

УДК 577.122

Богданова М.Н. (5 курс, каф. БФ), В.В.Захаров (ПИЯФ ОМРБ)

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЕМЕЙСТВ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ МОЗГА *VASP1* И *GAP-43*

Значительное внимание в изучении молекулярных основ нервных процессов уделяется белкам, выполняющим в клетке разнообразные регуляторные функции и играющим важную роль в интеграции всех процессов, протекающих в мозге.

Рассматриваемые в данной работе белки *VASP1* и *GAP-43* являются одними из ключевых в целом ряде процессов, протекающих в нейронах. Белки *VASP1* и *GAP-43* являются преобладающими белками нервных окончаний. Экспрессия этих белков непосредственно связана с ростом и регенерацией аксонов, установлением новых синаптических связей при развитии нервной системы, а также с пластичностью синапсов во взрослом организме.

Целью данной работы явилось выделение изоформ белка *VASP1* в чистом виде, определение их аминокислотной последовательности, изучение механизма образования данных изоформ, а также выяснение механизма специфического протеолиза *GAP-43*, идентификация протеазы и выявление внутриклеточных сигналов, приводящих к протеканию протеолиза. Исследование механизма образования изоформ *GAP-43* проводили на синаптосомных и цитозольных фракциях гомогената головного мозга крысы. При инкубации синаптосом *in vitro* в присутствии ионов кальция наблюдался переход основной формы белка *GAP-43* в изоформы *GAP-43*⁵⁻²²⁶ и *GAP-43*⁴¹⁻²²⁶. Это доказывает, что они являются протеолитическими фрагментами основной формы белка *GAP-43*. Протеолиз белка *GAP-43* наблюдался также в цитозольной фракции. Регистрация образовавшихся протеолитических фрагментов производилась при помощи специфических антител к белку *GAP-43* (иммуноблоттинг). Используя ингибиторы различных протеаз, было показано, что исследуемая протеазная активность подавляется ингибиторами цистеиновых протеаз. Основная рабочая гипотеза состоит в том, что данная активность принадлежит кальций-зависимой цистеиновой протеазе кальпаин.

Изоформы белка *VASP1* были обнаружены при анализе экстрактов гомогената ткани мозга 5 % хлорной кислотой и 1 % тритоном X-100 с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. Было показано, что изоформы имеют меньшую молекулярную массу по сравнению с основным белком. Анализ гидрофобных свойств изоформ белка *VASP1* с помощью двумерного электрофореза в ПААГ (первое направление - система уксусная кислота/мочевина, второе – та же система, но с добавлением тритона X-100), показал, что большинство изоформ *VASP1* проявляют гидрофобные свойства, причем степень их гидрофобности сходна со степенью, проявляемой самим белком. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что большинство изоформ белка *VASP1* являются миристилированными. С целью определения их аминокислотной последовательности были выделены в чистом виде изоформы белка *VASP1*, проявляющие гидрофобные свойства.

Итак, исследован протеолиз белка *GAP-43* и получены данные, подтверждающие участие кальпаина в этом процессе; обнаружены изоформы белка *VASP1*, присутствующие в нервной клетке *in vivo*; выделена в чистом виде часть из них, проявляющая гидрофобные свойства: проведены эксперименты по исследованию механизма образования изоформ белка *VASP1*.

*Работа поддержана федеральной целевой программой "Интеграция" № 783/89
(Развитие и поддержка учебно-научного центра "Молекулярно-биологические проблемы
современной медицины")*