92.
48. *Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Himmelreich N. H. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2007. — **1768**. — P. 2757–2763.
49. *Романенко А. В., Гнатенко В. М., Владимірова І. А., Вовк А. І.* // *Нейрофізіологія.* — 1995. — **27**, № 5/6. — С. 375–386.
50. *Романенко А. В., Вовк А. І., Шатурський О. Я.* // *Там же.* — С. 368–374.
51. *Storchak L. G., Linetska M. V., Himmelreich N. H.* // *Neurochem. Int.* — 2002. — **40**, N 5. — P. 387–395.

Отримано 18.01.2011