

УДК 577.352.33

М.П.Райко (5 курс, каф. БФ), Е.С.Кропотова, м.н.с. (ПИЯФ РАН)

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ БЕЛКА NCAM В РАФТАХ МЕМБРАНЫ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ

Основной ролью детергент-устойчивых участков мембраны (рафтов) в клетке, вероятнее всего, является их участие в передаче межклеточных сигналов. С рафтами связаны сигнальные белки GAP-43, BASP1 MARCKS и NCAM, непосредственно влияющие на процессы передачи нервного импульса, рост нейритов и пластичность синапсов.

Исходя из полученных в нашей лаборатории данных о гетерогенности рафтов, было решено детально исследовать распределение в рафтах сигнальных белков, участвующих в процессах GAP-43-опосредованного роста нейритов. Основным объектом изучения являлся белок NCAM (neural cell adhesion molecule), отвечающий за межклеточную адгезию и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Существует три основные изоформы NCAM: NCAM180 и NCAM140 – трансмембранные формы, NCAM-120 – GPI-заякоренная. Было показано, что NCAM оказывает существенное влияние на рост нейритов и передачу сигнала, модулируя уровень вторичных мессенджеров. В литературе нет единого мнения о том, какая именно изоформа NCAM участвует в процессах роста нейритов, стимулируемого GAP-43. Было показано, что в детергент-устойчивой фракции мышинового мозжечка содержится только GPI-заякоренный NCAM120, а трансмембранные формы NCAM отсутствуют. По некоторым данным, рафты, выделенные из конусов роста нейронов новорожденных крысят, в частности, содержащие GAP-43, связаны с NCAM120 и NCAM140, а NCAM180 в них отсутствует. В рафтах, выделенных из мозга взрослых крыс, был обнаружен преимущественно NCAM120. При этом более плотные рафты содержали также некоторое количество NCAM140 и следы NCAM180.

Было решено проверить возможность взаимодействия трансмембранной изоформы NCAM180 с GAP-43 в процессах, связанных с передачей сигнала. Для этого выделялись рафты, содержащие GAP-43, которые анализировались по белковому составу.

Нашей первой целью было получить устойчивые к тритону X-100 мембранные домены (рафты), а затем исследовать их белковый состав. Для получения мембранной фракции, устойчивой к тритону X-100, брался не целый мозг, а отделённые от клеток нервные окончания (синапсосомы). Одной из задач была подготовка препарата для дальнейшего фракционирования. Поэтому в качестве исходного материала были выбраны именно синапсосомы. Эта субклеточная фракция является более чистым препаратом по сравнению с мозгом. Для получения рафтов мембраны нервных окончаний использовался метод ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы. Таким образом, были получены участки нейрональной мембраны, а конкретнее – аксональной мембраны, содержащие белково-липидные домены. Затем из полученной фракции было необходимо выделить рафты, имеющие в своем составе белок GAP-43. Так как белки BASP1 и GAP-43 достаточно прочно связаны с мембраной, использовался метод иммунопреципитации рафтов со специфическими антителами к нашим белкам.

Полученные результаты несколько отличаются от литературных. Прежде всего, было показано, что NCAM180 присутствует в рафтах аксональной мембраны в значительных количествах. Фракция рафтов, содержащих белок GAP-43 оказалась обогащена NCAM180 в большей степени, чем NCAM140 и 120.

Наши результаты подтверждают экспериментальные данные коллег из Копенгагенского университета о том, что именно 180 кДа-изоформа NCAM вовлечена в процесс GAP-опосредованного роста нейритов.