



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93637** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C07D 277/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 04639	(72) Винахідник(и): Борисова Тетяна Олександрівна (UA), Романенко Олександр Вікторович (UA), Крисанова Наталія Валеріївна (UA), Борисов Арсеній Андрійович (UA), Остапченко Людмила Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.04.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2014, Бюл.№ 19	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA), ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)

(54) БІЛКОВИЙ КОМПЛЕКС ФЕРИТИН

(57) Реферат:

Білковий комплекс феритин, до складу якого входять залізні наночастинки, що викликає дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул у нервових терміналях головного мозку

UA 93637 U

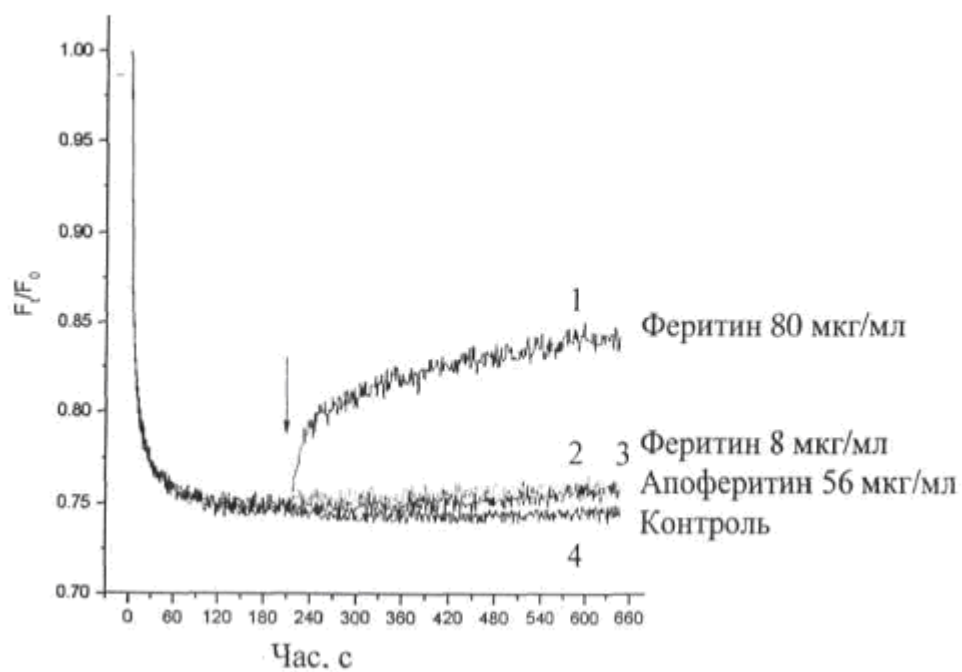


Fig.

Корисна модель належить до галузі біотехнології та медицини.

Задачею корисної моделі є дослідження дії білкового комплексу феритину, до складу якого входять магнітні залісні наночастинки на протонний градієнт синаптичних везикул в нервових терміналях головного мозку.

5 Вивчення дії феритину на протонний градієнт синаптичних везикул в нервових терміналях головного мозку проводилось у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України і на кафедрі біології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Одним з ключових етапів синаптичної трансмісії є екзоцитоз - вивільнення нейромедіаторів із синаптичних везикул шляхом їх злиття з плазматичною мембраною нервових закінчень. Синаптичні везикули є кислими компартментами нервових закінчень, які зберігають нейротрансмітери і вивільнюють їх шляхом екзоцитозу при стимуляції. Накопичення ацетилхоліну, моноамінів, γ -аміномасляної кислоти, гліцину і глутамату в синаптичні везикули здійснюється специфічними везикулярними транспортерами, функціонування яких залежить від протонного електрохімічного градієнта $\Delta\mu\text{H}^+$, який створюється V-АТРазою [1, 2]. У цьому контексті закислення синаптичних везикул є загальною важливою характеристикою, яка забезпечує акумуляцію нейромедіаторів [3]. Оскільки протонний градієнт синаптичних везикул є важливим для акумуляції нейромедіаторів, очевидно, що його зменшення може призвести до екзоцитозу спустошених везикул у відповідь на деполяризацію плазматичної мембрани. Було показано, що неповне заповнення синаптичних везикул нейромедіатором призводить до зниження вивільнення шляхом екзоцитозу, що не супроводжується змінами в злитті синаптичних везикул і/або інших стадіях екзоцитозу [4-6]. Оскільки вивільнений з нервових закінчень в синаптичну щілину нейромедіатор зв'язується з мембранними рецепторами на постсинаптичній мембрані та активує відповідні сигнальні шляхи, то зменшення сигналу може викликати значні порушення процесу синаптичної передачі.

Нещодавно було висунуто гіпотезу, що однією з причин розвитку нейрологічних захворювань може бути порушення транспорту заліза у мозку, що здійснюється за допомогою глобулярного білкового комплексу феритину, до складу якого входять магнітні залісні наночастинки [7]. Основною функцією феритину, який було знайдено в багатьох прокариотичних та еукаріотичних організмах, є вилучення надлишку іонів заліза та переведення їх в безпечну мінеральну форму [8-11]. Феритин складається з 24 субодиниць, які формують сферичну оболонку з великою порожниною, де може розміщуватися до 4500 іонів тривалентного заліза у формі компактних мінеральних кристалітів, що нагадують феригідрити. Феритинове ядро виявляє суперпарамагнітні властивості, які характерні для магнітних наночастинок. Іони заліза входять до ядра феритину крізь міжсубодиничні канали, при цьому в середньому діаметр феритинового ядра змінюється в різних тканинах від 3,5 нм до 7,5 нм. Феритин забезпечує динамічний баланс заліза, захищаючи клітину від потенційного залізо-опосередкованого ушкодження вільними радикалами та вивільнюючи іони металу за потреби. В середині клітини феритин було знайдено в цитозолі, ядрах, ендолізосомальних компартментах та мітохондріях. Позаклітинний феритин знайдено в сироватці крові, синовіальній та цереброспінальній рідині. Експерименти з клітинами кишечника Сасо-2 показали, що на ентероцитах знаходиться феритиновий рецептор і вони можуть поглинати феритин рецептор-опосередкованим шляхом [10]. Також феритиновий рецептор присутній на плацентарних мембранах. У комах та черв'яків, феритин належить до класичних білків-транспортерів заліза, що секретуються. Внутрішньоклітинний та позаклітинний феритин може відігравати роль у між- та внутрішньоклітинному перерозподілі заліза.

Нині існує припущення, що феритин може відігравати суттєву роль при нейродегенерації [7]. Механізм, за допомогою якого феритин переміщується через гематоенцефалічний бар'єр є клатрин-залежним, схожий на раніше виявлений для трансферину. Зв'язування екзогенного феритину з рецепторами клітинної поверхні розглядається як важливий шлях надходження заліза в мозок [11, 12]. Порушення надходження заліза в мозок або регуляції цього процесу може спричинювати аномальний перерозподіл заліза, що сприяє розвитку цілої низки нейрологічних порушень.

У рамках даної роботи був проаналізований вплив феритину на протонний градієнт синаптичних везикул у ізольованих нервових терміналях головного мозку.

55 Ізольовані нервові термінали (синаптосоми), виділені з головного мозку щурів, зберігають усі властивості інтактного нервового закінчення, що забезпечують процес передачі нервового імпульсу, а саме здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатори, підтримувати мембранний потенціал та функціональний стан синаптичних везикул. Беручи до уваги дані, що наведені вище, доцільним є аналіз впливу феритину на протонний градієнт синаптичних

везикул у синапсосомах, що матиме значення для використання феритину у галузі біотехнології та медицині для модуляції транспорту нейромедіаторів у нервових терміналях головного мозку.

В основу корисної моделі поставлено задачу того, що відкриті нові властивості природного білкового комплексу феритину, до складу якого входять магнітні залізні наночастинки, щодо дії на протонний градієнт синаптичних везикул в нервових терміналях головного мозку.

Показано, що феритин викликає дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул в препараті ізольованих нервових терміналей головного мозку щурів. Синапсосоми попередньо навантажували рН-чутливим флуоресцентним зондом акридиновим оранжевим, який акумулюється в кислих компартментах синапсосом, а саме синаптичних везикулах. Додавання феритину у концентрації 80 мкг/мл миттєво викликає вивільнення флуоресцентного зонда з синапсосом.

Цей факт є важливим для використання феритину у галузі біотехнології та медицині для модуляції транспорту глутамату у нервових терміналях головного мозку.

Методика виділення пресинаптичних нервових закінчень головного мозку щурів та визначення рівня закислення синаптичних везикул

Виділення синапсосом з головного мозку щурів

Щурів-самців лінії Wistar масою 100-120 г декапітували, великі півкулі головного мозку швидко переносили в льодяний розчин 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) та 0,2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). Усі операції проводилися при 4 °С. Синапсосоми виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням в градієнті фіколу, застосовуючи метод Котмана [14] з модифікацією: розчин сахарози для приготування градієнта фіколу містив 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) і 0,2 мМ ЕДТА. Синапсосомальну фракцію, отриману при фракціонуванні в градієнті фіколу, розводили 10 об'ємами 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) та центрифугували при 20000 g протягом 20 хв. Отриманий осад повільно суспендували в 4 мл оксигенованого холодного середовища, що містило (в мМ): NaCl - 126, KCl - 5, MgCl₂ - 1,4, NaH₂PO₄ - 1,0, HEPES - 20, CaCl₂ - 2 і d-глюкозу - 10 (pH 7,4), (кінцева концентрація білка становила біля 4 мг/мл), та використовували в експериментах протягом 2-4 годин після виділення. Концентрацію білка визначали за методом Larson [15].

Визначення рівня закислення синаптичних везикул

Для дослідження закислення синаптичних везикул був використаний рН-чутливий флуоресцентний барвник акридиновий оранжевий, що, як показав Zoccarato (3), селективно накопичується у клітинних компартментах з кислими значенням рН (зокрема в синаптичних везикулах) [16]. Акридиновий оранжевий - це ліпофільний амін; непротонована форма якого вільно проникає в мембрану. Він стає непроникаючим після протонування в кислому просторі органел, що мають всередині позитивний мембранний потенціал. Розподіл акридинового оранжевого залежить від рН. Таким чином, флуоресценція акридинового оранжевого, акумульованого в органелах, пропорційна рН органели і якісно може віддзеркалювати рівень рушійної сили для наповнення синаптичних везикул нейромедіатором. Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія), на довжинах хвиль збудження та емісії 490 та 530 нм, відповідно, (ширина щілин по 5 нм). Реакція починалася після додавання акридинового оранжевого (кінцева концентрація 5 мкМ) до суспензії синапсосом (кінцева концентрація білка 0,2 мг/мл), при постійному перемішуванні та після преінкубації синапсосомальної суспензії протягом 10 хв. при 37 °С. Флуоресценцію визначали згідно формули:

$$F = F_t / F_0$$

де F_0 та F_t - інтенсивності флуоресценції акридинового оранжевого, відповідно, за відсутності та в присутності синапсосом. Значення F_0 розраховувалось шляхом екстраполяції функції експоненційного затухання до $t = 0$.

В наших експериментах додавання синапсосомальної суспензії до розчину акридинового оранжевого супроводжувалось частковим гасінням флуоресценції внаслідок входу барвника в кислі компартменти синапсосом, а саме синаптичні везикули. Акумуляція акридинового оранжевого не є швидким процесом, стабілізація рівня флуоресцентного сигналу проходила впродовж декількох хвилин (Фіг.).

Додавання феритину (80 мкг/мл) до синапсосом призводило до вивільнення акумульованого барвника і, як наслідок, до суттєвого (~ 40 %) збільшення флуоресцентного сигналу, що свідчить про миттєву дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул, викликану феритином (Фіг.).

Як було зазначено вище, молекула феритину складається з білкової оболонки, в середині якої розташована порожнина з мінеральною наночастинкою, що нагадує феригідрит. Для

дослідження ефектів, пов'язаних з протеїновим компонентом молекули феритину, було проаналізовано протонний градієнт синаптичних везикул в присутності апоферитину, який містить лише залишок слідів заліза. Слід зазначити, що в молекулі апоферитину (A3660, Sigma лот 061M6039) концентрація заліза складає 0,025 мг/мл (0,0025 % залишкового заліза), в той час як в молекулі феритину (F4503, Sigma, лот 079K7001) - 7,13 мг/мл (вміст заліза - 0,7 %). Апоферитин в концентрації 80 мкг/мл практично не впливав на протонний градієнт синаптичних везикул у синапсосомах. Отже, вплив феритину на протонний градієнт синаптичних везикул обумовлений неорганічним компонентом молекули, а саме феррігідритом (Фіг.).

Таким чином, слід підкреслити наступне:

1. Феритин миттєво викликає дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул в ізольованих нервових закінченнях головного мозку щурів.

2. Зниження протонного градієнта синаптичних везикул в ізольованих нервових закінченнях головного мозку щурів на 40 % відбувається при додаванні 80 мкг/мл феритину в середовище інкубації.

3. Вплив феритину на протонний градієнт синаптичних везикул обумовлений неорганічним компонентом молекули, а саме феррігідритом.

Література:

1. Moriyama Y, Maeda M, Futai M. The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J Exp Biol.* 1992 Nov; 172:171.

2. Nelson N. Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. *J Exp Biol.* 1992 Nov; 172:149.

3. Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. *J. Neurochem.* 1999, V. 72, P. 625-633.

4. Dröse S. and Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* 1997, V. 200, P. 1-8.

5. Floor E., Leventhal P.S., Schaeffer S.F. Partial purification and characterization of the vacuolar H(+)-ATPase of mammalian synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 1990, V. 55, P. 1663-1670.

6. Zhou Q, Petersen C. C H, and Nicoll RA Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones *J Physiol.* 2000 May V. 15, P. 195-206.

7. Friedman A., P. Arosio, D. Finazzi, D. Koziorowski, J. Galazka-Friedman, Ferritin as an important player in neurodegeneration, Parkinsonism and Related Disorders 2011, V. 17, P. 423-430.

8. Munro H.N., M.C. Linder Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism, *Physiol. Rev.* 1978, V. 58, P. 317-396.

9. Andrews S.C., P. Arosio, W. Bottke, J.F. Briat, M. vonDarl, P.M. Harrison, J.P. Laulhere, S. Levi, S. Lobreaux, S.J. Yewdall Structure, function, and evolution of ferritins, *J. Inorg. Biochem.* 1992, V. 47, P. 161-174.

10. Kidane T.Z., E. Sauble, M.C. binder, Release of iron from ferritin requires lysosomal activity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006, V. 291, C. 445-C455.

11. Kalgaonkar S., B. Lonnerdal Receptor-mediated uptake of ferritin-bound iron by human intestinal Caco-2 cells, *J. Nutr. Biochem.* 2009, V. 20, P. 304-311.

12. Burdo J.R., D.A. Antonetti, E.B. Wolpert, J.R. Connor, Mechanisms and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system, *Neuroscience* 2003, V. 121, P. 883-890.

13. Fisher J., K. Devraj, J. Ingram, B. Slagle-Webb, A.B. Madhankumar, X. Liu, M. Klinger, I.A. Simpson, J.R. Connor, Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, V. 293, P. 641-C649.

14. Cotman C.W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol.* - 1974, V. 31, P. 445-452.

15. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* - 1986. - Vol. 155, № 2. - P. 243-248.

16. Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes // *J. Neurochem.* - 1999, V. 72, P. 625-633.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Білковий комплекс феритин, до складу якого входять залізні наночастинки, що викликає дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул у нервових терміналях головного мозку.

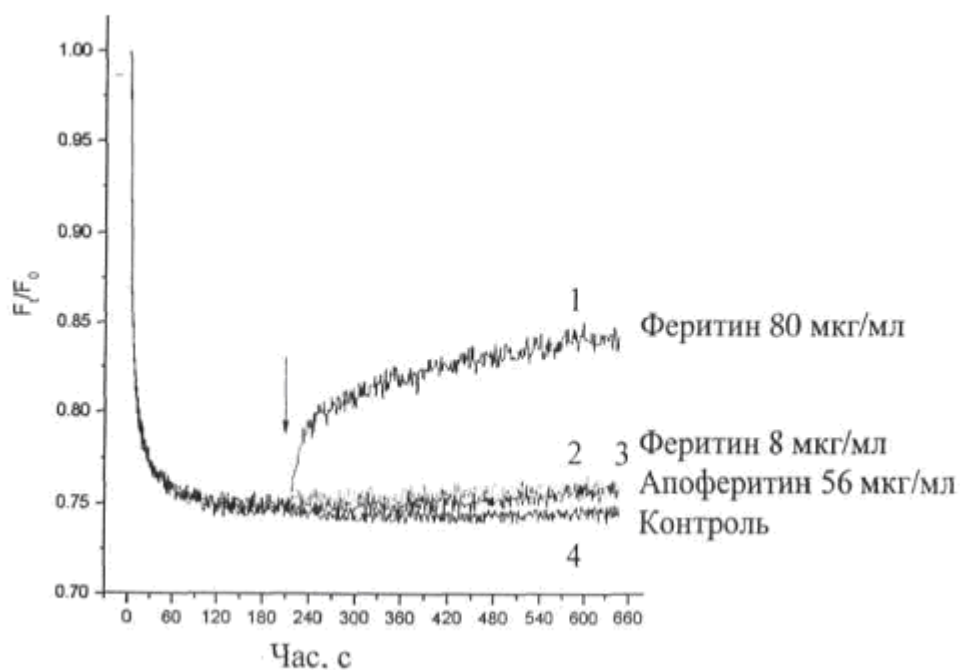


Fig.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601