

CA<sup>2+</sup>–ИНДУЦИРОВАННОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ БЕЛКА GAP-43 ИЗ СИНАПТОСОМ

Объект данного исследования, белок GAP-43, является нейроспецифическим белком, преобладающим в нервных окончаниях. GAP-43 играет важную роль в таких фундаментальных для нервной ткани процессах как синаптогенез, нейритогенез, нейрорегенерация, регуляция секреции нейромедиаторов, а также апоптоз нейронов [1,2]. Белок GAP-43 является внутриклеточным мембрансвязанным белком, однако механизм связывания его с мембраной до конца не выяснен [3]. Существует два предположения, по одному из которых белок GAP-43 прикреплен к мембране с помощью пальмитиновой кислоты [4]. Другая группа авторов считает, что он связан с плазматической мембраной через белок-посредник [5]. Мы предполагаем, что кроме мембрансвязанной внутриклеточной формы белка GAP-43, существует и его внеклеточная форма. Целью нашего исследования является выявление факторов высвобождения белка GAP-43 из синапсосом.

В данной работе на модели синапсосом (выделенных нервных окончаний) при помощи иммуноферментного анализа с использованием коммерческих моноклональных антител против белка GAP-43 было установлено, что белок GAP-43 способен высвобождаться из синапсосом, причем данный процесс критическим образом зависит от концентрации ионов кальция в среде. Нами было показано, что при концентрации ионов кальция в среде 1mM, что соответствует внутриклеточной концентрации кальция 150 nM, наблюдается быстрое высвобождение белка из синапсосом. Также нами выявлено, что присутствие в инкубационной среде 1mM глутамата стимулирует высвобождение белка из синапсосом. В связи с этим нами было проверено влияние различных ингибиторов NMDA рецепторов глутамата с различной константой связывания, таких как МК-801, мемантин, амантадин. Оказалось, что присутствие в среде этих ингибиторов значительно снижает содержание белка GAP-43 вне синапсосом.

Из литературных данных известно, что белок GAP-43 является субстратом для нейтральной цистеиновой кальций-зависимой протеазы кальпаин [6]. В результате действия кальпаина от белка GAP-43 отщепляется N-концевой пептид длиной 40 аминокислот, на котором находится домен связывания с мембраной, поэтому мы предполагаем, что в межклеточную среду может попадать не сам белок, а его протеолитический фрагмент. Чтобы проверить наше предположение, мы исследовали влияние на высвобождение белка GAP-43 из синапсосом коммерческого ингибитора кальпаина (ингибитор кальпаина 1). К сожалению, данный ингибитор растворим исключительно в полярных растворителях, при добавлении которых, синапсосомы теряют свою жизнеспособность. В связи с этим, планируется выбрать другой водорастворимый ингибитор кальпаина леупептин.

Добавление в инкубационную среду ингибитора сериновых протеаз ФМСФ не снижало внеклеточного уровня белка GAP-43. Таким образом, белок GAP-43 обнаруживается во внеклеточной жидкости не в результате протеолитического расщепления сериновыми протеазами.

В ряде исследований при нейродегенеративных заболеваниях в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов обнаруживают увеличение концентрации белка GAP-43 [7]. До сих пор считалось, что белок GAP-43 попадает в СМЖ в результате разрушения нейронов, однако, исходя из наших результатов, мы полагаем, что GAP-43 или его протеолитический фрагмент может высвобождаться во внеклеточную среду кальций-зависимым регулируемым процессом, и считаем, что внеклеточная форма белка GAP-43 может играть как физиологическую, так и патологическую роль в зависимости от формы и концентрации.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.G. and Finklestein, S.P. (1987) *J. Neurochem.* 48, 1640-1647.
2. Hens J.J.H., Ghijsen W.E.J.M., Weller U., Spierenburg H.A., Boomsma F., Oestreicher A.B., da Silva F.H.L., De Graan P.N.E. (1998b) *Eur. J. Pharmacol.* 363, 229-240.
3. Oestreicher A.B., De Graan P.N., Gispen W.H., Verhaagen J., Schrama L.H. (1997) *Prog. Neurobiol.* 53, 627-686.
4. Didier H., Duportail S. G., Jean-Christophe D., and Baudier Sll J. (1991) *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc Vol 266, No. Issue of April 15, pp. 7121-7131.*
5. Rodgers W, Crise B, Rose J.K. (1994) *Mol Cell Biol* 1994 Aug;14(8):5384-91.
6. Мосевичкий М.И., Коновалова Е.С., Бичева Н.К., Клементьев Б.И. (2000) *Биохимия* 65(10), 1363-1367.
7. Blennow K.(2004) *American Society for Experimental NeuroTherapeutics. Apr;1(2):213-25.*