

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В НОРМАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ И В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

БЕРЕЗИН В. А., ШЕВЧЕНКО Г. М., *БУНЯТЯН Г. Г.

**ХАЛАНСКИЙ А. С., НЕДЗВЕЦКИЙ В. С.

Кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского государственного университета;

*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван;

**Институт морфологии человека АМН СССР, Москва

В нормальной нервной ткани и в опухолях головного мозга изучали образующий промежуточные филаменты глимальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ). Установлено, что в ткани мозга присутствуют по крайней мере две системы деградации ГФКБ— Ca^{2+} -активируемый путь и лизосомная система. Выявление деградации растворимой формы ГФКБ лизосомным катепсином D, приводящей к исчезновению иммунореактивности, указывает на то, что расщепление ГФКБ происходит в средней, коровой части его молекулы, где сосредоточены антигенные детерминанты. Содержание ГФКБ в разных перевиваемых опухолях мозга крысы, ведущих свое происхождение от одного первично индуцированного новообразования, сильно варьировало по величине от пассажа к пассажу. ГФКБ-положительные клетки были обнаружены как в самих опухолях, так и в прилегающей к ним пенетрирующей реактивной астроглии. Растворимость и степень деградации ГФКБ не находились в прямой зависимости. В опухолях мозга человека астроцитарного генеза в отличие от перевиваемых экспериментальных глиом были выявлены сильно деградированные полипептиды ГФКБ в области 37 кД и ниже.

Для различных типов клеток нервной ткани характерен особым образом организованный цитоскелет, который представлен структурами различного диаметра — микротрубочками (25 нм), микрофиламентами (5—6 нм) и промежуточными филаментами (10 нм). Если первые две микроструктуры образованы белками, присутствующими в основном во всех типах клеток животных, то для белков, которые формируют промежуточные филаменты, характерна тканеспецифичность. Различные типы клеток нервной ткани нейроэпителлиального генеза экспрессируют три разных белка, формирующих промежуточные филаменты—триплет белков нейрофиламентов, глимальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) и виментин [1]. К собственно нейроспецифическим компонентам относятся белки нейрофиламентов и ГФКБ. Виментин свойствен главным образом клеткам мезенхимного происхождения. В ранний период эмбрионального развития, когда еще отсутствуют астроциты, глимальные и эмбриональная радиальная глия экспрессируют виментин. Созревание глии характеризуется заменой экспрессии виментина на синтез специфического ГФКБ, характерного для зрелых астроцитов [2]. Большинство нейронов содержат нейрофиламентные белки с величиной M_r 70, 160 и 210 кД. В периферической НС отростки реактивных шванновских клеток содержат как виментин (основной компонент), так и ГФКБ.

Функции промежуточных филаментов не совсем понятны. Предпо-

лагается, что в нейронах они участвуют в медленном аксональном токе, но при этом требует объяснения факт отсутствия промежуточных филаментов в гранулярных клетках. Промежуточные филаменты отсутствуют также в олигодендроглии. На этом основании некоторые авторы высказывают сомнение относительно главной их функции—цитоскелетной и предполагают, что белки промежуточных филаментов вовлечены в регуляцию генной экспрессии [2].

Хотя метаболизм белков промежуточных филаментов в клетках нервной ткани недостаточно изучен, известно, что они подвергаются быстрой специфической деградации под действием кальпаинов— Ca^{2+} -активируемых протеиназ мозга [3]. Возможно, что протеолиз белков промежуточных филаментов *in vivo* связан с регуляцией их функции в клетке. Наиболее интенсивно *in situ* протекает протеолиз ГФКБ, причем деградации подвергается N-концевой домен [4]. Нами была установлена деградация как интактного филаментного (49 кД), так и растворимого (с деградированным в результате автолиза N-концевым доменом) ГФКБ (M_r 37 кД) очищенной внутриклеточной лизосомной протеиназой—катепсином D [5]. Поскольку регистрацию деградации проводили иммуноэлектрофоретически и при действии фермента на растворимый ГФКБ наблюдали значительное уменьшение площадей иммуопреципитатов, то можно заключить, что катепсин D расщепляет растворимый ГФКБ в средней, коровой части, где сосредоточено большинство антигенных детерминант. Оптимум pH такой деградации равен 3.0. С другой стороны, деградация филаментного ГФКБ при pH 3—4 приводила к солюбилизации специфического белка—появлению растворимой при pH 8.0 формы, обладающей иммуореактивностью. Следовательно, катепсин D способен расщеплять связи в филаментном белке не только в коровой области. Можно предположить, что катаболизм промежуточных филаментов *in vivo* протекает с участием лизосомного пути.

В последние 5—6 лет белки промежуточных филаментов привлекают пристальное внимание онкологов, поскольку при малигнизации клеток различного генеза сохраняется специфичность синтезируемых в них белков. Цитокератин синтезируется карциномами, десмин—рабдомиосаркомами, виментин—немышечными саркомами, лимфомами, нейрофиламентные белки—ганглионейробластомами, ГФКБ—глиомами [6]. Выявление ГФКБ как глиального маркера в опухолях мозга человека нашло достаточно широкое применение в нейроонкологической практике при гистологическом типировании биопсийных образцов. Однако проведенное нами сравнительное исследование различных нейроспецифических маркеров (в том числе и ГФКБ) показало, что в злокачественных опухолях—глиобластомах, медуллобластомах—ГФКБ часто отсутствовал, в то время как другие белки (например, гликопротеин D2) являются более специфическими маркерами нейроэпителиальных опухолей [7, 8].

Типирование с помощью глиоспецифических маркеров нервных тканей лабораторных животных имеет большое значение при испытании противоопухолевых химиопрепаратов. Представленные на рис. 1 данные

свидетельствуют о том, что распределение ГФКБ между разными опухолями, ведущими свое происхождение от одного первично индуцированного новообразования, сильно варьировало по величине от пассажа к пассажи. Опухоли, принадлежавшие к одному пассажи, но выросшие у разных животных, часто содержали близкое количество ГФКБ, тогда как у группы штаммов злокачественных глиом имели место резко выраженные колебания концентрации ГФКБ между соседними пассажами. Проведенное нами гистохимическое (методом непрямой иммунофлуоресценции) изучение распределения ГФКБ в глиомах крысы пока-

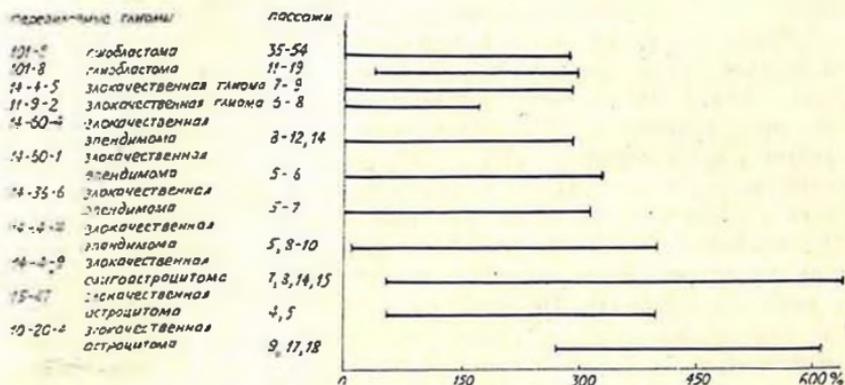


Рис. 1. Вариабельность содержания глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в отдельных перивиаемых глиомах крыс в зависимости от пассажа. По оси абсцисс — содержание ГФКБ в опухоли, выражено в % от концентрации этого белка в нормальной ткани мозга крысы

зало, что в большинстве своем ГФКБ-продуцирующие клетки находились на границе опухоли и здоровой ткани мозга. В более доброкачественных опухолях были видны россыпи отдельных клеток в паренхиме, значительное свечение вокруг сосудов. Основная трудность в решении вопроса о присутствии ГФКБ в перивиаемых глиомах заключается в невозможности в большинстве случаев точного различения нормальных реактивных и опухолевых астроцитов. Вероятнее всего, определяемый иммунохимическими методами в ткани опухоли ГФКБ можно отнести как к ГФКБ, экспрессируемому собственно клетками опухоли, так и к ГФКБ прилегающей и пенетрирующей реактивной астроглии (реактивный глиоз). Зоны с реактивным глиозом при иммунофлуоресцентной реакции светятся гораздо более интенсивно, чем клетки опухоли и даже нормальная ткань мозга. Возможно, это связано не только с различной концентрацией ГФКБ-положительных клеток, но и с особенностями организации ГФКБ-содержащих промежуточных филаментов и реактивных клетках астроглии и собственно глиомах.

В ряде работ было показано, что ГФКБ нормального мозга и его опухолей иммунологически идентичен [9]. На этом основании принято

считать, что изменения ГФКБ в опухолях касаются только нарушения его экспрессии. В то же время нами установлено, что отношения нерастворимой и растворимой в буфере с низкой ионной силой форм ГФКБ в мозгу и в его опухолях могут сильно отличаться. В опухолях эти величины крайне непостоянны. В некоторых астроцитах и анапластических астроцитах соотношение нерастворимой и растворимой форм может быть выше в 1000 и более раз, чем в белом веществе нормального взрослого мозга. В других случаях значительно превалировала растворимая форма. Для многих глиобластом характерным было практически полное отсутствие иммунологически определяемого ГФКБ [8].

Разделение филаментного и растворимого ГФКБ только на основе их различной растворимости в гипотоническом буфере при рН 8,0 не совсем точно отражает истинное отношение этих двух форм белка промежуточных филаментов. Нами было показано [10], что иммуноблоттинг препарата нерастворимого ГФКБ мозга человека выявляет серию полипептидов, среди которых есть деградированные формы филаментного белка в области 37 кД и выше и нитактивный, по-видимому, собственно филаментный ГФКБ с M_r 49 кД. Следовательно, растворимость и степень деградированности (определяемая по величине M_r) не находятся в прямой зависимости. Полипептиды в области 37—49 кД характерны как для растворимой, так и нерастворимой форм ГФКБ. Это связано, по-видимому, с тем, что автолиз ГФКБ протекает с участием нескольких протеолитических систем, различающихся по специфичности действия.

В связи с вышесказанным, интерес вызывают данные по изучению полипептидного состава ГФКБ в гистотипически различающихся опухолях мозга. На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга экстрактов нормального головного мозга крысы, человека, быка, опухолей мозга человека и перевиваемых опухолей мозга крысы, содержащих растворимую и нерастворимую в буфере с низкой ионной силой формы ГФКБ. Обращает на себя внимание то, что экстракты мозга крысы и быка содержали значительно меньше деградированных полипептидов ГФКБ в области 37—49 кД по сравнению с экстрактом мозга человека и совсем не содержали полипептидов с M_r ниже 37 кД. Это связано, видимо, с тем, что пробы мозга человека подвергались автолизу в течение довольно значительного времени (6—8 ч).

Растворимые и нерастворимые препараты ГФКБ экспериментальных опухолей мозга крыс также представлены ограниченным числом полипептидов. В главном S_6 полипептид с M_r 49 кД при используемых концентрациях белка не выявляется.

Препараты нерастворимой в буфере с низкой ионной силой формы ГФКБ астроцитом и олигодендроастроцитом представлены серией полипептидов в области 37—49 кД, тогда как растворимая форма специфического белка, помимо главного полипептида с M_r 49 кД, содержала значительное количество сильно деградированных полипептидов с M_r ниже 37 кД. Нерастворимая форма ГФКБ глиобластомы содержала только

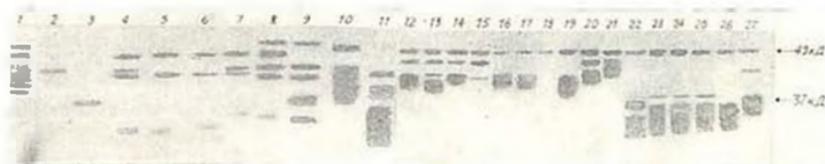


Рис. 2. Иммуноблоттинг ГФКБ проб опухолей мозга после разделения соответствующих экстрактов электрофорезом и ПААГ в присутствии ДДС-Na. 1—головной мозг быка (экстракция 2 М мочевиной); 2, 3—глиома С₆ (здесь и далее везде ГФКБ—соответственно нерастворимый и растворимый в буфере с низкой ионной силой); 4, 5—крысинная глиома № 223 в присутствии дексазона; 6, 7—крысинная глиома № 223; 8, 9—нормальный головной мозг крысы; 10, 11—нормальный головной мозг человека; 12, 20—астроцитома фибриллярно-протоплазматическая; 13, 21—астроцитома фибриллярно-протоплазматическая; 14, 22—олигодендроастроцитома; 15, 23—олигодендроастроцитома; 16, 24—астроцитома протоплазматическая; 17, 25—астроцитома протоплазматическая; 18, 26—астроцитома, близкая к глиобластому; 19, 27—нормальный головной мозг человека; длительность электрофореза белков в первом геле (пробы 1—11) больше, чем во втором (пробы 12—27)

главный полипептид (49 кД). Растворимый ГФКБ дополнительно также был представлен низкомолекулярными деградированными полипептидами. Наличие деградированных полипептидов ГФКБ в опухолях мозга человека нельзя объяснить активацией протеаз при приготовлении экстрактов в буфере с низкой ионной силой, поскольку аналогичные эффекты имели место и в случае использования одноразовой экстракции ГФКБ из ткани опухоли 2 М раствором мочевины, исключавшим активацию неспецифических протеаз [10].

Полученные результаты указывают на то, что в опухолевых клетках нарушен (изменен) процесс формирования нормальных промежуточных филаментов, вероятно, вследствие деградации интактной формы ГФКБ специфическими кальпаинами и лизосомным катепсином D. Однако возможно и альтернативное объяснение, на которое указывают данные иммунофлуоресцентного анализа экспериментальных опухолей мозга крыс. Наличие деградированных полипептидов ГФКБ отражает степень некротизации отдельных районов опухолей. В участках некроза *in vivo* могут быть активированы системы специфической и неспецифической деградации ГФКБ. На вероятность такого объяснения указывает то, что культура живых клеток глиомы C₅ содержала только по одному полипептиду ГФКБ в нерастворимой и растворимой в буфере с низкой ионной силой фракциях.

SPECIFIC PROTEIN OF INTERMEDIATE FILAMENTS IN NORMAL NERVOUS TISSUE AND IN BRAIN TUMOURS

BEREZIN V. A., SHEVCHENKO G. M., BUNYATIAN G. H.,
**KHALANSKY A. S., NEDZVETSKI V. S.

State University, Dnepropetrovsk;

*Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan;

**Research Institute of Human Morphology, Academy of Medical
Sciences, Moscow

The results of investigation of specific for glial intermediate filaments glial fibrillary acidic protein (GFAP) are presented. There are at least two degradation systems for GFAP in brain tissue: Ca²⁺-activated and lysosomal. The degradation of soluble GFAP by lysosomal cathepsin D results in a disappearance of immunoreactivity pointing that breakdown takes place in the middle (core) part of GFAP containing antigenic determinants. GFAP content in transplanted rat gliomas is strongly variable among passages. GFAP-positive cells were found both in tumour tissue and glioma-brain boundaries, penetrating reactive astroglia (shown by immunofluorescence). The solubility is not linearly dependent from degree of GFAP degradation. Extensively degraded GFAP fragments-polipeptides with M_r 37 K and smaller are detected in astrocytic human brain tumours but not in transplanted rat gliomas.

1. Osborn M. J. Invest. Dermatol., v. 81, p. 104—109, 1983.
2. Dahl D., Bignami A. — In: Cell. and Muscle Motility, v. 6, 75—96, N. Y., London, 1985.
3. De Armond S. J., Fajardo M., Naughton S. A., Eng L. F. Brain Res., v. 262, p. 275—282, 1983.
4. Dahl D., Bignami A. — In: Handbook of Neurochemistry, v. 5, p. 127—151, N. Y., Plenum Press, 1983.
5. Шевченко Г. М., Бунятыя Г. Г., Березин В. А. Нейрохимия, т. 3, с. 400—404, 1984.
6. Osborn M., Altmaunberger M., Debus E., Weber K. J. Submicrosc. Cytol., v. 16, p. 149—150, 1984.
7. Березин В. А., Жмарова Е. Н., Бродская И. А., Шевченко Г. М., Зашко А. С., Понсидлок Н. В., Кузнецов А. В., Кузнецова И. В., Кононова Л. И. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 50, № 7, с. 68—70, 1985.
8. Березин В. А., Жмарова Е. Н., Рамоданов С. А., Шевченко Г. М., Бродская И. А. Вопр. экологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
9. Dittmann L., Axelsen N., Norgaard-Pedersen B., Bock E. Brit. J. Cancer, v. 35, p. 135—141, 1977.
10. Недзвецкий В. С., Березин В. А., Оберняк Т. И., Жмарова Е. Н. Биохимия т. 51, № 11, с. 1843—1850, 1986.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112.5

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА СЕТЧАТКИ БЫКА—ИНГИБИТОРА 3', 5'-сGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

ЛИПКИН В. М., МУРАДОВ Х. Г., *ДУМЛАЕР И. А., *ЭТИНГОФ Р. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград

Исследована роль γ -субъединицы 3', 5'-сGMP-фосфодиэстеразы в первичных механизмах фоторецепции и специфичность γ -субъединицы для ткани сетчатки. Используя моноспецифические антитела к γ -субъединице, установили, что она присутствует только в фоторецепторных мембранах сетчатки разных животных и не обнаруживается в других тканях. Показана необходимость γ -субъединицы для фотониндуцированной активации фосфодиэстеразы. Определены аминокислотная последовательность γ -субъединицы и нуклеотидная последовательность соответствующей кДНК.

Поглощение квантов света родопсином, содержащимся в фоторецепторных мембранах сетчатки, обуславливает каскад реакций, обеспечивающих усиление сигнала и в результате изменение биоэлектрической активности фоторецепторной клетки. Одной из центральных реакций каскада является фотониндуцированная активация 3', 5'-сGMP-фосфодиэстеразы (ФДЭ), вследствие чего уменьшается содержание сGMP в фоторецепторе [1, 2]. Этому явлению ряд исследователей [3, 4] при-