

УДК 577.152.1.274

СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ МОЗГА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ, ВЫЯВЛЯЕМОЕ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

КЛЮШНИК Т. П., СПУНДЭ А. Я., ЯКОВЛЕВ А. Г.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Анализ двумерных белковых карт водорастворимых экстрактов постмортального мозга больных шизофренией выявил значительное снижение количества белка с молекулярной М_r 40 кД и ИЭТ 5,1—5,2 по сравнению с контрольными образцами мозга. После препаративного выделения этого белка из водорастворимого экстракта ткани мозга он был идентифицирован как мозговой изофермент креатинфосфокиназы (КФК ВВ). Снижение количества КФК ВВ в водорастворимых экстрактах мозга при шизофрении подтверждено методом иммуноэлектроблоттинга с использованием специфических для КФК ВВ антител.

Выяснение биологических причин психических расстройств человека является одной из важнейших задач нейробиологии, поскольку эта область способна не только расширить сферу знаний о механизмах психической деятельности, но и указать новые и эффективные пути профилактики и терапии ее нарушений. С развитием арсенала методов молекулярной биологии возможность решения этой задачи становится реальной, в особенности в случае заболеваний с выраженной наследственной природой.

Одним из методических подходов при поиске биологических нарушений, связанных с развитием сложных наследственных заболеваний, является сравнительный анализ белкового спектра идентичных тканей больных и здоровых индивидов.

В этой работе, используя высокоэффективную процедуру двумерного электрофоретического фракционирования водных белковых экстрактов, проведен сравнительный анализ белковых карт отделов постмортального мозга здоровых и страдавших шизофренией индивидов.

Материалы и методы

Материалом для анализа служили различные отделы постмортального головного мозга человека. Были использованы образцы мозга 29 человек, не страдавших психическими заболеваниями и умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности и 25 больных шизофренией (прогредиентная и приступообразно-прогредиент-

ная), умерших в терминальной стадии этого заболевания от острой сердечной-сосудистой недостаточности или пневмонии. Аутопсию мозга в обеих группах проводили не позже 7—8 ч после смерти.

Ткань гомогенизировали в 10 объемах 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0 (КФБ) в гомогенизаторе «Виртис». Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 100000 g 4°. Супернатант лиофилизировали и использовали для анализа двумерным электрофорезом по методу O'Farrell [1]. Для приготовления образцов для изоэлектрофокусирования 100 мкг лиофилизата растворяли в 25 мкл диссоциирующего буфера, содержащего 8 М мочевины, 1%-ный Нонидет Р-40, 2%-ные амфолины (рН 3—10, рН 3,5—5, рН 4—6, рН 5—7 в соотношении 3:3:1:3) и 1 мМ дитиотреитол. Фокусирование проводили в 5%-ном ПААГ, содержащем 8 М мочевины, 1%-ный Нонидет Р-40 и амфолины как в диссоциирующем буфере. Электрофорез во втором направлении проводили в 12%-ном ПААГ. Белки в геле окрашивали раствором 0,1%-ного Кумасси R 250 в 25%-ном метаноле, 10%-ной уксусной кислоте.

Препаративное выделение белка Р-40 проводили на системе FPLC («Pharmacia»). Все стадии выделения проводились при 4°. На колонку размером 4,0 × 20 см, заполненную смолой DEAE-Toyo Perl 650 M («Toyo Soda», Япония) и уравновешенную буфером А (50 мМ K_2HPO_4 , рН 7,0, 1 мМ дитиотреитол), наносили 100 г водорастворимого экстракта мозга человека, приготовленного, как описано ранее. Элюцию осуществляли 0—0,4 М градиентом концентрации КСl. Фракцию, элюирующуюся 0,1—0,25 М КСl, высаливали сульфатом аммония (40—60% насыщения), осадок растворяли в 10 мл буфера А. Для гель-фильтрации использовали колонку 2,6 × 100 см, наполненную смолой Toyo Perl 55SF и уравновешенную буфером А. Фракцию, обогащенную Р-40, наносили на колонку Mono Q HR5/5 («Pharmacia», Швеция). Элюцию вели 0,1—2,0 М градиентом КСl. Белки, элюируемые 0,1—0,15 М КСl, после концентрирования на ультрафильтрах РМ 10 («Amicon», США), фракционировали на колонке «Superose 12 HR 10/30» («Pharmacia», Швеция).

Белковый состав полученных фракций контролировали методом электрофореза [2] с использованием электрофоретической системы Phast System («Pharmacia», Швеция).

Измерение креатинфосфокиназной активности проводили с использованием набора «NAC-activated CPK tests» («KONE», Finland).

Для получения специфических антител против креатинфосфокиназы ВВ (КФК ВВ) человека кроликов иммунизировали интракожным введением 200 мкг очищенного по методу Miller [3] препарата КФК ВВ в смеси с адьювантом Фрейнда (1/1) с интервалом 2 недели в течение 2-х месяцев (первая инъекция—с полным адьювантом, последующие—с неполным). Забор крови проводили через 7—10 дней после последней инъекции.

Иммуноэлектроблоттинг проводили по методу Towbin [4]. После переноса нитроцеллюлозный фильтр инкубировали в 10%-ной фе-

тальной сыворотке теленка в течение 1 ч при 37°, промывали 100 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащим 150 мМ NaCl и 2%-ный Твин-20 (промывающий буфер) и инкубировали в течение 1 ч при 37° с анти-сывороткой к КФК ВВ в разведении 1/250. После промывания (3 раза по 10 мин) промывающим буфером фильтр помещали на 1 ч при 37° в раствор козьих антител против IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Для проявления реакции использовали 0,05%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина, содержащий 0,15%-ный H₂O₂.

Результаты исследования

Для сравнительного анализа белков мозга человека в норме и при шизофрении в этой работе использованы водные белковые экстракты различных областей коры больших полушарий мозга, а также ядер таламуса, коры мозжечка и продолговатого мозга. Белковые карты, полученные методом двумерного электрофореза, отражают специфические особенности различных отделов мозга [5, 6].

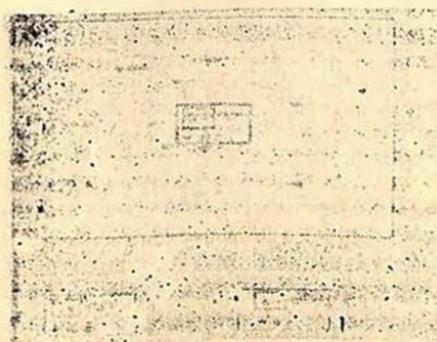


Рис. 1. Двумерная электрофореграмма водорастворимого экстракта лобной коры постмортального мозга человека. Фрагмент двумерной электрофореграммы контрольного образца мозга (а), образца мозга больного шизофренией (б). Рамкой внутри фрагмента выделен белок P-40

Вместе с тем, сравнивая двумерные карты белков отделов постмортального мозга больных шизофренией с соответствующими контрольными картами, практически для всех исследованных отделов мозга были выявлены некоторые, главным образом, количественные отличия, по-видимому, характерные для шизофрении. Рис. 1 демонстрирует двумерные карты водорастворимых белковых экстрактов лобной коры постмортального мозга, типичные для контрольной группы людей, не страдавших психическими заболеваниями, и группы больных шизофренией. Анализ этих карт позволяет отметить наиболее существенное снижение интенсивности окрашивания одного из хорошо разрешаемых белков с величиной M_r 40 кД и рН 5,1—5,2 в случае шизофрении по сравнению с контролем. Условно этот белок был обозначен как P-40.

Снижение содержания в водорастворимых белковых экстрактах мозга белка Р-40 было выявлено в 21 из 25 исследованных образцов лобной коры больных шизофренией. Из 28 контрольных образцов аналогичное снижение интенсивности окрашивания соответствующего пятна наблюдали лишь в двух случаях. Следует отметить, что содержание Р-40 в водорастворимых экстрактах мозга человека в исследованной выборке не зависит ни от половых, ни от возрастных отличий доноров. Стабильное снижение его содержания в экстрактах мозга больных свидетельствует также об отсутствии связи этого явления со специфическими формами течения заболевания и его лекарственной терапии. Поскольку при шизофрении количество Р-40 пропорционально резко снижено во всех исследованных нами отделах мозга, этот процесс не является локализованным.

Сопоставление полученных нами двумерных электрофореграмм с опубликованными белковыми картами мозга [7, 8] не позволило идентифицировать белок Р-40, хотя соответствующее ему пятно также присутствует на опубликованных картах. Сопоставление проводили на основе идентификации характерных маркерных белков, таких как актин, тубулин, альбумин, глицальный фибриллярный кислый белок и др.

С целью идентификации Р-40 был препаративно выделен из ткани мозга человека. В процессе его очистки мы исходили из известных значений величины M_r и ИЭТ, определенных по результатам двумерного электрофореза. Контролем в процессе очистки служило сравнение полипептидного состава фракций из тестированных ранее двумерным электрофорезом контрольного мозга и мозга больного шизофренией. Сравнение проводили методом электрофореза в ПААГ, содержащем ДДС-Na. Этапы выделения белка Р-40 описаны в разделе «Материалы и методы». На рис. 2 приведены электрофореграммы промежуточных белковых фракций, а также очищенного белка. Идентичность выделенного белка белку Р-40 была подтверждена сопоставлением их положения на двумерной белковой карте.

Результаты нативного электрофореза Р-40 свидетельствуют о его субъединичном строении, поскольку в этих условиях белок мигрирует гомогенной зоной, соответствующей M_r 76 кД (данные не представлены). Учитывая, что величина M_r Р-40 по результатам электрофореза в присутствии ДДС-Na была определена как 40 кД, нативный белок, очевидно, является димером, состоящим из двух идентичных субъединиц.

В дополнительных исследованиях периферических тканей человека методом двумерного электрофореза водных белковых экстрактов было показано, что Р-40 не обнаруживается в печени, почках и сыворотке крови, но представлен, хотя и в меньших количествах, чем в мозгу, в ткани сердечной мышцы.

Среди изученных белков мозга с известными физико-химическими параметрами сходными характеристиками обладает мозговая изо-

форма креатинфосфокиназы. Этот фермент состоит из двух идентичных субъединиц (ВВ) с величиной $M_r \sim 40$ кД. Известно также, что креатинфосфокиназа обнаруживается в сердце, но в форме гетеродимера (КФК МВ) [9, 10].

Идентичность белка Р-40 и В-изоформы креатинфосфокиназы была доказана на основании иммунореакции Р-40 с антителами против КФК ВВ. Кроме того, наличие креатинфосфокиназной активности у гомогенного препарата Р-40 было подтверждено с помощью специфического энзиматического анализа.

На рис. 3 представлены результаты стандартной процедуры иммуноблоттинга, где фракционированные в электрофорезе в присутст-

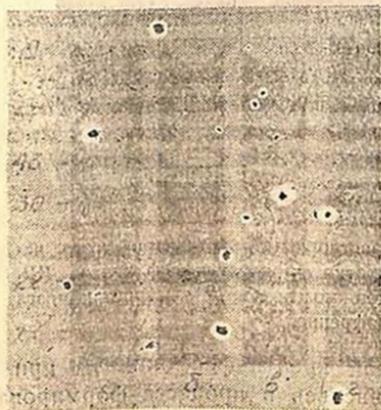


Рис. 2. Электрофореграммы промежуточных фракций, полученных при выделении белка Р-40. а—водорастворимый экстракт мозга человека, б—элюат 0,1—0,25 М КСI с ДЭАЭ Тоюо Perl 650 М, в—элюат 0,15 М КСI с Меню Q HR5/5. 2—очищенный препарат белка Р-40

вии ДДС-На белки водных экстрактов мозга больных шизофренией и контрольных индивидов окрашивали антителами против КФК ВВ. Результаты этих исследований подтверждают выявленное двумерным электрофорезом снижение концентрации КФК ВВ в водных экстрактах мозга при шизофрении.

Результаты и обсуждение

Поиск белковых маркеров психических заболеваний представляется важной областью исследований в биологической психиатрии, поскольку может открыть возможность определения ключевых биохимических механизмов, определяющих вероятность развития заболевания. Одним из наиболее мощных при поиске белкового полиморфизма инструментом является метод двумерного электрофореза и составления белковых карт исследуемых тканей. Применительно к психическим заболеваниям человека этот метод уже использовался для сопоставления карт тотальных экстрактов белков мозга больных с картами здоровых индивидов [11, 12].

В этой работе с помощью двумерного электрофореза фракции водорастворимых белков продемонстрировано значительное умень-

шение в отделах мозга индивидов, страдавших шизофренией, количества одного из важнейших ферментов энергетического обмена в мозгу—цитозольной креатинфосфокиназы. Этот белок, как известно, состоит из двух субъединиц, характеризующихся тканевой специфичностью, и катализирует обратимое фосфорилирование креатина, играя важную роль в регуляции концентрации АТФ в клетке.

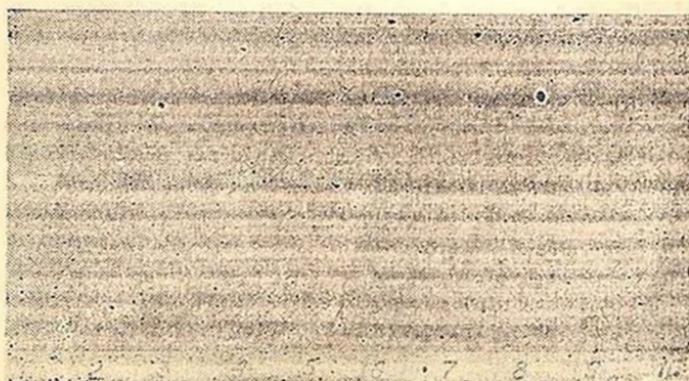


Рис. 3. Иммуноэлектроблоттинг водорастворимых экстрактов мозга человека с использованием антисыворотки к креатинфосфокиназе ВВ. 1—5—экстракты контрольных образцов мозга; 6—10—экстракты мозга больных шизофренией

Снижение количества цитозольной креатинфосфокиназы при шизофрении может явиться одним из звеньев в процессе формирования энергетического дефицита при этом заболевании [13]. Причины снижения концентрации цитозольной КФК в мозгу при шизофрении пока не ясны и в дальнейшем предстоит выяснить, связано ли это явление с измененной активностью кодирующего ее гена или с процессами модификации белка в клетке, приводящими к деградации или перераспределению КФК в субклеточных фракциях.

DECREASE OF CREATIN PHOSPHOKINASE BB CONTENT IN WATER-SOLUBLE FRACTION OF SCHIZOPHRENIC BRAINS REVEALED BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

KIJUSHNIK T. P., SPUNDE A. Y., YAKOVLEV A. G.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Analysis of water-soluble extracts from postmortem schizophrenic brains by two-dimensional electrophoresis reveals significant decrease of protein with M_r 40 kD and pI 5,1—5,2 comparing with normal brains. This protein was identified as creatin phosphokinase BB (CPK BB). Reduction of CPK BB amount in water-soluble extracts from schizophrenic brains was confirmed by immunoblotting with antibody to CPK BB.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. O'Farrell P. H. J. Biol. Chem., v. 250, p. 4007—4021, 1975.
2. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
3. Miller J., Wei R. Clin. Biochem., v. 13, p. 14—19, 1985.
4. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), v. 76, p. 4350—4355, 1979.
5. Klushnik T., Burbac a G., Aka'ov I. Neurochemistry international, v. 1. suppl. 1, p. 139, 1988.
6. Jacobowitz D. M., Heydorn W. E. Clin. Chem., v. 30(12), p. 1996—2002, 1984.
7. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28/4, p. 782—789, 1982.
8. Narayan R. K., Heydorn W. E., Creed G. J., Kornblith P. L. Clin. Chem., v. 30(12), p. 1989—1995, 1984.
9. Nea'on D. A. Clin. Chem Acta, v. 166(1), p. 73—78, 1987.
10. Сакс В. А. Успехи биологической химии, т. XXIV, с. 40—64, 1983.
11. Perrett C. W., Whatley S. A. Biochem. Soc. Trans., v. 15, p. 546, 1987.
12. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28/4, p. 793—804, 1982.
13. P'clar D. Schizophrenia Bull., v. 14, № 2, p. 255—269.

Поступила 4. XII 1990