Министерство общего и профессионального образования Российской Федерации

Мордовский ордена дружбы народов государственный университет

имени Н.П. Огарева

Факультет биологический

Кафедра генетики

Утверждаю

Зав. кафедрой

д.б.н., профессор Трофимов В.А..

«\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2001 г.

Дипломная работа

тема: **Изучение взаимодействия синтаксина 6 с мембранными белками секреторных гранул нейтрофилов человека**

Автор дипломной работы: Сальникова Е.Н.

Обозначение дипломной работы: ДР-2069965-011600-14-01 группа 501

Специальность: 011600

Руководитель работы: д.б.н., профессор Набокина С.М.

Нормоконтролер: к.б.н., доцент Мышляков Г.М.

Рецензент: д.б.н., профессор Шубина О.С.

Саранск 2001

МОРДОВСКИЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.П. ОГАРЕВА

факультет иностранных языков

кафедра английского языка

 Утверждаю

 Зав.кафедрой

д.б.н., профессор Трофимов В.А.

 «\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2001

ЗАДАНИЕ НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ

Студентка Сальникова Елена Николаевна группа 501

Тема: Изучение взаимодействия синтаксина 6 с мембранными белками секреторных гранул нейтрофилов человека.

Срок представления работы к защите: 20.06.2001 г.

Исходные данные для дипломной работы: литературные материалы, публикации в периодической печати.

Содержание дипломной работы:

Список использованных сокращений

Введение

Обзор литературы

Характеристика основных белковых компонентов модели

Методы

Полученные результаты и их обсуждения

Выводы

Список использованных источников

Руководитель работы: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_С.М. Набокина

 подпись, дата д.б.н., профессор

Задание принял к исполнению: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_Е.Н. Сальникова

 подпись, дата

**Реферат**

Дипломная работа содержит 44 страницы машинописного текста, 5 рисунков, 2 таблицы, 48 использованных источников, из них – 40 иностранной литературы.

**Перечень ключевых слов:** нейтрофилы, экзоцитоз, взаимодействие белков, snare, vamp-1, синтаксин 6, snap-25, snap-23.

**Объекты исследования:** нейтрофилы периферической крови человека.

**Цель работы:** изучение взаимодействия белок-белковых взаимодействий между синтаксином 6 и другими белками группы snare in vivo.

**Методы исследования:** выделение из нейтрофилов человека snare комплексов при помощи иммунопреципитации на моноспецифических антителах против синтаксина 6, присоединенных к протеину а-агарозе и их харакетристика.

**Полученные результаты:** выявлены взаимодействия синтаксина 6 с vamp-1, snap-23 и snap-25.

**Список использованных сокращений**

БЛМ – бислойные липидные мембраны

ПМЯ – полиморфно-ядерные лейкоциты

SNAP – белок цитозоля, связывающийся с NSF

NSF – фактор, чувствительный к N-этилмалеимиду

SNARE – рецептор для SNAP

SNAP-25 – белок с молекулярной массой 25 кДа, ассоциированный с синаптосомами

SNAP-23 – белок с молекулярной массой 23 кДа, ассоциированный с синаптосомами

VAMP – мембранный белок, ассоциированный с везикулами

МПО – миелопероксидаза

ФМА – 4бетта-форбол 12-миристат 13-ацетат

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ДДС-Na – додецилсульфат натрия

ПААГ – полиакриламидный гель

ТЕМЕД – N, N, N, N – тетраметилэтилендиамин.

**Содержание**

Список использованных сокращений

Введение

1. Обзор литературы

1.1. Общая характеристика нейтрофилов человека

1.2. Внутриклеточные гранулы нейтрофилов человека

1.3. Современные представления о механизмах слипания/слияния мембран

2. Характеристика основных белковых компонентов модели

2.1. VAMP/ синаптобревин

2.2. Синтаксины

2.3. SNAP-25

2.4. NSF

2.5. SNAP

2.6. Механизм слипания/ слияния мембран

3. Методы

3.1. Объекты исследования

3.2. Выделение нейтрофилов человека

3.3. Электрофорез белков

3.4. Иммуноблоттинг

3.4.1. Перенос фракций из геля на фильтр

3.4.2. Иммунное выявление антигенов на фильтре

3.4.3. Активация нейтрофилов

3.4.4. Иммунопреципитация

4. Полученные результаты и их обсуждение

Выводы

Список использованной литературы

**Введение**

Нейтрофилы и продукты их секреции принадлежат к числу центральных участков воспаления. Они играют ключевую роль в защите организма, поглощая и разрушая чужеродные клетки и бактерии. Нейтрофилы человека содержат четыре типа гранул: азурофильные, специфические, желатиназные гранулы, а также везикулы которые в разной степени способны претерпевать экзоцитоз в ответ на повышение внутриклеточной концентрации ионов Са+.

В настоящее время для объяснения молекулярного механизма экзоцитоза в нейтрофилах используется SNARE гипотеза. Эта модель основана на взаимодействии белков мембраны секреторной везикулы и белков плазматической мембраны с последующим связыванием цитозольных белков, приводящая к слиянию мембран. Группу SNARE составляют белки, относящиеся к семействам:

семейство VAMP (Vesicle – Associated Membrane Protein),

семейство SNAP-25 (Synaptosome – Associated Protein of 25 кДа),

семейство синтаксинов.

В настоящее время в нейтрофилах человека идентифицированы множественные изоформы SNARE белков.

Обнаружено, что нейтрофилы человека экспресируют широкий набор белков семейства синтаксинов и установлена внутриклеточная локализация для двух представителей этого семейства: синтаксина 4 и 6. В последние годы в литературе появились сведения о взаимодействии синтаксина 4 с VAMP-2, SNAP-25 и SNAP-23. Что касается белка синтаксина 6, то в настоящее время взаимодействия этого белка с другими белками группы SNARE, не изучены. Поэтому целью данной дипломной работы явилось изучение белок-белковых взаимодействий между синтаксином 6 и другими белками группы SNARE in vitro, т.е. в интактных клетках.

**1. Обзор литературы**

**1.1. Общая характеристика нейтрофилов человека**

Нейтрофилы (полиморфно-ядерные лейкоциты, ПМЯ) и продукты их секреции принадлежат к числу центральных участков воспаления. Они играют ключевую роль в защите организма, поглощая и разрушая чужеродные клетки и бактерии [3].

Нейтрофилы имеют ряд характерных черт. Это присутствующие в большом количестве подвижные, короткоживущие клетки, способные к хемотаксису и фагоцитозу [1]. Общий вес нейтрофилов у одного человека составляет 1,5 кг [6]. Эти клетки являются источником медиаторов воспаления, включая цитокины, и токсичных продуктов, таких как радикалы кислорода и гидролазы. В норме лизосомные ферменты и окислительные агенты нейтрофилов, продуцированные при запуске фагоцитоза, осуществляют внутриклеточный катаболизм белков и других макромолекул, деградацию фагоцитированных вирусов и бактерий. В норме нейтрофилы находятся в неактивном, спокойном состоянии.

При патологических состояниях функции этих клеток усиливаются. При этом происходит интенсивное генерирование и высвобождение медиаторов воспаления в межклеточное пространство. Инициация каскадных протеолитических реакций и продукция биологически активных пептидов, связанно с этими процессами, приводят к развитию воспаления [7].

**1.2. Внутриклеточные гранулы нейтрофилов человека**

Нейтрофилы человека содержат четыре типа гранул: азурофильные, специфические, секреторные везикулы и желатиназные. Последние два типа были обнаружены в последние 10 – 15 лет с помощью субклеточного фракционирования и иммуно-электронной микроскопии. Гранулы, принадлежащие к разным типам, отличаются размером, морфологией, составом и способностью к мобилизации. Классификация азурофильных и специфических гранул основывалась на сродстве гранул к основному красителю азуровому А, содержании в гранулах миелопероксидазы и очередности появления гранул в ходе миелопоеза.

Желатиназные гранулы, формируемые на стадии палочкоядерных клеток, мобилизуются более быстро, чем специфические гранулы, образуемые на стадии миелоцитов и метамиелоцитов, а специфические гранулы, в свою очередь, мобилизуются более быстро, чем азурофильные гранулы, появляющиеся на стадии промиелоцитов.

Гранулы ПМЯ содержат большое количество различных ферментов, а именно протеолитические ферменты являются наиболее деструктивными [1].

Таблица 1.1.

Субклеточная локализация белков и ферментов в ПМЯ (Белова, 1997).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Класс | Азурофильные гранулы | Специфические гранулы |
| Бактерицидные ферменты | МиелопероксидазаЛизоцим | Лизоцим |
| Протеиназы | ЭластазаКатепсин GПротеиназа ЗКатепсин ВКатепсин Д | Коллагеназа |
| Другие гидролазы | N-Ацетил-β-глюкозаминидазаβ-глюкоуронидазаβ-глицерофосфатазаα-маннозидазаСульфатазыНуклеазы | Щелочная фосфотаза |
| Другие белки |  | ЛактоферринБелки, связывающие витамин В12 β2-микроглобулин |

Ферменты нейтрофилов, действуя совместно, могут разрушать эластин, коллаген и различные другие белки, активировать комплемент, образовывать кинины из различных кининогенов, а также повышать проницаемость сосудов [8].

В азурофильных гранулах нейтрофилов и моноцитов содержится также миелопероксидаза (МПО) – гемопротеин с молекулярной массой 150 кДа; этот фермент катализирует окисление ионов гамедов (в особенности J-) до гипогаметов [3]. В сочетании с Н2О2 и гамедами, особенно иодидом и бромидом, МПО токсична для различных клеток, в том числе для микроорганизмов, опухолевых клеток, нормальных эритроцитов, тромбоцитов и других лейкоцитов. Хотя фагоцитирующие клетки обычно продуцируют пероксид водорода (Н2О2), бактерии, не продуцирующие каталазы, способны вырабатывать достаточное количество Н2О2 для собственного разрушения [8]. Продукты окисления системы МПО могут также вызывать высвобождение васоактивных аминов из тромбоцитов и тучных клеток [6]. МПО обладает рядом других функций, например она инактивирует окисление хемотаксических олигопентидов, содержащих метионин [39]. Специфические гранулы нейтрофилов содержат лактоферрин – белок с молекулярной массой 90 кДа, в котором имеется два участка, связывания железа. Этот белок высвобождается во внеклеточное пространство вместе с другими ферментами гранул [2]. Железо, связанное с лактоферрином, может играть определенную роль в генерации ОН из О2 и Н2О2.

Другим важным ферментом нейтрофилов, играющим, по-видимому, определенную роль в развитии устойчивости к бактериальной инфекции, является лизоцим. Лизоцимы – это ферменты, растворяющие различные гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой, что ведет к лизису клеточных стенок микроорганизмов, а также и к существенному воздействию на мембраны клеток млекопитающих [22].

Учитывая содержимое гранул обоих типов, можно заметить, что набор этих ферментов достаточен для деградации многих или всех липидов, полисахаридов и белков чувствительных бактерий, часто приводящей к деструкции. Эти ферменты могут действовать как внутри клетки, так и вне ее. Если фермент функционирует внутри клетки, частица, доставляется в клетки фагосомой. При продвижении содержащей частицы фагосомы внутрь клетки она сливается с азурофильными и специфическими гранулами и образует фаголизосому; при этом частица, содержащаяся в фагосоме подвергается действию ферментов и других веществ, находившихся в гранулах. Гранулы формируются в аппарате Гольджи на промежуточной стадии развития в костном мозге. Слияние фагосом со специфическими гранулами происходит через 30 с после начала фагоцитоза, тогда как слияние с азурофильными гранулами через 1-3 мин. [1].

Многие из ферментов специфических гранул наиболее активны при нейтральном или щелочном рН, тогда как большинство ферментов азурофильных гранул наиболее активны при кислых значениях рН.

Высвобождение из клетки гранулярных ферментов легче всего наблюдать при усиленном фагоцитозе, когда вновь фагоцитируемые частицы попадают в уже сформированную фаголизосому [2]. Изучение высвобождения содержимого гранул в среду часто проводят в присутствии цитохалазина В; нейтрофилы превращаются в клетки с низкой фагоцитирующей активностью, легко высвобождающие продукты гранул в среду. Высвобождение гранулярных ферментов можно наблюдать и без цитохалазина В – под влиянием самых различных частиц. К числу наиболее эффективных стимулов относятся содержащие молекулы JgG крупные комплексы антигена с антителом [1]. Высвобождение ферментов из специфических гранул происходит в целом с большей интенсивностью чем у азурофильных гранул. Большинство стимулов вызывает одинаковое высвобождение ферментов из специфических и азурофильных гранул, среди них есть и такие, которые индуцируют специфические гранулы, например Кон А, ФМА.

Ферменты нейтрофилов способны функционировать как внутри клетки при фагоцитозе, так и вне клетки при экзоцитозе.

Гранулы нейтрофилов являются источником важных мембранных белков – рецепторов, антигенов, ферментов. В ходе экзоцитоза эти белки встраиваются в плазматическую мембрану нейтрофила и значительно изменяют способность клетки к взаимодействию с ее окружением.

**1.3. Современные представления о механизмах слипания/слияния мембран**

Слипание и слияние мембран – универсальный и нормальный процесс, важная стадия гетерологического и гомологического межмембранного взаимодействия в ходе экзоцитоза; в ходе аутоиммуных реакций (например, при слиянии макрофагов с лимфоцитами).

Механизмы слияния клеточных и модельных (искусственных) мембран включает в себя одни и те же стадии, что указывает на универсальный механизм взаимодействия мембран. Эти же механизмы распространяются и на слияние мембран внутриклеточных органелл, везикул с плазмалеммой, где важно учитывать специфические подготовительные стадии, ведущие к слиянию. Механизмы слияния в системах клетка-клетка, клетка-везикула (чаще всего секреторные гранулы), везикула-везикула, везикула-плазмалемма, везикула-плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ), БЛМ-БЛМ. Слияние, вероятно, происходит только в специфических участках липидного бислоя мембран. Основной эндогенный фактор слияния – ионы Са – резко снижает гидротационный барьер при слиянии мембран. Кроме того, ионы Са снижают (или нейтрализуют) отрицательный поверхностный заряд, непосредственно модифицируют структуру липидного бислоя, вызывают разделение липидов в бислоях, дестабилизируя их; создают кальциевые мостики между двумя контактирующими мембранами, индуцируя слияние.

Полярные амфидильные молекулы (ненасыщенные жирные кислоты, моноацилглицерин), поликатионы (полилизин), углеводороды (декан), продукты перекисного окисления липидов, диметилсульфоксид, являются индукторами слияния. Процессы слияния предваряются агрегацией везикул, слипанием (адгезией) мембран. Процессам слияния сопутствуют высвобождение содержимого везикул в наружный раствор.

Сам акт слияния включает несколько стадий: частичное (полуслияние и полное слияние, сопровождающееся на последних этапах стабилизацией переходных структур, появлением особых кохлеарных внутримембранных частиц и самое главное, объединением внутренних объемов клеток или везикул. Снижение плотности поверхностного заряда, увеличение ионной концентрации среды, снижение рН среды и введение поликатионов способствует сближению и контакту мембран. Повышение вязкости среды мешает сближению, но облегчает образование контакта уже сближенных мембран. Деформация клеточной поверхности – важный фактор слипания и слияния мембран.

Плотный контакт обеих мембран сначала приводит к образованию пенталаминарной, а затем триламинарной структуры (диафрагмы). Последняя образуется после постепенного вытеснения двух лишних слоев мембран на периферию области контакта. Триламинарная структура – это новый одинарный бислой в зоне контакта, образованный из двух сблизившихся и контактирующих бислоев. Образование триламинарной структуры – универсальный процесс межмембранного взаимодействия.

Добавление ионов Са в малой концентрации в суспензию мембранных везикул вызывает агрегацию, но не слияние последних. При достижении пороговой концентрации Са2+ происходит изотермический фазовый переход фосфолипидов из жидкого состояния в кристаллическое и индуцируется слияние. Ионы Mg повышают температуру фазового перехода фосфолипидов в меньшей степени, чем Са2+. Отсюда следует, что когда Са2+ вызывает слияние везикул, фосфолипиды в присутствии Mg2+ остаются в жидком состоянии и наблюдается агрегация везикул. Это указывает на то, что дестабилизация бислоев при слиянии обусловлена образованием кластеров твердых липидов в жидком бислое.

Структурные перестройки и образование триламинарной структуры могут происходить двумя путями: локально, в зоне «точечного» контакта, в этом случае образуется сталк (перемычка); в зоне плотного дегидратированного контакта (адгезия) на значительной площади мембраны.

Сталкерный механизм предусматривает, что в зоне точечного контакта присутствуют ассиметричные молекулы липидов, участки нестабильности. При контакте эти молекулы хаотически двигаются до тех, пока не образуется триламинарная структура. Адгезионный механизм предусматривает образование в зоне контакта обратных мицелл, сходных гексагональной фазе, в зоне контакта нарушается устойчивость плоской упаковки монослоев, последние преобразуются на обратные мицеллы.

В нормальных условиях слипание и слияние клеток происходит сравнительно редко (в зависимости от функционального состояния клеток). По-видимому, мембранные компоненты различных гранул ответственны за селективную дегрануляцию.

В то время как в нейтрофилах механизмы экзоцитоза не ясны, в нейрональных и дрожжевых клетках механизмы и белковый аппарат секреции изучены довольно детально. Модели слияния мембран, получившей название SNARE гипотеза. Эта гипотеза, впервые предложенная для экзоцитоза синаптических пузырьков, по-видимому ,носит универсальный характер и справедлива как для конститутивного, так и регулируемого слияния мембран.

SNARE гипотеза основана на взаимодействии цитозольных белков NSF (N – ethylmaleimide-sensitive factor) и SNAP (soluble NSF attachment protein) с их рецепторами, названными SNARE (от сочетания английских слов SNAP RECEPTOR). Под термином SNARE традиционно объединяют три группы белков: синтаксисы, синаптобровины/ VAMP (vesicle – associated membrane protein) и SNAP-25 (synaptosome – associated protein of 25 кДа) [45]. Ниже представлена характеристика SNAP, NSF и SNARE, после чего рассмотрен механизм слияния мембран с участием этих белков.

**2. Характеристика основных белковых компонентов модели**

**2.1. VAMP/ синаптобревин**

Семейство VAMP/ синаптобревинов объединяет интегральные мембранные белки с молекулярной массой порядка 18 кДа. Два представителя этого семейства VAMP-1 (синаптобревин 1) и VAMP-2 (синаптобревин 2) впервые были обнаружены и охарактеризованы в везикулах нейтральных клеток [9]. Белки представляют собой продукты двух отдельных генов, экспрессия которых различным образом регулируется в нейронах [30]. В настоящее время ненейрональные гомологи VAMP-1 и VAMP-2 идентифицированы в самых разных эукариотических клетках [13]. Одна из изоформ VAMP, а именно VAMP-3/ селлюбревин, характерна только для ненейрональных клеток [35].

В молекулярной структуре белков этого семейства можно выделить NН2 – концевой район, обогащенный остатками промена (аспарагина), гидрофильный центральный участок – «кор»-протяженностью в 70 аминокислотных остатков и СООН – концевой мембранный домен. В некоторых белках, в частности VAMP из Aplysia Californica и Drosophila melanogaster, на С-конце молекулы присутствует небольшой домен, обращенный в полость везикулы [20]. Гидрофильный «кор» является довольно консервативным и незначительно меняется при переходе от одной изоформы к другой. Напротив, в пределах N-концевого района сконцентрированы аминокислотные домены, отличающие белки этого семейства.

VAMP/ синаптобревинам свойственна мембранная топология и ассоциация с мембранами секреторных везикул. В этой связи белки были названы V-SNARE (от английского слова vesicle – везикула). Для некоторых новых изоформ VAMP обнаружен необычный образец внутриклеточной локализации белка. Так, в частности, VAMP-5 связан с плазматической мембраной миобластов, VAMP-1А идентифицирован в плазмалемме, а VAMP-1В в митохондриях клеток эндотелия [28].

Во многих клетках, способных как конститутивной, так и регулируемой секреции, обнаружены белки, гомологичные VAMP.

Комбинация методов субклеточного фракционирования и иммуноцитохимических методов позволила установить наличие VAMP-иммунореакцивных белков в гранулах различных клеток с регулируемым типом секреции. Так, в частности, эти белки идентифицированы в адипоцитах [19], зимогеновых гранулах ацинарных клеток поджелудочной железы крысы [17], инсулин-содержащих гранулах β-клеток островков Лангерланса поджелудочной железы крысы, специфических гранулах нейтрофилов человека [16], тубувезикулах пристеночных клеток желудка [18], акросомальных везикулах сперматозоидов и кортикальных гранулах яйцеклеток [21] морского ежа. Для гомологов VAMP-2 прослеживается более широкий образец распространения в указанных клетках, чем для другой белковой изоформы – VAMP-1.

VAMP-3/ селлюбревин был обнаружен во всех исследованных клетках и тканях крысы, что указывает на вовлечение этого белка в процессы конститутивного транспорта везикул [35]. Эксперименты по определению внутриклеточной локализации селлюбревина показали, что белок находится преимущественно в структурах эндосомного происхождения.

Результаты трех независимых экспериментальных подходов указывают на участие белков семейства VAMP/ синаптобревинов в секреции. Во-первых, эти белки взаимодействуют с цитозольными белками NSF, а также α- и γ-SNAP, которые являются необходимыми факторами слияния мембран [47].

Во-вторых, VAMP/ синаптобревины являются мишенями для протеолитической деградации клостридиальными нейротоксинами – тетанусным токсином и ботулиническим токсином серотипов В, D, F, G [39], которые блокируют высвобождение нейротрансмиттера в синапсах.

В-третьих, важная роль VAMP/ синаптобревинов в процессах секреции подтверждается результатами генетических экспериментов на дрожжах Saccharomyces cerevisial. Так, мутации в дрожжах по генам, кодирующим гомологи VAMP, приводят к значительным нарушениям конститутивной секреции [24]. При этом мутации по разным изоформам блокируют различные этапы секреторного процесса: транспорт везикул и эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, из аппарата Гольджи к плазматической мембране и из аппарата Гольджи к вакуолям [42]. Мутации в этих генах приводят к нарушению секреции, которое выражается в накоплении везикул, не способных сливаться с плазмолеммой.

**2.2. Синтаксины**

Синтаксины представляют мультигенное семейство интегральных мембранных белков с молекулярной массой ≈ 35 кДа. Первый представитель этого семейства, синтаксин 1А/1В, был идентифицирован в нейронах крысы в морфологически детерминированном участке плазматической мембраны, формирующем зону синаптического контакта [11]. Белок демонстрировал способность к взаимодействию с мембранным белком синаптической везикулы, синаптотагмином (р65), и кальциевым каналом N-типа, который, вовлечен в регуляцию высвобождения нейротрансмиттера. Базируясь на этих наблюдениях, авторы предложили участие синтаксина в слипании/ слиянии мембраны синаптического пузырька с пресинаптической мембраной.

Множественные ненейрональные гомологи синтаксина 1А/1В были найдены в самых разных организмах: от дрожжей до человека [12]. При этом наблюдается избирательный характер распространения отдельных представителей в специфических клеточных фетотипах. Так, синтаксин 1А/1В присутствует исключительно в нейрональных и нейроэндокринных клетках. Синтаксины 2, 4 и 5 довольно широко распространены в разных клетках и тканях млекопитающих. В нейтрофилах человека также был идентифицирован представитель семейства синтаксинов, синтаксин 4 [16].

Синтаксины являются достаточно консервативными белками. Сравнение аминокислотных последовательности шести различных изоформ, присутствующих в тканях крысы, показывает 30-90 %-ную степень гомологии между отдельными белками [12]. При этом степень гомологии между синтаксинами 1А и 1В составляет 90 %, между синтаксинами 2-4 и синтаксинами 1А/1В варьирует от 46 до 64 %, а между синтаксином 5 и остальными белками составляет лишь 23-26 %. Синтаксинам свойственны общие черты структурной организации белковых молекул. Молекулы этих белков протяженностью в 288-301 аминокислотных остатков содержат на карбоксильном конце транс-мембранный домен. Этот домен играет важную роль в «заякоривании» белка в мембране, а также, и в детерминировании внутриклеточной локализации белка [34]. Каждый член семейства синтаксинов содержат несколько доменов, способных к образованию различных спиральных α-спиралей, структур, которые участвуют в межмолекулярных белок-белковых взаимодействиях. Следует отметить, что синтаксинам присуще огромное разнообразие белок-белковых взаимодействий. Установлено, что синтаксин взаимодействует с синколлином, белком зимогеновых гранул поджелудочной железы [22], томосином, тубулином, киназой 5 и некоторыми другими белками. Функциональное значение этих взаимодействий в настоящее время выясняется.

Для синтаксинов характерна ассоциация с акцепторной мембраной, являющейся мишенью для транспортной везикулы. Поэтому синтаксины относят к t-SNARE (от английского слова target – мишень).

В клетках, способных к регулируемому экзоцитозу, синтаксины, главным образом, ассоциированы с плазматической мембраной. Однако недавно в литературе появились сообщения о существовании пула синтаксинов в мембранах секреторных везикул. Так, иммуно-электронной микроскопией установлено присутствие синтаксина 1А в мембранах синаптических пузырьков [33], а в зимогеновых гранулах поджелудочной железы обнаружен синтаксин 3. Эти данные противоречат традиционной точке зрения о синтаксинах, как и белках, функционирующих по типу t-SNARE. При этом не ясно, является ли везикулярный пул синтаксинов функционально значимым.

Как и в случае VAMP/ синаптобревинов, роль белков семейства синтаксинов в процессах секреции подверждается тремя линиями доказательств. 1) Гомологи синтаксина в дрожжах (белки Sso1, Sso2, Pep12, Sed5, T1g1p, T1g2p) необходимы для транспорта внутриклеточных везикул [24]. Белки Sso1 и Sso2 наиболее родственны нейрональным синтаксинам. 2) Ботулинический токсин серотипа С1, разщепляющий молекулы синтаксина, ингибирует высвобождение нейротрансмиттера. 3) Синтаксин взаимодействует с NSF и SNAP, белками, необходимыми для транспорта везикул через мембраны аппарата Гольджи [12].

**2.3. SNAP-25**

SNAP-25 принадлежит к семейству эволюционно консервативных белков, члены которого абсолютно необходимы для экзоцитоза. SNAP-25 был исходно обнаружен в синаптосомах. Белок локализуется в пресинаптической мембране, в связи с чем его, как и синтаксин, относят к t-SNARE.

В отличие от синаптобревина и синтаксина SNAP-25 не является интегральным мембранным белком. Молекулы SNAP-25 ассоциированы с мембраной, за счет жирнокислотных групп, модифицирующих остатки цистеина в центральной части молекулы [27]. В ходе альтернативного сплайсинга РИК образуются две нейронспецифичные изоформы SNAP-25, А и В, которые содержат аминокислотные замены в участке молекулы, вовлеченном в ассоциацию с плазматической мембраной. Эти изоформы имеют различные количественные и анатомические образцы экспрессии в нейронах при развитии мора, что указывает на возможность их участия в разных секреторных процессах.

Как и для описанных выше SNARE, на роль SNAP-25 в секреции указывают данные по осаждению этого белка на NSF/ SNAP аффинных сорбентах и деградации нейротоксинами [39].

До недавнего времени считалось, что SNAP-25 экспрессируется исключительно в нервной системе и нейроэндокринных клетках, таких как островки Лангерганса поджелудочной железы, хромаффинные клетки надпочечников, энтерхромаффинные клетки желудка. Однако экспрессия белка обнаружена также, хотя и в крайне малых количествах, в ограниченном наборе ненейрональных клеток, в частности скелетных мышцах и клетках жировой ткани [31]. Интересно, что оба указанных объекта содержат инсулин-зависимый транспортер глюкозы, GLUT 4. Транспортер находится во внутриклеточных везикулах, а при стимуляции клеток инсулином претерпевает транслокацию к плазматической мембране. SNAP-25 участвует в транслокации GLUT 4 по типу регулируемого экзоцитоза. Совсем недавно SNAP-25 обнаружен в ряде ненейрональных объектах, сперматозоидах морского ежа, где он принимает участие в акросомной реакции, и яйцеклетках мыши [28].

Если SNAP-25 действительно играет ключевую роль в процессах секреции, этот белок или его гомологи должны присутствовать во всех клетках, способных как к конститутивной секреции, так и к регулируемому экзоцитозу. Равичандран с сотрудниками клонировании новую изоформу SNAP-25, названную SNAP-23, которая демонстрирует 72 %-ную гомологию по аминокислотной последовательности со SNAP-25В. Изоформа была найдена во всех исследованных тканях крысы, в том числе мозге. В нейтрофилах человека также недавно было обнаружена экспрессия SNAP-23; причем белок, по-видимому, присутствует в этих клетках в двух изоформах, обозначенных SNAP-23А и SNAP-23В [37].

Распространение SNAP-23 в клетках и тканях указывает на возможность участия этого белка в конститутивной секреции, в то время как SNAP-25, по-видимому, требуется для регулируемой секреции.

**2.4. NSF**

NSF представляет цитозольный белок с молекулярной массой 76 кДа, обладающий АТФазной активностью. Молекула белка содержит в своем составе два АТФ-связывающих домена, которые необходимы для обеспечения процесса слияния мембран. Мутантные формы белка содержащие отдельные аминокислотные замены в АТФ-связывающих доменах, не способны катализировать гидролиз АТФ, что приводит к нарушениям в секреции [48]. АТФазная активность NSF индуцируется комплексом SNAP-синтаксин [9]. NSF выполняет универсальную функцию во всех клетках и требуется для слияния транспортной везикулы с самыми разными акцепторными мембранами как в ходе конститутивной, так и регулируемой секреции.

**2.5. SNAP**

Белки семейства SNAP являются цитозольными белками с молекулярной массой порядка 35-40 кДа, которые обеспечивают связывание NSF с мембранами, претерпевающими слипание/ слияние [48]. SNAP существует в тех изоформах, названных α-, β- и γ-SNAP. Два из этих белков, α и γ найдены в самых разных клетках и тканях, в то время как β-SNAP обнаруживается исключительно в мозге. α и γ изоформы действуют совместно в процессах транспорта везикул между мембранами аппарата Гольджи, и оба эти белка требуются для оптимального связывания NSF с мембранами [45]. Однако следует отметить, что хотя оба белка прямо взаимодействуют с NSF, только α-SNAP, контактирует с мембранным рецептором (SNARE) [44].

Роль α и γ изоформ универсальна, в то время как β-SNAP, выполняет какую-то специализированную функцию. Интересно при этом отметить, что синаптотагмин I, нейрон-специфичный белок, взаимодействует с β-SNAP, но не способен связываться с двумя другими изофорамами SNAP [45]. Вполне возможно, что это белок – белковое взаимодействие необходимо для осуществления нейросекреции.

**2.6.** **Механизм слипания/ слияния мембран**

Молекулярный механизм слипания/слияния мембран, SNARE гипотеза, предложенный исходно для слияния мембраны синаптической везикулы с пресинаптической мембраной [47], представлен на рис.2.1. Гипотеза носит универсальный характер.

Исходно, перед сборкой функционального белкового комплекса синтаксин связан с белком цитозоля n-sec1, а VAMP с мембранным белком везикулы, синаптофизином. Белки n-sec1 и синаптофизин предотвращают синтаксин и VAMP от ассоциации в другими SNARE и являются негативными регуляторами секреции. В ходе состыковки и слипания мембран n-sec1 ассоциирует от синтаксина, а синаптофизин от VAMP, что приводит к образованию SNARE комплекса (коэффициент седиментации 7s), состоящего из синтаксиса, SNAP-25, VAMP и синаптотагнина.

Синаптотагмин представляет собой обязательный компонент SNARE комплекса только в нейронах и некоторых клетках, способных к регулируемой секреции. SNARE комплекс является высокоаффиным рецептором для цитозольных белков NSF и α-SNAP. Присоединение к комплексу α-SNAP приводит к одновременному высвобождению из него синоптотагмина. NSF, обладающий АТФазной активностью, гидролизует АТФ.

Существование белковых комплексов, постулированных SNARE гипотезой, было продемонстрировано экспериментально, в частности, иммунопреципитацией из экстракта мозга [15]. SNARE комплексы, содержащие гомологи синтаксина, VAMP и SNAP-25 были обнаружены и выделены из дрожжей [47], хромаффинных клеток надпочечников [36], адипоцитов мыши [44].

Недавно были получены данные по взаимодействию in vivo – в аксонах и нейромышечных синапсах – синтаксина, SNAP-25 и VAMP [46].

Эксперименты по связыванию белков in vitro продемонстрировали существование бинарных комплексов с микромолярной аффинностью между VAMP и синтаксином, VAMP и SNAP-25, синтаксином и SNAP-25 [17].Некоторые из этих белок-белковых взаимодействий обнаруживают определенную селективность в отношении различных изоформ SNARE. Так, например, VAMP-1 связывается с синтаксинами 1 и 4, но не присоединяется к синтаксинам 2 и 3 [19]. Вполне возможно, что пативных клетках VAMP-1 посредством связывания с определенной изоформой синтаксина участвует в разных секреторных процессах. Не исключена и вероятность того, что указанные взаимодействия VAMP с синтаксином вообще не реализуются in vivo по причине крайне низкой аффинности белков. Добавление же в бесклеточную систему SNAP-25 значительно повышает сродство синтаксина к VAMP и приводит к созданию высокоаффинного комплекса [23]. Структурные изменения в молекулах SNARE были продемонстрированы in vitro при сборке и разборке тримерного комплекса [17].

В молекуле SNAP-25 синтаксин – связывющий домен занимает N-концевую половину молекулы. Синаптобревин – связывающий домен SNAP-25 расположен в С-концевой части молекулы.

Совсем недавно в литературе появились данные двух независимых лабораторий об обнаружении минимального «корового» комплекса SNARE, устойчивого к протеолизу, и идентификации фрагментов белковых молекул, достаточных для сборки функционального тримерного комплекса. Минимальный «кор» включает цитоплазматический домен VAMP/ синаптобревина, С-концевой фрагмент молекулы синтаксина, а также N- и С- концевые участки молекулы SNAP-25. N- и С-концевые фрагменты SNAP-25 могут функционировать как независимые домены и по отдельности связываться с VAMP и синтаксином с образованием стабильного комплекса [41].

SNARE гипотеза постулирует, что обязательным условием эффективного слияния мембран является наличие v- и t-SNARE на разных мембранах.

Согласно SNARE гипотезе, транспортная везикула узнает соответствующую акцепторную мембрану за счет специфического связывания мембранных белков везикулы (v-SNARE) с их строго определенными партнерами на акцепторной мембране (t-SNARE). NSF и SNAP, повсеместно распротраненные цитозольные белки, не являются факторами, определяющими специфичность слияния.

Специфичность, постулируемая SNARE гипотезой, позволяет объяснить присутствие в одной и той же клетке нескольких различных изоформ SNARE. Во-первых, изоформы могут участвовать в разных секреторных процессах. Например, отдельные гомологи синтаксина требуются для миграции транспортной везикулы из эндоплазматического ретикулума в аппарат Голджи, из Гольджи в плазматическую мембрану к вакуолям [15]. Во-вторых, одна и та же изоформа может функционировать в составе разных SNARE комплексов при объединении с разными белками и участвовать в разных секреторных событиях.

Вопрос о том, на какой стадии слияния мембран функционируют SNARE, представляется крайне важным для формирования целостного представления о механизмах секреции и факторах ее реализующих. Известно, что процесс Са2+-регулируемой секреции состоит из четырех основных стадий: 1) «рекрутирование» везикул, 2) «заякоривание»/ слипание везикул с плазматической мембраной, 3) «праймирование»/ подготовка везикул к слиянию с плазматической мембраной и, наконец, 4) Са2+-тримерное слияние мембран [2].

Ранее предполагалось, что SNARE комплекс образуется на стадии заякоривания и необходим для осуществления процесса слипания мембраны везикулы и плазмалеммой.

Эти исследования свидетельствуют о важной роли SNAP-25, VAMP и синтаксина в поздних стадиях экзоцитоза. Некоторые из SNARE идентифицированы в нейтрофилах человека. В настоящее время идентифицированы следующие SNARE белки: два белка семейства VAMP (VAMP-1 и VAMP-2), два белка семейства SNAP-25 (SNAP-25 и SNAP-23), и широкий набор белков семейства синтаксинов, а именно синтаксины 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 и 16. Выявлены две изоформы синтаксина 3: синтаксин 3А, идентичный ранее известному синтаксину 3, и новая изоформа, синтаксин 3В. Множественные изоформы SNARE белков идентифицированных в нейтрофилах человека, по-видимому, могли бы принимать участие в экзоцитозе разных типов гранул и, тем самым являться факторами, обеспечивающими селективный характер дегрануляции. Однако информация о взаимодействиях SNARE белков в этих клетках крайне неполная. Поэтому определенный интерес для установления молекулярных механизмов экзоцитоза представляет выяснение отдельных межбелковых SNARE-SNARE взаимодействий. Основной целью данной работы является выяснение взаимодействия синтаксина 6 с другими SNARE.

**3. Методы**

**3.1. Объекты исследования**

В настоящей работе объектом исследования являлись нейтрофилы периферической крови человека. В качестве контроля использовали экстракт мозга крысы, где присутствуют все нейтрон-специфичные SNARE.

**3.2. Выделение нейтрофилов человека**

Выделение нейтрофилов человека осуществляли по методу Моллинедо (Mollinedo F. et al., 1989). Клетки выделяли из 20 мл крови, взятой у здоровых доноров. Оставляли на 1-2 часа при комнатной температуре для седиментации эритроцитов. Верхний светлый слой суспензии отбирали и подвергали центрифугированию при 1200 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок, обогашенный лейкоцитами, ресуспендировали в 3 мл РВS, после чего суспензию наслаивали на 3 мл Ficoll/ Hypaque и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин. PBS содержит натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный в концентрации 0,02 моль/л, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный в концентрации 0,02 моль/л и натрий хлористый в концентрации 0,1 моль/л. Получали верхний слой (PBS), промежуточный слой (лимфоциты, моноциты, тромбоциты), нижний слой (Ficoll/ Hypaque) и осадок. Осадок, обогащенный нейтрофилами, суспендировали в 2 мл PBS, переносили в предварительно взвешенную центрифужную пробирку, добавляли 6 мл воды и инкубировали в течение 2 мин. При этом примесные эритроциты, присутствующие в осадке, будут разрушены в указанных условиях гипотонического лизиса, а нейтрофилы сохраняют свою целостность. По истечение времени инкубации осматическое давление восстанавливали добавлением 2 мл 3,6 % раствора NaCl, после чего нейтрофилы осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин. Осадок взвешивали и определяли количество выделенных нейтрофилов из расчета, что 106 клетки имеют вес 1,22 мг.

**3.3. Электрофорез белков**

Белковый состав препаратов оценивали при помощи диск-электрофореза в присутствии ДДС-Na по методу Леммли с модификациями. Использовали прибор для вертикального электрофореза (ячейка для электрофореза Mini-PROTEAN, BIO-RAD, Швеция). Разделение белков приводили в мини-гелях. В зависимости от молярной массы интересующего белка в качестве разделяющего геля использовали 12 % полиакриламидный гель, а в качестве концентрирующего – 6 % полиакриламидный гель. Растворы для гелей готовили согласно таблице:

Таблица 3.1.

Конечная концентрация веществ для приготовления гелей.

|  |  |
| --- | --- |
| Исходные растворы | Процентное содержание акриламида |
| 6 % | 12 % |
| 0,5 Мтрис рН 6,8 | 0,125 М | - |
| 1,5 Мтрис рН 8,8 | - | 0,375 М |
| 30 % акриламид | 6 % | 12 % |
| 10 % ДДС-Na | 0,1 % | 0,1 % |
| 1 % персульфат аммония | 0,075 % | 0,05 % |
| 100 % ТЕМЕД | 0,015 % | 0,01 % |

Разделяющий гель полимеризовали в течение 1 часа при комнатной температуре. О завершении полимеризации судили по появлению резкой границы между гелем и дистиллированной водой, которую наслаивали на разделяющий гель. По окончании полимеризации акриламида воду удаляли. В состав электродного буфера входили 0,025 М трис – HCl, рН 8,3; 0,191 М глицин, 0,1 % ДДС-Na. При приготовлении проб белка для электрофореза смешивали 3 объема раствора белка с 1 объемом 4-кратного буфера для приготовления проб. Буфер для приготовления проб содержит 62,5 мМ трис – HCl, рН 7,4, 2,5 % ДДС-Na, 12 % сахарозу, 1 % ДТТ. Перед электрофорезом пробу белка кипятили на водяной ванне 5 минут. Количество белка, наносимого на лунку, варьировали в зависимости от целей эксперимента. В качестве стандартов использовали окрашенные белки – маркеры LMW фирмы LKW (Швеция). Белки – маркеры: α-Лактальбумин – 14,4 кДа, Карбоангидраза – 30 кДа, Ингибитор Трипсина из сои – 20,1 кДа, Овалбумин – 43 кДа, Бычий сывороточный альбумин – 67 кДа, Фосфорилаза b – 94 кДа.

Электрофорез проводили в режиме: 10 мин при 25 В для вхождения белков в гель, а затем 1–1,5 ч при 120 В до начала выхода бромфенолового синего из геля.

После электрофореза гели либо окрашивали Кумасси R-250, либо подвергали иммуноблоттингу. В первом случае гели фиксировали в смеси метанол : уксусная кислота : вода (50:10:50), окрашивали 0,125 %-ным раствором Кумасси ярко голубого R-250 в смеси этанол : уксусная кислота : вода (50:10:40), удаляли фон в растворе этанол : уксусная кислота : вода (15:7,5:77,5) и хранили в 7 %-ной уксусной кислоте.

**3.4. Иммуноблоттинг**

Иммуноблоттинг выполняли в три основных этапа: 1) фракционирование образца (см.3.3.), 2) перенос фракций на фильтр (собственно блоттинг), 3) иммунное выявление антигенов на фильтре.

**3.4.1. Перенос фракций из геля на фильтр**

Белки переносили из геля на фильтр электрофоретическим пометоду Тоубина с модификациями. Использовали нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Перенос осуществляли в приборе для переноса (BIO-RAD, Швеция) (рис.3.1), следуя протоколу фирмы.

Прибор для переноса белков (BIO-RAD, Швеция).

Рис.3.1.

В состав буфера для переноса входили 0,025 М трис – HCl, рН 8,3, 0,192 М глицин, 20 % метанол. Готовили «сэндвич», состоящий из последовательно уложенных друг на друга 1 листа фильтрованной бумаги, нитроцеллюлозы, гель и 1 листа фильтрованной бумаги. Такой «сэндвич» плотно зажимали между двумя губчатыми прокладками и помещали в камеру для переноса. Перенос проводили при комнатной температуре в режиме стабилизации по напряжению (100 В) в течение 1,5-2 часов.

По окончании переноса фильтр подвергали иммунному окрашиванию.

**3.4.2. Иммунное выявление антигенов на фильтре**

Иммунное выявление антигенов на фильтре выполняли по методу Тоубина с модификациями. По окончании электропереноса фильтр промывали в РВS (50 мМ трис HCl, рН 7,5, содержащий 150 мМ NaCl) в течение 5 мин, а затем инкубировали в РВS, содержащем 0,05 % Твина – 20 и 2 % сухого обезжиренного молока в течение 1 часа. Эта стадия необходима для блокирования свободных участков мембраны и предотвращения последующей неспецефической сорбции антител на эти участки. Фильтр отмывали 5 минут в Т-РВS (РВS, содержащий 0,05 % Твина – 20), а затем инкубировали с первичными антителами, взятыми в соответствующих разведениях в Т-РВS (1:1000), в течение ночи при 4 °С. Затем фильтр отмывали Т-РВS (3 раза по 10 минут) и инкубировали с биотинилированными антимышинными либо антикроличьими JgG, взятыми в разведении 1:1000 в Т-РВS, в течение 1 часа. От несвязавшихся иммуноглобулинов фильтр отмывали 3 раза по 10 минут в Т-РВS, а затем инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена, взятым в разведении 1:1000 в Т-РВS, в течение 1 часа. По окончании инкубации фильтр отмывали в Т-РВS 5 раз (первые две отмывки были по 15 минут, а три последние по 5 минут).

Мониторинг иммобилизованных антигенов проводили с помощью окрашивания в 10 % растворе диаминобензидина в 0,1% Т-РВS, содержащим 3% Н2О2.

**3.4.3. Активация нейтрофилов**

Выделенные нейтрофилы ресуспендировали в Hepes/ глюкозном буфере (10 мМ HEPES, рН 7,5, содержащий 150 мМ NaCl, 5 мМ КОН, 1,2 мМ MgCl2, 1,3 мМ CaCl2, 5,5 мМ глюкозы) до концентрации 1-3×107 клеток/мл. Клеточную суспензию делили на аликвоты по 500 мкл., которые либо помещали в ледяную баню (для исследования антигенов в покоящихся клетках) либо подвергали воздействию агента, стимулирующего секрецию. В последнем случае клетки преинкубировали в 4β-форбол 12-миристат 13-ацетатом, взятым в концентрации 20 мг/мл при 37 °С в течение 10 мин., затем активированные и покоящиеся нейтрофилы подвергали процедуре иммунопреципитации.

**3.4.4. Иммунопреципитация**

В экспериментах по иммунопреципитации покоящиеся и активированные нейтрофилы (≈107 клеток) лизировали в 500 мкл лизисного буфера (20 мМ Т рис – НСl, рН 7,2, 100 мМ КСl, 0,9 % Тритон Х-100, 10% глицерол, 2 мМ ФМСФ). Лизаты подвергали центрифугированию при 18000 д (20 мин; 4°С) и отбирали супернатанты. Супернатанты (в составе которых имеются различные SNARE комплексы) подвергали иммунопреципитации. Антитела против VAMP-1, SNAP-25, SNAP-23 сорбировали на протеин А-агарозе (10-20 мкг антител на 100 мкл 20-%-ой протеин А-агарозы) 2 часа при 4 °С. Полученный афинный сорбент отмывали от несвязавшихся антител лизисным буфером, после чего инкубировали с лизатом нейтрофилов в течение носи при 4°С. По окончании инкубации агарозу осаждали и 3 раза промывали лизисным буфером, после чего добавляли 30 мкл буфера для приготовления образцов для электрофореза (62,5 мМ Т рис -–НСl, рН 6,8, 100 мМ дитиотрейтол, 2% SDS, 10% глицерол и 0,1 %, бромфеноловый синий) [5] и иммуноблотингу с использованием антител против синтаксина 6, а также VAMP-1, SNAP-25 и SNAP-23 (для контроля связывания АТ носителя с соответствующими компонентами SNARE комплексов).

**4. Полученные результаты и их обсуждение**

Задача настоящего исследования заключалась в исследовании особенностей функционирования белка синтаксина 6 в экзоцитозе внутриклеточных гранул нейтрофилов человека. К настоящему времени белок синтаксин 6 идентифицирован в нейтрофилах. Установлено, что синтаксин 6 присутствует в плазматической мембране клеток. Так в покоящихся нейтрофилах белок равномерно распределен по всей поверхности клетки, в то время как в нейтрофилах, подвергнутых стимуляции, происходит перераспределение синтаксина 6 и накопление белка в зонах интенсивной дегрануляции. Синтаксин 6 взаимодействует с другими SNARE in vitro. Ранее Равинчандраном с соавторами было обнаружено, что синтаксин 6 способен к взаимодействию с двумя изоформами SNAP-23 (SNAP-23A и SNAP-23B) [43]. Совокупность этих данных позволила заключить, что синтаксин 6, вероятно участвует в экзоцитозе гранул в качестве t-SNARE. Известно, что нейтрофилы человека содержат четыре типа гранул: азурофильные, специфические, секреторные и желатиназные гранулы, которые в разной степени способны претерпевать экзоцитоз. В настоящее время в нейтрофилах человека выявлены множественные изоформы ключевых белков SNARE комплекса: два белка семейства VAMP (VAMP-1 и VAMP-2), два белка семейства SNAP-25 (SNAP-25 и SNAP-23), и широкий набор белков семейства синтаксионов, а именно синтаксины 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9,11 и 16. Следовательно, вполне возможно, что множественные изоформы v- и t-SNARE требуются для обеспечения необходимой селективности при слиянии мембран в нейтрофилах. Таким образом, мы предположили, что в клетке при активации экзоцитоза определенного типа гранул формируются строго определенные SNARE комплексы. Мы попытались выявить и охарактеризовать синтаксин 6 – содержащие SNARE комплексы. Для решения этой задачи был использован экспериментальный подход, основанный на выделении из нейтрофилов человека SNARE комплексов при помощи иммунопреципитации на моноспецифических антителах, присоединенных к протеин А-агарозе и последующем иммунохимическом анализе белкового состава этих комплексов. Выделение SNARE комплексов осуществляли из покоящихся и активированных клеток. Выделение нейтрофилов проводили из свежей периферической крови человека при помощи седиментации эритроцитов, центрифугирования на Ficol/Hipaque и последующего гипотетического лизиса примесных эритроцитов. Выделенные клетки активировали с целью экзоцитоза внутриклеточных гранул. Известно, что нейтрофилы могут находиться как в покоящемся так и в активированном состоянии [8]. При активации резко увеличиваются основные функции нейтрофилов: защитные и воспалительные, за счет дегрануляции внутриклеточных гранул [1], а значит и способность к образованию SNARE комплексов [45]. Нейтрофилы активировали к экзоцитозу при помощи 4β-форбол 12-миристат 13-ацетата (ФМА) в концентрации 20 мг/мл. Из литературных источников известно о существовании большого количества активаторов нейтрофилов, в том числе и активаторов секреции. Так, в частности, секрецию можно индуцировать путем воздействия на клетку форболовых эфиров, хемотаксических пептидов (типа формил-метионил-лейцил-фенилаланина, FMLP), иммунных комплексов антиген/антитело и т.д. Причем, среди этих соединений выявляются индукторы способные вызывать экзоцитоз гранул только определенного типа. Так, например, (FMLP) хемотаксический пептид в концентрации 10-7 М, при которой индуцируется экзоцитоз гранул. Известно, что активация нейтрофилов хемоаттрактантами сопровождается хемотаксином и изменениями формы клеток; клетки при этом становятся асимметричными вытянутыми, приобретают отростки, а лидирующий край клетки формирует зону, вовлеченную в дегрануляцию [5]. В данной работе мы использовали форболмиристатацетат (ФМА), так как он является индуктором экзоцитоза желатиназных и специфических гранул. А так как известно, что VAMP-1; VAMP-2 и SNAP-25, SNAP-23 локализованы в мембранах желатиназных/специфических гранул [8], поэтому был применен именно ФМА. Активацию проводили 10 минут при 37 °С при конечной концентрации индуктора 20 мг/мл, т.к. в этих условиях экзоцитоз происходит полностью. В качестве контроля браликлеточную суспензию, выдержанную в покое при +4°С, 10 мин. Затем активированные и покоящиеся нейтрофилы подвергали процедуре иммунопреципитации. При помощи иммунопреципитации, мы исследовали взаимодействия белков синтаксина 6 с VAMP-1, SNAP-25, SNAP-23. Для изучения взаимодействия синтаксина 6 с белком VAMP-1 было осуществлено осаждение на моноспецифических поликлональных, кроличьих антителах против VAMP-1 (Synaptyc Systems, Германия). Эти тела обладают высокой специфичностью а распознавании VAMP-1. Затем VAMP-1 иммуноприципитаты подвергали электрофорезу в присутствии ДДС-Na для разделения белков в полиакриламидном геле по их молекулярной массе и последующему иммуноблоттингу с применением моноспецифических моноклональных антител, против синтаксина 6. Результаты Иммуноблотинга показаны на рис.4.1. Видно, что в VAMP-1-иммунопреципитатах выявляется синтаксин 6. Таким образом, мы заключили что синтаксин 6 (белок плазматической мембраны, t-SNARE), способен in vivo к связыванию с мембранным белком секреторных гранул VAMP-1, v-SNARE. Сравнительный анализ иммунопреципитатов из покоящихся и активированных форболмиристатацетатом клеток показал, что содержание синтаксина 6 в иммунопреципитатах из активированных клеток значительно выше, чем из покоящихся нейтрофилов. Таким образом, бинарные взаимодействия синтаксина 6/VAMP-1, по-видимому, реализуются при экзоцитозе популяции желатиназных и специфических гранул нейтрофилов человека. Следуя схеме стратегии мы исследовали взаимодействие синтаксина 6 со SNAP-25 и SNAP-23 белками секреторных гранул нейтрофилов. Для этого мы использовали мноспецифические, моноклональные антитела против белка SNAP-23 (SMI 81, Sternberger Monoclonals Inc., США) и поликлональные антитела против SNAP-23. Из литературных данных известно, что в нейтрофилах человека, где присутствует две изоформы SNAP-23 (SNAP-23A и SNAP-23B), синтаксин 6 взаимодействует с обеими изоформами [43] in vitro. При помощи иммуноприципитации на моноспецифических антителах присоединенных к протеин А-агарозе, мы исследовали взаимодействия белков синтаксина 6 со SNAP-23 и SNAP-25. Затем иммуноприципитанты подвергали электрофорезу. Результаты электрофореза показаны на рис.4.2 и рис.4.3. Наши данные свидетельствуют, что взаимодействия синтаксина 6 с белками семейства SNAP-25 происходят и in vivo, т.е. интактных клетках.

кДа

К

П

А

43

30

Рис.4.1. Иммунодетекция синтаксина 6 в VAMP-1 иммуноприципитатах из нейтрофила человека. Равные количества иммуноприципитатов были подвергнуты разделению в 12%-ом ПААГ и иммуноблотингу с использованием антител против синтаксина 6.

К – экстракт из мозга крысы (3 мкг белка).

П – клетки не подвергнутые активации (покой).

А – активированные ФМА клетки.

кДа

К

П

А

43

30

Рис.4.2. Иммунодетекция синтаксина 6 в SNAP-25 иммуноприципитатах из нейтрофила человека. Равные количества иммуноприципитатов были подвергнуты разделению в 12%-ом ПААГ и иммуноблотингу с использованием антител против синтаксина 6.

К – экстракт из мозга крысы (3 мкг белка).

П – клетки не подвергнутые активации (покой).

А – активированные ФМА клетки.

Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет заключить, что экзоцитоз специфических/желатиназных гранул, по-видимому, сопровождается образованием SNARE комплексов, в состав которых входят синтаксин 6 /SNAP-25/ VAMP-1 или синтаксин 6 /SNAP-23/ VAMP-1.

кДа

К

П

А

43

30

Рис.4.3. Иммунодетекция синтаксина 6 в SNAP-23 иммуноприципитатах из нейтрофила человека. Равные количества иммуноприципитатов были подвергнуты разделению в 12%-ом ПААГ и иммуноблотингу с использованием антител против синтаксина 6.

К – экстракт из мозга крысы (3 мкг белка).

П – клетки не подвергнутые активации (покой).

А – активированные ФМА клетки.

**Выводы**

При помощи иммунопреципитации изучены взаимодействия белка плазматической мембраны. Синтаксина 6, с отдельными представителями белков группы SNARE in vitro. Синтаксин 6 взаимодействует с белками мембран гранул VAMP-1 и двумя белками семейства SNAP-25 (SNAP-23 и SNAP-25).

На основании литературных данных и результатов собственных исследований предложена схема, объясняющая экзоцитоз специфических гранул нейтрофилов человека через образование тримерных SNARE комплексов – VAMP-1 /синтаксин 6/ SNAP-25 и VAMP-1 /синтаксин 6/ SNAP-23.

**Список использованной литературы**

1. Белова Л.А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // Биохимия. – 1997. – Т.62. – С. 659-668.
2. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз // Биохимия мембран. – М.: Высшая школа, 1987. – 95 с.
3. Маянский А.И., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск, 1983.
4. Набокина С.М., Моллинедо В. Внутриклеточная локализация VAMP-1 в нейтрофилах человека // Тезисы докладов, 1998. – С. 82.
5. Набокина С.М. Регуляция экзоцитоза в нейтрофилах человека: Автореф.: дисс…докт.биол.наук: 03.00.25. – М., 1999. – 33 с.
6. Оглоблина О.Г. Вопросы медицинской химии. – М., 1988. – С. 2-9.
7. Хорст А. Молекулярные основы патагенеза болезней. – М.: Медицина, 1982.
8. Чижевский А.А. Биофизические механизмы оседания эритроцитов. – Новосибирск, 1987. – С. 39-43.
9. Barnard R.J., Morgan A., Burgoyne R.D. Stimulation of NSF ATPase activiny by alhpa – SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis // J. Cell Bid. – 1997. – V.139. – P. 875-883.
10. Baumert M., Maycox P.R., Navone F., Decamilli P., Jahn R. Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain // EMBOJ. 1989. – V.8. – P. 379-384.
11. Bennett M.K., Calakos N., Sheller R.H. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic at presynaptic active zones // Science. – 1992. – V. 257. – P. 255-259.
12. Bennett M.K., Garcia-Arraras J.E., Elferink L.A., Peterson K., Fleming A.M., Hazuka C.D., Scheller R.H. The syntaxin family of vesicular transport receptors // Cell-1993. – V. 74. – P. 863-873.
13. Bock J.B., Lin R.C., Scheller R.H. A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles // J. Biol. Chem – 1996. – V.271. – P. 17961-17965.
14. Bock J.B., Scheller R.H. A fusion of new ideas // Nature. – 1997. – V.387. – P. 133-135.
15. Brennward P., Kearns B., Champion K., Keranen S., Bankaitis V., Novick P. Sec 9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the offector of Sec 4 function in exocytosis // Cell. – 1994. – V.79. – P.245-258.
16. Brumell J.H., Volchuk A., Sengelov H., Borregaard N., Cieutat A.–M., Baiton D.F., Grinstein S., Klip A. Subcellural distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments // J. Immund. – 1995. – V.155. – P.5750-5759.
17. Galakos N., Bennett M.K., Peterson K.E., Scheller R.H. Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficing // Science. – 1994. – V.263. – P.1146-1149.
18. Calhoun B.C., Goldenring J.R. Two Rab proteins, vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs), are present on immunoisolated parietal cell tubulovesicles // Biochem. J. – 1997. – V.325. – P.559-564.
19. Cheatham B., Volchuk A., Kahn C.R., Wang L., Rhodes C.J., Klip A. Insulinstimulated translocation of GLUT 4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – V.93. – P15169-15173.
20. Chin A.C., Burgess R.W., Wong B.R., Schwarz T.L., Scheller R.H. Differential expression of transcripts from syb, a Drosophila melanogaster gene encoding VAMP (synaptobrevin) that is abundant in non – neuronal cells // Gene. – 1993. – V.131. – P.175-181.
21. Conner S., Leaf D., Wessel G. Members of the Snare hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg // Mol. Reprod. Dev. – 1997. – V.48. – P.106-118.
22. Edwardson J.M. A cell-free system Ca2+-regulated exocytosis // Methods. – 1998. – V.16. – P. 209-214.
23. Fasshauer D., Eliason W.K., Brunger A.I., Jahn R. Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly // Biochemistry. – 1998. – V.37. – P.10354-10362.
24. Ferro-Novick S., Jahn R., Vesicle fusion from yeast to man // Nature. – 1994. – V.370. – P.191-193.
25. Fujita H., Tuma P.L., Finnegan C.M., Locco L., Hubbard A.L. Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exibit but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane // Biochem. J. – 1998. – V.329. – P. 527-538.
26. Gaisano H.V., Sheu L., Grondin G., Ghai M., Bouquillon A., Lowe A., Beaudoin A., Trimble W.S. The vesicle-associated membrane protein family of proteins in rat pancreatic and parotid acinar cells // Gastroenterology. – 1996. – V.111. – P. 1661-1669.
27. Hess D.T., Slater T.M., Wilson M.C., Skene J.H.P. The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polyleltide in rapid exonal transport and a major substrate for palmiloylation in adult CNS // J. Neurosci. – 1992. – V.12. – P.4634-4641.
28. Ikebuchi Y., Masumoto N., Matsuoka T., Yokoi T., Tahara M., Tasaka K., Miyake A. SNAP-25 is essential for cortical granule exocytosis in mouse eggs // Am. J. Physiol. – 1998. – V.274. – P.1496-1500.
29. Isemann S., Knew-Goodall Y., Gamble J., Vadas M., Wattenberg B.W. A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal // Mol. Biol. Cell. – 1998. – V.9. – P.1649-1660.
30. Jacobsson G., Pichl F., Meuster B. VAMP-1 and VANP-2 gene expression in rat spinal motoneuruns: differential regulation after neuronal injury // Eur. J. Neurosci: - 1998. – V.10. – P.301-316.
31. Jagadish M.N., Fernandec C.S., Hewich D.R., Macaulay S.L., Gough K.H., Grusovin J., Verkuylen A., Cosgrove L., Alafaci A. Insulin-responsive tissues contain the core complex protein SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) A and B isoforms in addition to syntaxin 4 and synaptobrevins 1 and 2 // Biochem. J. – 1996. – V.317. – P.945-954.
32. Klumperman J., Kuliawt R., Criffith J.M., Geuze H.J. Mannose G-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles // J. Cell Biol. – 1998. – V.141. – P.359-371.
33. Kretzschman S., Volknandt W., Zimmermann H. Colocalization on the same synaptic vesicles of syntaxin and SNAP-25 with synaptic vesicle proteins: A reevaluation of functional models required? // Neurisci. Res. – 1996. – V.26. – P.141-148.
34. Masaki R., Yamamoto A. Important roles of the C-terminal portion of HPC-1/syntaxin 1A in membrane anchoring and intracellular localization // J. Biochem. (Tokyo). – 1998. – V.124. – P.311-318.
35. McMahon H.T., Usharyov Y.A. Cellubrevin is a ubiguitous vesicle fusion protein // Nature. – 1993. – V.364. – P.346-349.
36. Misonou H., Kumaruka K. Regulation of the priming of exocytosis and the dissociation of SNAP-25 and VAMP-2 in adrenal chromaffin cells // Neurosci. Lett. – 1997. – V.232. – P.182-184.
37. Mollinedo F., Lazo P.A., Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – V.231. – P.808-812.
38. Mollinedo F., Naranjo J.R. Uncuopled changes in the expression of the jun family members during myeloid cell differentiation // Eur. J. Biochem. – 1991. – V.200. – P.483-486.
39. Niemann H., Blasi J. Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis // Trends Cell Biol. – 1994. – V.4. – P.179-185.
40. Pevcner J., Calacos N., Ting A.E. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex // Neuron. – 1994. – V.13. – P.353-361.
41. Poirier M.A., Xiao. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle // Nat. Struet. Biol. – 1998. – V.5. – P.765-769.
42. Protopopov V., Gerst J. Homologs of the synaptobrevin VAMP family of the synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in S. cerevisial // Cell. – 1993. – V.74. – P.855-861.
43. Ravichandran V. Identification of a novel syntaxin – and synaptobrevin / VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues // J. Biol. Chem. – 1996. – V.271.
44. Rothman J.E. Mechanisms of intracellular protein transport // Nature. – 1994. – V.372. – P.55-63.
45. Schiavo G., Stenbeck G. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses // Proc.Natl.Acad. Biol. Chem. – 1998. – V.273.
46. Shiff G., Morel N. Association of syntaxin with SNAP-25 and VAMP (synaptobrevin) during axonal traonsport // J. Neurosci. Res. – 1997. – V.48.
47. Sollner T., Whiteheart S.W. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion // Nature. – 1993. – V.362. – P.318-324.
48. Whiteheart S.W., Griff C., Clary D.O. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform // Nature. – 1993. – V.362. – P.353-355.