



УДК 577.27 : 547 : 615.91 : 591.044

© 1992 г.

*В. Н. Пашков, Г. И. Говалевская, Н. Б. Грико,
О. В. Булгаков, Е. В. Яжмина, Е. В. Николитина*,
Л. Г. Сторчак*, О. Я. Шатурский*, Н. Г. Гиммельрейх*,
Е. В. Гришин*

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ЛАТРОТОКСИНА

*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН,
г. Пушкино Московской обл.;*

** Институт биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев*

Получена панель моноклональных антител (МА) против α -латротоксина (ЛТ). Определены их основные характеристики, исследовано влияние МА на функциональные эффекты ЛТ в синапсосамах и на способность к образованию ионных каналов в бислоистой липидной мембране (БЛМ). Эти МА не ингибируют связывание ЛТ с синапсосамами из мозга крысы, но модифицируют взаимодействие ЛТ-рецептор в терминах каналоформирующего и секретогенного действия ЛТ. Антитела А6 и А24 блокируют эти эффекты, А4 частично сохраняет секретогенное действие ЛТ, но полностью блокирует каналоформирующий эффект. Только антитело А15 влияет на способность ЛТ формировать катионные каналы в БЛМ, вызывая значительное уменьшение частоты образования каналов. Анализ результатов проведенных экспериментов позволяет выделить в молекуле ЛТ несколько функциональных центров, ответственных за: 1) токсин-рецепторное взаимодействие; 2) каналоформирующий и связанный с ним кальцийзависимый секретогенный эффект; 3) кальцийнезависимый секретогенный эффект; 4) образование ионных каналов в искусственном липидном бислое.

ЛТ, основной токсический компонент яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, является нейротоксином пресинаптического действия для позвоночных и широко используется исследователями в электрофизиологическом и биохимическом изучении процесса нейросекреции. К настоящему времени установлено, что ЛТ взаимодействует с высокой аффинностью (константа диссоциации порядка 0,1 нМ [1]) с мембранным рецептором плазмалеммы синапсосом и клеток феохромоцитомы РС12 и вызывает: 1) увеличение проницаемости плазматической мембраны для кальция и, как следствие, рост концентрации кальция в цитозоле; 2) гидролиз фосфоинозитидов; 3) ускоренный массивный выброс нейромедиаторов [1, 2]. В исследованиях, проведенных на клетках РС12 с использованием моноклональных антител, было показано, что при сохранении неизменной способности токсина взаимодействовать с мембранным рецептором могут быть полностью блокированы его функциональные эффекты [3]. На синапсосамах из головного мозга крысы были получены данные о возможности разобщения каналоформирующего и секретогенного эффектов ЛТ [4]. Таким образом, можно было предполагать, что все изучаемые эффекты токсина не представляют собой единую цепь событий, а являются результатом взаимодействия различных центров молекулы токсина с мембранными структурами.

Сокращения: ЛТ — α -латротоксин, МА — моноклональные антитела, ГАВА — гамма-аминомасляная кислота, БЛМ — бислоистая липидная мембрана, БСА — бычий сывороточный альбумин, SDS — додецилсульфат натрия, ПЭГ — полиэтиленгликоль.

Основные характеристики моноклональных антител к латротоксину

МА	Изотип	Взаимодей- ствие с на- тивным ЛТ в растворе	Аффинность, $K_d \cdot 10^8$, М	Взаимодей- ствие с де- натуриро- ванным ЛТ	Ингибиро- вание связы- вания ЛТ с синапосо- мами	Ингибиро- вание входа кальция в синаптосомы	Ингибиро- вание выхода GABA из синаптосом	Ингибиро- вание встря- нутия ЛТ в БЛМ
A4	IgG1(λ)	Да	30	Нет	Нет	Да	Частично	Нет
A6	IgM	»	3	»	»	»	Да	Не определено
A15	IgG1(λ)	»	8	»	»	Нет	Нет	Частично
A19	IgG2b(κ)	»	7	»	»	»	»	Нет
A24	IgG1(κ)	»	3	Да	»	Да	Да	»

С другой стороны, установленная недавно первичная структура ЛТ [5] открывает возможности исследования молекулярных основ его действия. Одним из возможных подходов при этом может быть использование МА к различным участкам молекулы ЛТ, изменяющих его действие. В случае однозначного установления связи между участком узнавания антитела и вызываемым этим антителом изменением эффектов ЛТ возможно выяснение структурно-функциональных связей в молекуле ЛТ.

В настоящей работе представлены данные по влиянию МА против ЛТ на различные функциональные эффекты, вызываемые ЛТ в синаптосомах из мозга крысы, и на способность ЛТ к образованию ионных каналов в БЛМ.

В результате проведения нескольких независимых гибридизаций спленоцитов иммунных животных с миеломными клетками была получена панель МА против ЛТ. Наиболее хорошо растущие и стабильные линии гибридом были наращены в виде асцитной опухоли в мышках линии BALB/c и антитела, продуцируемые ими, выделены из асцитной жидкости хроматографией на гидроксилapatите [6]. Этот метод позволяет в мягких условиях получить МА более 9% чистоты за одну стадию хроматографии. После выделения МА диализовали против раствора, содержащего 0,15 М NaCl 20 мМ трис-HCl (рН 7,4), и хранили при -20°C до использования. Так как детектирование МА на стадии получения гибридом проводили методом непрямой иммунопреципитации [^{125}I]ЛТ из раствора, все используемые в работе МА взаимодействовали с ЛТ в растворе. Всего было наращено в асцитах и хроматографически выделено 10 МА, взаимодействующих с нативным ЛТ в растворе, а 6 из них выявляли и денатурированный ЛТ. Основные характеристики некоторых из них представлены в таблице (антитела, не внесенные в таблицу, не оказывали никакого влияния на исследуемые в дальнейшем эффекты ЛТ). В предварительных экспериментах было обнаружено, что молярное соотношение ЛТ : МА = 1 : 2 является достаточным для изменения функциональных свойств ЛТ. При этом в экспериментах по взаимодействию [^{125}I]ЛТ с синаптосомами не было обнаружено какого-либо влияния МА на специфическое связывание токсина (см. таблицу).

Несмотря на отсутствие влияния МА на связывание ЛТ с синаптосомами, модификация ЛТ антителами оказывала различное действие на каналоформирующую и секретогенную функции ЛТ в синаптосомах. При исследовании способности токсина повышать кальциевую проницаемость синаптосом было обнаружено, что МА А4, А6 и А24 полностью нейтрализуют, а А15 и А19 никак не влияют на каналоформирующий эффект ЛТ (рис. 1). В то же время МА А6 и А24 полностью, а А4 лишь частично ингибировали способность ЛТ инициировать высвобождение GABA из синаптосом. Антитела А15 и А19 не влияли также и на секретогенную функцию (рис. 2).

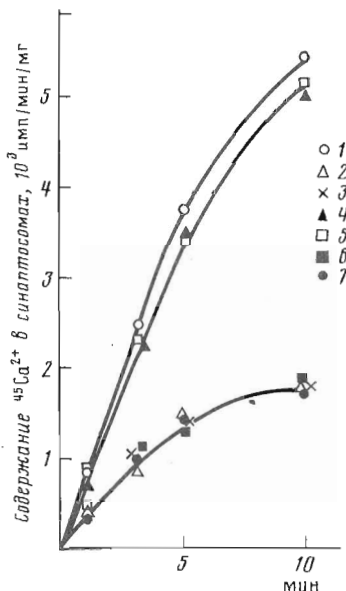


Рис. 1. Индукция входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсосомы латротоксином (1) и латротоксином, модифицированным МА А4 (2), А6 (3), А15 (4), А19 (5) и А24 (6). 7 — контрольные синапсосомы

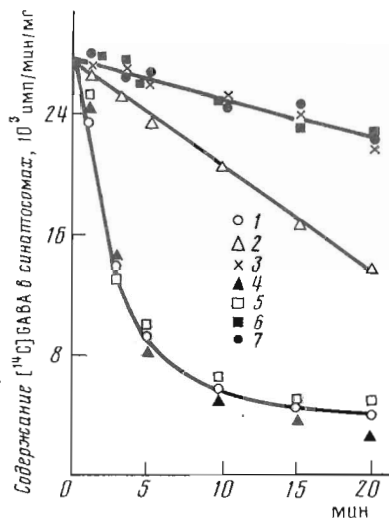


Рис. 2. Высвобождение $[^{14}\text{C}]$ GABA из синапсосом под влиянием латротоксина (1) и латротоксина, модифицированного МА А4 (2), А6 (3), А15 (4), А19 (5) и А24 (6). 7 — контрольные синапсосомы

В экспериментах по встраиванию ЛТ, модифицированного антителами, в бислоюную липидную мембрану (рис. 3) не было отмечено случаев, когда бы ЛТ полностью утрачивал способность увеличивать проводимость БЛМ (за исключением антитела А6: с ним не удалось провести эксперименты, так как при добавлении к БЛМ латротоксина, модифицированного этим антителом, происходило быстрое разрушение мембраны). Некоторые различия касались лишь частоты встраивания каналов, причем только в одном случае (антитело А15) отмечалось выраженное снижение частоты встраивания. При этом было отмечено также уменьшение амплитуды образующихся каналов и приобретение каналами способности переходить в закрытое состояние при положительном потенциале, чего никогда не наблюдалось после инкубации с другими типами МА.

Существующее ныне понимание механизма действия ЛТ нуждается в дальнейшем углублении и уточнении. Как видно из представленного материала, МА к ЛТ являются ценным инструментом исследования взаимодействия токсина с пресинаптической мембраной нервных клеток. Они позволяют выявить отдельные стороны механизма действия ЛТ и в перспективе картировать функциональные домены его молекулы.

В работе Мельдолези с соавт. [7] было показано, что взаимодействие ЛТ со своим рецептором запускает трансмембранный механизм сигнализации, связанный с системой гидролиза фосфатидилинозитола, и этого достаточно для токсинзависимого увеличения концентрации кальция и высвобождения нейромедиатора допамина в клетках РС12. В более поздних исследованиях были получены результаты, не укладывающиеся в эту схему. В работе [3] МА 4С4.1, не препятствуя связыванию токсина с рецептором на поверхности клеток РС12, ингибировали вызываемые токсином увеличение аккумуляции $^{45}\text{Ca}^{2+}$ и высвобождение нейромедиатора допамина клетками РС12. Хотя при этом и происходило изменение величины

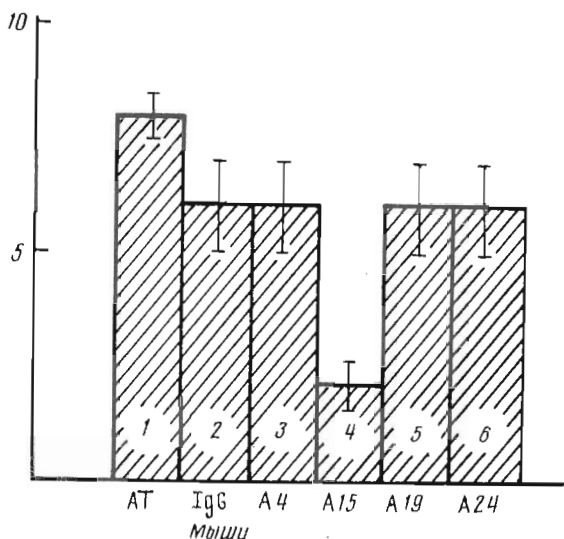


Рис. 3. Гистограмма частоты образования ионных каналов в БЛМ за 10 мин при взаимодействии ее с латротоксином (1) и с латротоксином, модифицированным антителами неиммунизированной мыши (2), А4 (3), А15 (4), А19 (5) и А24 (6). БЛМ находится в симметричном растворе, содержащем 10 мМ CaCl_2 , 10 мМ трис-HCl , pH 7,4. Потенциал на мембране 100 мВ. Концентрация ЛТ 3 нМ. По оси ординат – число каналов

токсинзависимого гидролиза фосфатидилинозитола, но в степени, недостаточной для объяснения полного ингибирования каналоформирующей и секретогенной функций ЛТ. Дополнительно было показано, что эти МА предотвращают образование латротоксином ионных каналов в искусственной бислойной липидной мембране. Закономерен и вывод авторов, состоящий в том, что взаимодействие ЛТ с рецептором является только частью феномена его действия в мембране и за развитие эффектов ЛТ может отвечать участок молекулы, не участвующий в токсин-рецепторном взаимодействии.

Экспериментальные данные, полученные в нашем исследовании, позволяют предположительно выделить в молекуле ЛТ несколько функциональных доменов. В первую очередь подтверждаются данные работы [3] о том, что можно полностью разобщить феномен токсин-рецепторного взаимодействия и дальнейшее развитие эффектов, касающихся каналоформирующей и секретогенной функций ЛТ (рис. 1, 2): антитела А6 и А24, не влияя на связывание, блокируют эти эффекты. Интересной особенностью обладает антитело А4: не влияя на связывание ЛТ и полностью блокируя его каналоформирующее действие, оно частично сохраняет секретогенное действие токсина. Возможно, что это кальцийнезависимая часть секретогенного эффекта ЛТ.

Предварительно инкубированный с антителами А4 и А24 ЛТ по способности образовывать специфические каналы в БЛМ существенно не отличался от нативного токсина. Эти данные не находят объяснения в рамках высказанных ранее предположений о том, что одна и та же часть молекулы токсина образует катионспецифический канал в искусственном липидном бислое и в пресинаптической мембране [8–10]. По-видимому, формирование токсинзависимого катионного канала в пресинаптической мембране и в липидном бислое происходит принципиально различным образом с вовлечением разных частей молекулы ЛТ. Это предположение

подтверждается и наблюдаемым влиянием антител A15 на способность ЛТ образовывать катионные каналы в БЛМ. Эти антитела вызывают значительное уменьшение частоты образования каналов и существенно изменяют их свойства. В то же время антитела A15 абсолютно нейтральны в отношении изменения каналоформирующего эффекта ЛТ в пресинаптической мембране.

Приведенные выше данные и их обсуждение позволяют нам выделить в молекуле ЛТ несколько функциональных (а возможно, и структурных) доменов, ответственных за: 1) токсин-рецепторное взаимодействие; 2) каналоформирующий и связанный с ним кальцийзависимый секретогенный эффект; 3) кальцийнезависимый секретогенный эффект; 4) образование катионных каналов в искусственном липидном бислое. Отсутствие влияния антител A19 на изучаемые эффекты ЛТ предполагает наличие в молекуле токсина функционально малозначимых участков. В то же время изменение других частей молекулы (например, взаимодействующих с антителами A6 и A24) приводит к полному исчезновению эффектов ЛТ в пресинаптической мембране.

Экспериментальная часть

В работе использованы: среда для культивирования клеток RPMI 1640, эмбриональная телячья сыворотка, компоненты селективной среды (Gibco, США, или Flow, Англия), ПЭГ 1500, пристан, адьюванты Фрейнда (Serva, Германия), Na^{125}I («Изотоп», СССР), реактивы для электрофореза и гидроксилатит (Bio-Rad, США), бромциан-сефароза, CM-сефадекс C-50 (Pharmacia, Швеция), моноспецифические антитела против изомеров мышинных иммуноглобулинов (Calbiochem, США), трис (Serva, Германия), NEPER (Fluka, Швеция), $^{45}\text{CaCl}_2$ (40 мКи/мг) и [^{14}C]GABA (232 мКи/ммоль) (Amersham, Англия), амингидроксиуксусная кислота, D600 (Sigma, США), моноспецифические антитела кролика против иммуноглобулинов мыши, белок-A-сефароза получены самостоятельно, белок A и остальные реактивы марки х.ч. или ос.ч. отечественного производства.

Латротоксин выделяли из лиофилизованного яда или ядовитых желез паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* (поставки Ашхабадского и Алма-Атинского зоокомбинатов) хроматографически по методу [11, 12] или иммуноаффинной хроматографией [13]. Радиоактивное производное ЛТ получали хлораминовым методом [14]. Удельная радиоактивность препаратов составляла 200–800 Ки/ммоль.

Получение МА. ЛТ (2 мкг) в полном адьюванте Фрейнда вводили мышам линии BALB/c внутривенно, затем с 2-недельными интервалами иммунизацию повторяли еще трижды с неполным адьювантом Фрейнда. В случае иммунизации денатурированным (прогрев при 100°C, 10 мин) ЛТ в последних двух иммунизациях его вводили в физиологическом солевом растворе. Через 3 дня после последней иммунизации клетки селезенки иммунной мыши гибридовали с миеломой X63Ag8.653 (соотношение клеток 2:1) по методу [15] с использованием ПЭГ 1500. После слияния клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с двойной концентрацией компонентов селективной среды и рассеивали по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов, содержащие по 100 мкл фидерного слоя макрофагов. На начальных стадиях получения гибридом среда содержала 20% бычьей эмбриональной сыворотки. Культуральные среды гибридом тестировали методом непрямой иммунопреципитации [^{125}I]ЛТ (см. ниже), клетки в лунках, давшие положительный ответ, дважды клонировали методом предельных разведений. Положительные моноклоны наращивали в виде асцитов в мышах линии BALB/c.

Непрямую иммунопреципитацию проводили в лунках 96-луночных круглодонных планшет для иммунологических реакций или в микроцентрифужных пробирках. К 80 мкл культуральной среды гибридом добавляли 10 мкл раствора [125 I]ЛТ (конечная концентрация 5 нМ) и инкубировали 2 ч при 20°С. Затем в лунки вносили по 10 мкл белок-А-сефарозы, насыщенной моноспецифическими кроличьими антителами против мышинных иммуноглобулинов (3–5 мг антител/мл белок-А-сефарозы) и инкубировали еще 1 ч при перемешивании. Твердую фазу отделяли низкоскоростным центрифугированием и промывали дважды буферным раствором (0,15 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,4), содержащим 0,1% БСА. Определяли радиоактивность в твердой фазе, и если она превышала в 3–4 раза и более радиоактивность отрицательных контрольных проб, то считалось, что культуральная среда содержит антитела против ЛТ.

Характеристика моноклональных антител к лагротоксину. МА из асцитов очищали на гидроксилapatите по [6], чистоту проверяли электрофорезом в денатурирующих условиях [16]. Изотипирование проводили с использованием моноспецифических антител против изотипов мышинных иммуноглобулинов согласно рекомендациям фирмы-поставщика, константы аффинности определяли по методике работы [17], используя для разделения связанного с антителами ЛТ от несвязанного моноспецифические антитела кролика против мышинных иммуноглобулинов, конъюгированные с белком-А-сефарозой.

Модификация лагротоксина антителами. Во всех экспериментах по влиянию антител на эффекты ЛТ в синапсосах и на БЛМ, ЛТ ($5 \cdot 10^{-7}$ М) в течение 1 ч при 20°С инкубировали с антителами (10^{-6} М). Затем смеси белков хранили в ходе экспериментов не более 2–3 ч при 4°С.

Влияние МА на связывание [125 I]ЛТ с синапсосами. [125 I]ЛТ ($5 \cdot 10^{-7}$ М) инкубировали с антителами ($1 \cdot 10^{-6}$ М) в течение 1 ч при 20°С, затем вносили аликвоты в суспензию синапсосом (конечная концентрация [125 I]ЛТ 5 нМ) и через 15 мин инкубации при 30°С отделяли несвязавшийся токсин центрифугированием синапсосом.

Синапсосомы из мозга крысы получали по методу [18], ресуспендировали в солевом буферном растворе следующего состава (мМ): NaCl – 126,0, KCl – 5,0, MgCl₂ – 1,4, CaCl₂ – 1,0, Na₂HPO₄ – 1,0, HEPES–NaOH – 20,0 (pH 7,5), глюкозы – 10,0 (раствор А) и хранили в ходе экспериментов на льду не более 2–3 ч.

Кальциевую проницаемость синапсосом оценивали по входу $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Суспензию синапсосом (4 мг белка/мл) инкубировали 5 мин при 20°С в растворе А. Затем вносили D600 (конечная концентрация $5 \cdot 10^{-4}$ М) и инкубировали еще 10 мин. Объем внесенного с D600 этилового спирта не превышал 1% от общего объема. Синапсосомы уравнивали 3 мин при 30°С и реакцию запускали добавлением к синапсосомам $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (конечная концентрация 0,5 мкКи/мл) и ЛТ (конечная концентрация 10 нМ) или ЛТ, модифицированного антителами в той же концентрации. Через определенные временные интервалы аликвоты суспензии синапсосом (по 100 мкл) наносили на колонки (0,6×1 см) CM-сефадекса С-50, уравновешенные 2 мМ CaCl₂, 50 мМ трис-HCl (pH 7,6). Синапсосомы с колонок элюировали 0,8 мл раствора, содержащего 0,1 М NaCl, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), растворяли в 1% SDS и просчитывали радиоактивность в сцинтилляционной жидкости ЖС-103.

Высвобождение [14 C]GABA из синапсосом. В качестве среды инкубации использовали раствор А, концентрация синапсосомального белка составляла 2 мг/мл. [14 C]GABA вносили в пробу в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М (0,1 мкКи/мл) и инкубировали 5 мин при 30°С. Затем охлаждали на льду, трехкратно разводили охлажденным раствором А и осаждали центрифугированием при 10 000 g 5 мин. Осадок суспендировали в

растворе А, содержащем 10 мкМ аминоксидроксиуксусную кислоту при 4°С; концентрация белка 1 мг/мл. Высвобождение ГАВА определяли при 30°С. Суспензию синапсом инкубировали 3 мин для прогрева до 30°С. После этого добавляли ЛТ (конечная концентрация 5 нМ), этот момент принимали за нулевое время. Аликвоты суспензии синапсом (по 0,5 мл) через определенные интервалы времени фильтровали через микропористые фильтры для отделения высвободившейся [¹⁴С]ГАВА, затем фильтры промывали 4 мл охлажденного раствора А, высушивали на воздухе и после обработки 1% SDS просчитывали радиоактивность в сцинтилляционной жидкости ЖС-103.

Встраивание латротоксина в БЛМ. Плоские липидные мембраны формировали по методу [19] на отверстиях диаметром 0,6 мм в тефлоновом стаканчике, помещенном в стеклянную ячейку, из раствора (20 мг/мл) фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 2:1 в *n*-гептане. Раствор, омывающий мембрану, содержал 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, и в зависимости от условий эксперимента необходимое количество хлоридов металлов. Внутренний объем стаканчика, заполненный водным раствором, был равен 1 мл, а снаружи содержалось 9 мл раствора. В работе использовали хлорсеребряные электроды, поляризационный потенциал между которыми не превышал 1–1,5 мВ. Потенциал снаружи тефлонового стаканчика (*цис*-сторона) задавали относительно потенциала внутреннего объема (*транс*-сторона), который принимали равным 0 мВ. Электрические измерения выполняли по методике [20]. Конечная концентрация ЛТ в ячейке 3 нМ. Эксперименты проводили при 20°С.

Аналитические процессы. Количество белка определяли по модифицированному методу Лоури [21], используя в качестве стандарта БСА. Концентрацию антител дополнительно определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. 1986. V. 7. № 4. P. 151–155.
2. Rosental L., Meldolesi J. // Pharmacol. Ther. 1989. V. 42. № 1. P. 115–134.
3. Cattaneo A., Grasso A. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 9. P. 2730–2736.
4. Гиммельрейх Н. Г., Пивнева Т. А., Сторчак Л. Г., Николишина Е. В., Лущко В. К. // Укр. биохим. журн. 1987. Т. 59. № 3. С. 29–34.
5. Kiyatkin N. I., Dulubova I. E., Chekhovskaya I. A., Grishin E. V. // FEBS Lett. 1990. V. 270. № 1/2. P. 127–131.
6. Stanker L. H., Vanderlaan M., Juarez-Salinas H. // J. Immunol. Meth. 1985. V. 76. № 1. P. 157–169.
7. Vicentini L. M., Meldolesi J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 121. № 2. P. 538–544.
8. Finkelstein A., Rubin L. L., Tzeng M.-C. // Science. 1976. V. 193. № 4257. P. 1009–1011.
9. Robello M., Rolandi R., Alema S., Grasso A. // Proc. Roy. Soc. London. B. 1984. V. 220. P. 477–487.
10. Robello M., Fresia M., Maga L., Grasso A., Ciani S. // J. Membrane Biol. 1987. V. 95. № 1. P. 55–62.
11. Grasso A. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 439. № 2. P. 406–412.
12. Frontali N., Ceccarelli B., Gorio A., Mauro A., Siekevitz P., Tzeng M.-C., Hurlbut W. P. // J. Cell Biol. 1976. V. 68. № 3. P. 462–479.
13. Пашков В. Н., Ковалевская Г. И., Красноперов В. Г., Булгаков О. В. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1281–1283.
14. Hunter W. M., Greenwood F. C. // Nature. 1962. V. 194. № 4827. P. 495–496.
15. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. № 5517. P. 495–497.
16. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
17. Heyningen V., Brock D. J. H., Heyningen S. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 62. № 1. P. 147–153.
18. Cotman C. W. // Meth. Enzymol. 1974. V. 31 (part A). P. 445–452.
19. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C. // Nature. 1962. V. 194. № 3519. P. 979–980.

20. Соколов Ю. В., Малышева М. К., Лишко В. К. // Биофизика. 1982. Т. 27. № 3. С. 430-434.
21. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1828-1837.

Поступила в редакцию
11.IX.1991

После доработки
28.XI.1991

V. N. PASHKOV, G. I. KOVALEVSKAYA, N. B. GRIKO, O. V. BULGAKOV,
E. B. YAHNINA, E. V. NIKOLISHINA*, L. G. STORCHAK*, O. Ya. SHATURSKY*,
N. G. HIMMELREICH*, E. V. GRISHIN

IMMUNOCHEMICAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF LATROTOXIN

*Branch of the M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian
Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region;
A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Ukraine,
Kiev*

A panel of monoclonal antibodies (mAb) against α -latrotoxin (LT) has been produced and their main characteristics have been determined. The influence of mAb on the functional effects of LT in synaptosomes from rat brain and on the channel formation in bilayer lipid membrane has been investigated. These mAbs do not inhibit binding of LT to rat synaptosomes but modify LT-receptor interaction in terms of LT's channel-forming and secretogenic effects. Antibodies A6 and A24 block these effects, whereas A4 partially preserves the secretogenic action of LT and completely blocks its channel-forming action. Only antibodies A15 affect the LT ability to form cationic channels in BLM, inducing considerable decrease in the frequency of the channel formation. These data and their analysis allow to identify several functional (and, probably, structural) domains of LT responsible for: 1) toxin-receptor interaction; 2) channel-forming and related calcium-dependent secretogenic effects; 3) calcium-independent secretogenic effects; 4) formation of cationic channels in the artificial lipid bilayer.