УДК 616-003.811:619:636.2

Василь ВЛІЗЛО, Петро ВЕРБИЦЬКИЙ, Христина МАЙОР, Віталій СТАДНИК

ПРОФІЛЬ ЕКСПРЕСІЇ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Інститут біології тварин УААН, м. Львів

Проведено дослідження ізоформ фізіологічного пріона у мозку великої рогатої худоби. Визначено стабільне співвідношення ізоформ пріона у різних структурно-функціональних частинах мозку. На підставі результатів цього дослідження постулюється можливість диференціації штамів фізіологічного та патологічного пріонів з використанням описаного методичного підходу.

Пріонні інфекції — це велика група нейродегенеративних захворювань, на які страждають тварини і люди. Захворювання такого типу у людей реєструють доволі рідко, тоді як лише у Великій Британії при епізоотії „коровʼячого сказу" загинуло понад 190 тис. голів великої рогатої худоби (ВРХ) [1]. Пріонні інфекції уражають клітини центральної нервової системи. При цьому простежується патологічно високий показник проліферації астроцитів, масове відмирання нейронів і утворення на їхньому місці вакуолей, на фоні відсутності будь-якої імунної реакції [2, 3]. Такі зміни несумісні з життям, тому усі пріонні хвороби летальні. Пріонні інфекції відрізняються нетиповою природою збудника. На відміну від розповсюджених інфекційних агентів (бактерій, вірусів тощо), збудником пріонних хвороб є білок — конформаційно змінена ізоформа непатогенного пріон-протеїну, який експресується у більшості клітин еукаріот [1].

Фізіологічна функція цього білка до кінця не зʼясована. З'ясовано, що він опосередковує передачу екстрацелюлярних сигналів, володіє про і антиапоптичною активністю, бере участь у транспорті міді [4, 5].

Відомо, що пріон — це мембранний білок, який у разі виникнення пріонної інфекції накопичується в середині клітини у великій кількості та слугує субстратом для утворення патологічного пріону [6]. Варто також зазначити, що для фізіологічного пріона характерна наявність трьох ізоформ — де-, моно- та диглікозильованої, які мають молекулярну масу 29, 25 та 19 kDa, відповідно [7].

Існує декілька гіпотетичних механізмів репродукції патологічної форми пріон-протеїну, проте жоден з них не доведений експериментально. Загальноприйнятим є припущення про здатність мінімальної інфекційної частки — пріонового димеру зв'язуватись із нормальним білком і трансфор-

мувати його у нерозчинну, стійку до дії протеїназ патологічну форму [5].

Мікроскопічні дослідження засвідчили, що молекули патологічного пріона асоціюють із утворенням амілоїдо-подібних фібрил. Така здатність до полімеризації зумовлена появою у складі патологічного пріону підвищеної кількості гідрофобних β-складчастих структур, які мають високий потенціал полімеризації [1].

Отже, пріонні хвороби характеризуються накопиченням у клітинах мозку агрегатів патологічного пріон-протеїну, своєрідним субстратом для утворення якого є фізіологічний пріон.

Експресія фізіологічного пріону є важливим фактором розвитку пріонних хвороб, з огляду на те, що накопичення патологічного пріона безпосередньо пов'язане з інтенсивністю біосинтезу його фізіологічного попередника.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на головному мозку клінічно здорових особин великої рогатої худоби зрілого віку чорно-рябої породи. Відпрепаровані частини головного мозку до проведення досліджень зберігалися при −20°С.

Дот-блот аналіз. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буфера (10% N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0.01 М Na-фосфатному буфері, 0.001% коктейль інгібіторів протеїназ (Sigma, Germany), pH 7.4). Далі зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв при 4°С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі (Сімко, Україна). Для вирівнювання об'ємів і концентрацій загального білка зразки розводили спеціальним буфером (25 мМ Tpic-HCl, 150 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, pH = 7.4). Далі розведені зразки наносили на нітроцелюлозну мембрану (Millipor). Для виявлення фонового свічення на мембрану наносили буфер для лізування та спеціальний буфер для розведення зразків. Після нанесення контрольнихі дослідних зразків мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP^C антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) — 1:2000 у ЗФРТ 90 хв., поліклональними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, USA) — 1:5000 у ЗФРТ 30 хв. Детекцію імунних комплексів проводили з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, USA) та набору для проявки плівок (Kodak).

Імуноблот-аналіз глікоформ PrP^C [8]

Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буфера (10% N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0.01 М Na-фосфатному буфері, 0.001% коктейль інгібіторів протеїназ (Sigma, Germany), pH 7.4). Далі зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв при 4°С. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі. Далі до над осадової рідини додавали однаковий об'єм буферу Леммлі [9] (Sigma, Germany), зразки прогрівали протягом 5 хв при 95°С, після чого проводили електрофорез у градієнтному (5 − 18% градієнт мономерів) поліакриламідному гелі та електроблотинг білків на PVDF-мембрану (Millipor, USA). Для контролю

блотингу та визначення відносних молекулярних мас досліджуваних білків використовували набір білкових маркерів SeaBlue Plus2 (Invitrogen, USA). Після електроблотингу мембрану блокували, шляхом інкубування в 5% знежиреному молоці на забуференому фізіологічному розчині (ЗФРТ) (0.01% Твін-20 на забуференому фізіологічному розчині) 60 хв. Далі мембрану інкубували з моноклональними анти-PrPC антитілами 6H4 (Prionics, Swiss) — 1:2000 у ЗФРТ 90 хв, поліклональними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, USA) — 1:5000 у ЗФРТ 30 хв. Детекцію імунних комплексів виконували з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, USA) та набору для проявки плівок (Kodak).

Статистичне опрацювання результатів. Опрацювання проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2003 з використанням t-тесту Стьюдента та обчисленням коефіцієнта кореляції.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджили загальний рівень експресії фізіологічної форми пріон протеїну у різних частинах головного мозку великої рогатої худоби методом точкової гібридизації. Було показано, що найвищий рівень експресії фізіологічного пріона простежується у довгастому мозку, нюховому тракті та нюхових горбах (рис. 1).

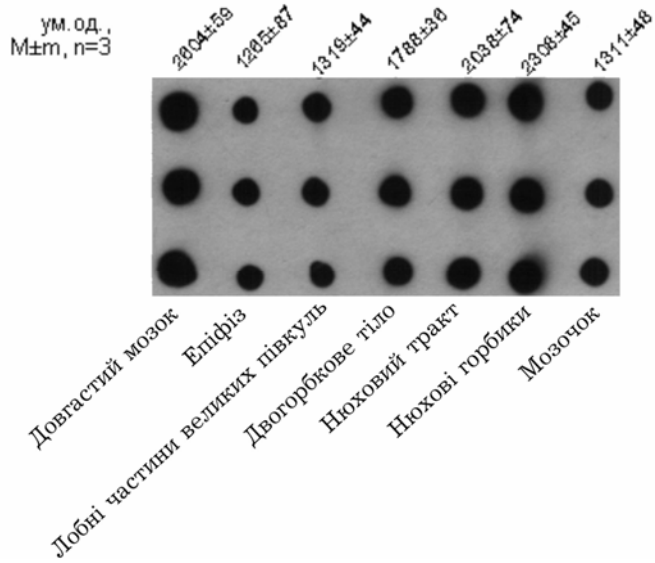

Рис. 1. Аналіз загального рівня експресії фізіологічного пріон-протеїна у відділах головного мозку великої рогатої худоби методом точкової гібридизації.

Для дослідження глікоформного спектра фізіологічного пріона у різних відділах голоного мозку ВРХ ми використали метод диск-електофо-

резу у градієнті ПААГ із наступним імуноблотингом.

Крім трьох основних глікоформ, ми виявили дві додаткові ізоформи в нюховому тракті та горбиках, двогорбковому тілі та мозочку. У лобних частках та епіфізі було детектовано три додаткові ізоформи (рис. 2). Враховуючи їх електрофоретичну рухливість — це частково глікозильовані форми фізіологічного пріона.

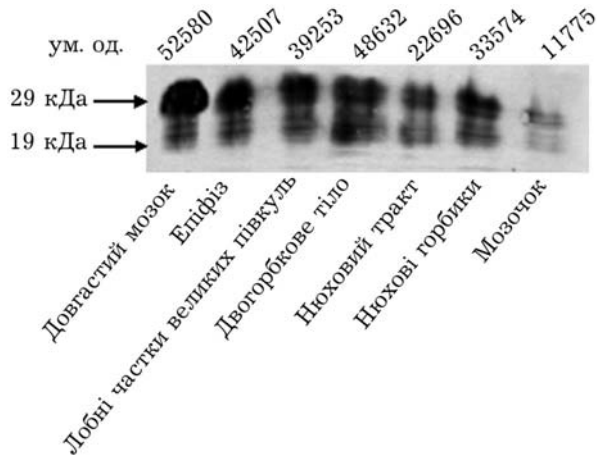

Рис. 2. Імуноблот-аналіз профілів експресії ізоформ фізіологічного пріона у відділах головного мозку великої рогатої худоби.

Узагальнюючи результати, отримані за допомогою методів точкової гібридизації та імуноблотингу, можна сказати, що найвищий рівень експресії фізіологічної форми пріон-протеїну протсежується у довгастому мозку, нюхових горбиках та нюховому тракті. В епіфізі, мозочку та лобних частках великих півкуль його рівень є приблизно у два рази нижчий, порівняно із довгастим мозком. Ці результати дають змогу виявити частини мозку, які можуть бути залучені у процеси реплікації патологічного пріона.

Дослідження експресії глікоформ фізіологічного пріон-протеїну засвідчило, що в усіх частинах мозку домінуючою є диглікозильована його ізоформа, дещо менше представлені ізоформи, які є частково глікозильованими. Мінорною є повністю деглікозильована форми фізіологічного пріона. І, хоча, співвідношення цих ізоформ є варіабельним, залежно від частини мозку, однак загальна тенденція є незмінною.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що найвищий рівень експресії фізіологічного пріон-протеїну простежується в довгастому мозку та частинах нюхового тракту ЦНС.
2. З'ясовано, що співвідношення глікоформ фізіологічного пріона досить стабільне для всіх досліджених частин мозку і виражається співвідношенням

$$2CHO\text{-}PrP^C > CHO\text{-}PrP^C > PrP^C,$$

де $2CHO\text{-}PrP^C$ — диглікозильована форма фізіологічного пріона;
$CHO\text{-}PrP^C$ — моноглікозильована форма фізіологічного пріона;
PrP^C — деглікозильована форма фізіологічного пріона.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Prusiner S.B.* Prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 13363 – 13383.
2. *Gavier-Widen D., Biacabe A.-G., Laplanche J.-L. et al.* Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases // EMBO J. — 2004. — Vol. 5. — P. 110 – 115.
3. *Wilesmith J.W., Wells G.A.H., Ryan J.B.M., et al.* A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy // Vet. Rec. — 1997. — Vol. 141. — P. 239 – 243.
4. *Beringue V., Mallinson G., Kaisar M. et al.* Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain // Brain. — 2003. — Vol. 126. — P. 2065 – 2073.
5. *Aguzzi A., Heikenwalder M.* Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook // Nature Reviews Microbiology. — 2006. — Vol. 4. — P. 765 – 775.
6. *Collinge J.* Molecular neurology of prion disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 2005. — Vol. 76. — P. 906 – 919.
7. *Be'ringue V., Bencsik A., Le Dur A. et al.* Isolation from Cattle of a Prion Strain Distinct from That Causing Bovine Spongiform Encephalopathy // PLoS Pathogens. — 2006. — Vol. 2, № 10. — P. 0956 – 0963.
8. *Peden A., Ritchie D., Head M. et al.* Detection and Localization of PrPSc in the Skeletal Muscle of Patients with Variant, Iatrogenic, and Sporadic Forms of Creutzfeldt-Jakob Disease // Amer. J. of Pathology. — 2006. — V. 168, №. 3. — P. 927 – 935.
9. *Laemmly U., Beguin F., Gujer-Kellenberg G.* A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation // J. Mol. Biol. — 1970. — V. 47, № 1. — P. 69 – 85.

SUMMARY

Vasyl VLIZLO, Petro VERBYTSKI, Khrystyna MAYOR, Vitaliy STADNYK

THE EXPRESSION PROFILE OF PHYSIOLOGYCAL PRION IN CATTLE BRAIN

Institute of Animal Biology UAAS, Lviv, Ukraine

The pattern of isoformes of physiological prion in cattle brain was investigated. Stable correlation between present isoformes was shown in different structural-functional parts of brain. On the basis of those results, an opportunity to differentiate strain of physiological and pathological prions taking into account the described methodical approach is suggested.