

CLONATGE D'UN POSSIBLE RECEPTOR PARA TOXINA BOTULINICA DE L'ORGAN ELECTRIC DE TORPEDO MARMORATA

L. Ruiz-Avila, J.M. Canals, M. Arribas, J. Herreros, J. Blasi and J. Marsal.

Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular. Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina (U.B)

La toxina botulínica de tipus A (BONT/A) és un potent inhibidor de l'alliberament d'acetilcolina a la unió neuromuscular de mamífer, provocant la mort per paràlisi flàccida (1). Per a d'altres toxines clostridials (toxina tetànica i toxina botulínica de tipus B) s'ha demostrat que la inhibició ve donada per una acció proteolítica específica sobre la sinaptobrevina, una proteïna de vesícules sinàptiques (2). Malgrat això, es coneix molt poc dels mecanismes que permeten la internalització específica d'aquestes toxines als terminals nerviosos presinàptics. La nostra hipòtesi de treball és que el receptor específic per a BONT/A conté una part proteica que facilita el reconeixement i/o la internalització de BONT/A als terminals colinèrgics. El nostre model experimental és l'òrgan elèctric del peix Torpedo marmorata. Aquest òrgan està relacionat ontogènicament amb la unió neuromuscular, i està format per un conjunt ordenat de cèl·lules polièdriques (electròcits), les quals reben un gran nombre de terminacions nervioses colinèrgiques, provinents del prominent lòbul elèctric del cervell de l'animal. En treballs previs realitzats al nostre departament s'ha demostrat que els sinaptosomes aïllats d'aquest òrgan són sensibles a l'acció de la toxina, resultant inhibit l'alliberament de neurotransmissor d'un 70 per cent. A més, hem detectat una unió específica de BONT/A a membranes presinàptiques de l'òrgan elèctric de Torpedo. Per experiments previs d'"overlay" s'ha caracteritzat una proteïna de 140 kDa que uneix ¹²⁵I-BONT/A (3). Anticossos obtinguts contra aquesta proteïna (α -P140) immunoprecipiten la toxina unida a membranes presinàptiques. El crivellatge d'una biblioteca de cDNA d'òrgan elèctric fent servir α -P140 ha permès d'obtenir dos clons que provenen del mateix mRNA, codificat per un gen de còpia única. El clon més llarg (RBONTX-1, 3 kb) presenta un marc obert de lectura codificant per a 757 aminoàcids. L'expressió del cRNA derivat d'aquest clon en oòcits de Xenopus en presència d'aminoàcids marcats permet detectar una proteïna d'un pes molecular aparent de 90 kDa, que no s'expressa en oòcits coinjectats amb el cRNA antisentit del mateix clon. Aquesta proteïna sintetitzada "in vivo" és immunoprecipitable amb α -p140. Una banda de la mateixa mobilitat aparent s'obté per immunoprecipitació de productes de traducció "in vivo" de mRNA del lòbul elèctric, la qual cosa permet suposar que s'ha clonat la seqüència codificant completa d'aquesta proteïna. La longitud aparent del mRNA es superior a les 6 kb, i s'expressa fonamentalment en teixit presinàptic (encara que el missatger és detectable a d'altres teixits). L'obtenció d'anticossos contra una proteïna de fusió derivada de RBONTX-1 permetrà aprofundir en la validació de RBONTX-1 com a possible receptor de toxina botulínica de tipus A.

REFERENCIES

1. Simpson LL (ed) Botulinum neurotoxin and tetanus toxin. Academic Press, San Diego (1989)
2. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature 359:832-835 (1992)
3. Blasi J, Egea G, Castiella MJ, Arribas M, Solsona C, Richardson PJ, Marsal J. Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo. J Neural Transm 90:87-102 (1992)