



УДК 612.82.015.13:577.156

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ
ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА (GFAP)
КАТЕПСИНОМ D ИЗ МОЗГА

ШЕВЧЕНКО Г. М., *БУМЯТЯН Г. Г., БЕРЕЗНИ В. А.

Кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского государственного университета.
*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) присутствует в ткани мозга в 2-х формах: растворимой в нейтральных и слабощелочных растворах (мономерная форма) и нерастворимой (в составе астроглиальных промежуточных филаментов) [1, 2]. Еще в первых работах по GFAP было показано, что даже непродолжительное хранение ткани мозга или препаратов белка приводит к значительному автолизу (деградации) специфического белка, выявляемому электрофорезом в ПААГ в присутствии DS-Na [3]. В дальнейшем оказалось, что в ткани мозга присутствует специфическая Ca^{2+} -зависимая система деградации белков цитоскелета (GFAP, триплета белков нейрофиламентов, белков, ассоциированных с микротрубочками) [4].

В данной работе было изучено действие очищенных препаратов лизосомного катепсина D из мозга человека *in vitro* на различные формы GFAP (растворимую и находящуюся в составе промежуточных глиальных филаментов) с целью выяснения возможности участия лизосом мозга в обмене белков промежуточных филаментов.

Выделение и очистку катепсина D из мозга человека проводили, как описано ранее [5], с тем отличием, что в качестве специфического сорбента использовали пепстатин-сефарозу [6]. Препараты растворимой формы и филаментного GFAP, которые использовали в опытах по изучению их деградации катепсином D, получали по схеме, представленной на рис. 1. Поскольку катепсин D активен при кислых значениях pH, при которых GFAP нерастворим, субстратом служила суспензия GFAP в цитратном буфере с соответствующим значением pH.

Деградацию препаратов GFAP осуществляли следующим образом: к 0,2 мл суспензии соответствующего препарата GFAP (42 мкг белка—растворимый препарат; 850 мкг белка—филаментный препарат) добавляли 0,05 мл (2,5 мкг белка) очищенного препарата катепсина D

из мозга и инкубировали при постоянном встряхивании в течение различных промежутков времени при 37° и соответствующем значении рН. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл раствора пепстатина (40 мкг в 1 мл). Контрольные пробы, содержащие пепстатин, также инкубировали при 37°. По окончании инкубации к пробам добавляли по 2 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 8,6. Таким способом оставшийся недеградированным

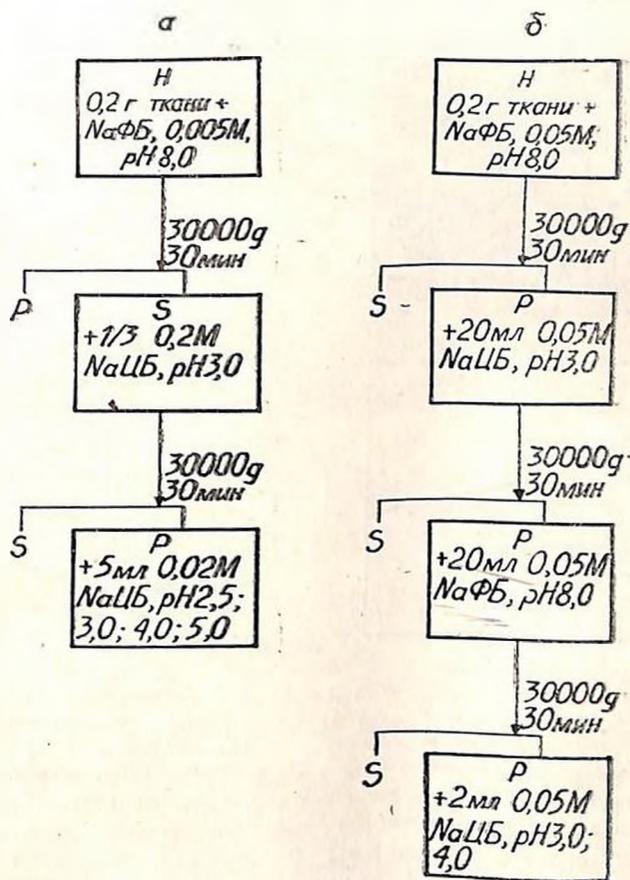


Рис. 1. Схема получения растворимого (а) и филаментного (б) препаратов GFAP для изучения деградации GFAP катепсином D. Ткань—белое вещество больших полушарий мозга человека. Н—гомогенат; S—супернатант; P—осадок; Na ФБ—натрий-фосфатный буфер; Na ЦБ—натрий-цитратный буфер.

растворимый GFAP или солицилизованный филаментный GFAP переводили в растворимую форму. Продукты деградации GFAP катепсином D регистрировали ракетным иммуноэлектрофорезом, как описано ранее при изучении деградации нейроспецифического гликопротеина D2 [7].

Выделение и очистку GFAP проводили по Dahl и соавт. [8]. После первой экстракции GFAP щелочным буфером (pH 8.0) следовало осаждение белка при pH 4,7, очистка хроматографией на гидроксипатите и высаливание 30% (по насыщению) сульфатом аммония. Моноспецифическую антисыворотку получали, как описано нами ранее для гликопротеина D2 [9].

Пример ракетного иммуноэлектрофореза, используемого для регистрации продуктов деградации растворимой формы GFAP, представлен на рис. 2, а. Деградация растворимого GFAP протекает нелинейно

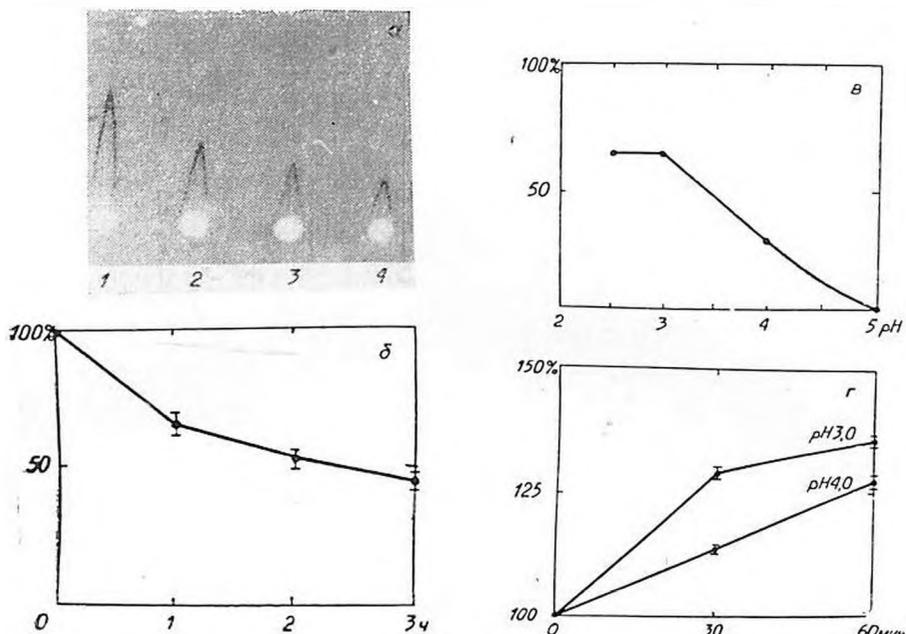


Рис. 2. Деградация растворимого (а, б, в) и филаментного (г) GFAP очищенным препаратом катепсина D. а—ракетный иммуноэлектрофорез. Антитела—кроличья моноспецифическая антисыворотка к GFAP (8,7 мкл в 1 см² геля). 1—контроль с пепстатином; 2, 3 и 4—по 5 мкл инкубационной пробы через 1, 2 и 3 ч инкубации при pH 3,0 соответственно; б—зависимость скорости деградации GFAP от времени инкубации. По оси абсцисс время инкубации (мин). По оси ординат—количество GFAP (в % от контроля). За 100% принято исходное количество GFAP, измеренное по площади иммунопреципитата, соответствующего препарату GFAP, не подвергнувшегося деградации. Условия инкубации те же, что и на рис. 2, а, а—зависимость скорости деградации растворимого препарата GFAP катепсином D от pH среды инкубации. По оси абсцисс—величина pH. По оси ординат—количество GFAP (в % от контроля). Время инкубации—60 мин; г—деградация филаментного GFAP катепсином D. По оси абсцисс—время инкубации. По оси ординат—количество растворимого GFAP (в % от контроля). За 100% принято количество GFAP, солюбилизирующееся при инкубации препарата филаментного белка в присутствии пепстатина. Условия инкубации указаны в тексте

во времени (рис. 2, б). Через 3 ч инкубации остается недеградированным около 50% растворимой формы GFAP. Максимальная деградация

растворимой формы GFAP отмечается при кислых значениях pH (2,5—3,0) (рис. 2, а). При pH 5,0 катепсин D практически не действует на растворимый GFAP. Активность фермента при pH ниже 2,5 нами не определялась, поскольку известно, что при таких кислых значениях pH катепсин D инактивируется [10]. Среди иммунохимически выявляемого GFAP после его инкубации с катепсином D при pH 5,0 могут быть и продукты ограниченного протеолиза, иммуноэлектрофоретически неотличимые от интактных молекул. Поэтому представленные данные дают возможность судить только об оптимуме pH гидролиза GFAP катепсином D до продуктов, которые теряют свою иммунореактивность. Известно, что другой белок цитоскелета клеток мозга—тубулин—также в растворимой форме легко гидролизует катепсином D. Однако оптимум pH такого гидролиза, в отличие от деградации GFAP, равен 5,8, хотя при pH 3,2 гидролиз тубулина также имеет место, но протекает с более низкой скоростью [11].

При изучении деградации филаментного GFAP (рис. 2, з) иммуноэлектрофоретически выявлялись только те из продуктов деградации, которые теряли связь с филаментами и становились растворимыми при pH 8,0. Это связано с тем, что при получении препаратов филаментного GFAP весь растворимый белок был предварительно тщательно отмыт большими объемами буфера при pH 8,0 (рис. 1, б). Таким образом, белок, который после деградации при кислых значениях pH и последующей экстракции щелочным буфером регистрировался иммуноэлектрофоретически, представлял собой солиобилизованный из филаментов GFAP. Данные, представленные на рис. 2, з, показывают, что деградация филаментного GFAP очищенными препаратами катепсина D из мозга человека приводит к солиобилизации GFAP, появлению растворимой при pH 8,0 иммунореактивной формы белка. Так же, как и в случае растворимой формы GFAP, деградация филаментного белка интенсивнее протекает при более кислых значениях pH. При pH 3,0 скорость протеолиза была выше, чем при pH 4,0 (рис. 2, з). Деградация филаментного белка проводилась в течение 30—60 мин, поскольку удлинение времени инкубации приводит к разрушению накапливающейся солиобилизованной формы GFAP катепсином D. В отличие от GFAP, другой белок цитоскелета—тубулин мозга, находясь в нерастворимой форме, был устойчив к действию катепсина D [12].

Таким образом, катепсин D мозга *in vitro* не только вызывает деградацию растворимой формы белка глиальных промежуточных филаментов GFAP, но и способен осуществлять протеолитическую модификацию филаментного белка, приводящую к появлению растворимой формы GFAP.

BREAKDOWN OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP) BY BRAIN CATHEPSIN D. IMMUNOCHEMICAL STUDY

SCHEVCHENKO G. M., BUNIATIAN G. H., BEREZIN V. A.

Dnepropetrovsk State University, Institute of Biochemistry, Armenian
SSR Academy of Sciences, Yerevan

To reveal the products of GFAP breakdown by human brain cathepsin D rocket immunoelectrophoresis was used. pH-optimum of degradation of the soluble form of GFAP was 2.5–3.0. It was not possible to reveal immunoreactive products of GFAP breakdown at pH 5.0. The breakdown of insoluble (filamentous) GFAP at pH 3.0–4.0 revealed immunoreactive and solubilizing at pH 8.0 GFAP, as a result of proteolytic modification of glial intermediate filaments.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B. *Brain Res.*, 28, 351–354, 1971.
2. Dahl D., Crosby C. J., Gardner E. E., Bignami A. *Anal. Biochem.*, 125, 165–169, 1982.
3. Dahl D. *Biochim. et biophys. acta.* 420, 142–154, 1976.
4. De Armond S. J., Fajardo M., Naughton S. A., Eng L. F. *Brain Res.*, 262, 275–282, 1983.
5. Березин В. А., Мухеев А. А., Жмарева Е. Н., Рева А. Д. Докл. АН СССР, сер. Б, 10, 64–65, 1983.
6. Azaryan A., Akopyan T., Buniatian H. *Biomed. Biochim. Acta.* 42, 10, 1237–1246.
7. Березин В. А., Мухеев А. А., Рева А. Д. Биохимия, 49, 1138–1146, 1984.
8. Dahl D., Bignami A. *Biochim. biophys. Acta.* 386, 41–54, 1975.
9. Березин В. А., Шевцова А. Н., Сегад Н. Б. Биохимия, 49, 742–748, 1984.
10. Press E. M., Porter R. R., Cebra J. *Biochem. J.*, 74, 501–514, 1960.
11. Bracco F., Banay-Schwartz M., de Guzman T., Lajtha A. *Neurochem. Int.*, 4, 541–549, 1982.
12. Bracco F., Banay-Schwartz M., de Guzman T., Lajtha A. *J. Neurochem Int.*, 4, 501–511, 1982.

Поступила 17. IV 1984