

СИНТЕЗ МЕМБРАННОГО БЕЛКА СЛИЯНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ SNAP25 В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ

© 2015 г. Р. Р. Исламов, Д. В. Самигуллин, А. А. Ризванов,
Н. И. Бондаренко, академик РАН Е. Е. Никольский

Поступило 09.04.2015 г.

Ранее нами была сформулирована гипотеза о компартментном синтезе белка в аксоне двигательного нейрона. В аксонном холмике, по всей длине аксона и в его окончаниях локально синтезируются специфические белки, обеспечивающие функцию каждого компартмента. В подтверждение данной гипотезы в настоящей работе был изучен локальный синтез белков в двигательном нервном окончании мышцы.

DOI: 10.7868/S0869565215250258

Согласно современным представлениям, синтез белка в нейроне осуществляется не только в перикарионе и дендритах, но и в аксоне [1]. Принимая во внимание тот факт, что функции аксона в разных его отделах достаточно специфичны (генерация нервного импульса происходит в аксонном холмике, его проведение осуществляется по всей длине аксона, а секреция нейромедитора только в его окончаниях), была сформулирована гипотеза о компартментном синтезе белка в аксоне [2]. Другими словами, есть основание полагать, что в разных участках аксона синтезируются преимущественно те белковые молекулы, которые обеспечивают функционирование данного компартмента аксона. Исходя из вышесказанного можно предположить, что белки, обеспечивающие экзоцитоз медиатора, синтезируются в терминальных разветвлениях аксона. Следуя этой гипотезе, в экспериментах на нервно-мышечном препарате крысы иммуногистохимическим методом с помощью электронной микроскопии в двигательных нервных окончаниях аксона мы впервые обнаружили рибосомальный белок L26 [3]. Известно, что в секреции нейромедитора в нервной терминали принимают участие семейство белков SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Одним из белков комплекса SNARE является белок SNAP25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa), кото-

рый локализуется преимущественно в плазматической мембране и осуществляет Ca^{2+} -зависимое слияние синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. При этом период полужизни SNAP25 составляет всего 16 ч [4], что требует постоянного обновления белка для нормального функционирования синапса. Следовательно, установление факта синтеза SNAP25 в окончаниях аксона может явиться хорошим подтверждением справедливости гипотезы компартментного синтеза белка в аксоне.

Одним из современных методов исследования функции белка является метод РНК-интерференции, позволяющий локально ингибировать продукцию белка путём деградации его мРНК. Ранее с помощью данного метода нами были установлены факт существования механизма РНК-интерференции в аксоне и возможность применения короткой интерферирующей РНК (киРНК) для исследования синтеза белка в нервном окончании [5, 6].

В настоящем исследовании на первом этапе для получения прямого доказательства возможности синтеза белка в пресинаптической зоне в двигательную нервную терминаль инъецировали рекомбинантную мРНК зелёного флуоресцирующего белка (ЗФБ) и наблюдали появление специфического свечения. На втором этапе исследования для подтверждения факта локального синтеза мембранного белка слияния синаптических везикул SNAP25 мы обнаружили факт нарушения квантовой секреции медиатора ацетилхолина в нервно-мышечном препарате после введения в нервную терминаль киРНК, комплементарной мРНК SNAP25.

Казанский государственный медицинский университет
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской Академии наук
E-mail: samid75@mail.ru
Казанский (Приволжский) федеральный университет

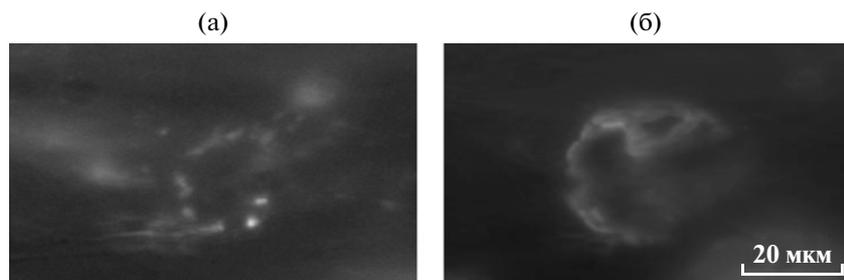


Рис. 1. Инъекция мРНК зелёного флуоресцирующего белка в двигательное нервное окончание мышцы. (а) – микрофотография нервного окончания мышцы через 24 ч после микроинъекции мРНК ЗФБ в режиме флуоресценции. (б) – микрофотография нервного окончания мышцы в режиме флуоресценции, окраска постсинаптических никотиновых рецепторов меченым α -бунгаротоксином (тот же препарат).

Эксперименты проводили на изолированном нервно-мышечном препарате *m. levator auris longus* мышей линии C57BL/6N (питомник “Пушино”). Препарат помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал раствор Рингера следующего состава (в мМ): NaCl 137.0, KCl 5.0, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 1.0, NaHCO₃ 11.0, глюкоза 11.0, pH 7.3–7.4. В экспериментах по изучению электрофизиологической активности нервно-мышечного препарата для предотвращения мышечных сокращений с целью регистрации одноквантовых токов концевой пластинки (ТКП) использовали физиологический раствор с пониженным содержанием кальция (0.5 мМ) и повышенным содержанием магния (5.0 мМ). Опыты проводили при температуре $20.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$, которую поддерживали с помощью элементов Пельтье.

Синтез мРНК гена ЗФБ проводили с помощью набора mScript mRNA Production System (MSC11610, “Cambio”, Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя. В качестве матрицы ДНК использовали плазмиду Monster Green Fluorescent Protein phMGFP Vector (E6421, “Promega”, США). мРНК гена ЗФБ вводили в нервную терминаль в концентрации 0.38 мкг/мкл. В эксперименте с ингибированием синтеза белка с помощью механизма РНК-интерференции в двигательную нервную терминаль в опытной серии ($n = 4$) вводили раствор киРНК (100 нМ), комплементарной мРНК мембранного белка слияния синаптических везикул SNAP25 (sc-36516, “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, США), а в контрольной серии ($n = 4$) – раствор соответствующей неактивной киРНК (100 нМ, sc-37007 “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”). киРНК и мРНК ЗФБ растворяли в 200 мМ растворе KCl, предварительно подвергнутом стерилизующей фильтрации.

Микроинъекции РНК в нервное окончание осуществляли под визуальным контролем при помощи микроскопа Olympus BX 51 (“Olympus Corp.”, Япония) с водоиммерсионным объекти-

вом $\times 60$, как описано в работе [7]. Инъекционную микропипетку, сопротивлением 150–200 мОм, содержащую порцию вводимого вещества, подводили к миелинизированной части терминали при помощи микроманипулятора Piezo-Patch PPM5000 (“WPI”, США). Используя режим микроманипулятора “прокол”, прокалывали мембрану нервного окончания и с помощью пневмоинъектора PV820 (“WPI”) впрыскивали около 100 пл киРНК или мРНК ЗФБ. Для обеспечения визуальной верификации качества микроинъекции и отсутствия повреждений пресинаптической мембраны в растворы киРНК добавляли индифферентный флуоресцентный краситель Alexa fluor 448 (“Invitrogen”, США).

Нервно-мышечный препарат после микроинъекции мРНК ЗФБ помещали в среду RPMI 1640, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% раствор пенициллина и стрептомицина (“ПанЭко”, Россия), и культивировали 24 ч. Флуоресцентное исследование выявило специфическое свечение в зоне нервного окончания, однозначно свидетельствующее о наличии синтеза ЗФБ в окончаниях аксона. Дополнительное окрашивание нервно-мышечного препарата α -бунгаротоксином, конъюгированным с флуоресцентной меткой, показало, что данное специфическое флуоресцентное свечение наблюдается в месте локализации постсинаптических ацетилхолиновых рецепторов (рис. 1).

Регистрацию синаптической активности до и после инъекции киРНК осуществляли при помощи стандартной микроэлектродной методики. Регистрировали спонтанные и вызванные ТКП при раздражении нерва с частотой 15 имп./с. Средний квантовый состав ТКП рассчитывали “прямым” методом как отношение количества зарегистрированных ТКП к количеству стимулирующих импульсов. Через 4 ч после инъекции киРНК, комплементарной мРНК SNAP25, средний квантовый состав ТКП снижался в 10 раз (0.30 ± 0.04 кванта в опыте и 0.03 ± 0.02 в контроле, $n = 4$, $p < 0.05$). Инъекции контрольной киРНК

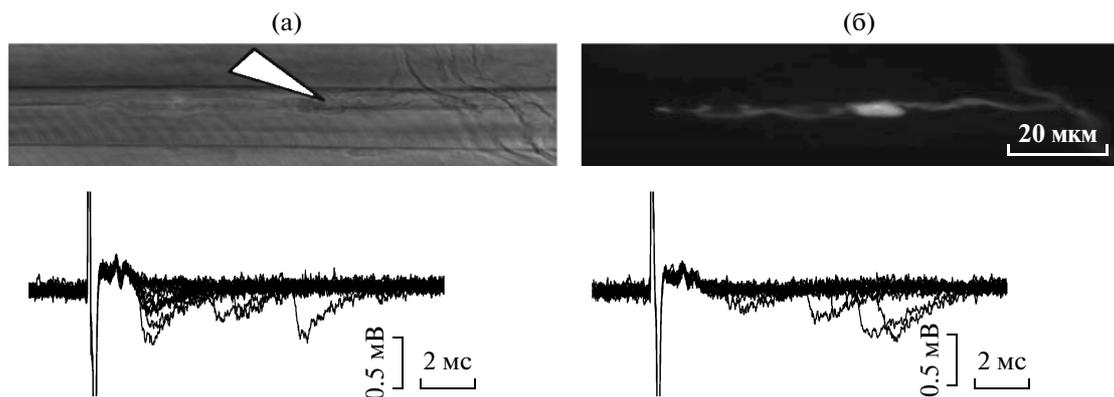


Рис. 2. Инъекция киРНК, комплементарной мРНК мембранного белка слияния синаптических везикул SNAP25, в двигательное нервное окончание мышцы. (а) — микрофотография нервного окончания мышцы в режиме освещения “светлое поле” и суперпозиция вызванных токов нервного окончания и ТКП при стимуляции двигательного нерва с частотой 15 имп./с в контроле. Стрелкой обозначено место микроинъекции киРНК. (б) — микрофотография нервного окончания в режиме флуоресценции и суперпозиция вызванных токов нервного окончания и ТКП при стимуляции двигательного нерва с частотой 15 имп./с через 4 ч после микроинъекции комплементарной киРНК. Данные получены при исследовании одного и того же препарата.

не оказывали достоверного влияния на величину среднего квантового состава ТКП (0.46 ± 0.13 кванта до инъекции и 0.40 ± 0.15 после инъекции, $n = 4$, $p > 0.05$, рис. 2).

Результаты проведенного исследования показали, что SNAP25 синтезируется в двигательной нервной терминали и что уровень содержания мРНК SNAP25 влияет на активность экзоцитоза нейромедиатора. Кроме того, из этих результатов следует, что в терминальных разветвлениях аксона двигательного нейрона млекопитающих “работают” молекулярные механизмы, ответственные не только за синтез белка, но и за деградацию мРНК.

Таким образом, в настоящем исследовании нами получено доказательство справедливости гипотезы компартментного синтеза белка в аксоне двигательного нейрона млекопитающих. Результаты проведенного исследования синтеза ЗФБ дают основания прийти к заключению, что в двигательной нервной терминали присутствуют все необходимые компоненты для синтеза белка, а эксперименты с введением киРНК, комплементарной мРНК SNAP25, доказывают существование локального синтеза белков семейства SNARE, обеспечивающих экзоцитоз нейромедиатора.

Исследование частично поддержано грантами РФФИ № 13–04–00310 (ИРР) и № 13–04–00886 (СДВ), Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий” и Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ РФ (НШ-5584.2014.4). Также в работе использовали средства субсидии, выделен-

ной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Отдельные эксперименты проведены на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deglincerti A., Jaffrey S.R. // *Open Biol.* 2012. V. 2. 120079. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120079>
2. Исламов Р.Р., Тяпкина О. В., Еремеев А.А., Шаймарданова Г.Ф., Чакаева Е.А., Козловская И.Б., Никольский Е.Е. // *Биофизика. Биофизика клетки.* 2010. Т. 55. № 5. С. 842–849.
3. Сальников В.В., Мишагина Е.А., Козловская И.Б., Никольский Е.Е., Григорьев А.И., Исламов Р.Р. // *ДАН.* 2009. Т. 427. № 2. С. 270–272.
4. Sanders J.D., Yang Y., Liu Y. // *J. Neurosci. Res.* 1998. V. 53. P. 670–676.
5. Rizyanov A.A., Muchamediarov M.A., Palotás A., Islamov R.R. // *Exp. Brain Res.* 2009. V. 195. № 1. P. 1–4.
6. Murashov A.K., Chintalgattu V., Islamov R.R., Lever T.E., Pak E.S., Sierpinski P.L., Katwa L.C., Van Scot M.R. // *FASEB.* 2007. V. 21. № 3. P. 656–670.
7. Coleman W.L., Bill C.A., Simsek-Duran F., Lonart G., Samigullin D., Bykhovskaia M. // *J. Physiol. London.* 2008. V. 586. № 19. P. 4649–4673.