

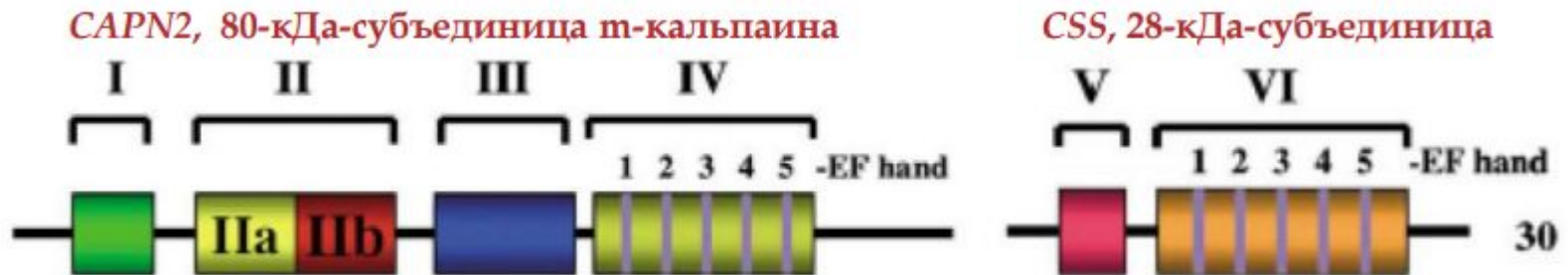
Исследование ферментативной
активности кальпаинов в поперечно-
полосатых мышцах спонтанно-
гипертензивных крыс (SHR)

Лосев Александр
Магистрант 2 курса

Основные белки кальпаиновой системы ПОЗВОНОЧНЫХ

- μ-кальпаин
- m-кальпаин
- Кальпастатин

- I** пропептид
- IIa / IIb** протеолитический домен цистеинового типа
триада **Cys¹⁰⁵ / His²⁶² / Asn²⁸⁶**
- III** C2-подобный домен
- IV, VI** кальмодулин-подобный Ca²⁺-связывающий домен
- V** глицин-богатый



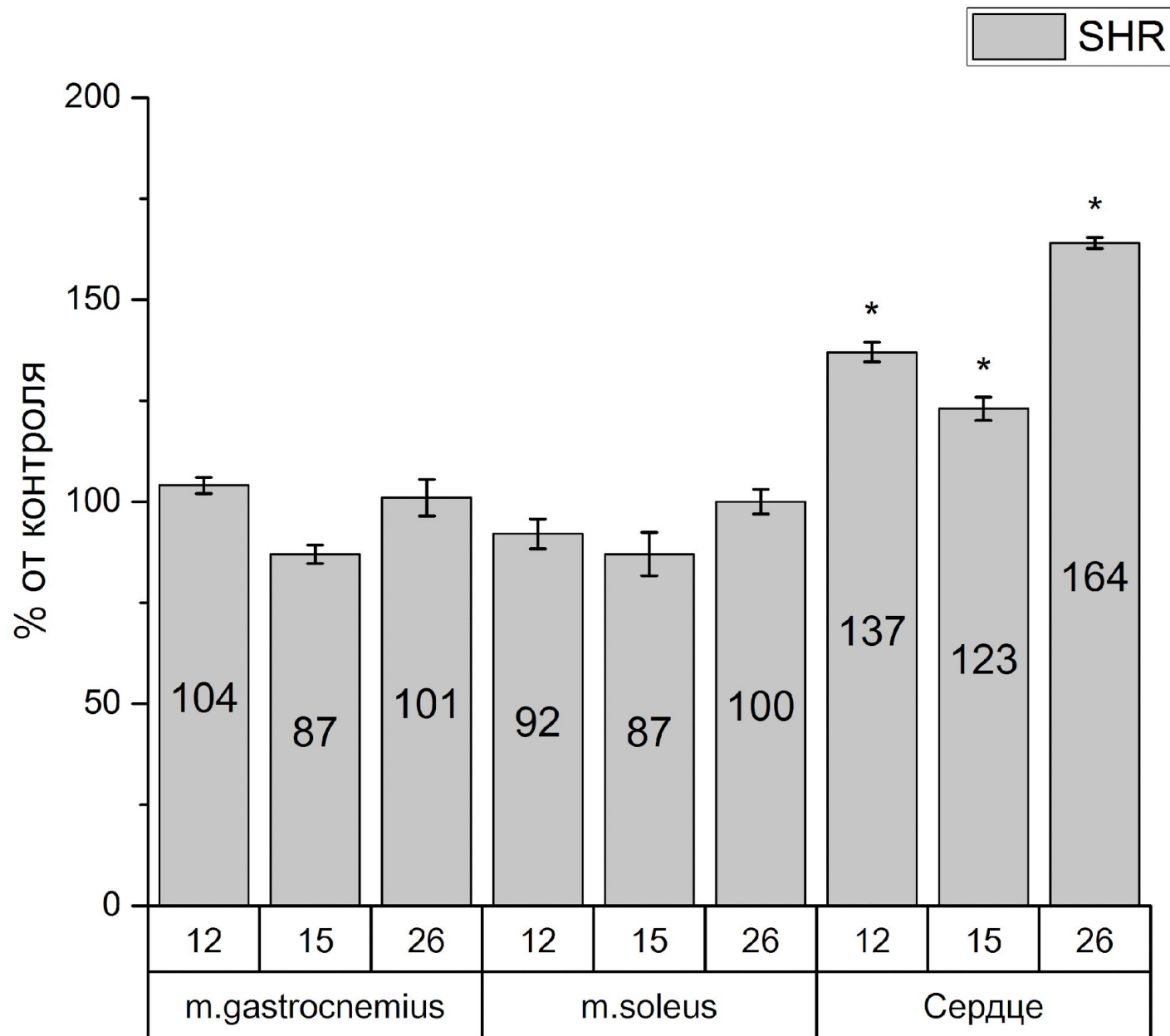
Цель: выяснение роли основных компонентов кальпаиновой системы в развитии гипертрофии сердечной мышцы и атрофии скелетных мышц у спонтанно-гипертензивных крыс (SHR)

Задачи:

- 1) Изучить изменения общей активности кальпаинов в белковых экстрактах, полученных из поперечно-полосатых мышц 12 и 15 недельных спонтанно-гипертензивных крыс (SHR)
- 2) Изучить изменения содержания μ -кальпаина и ингибитора кальпастина в поперечно-полосатых мышцах 12 и 15 недельных SHR
- 3) Изучить изменения содержания и уровня фосфорилирования субстратов кальпаинов – тайтина и небулина в поперечно-полосатых мышцах 12 и 15 недельных SHR
- 4) Изучить изменения экспрессии генов исследуемых белков в поперечно-полосатых мышцах 12 и 15 недельных SHR

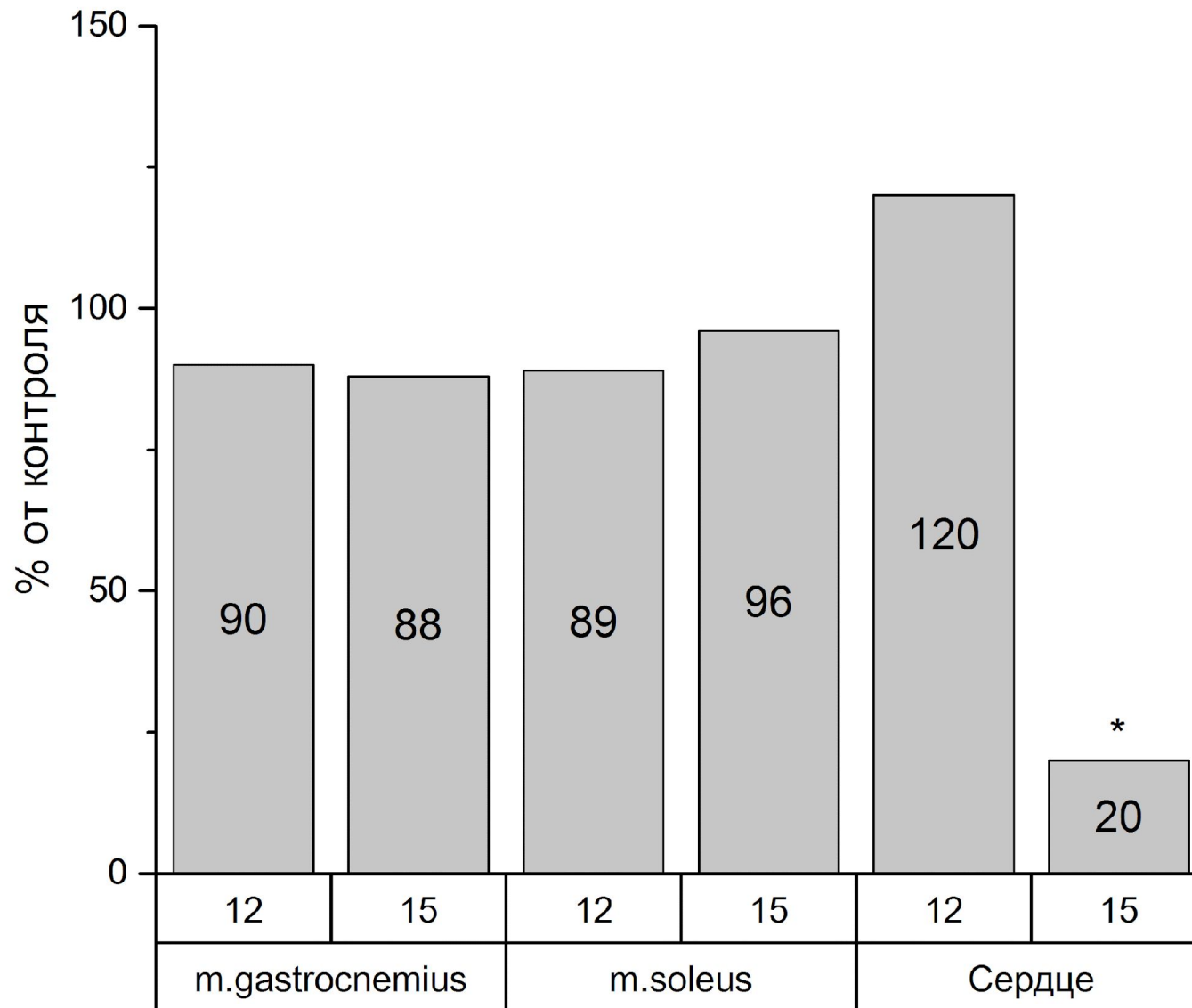
Методы

- Метод флуоресцентной спектрофотометрии с использованием набора Calpain Activity Assay Kit («Abcam») для определения общей активности кальпаинов
- ДСН-гель-электрофорез и Вестерн-блот анализ кальпаина и кальпастатина
- ДСН-гель-электрофорез тайтина
- Метод определения уровня фосфорилирования тайтина с помощью флуоресцентного красителя фосфатных групп белков Pro-Q Diamond («Invitrogen», США)

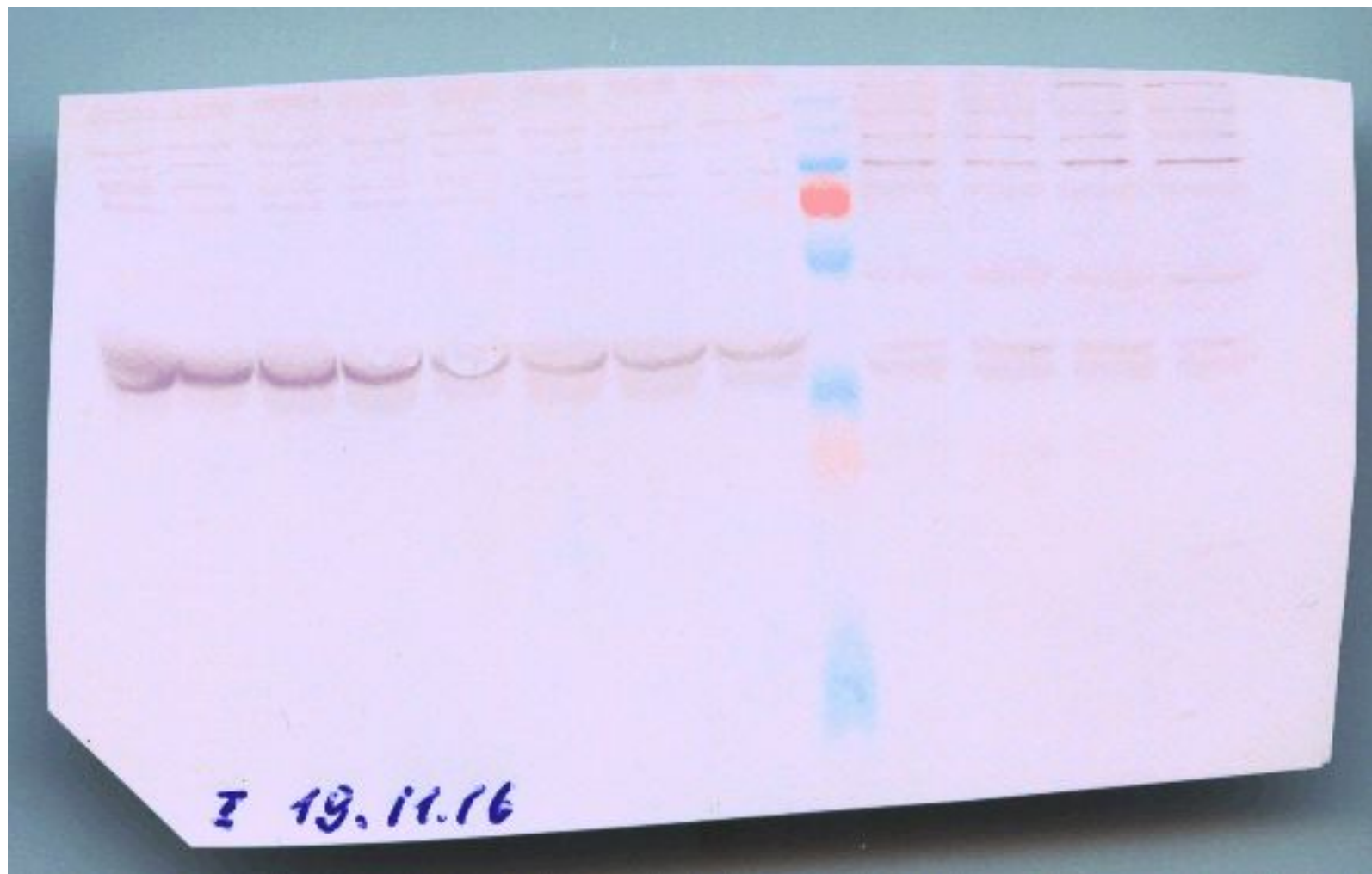


Общая активность кальпайнов

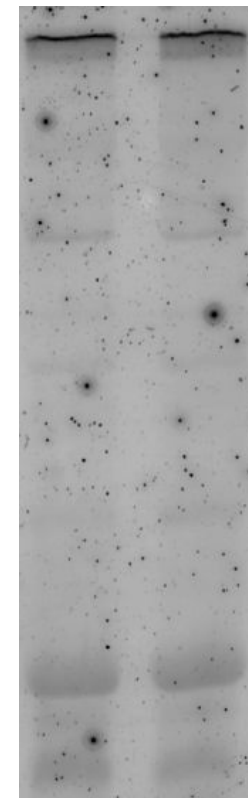
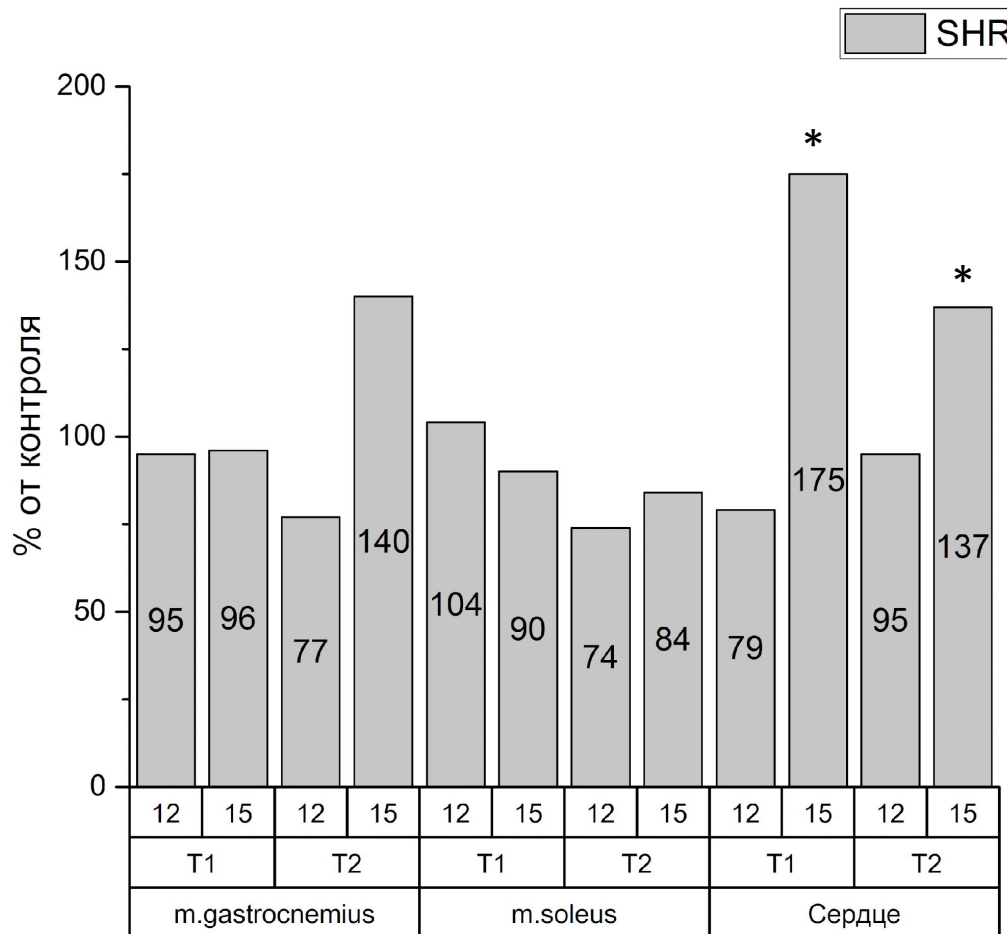
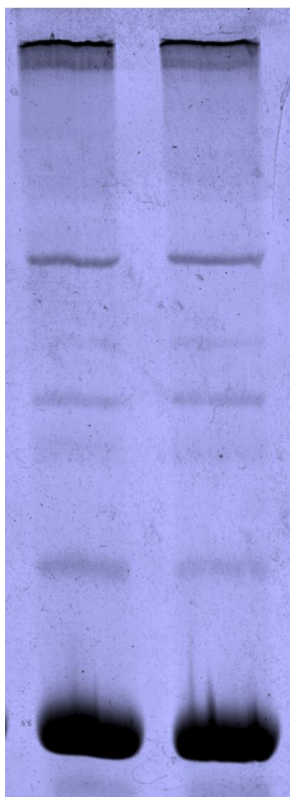
SHR



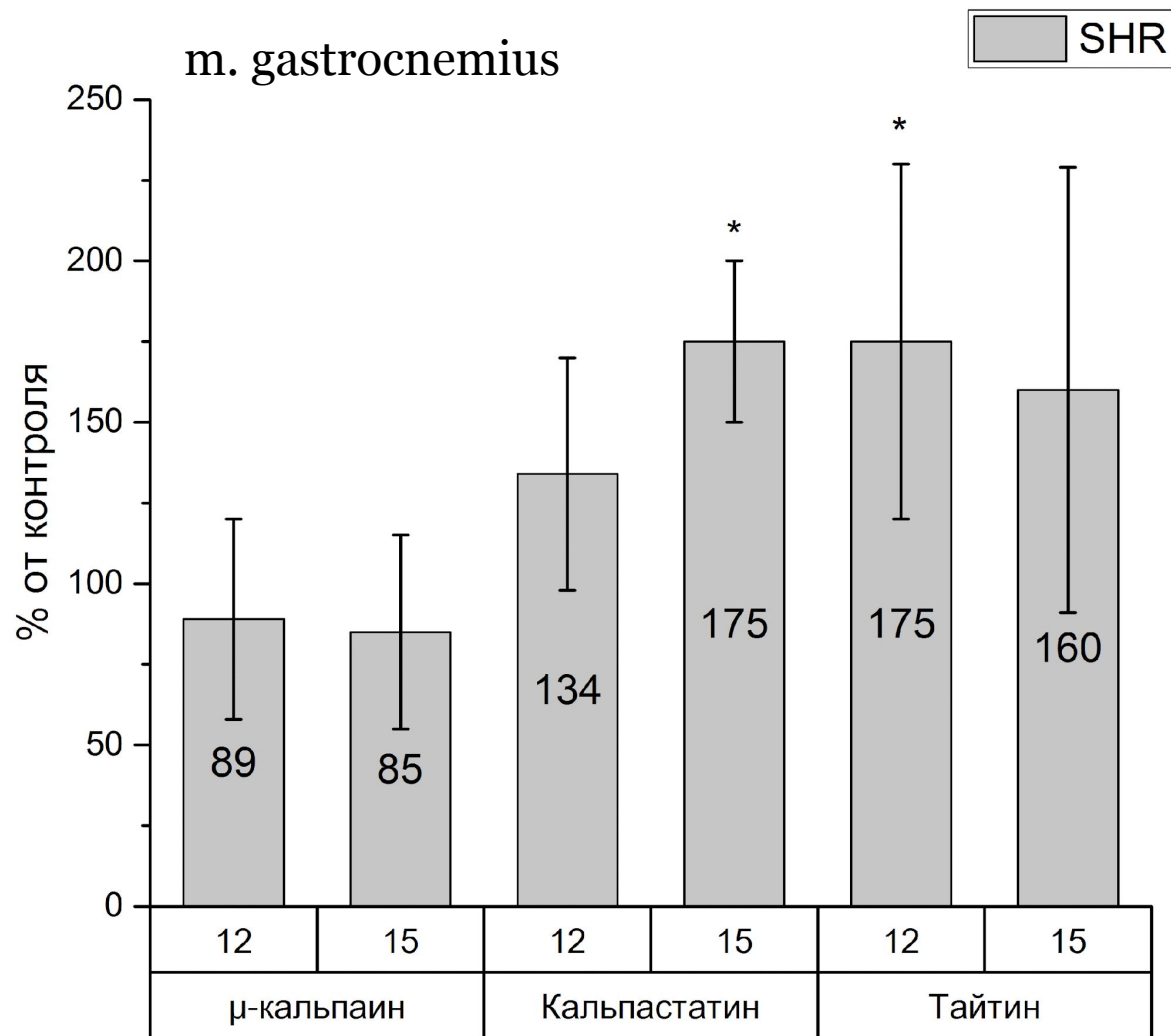
Вестерн-блот анализ



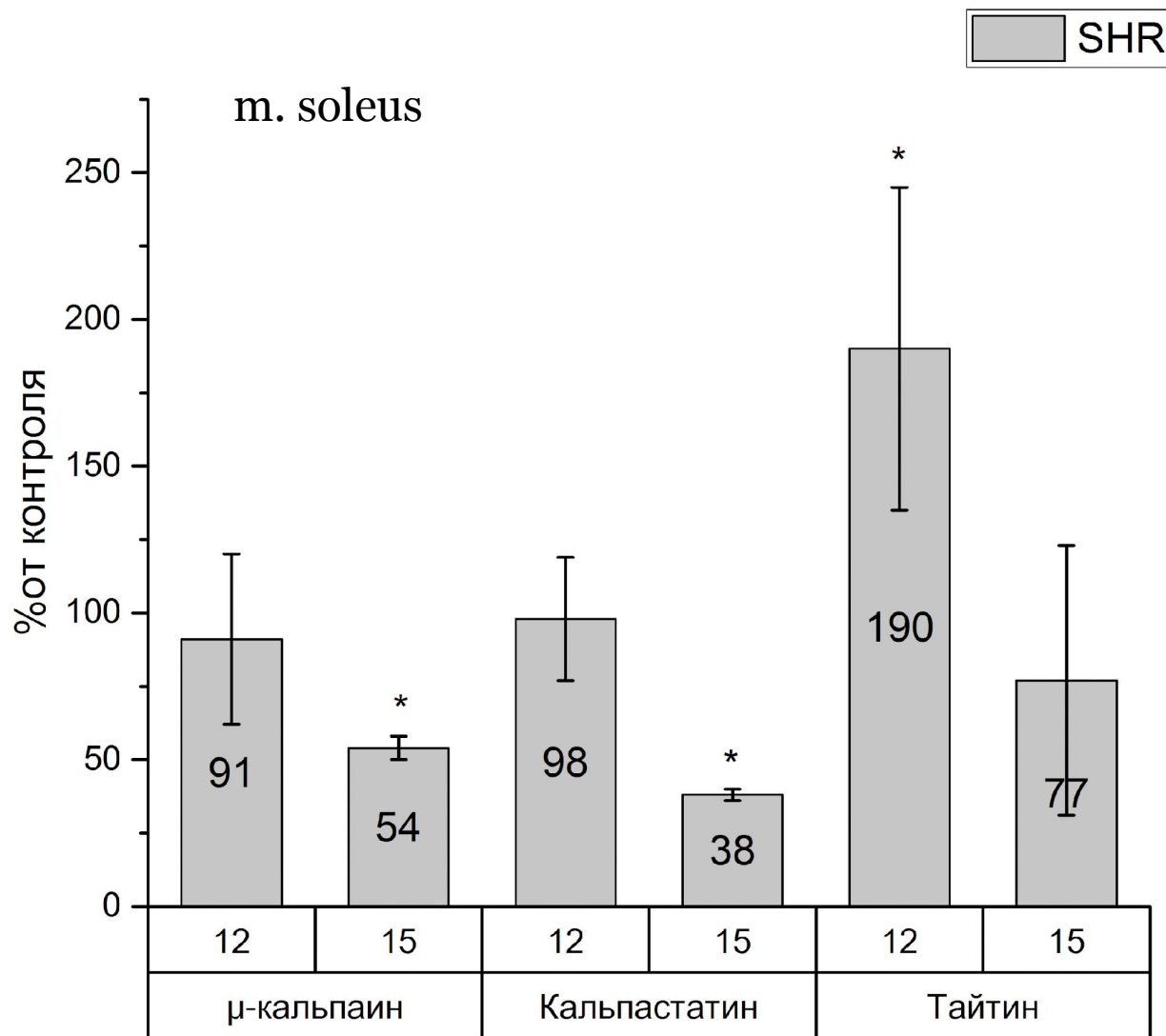
Уровни фосфорилирования тайтина



qRT-PCR

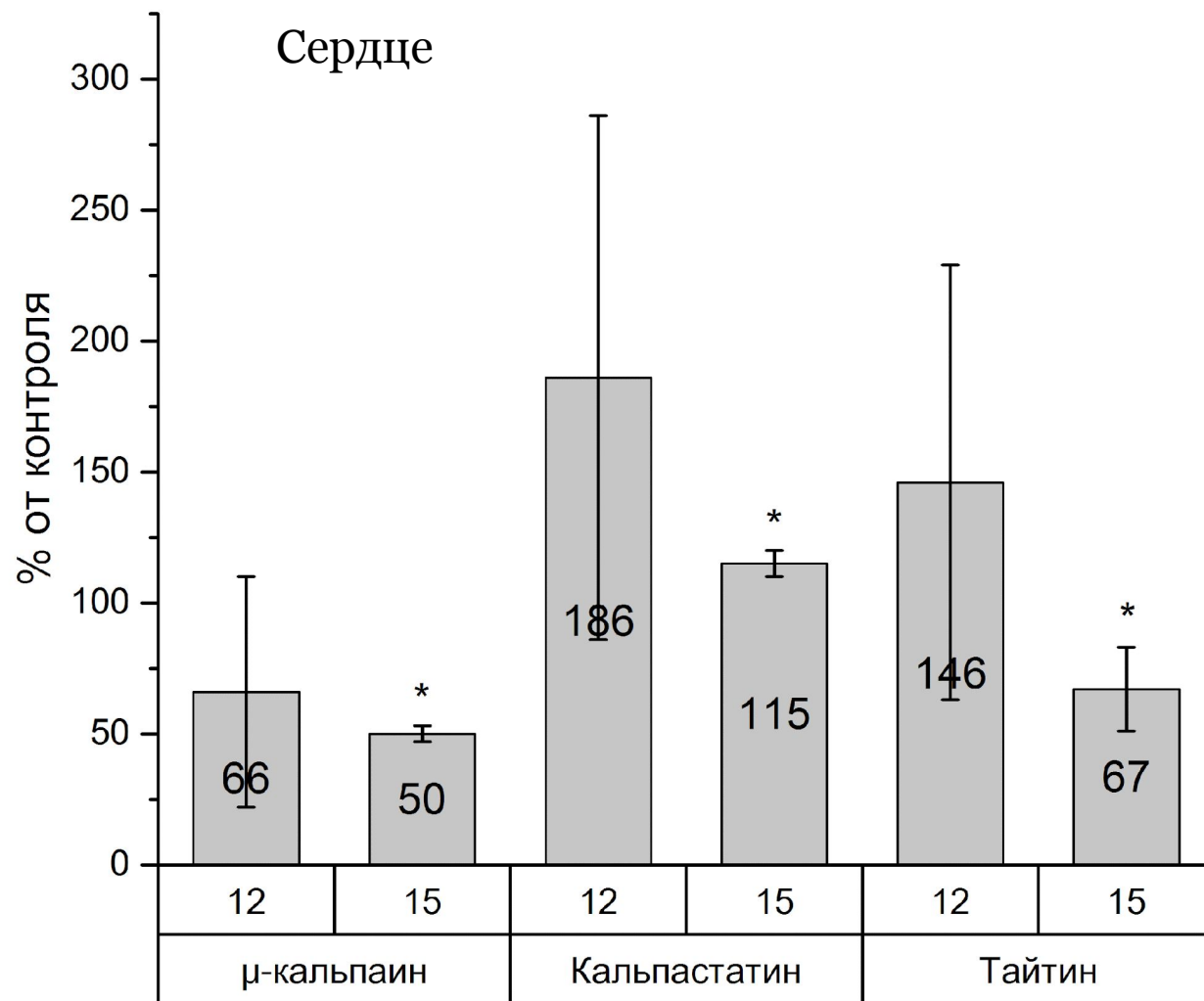


qRT-PCR



qRT-PCR

SHR



Выводы

- Обнаружены гипертрофические изменения в сердечной и атрофические изменения в скелетных мышцах (m.soleus) 12 и 15 недельных спонтанно-гипертензивных крыс (SHR). В m.gastrocnemius этих животных обнаружена тенденция к атрофии
- Гипертрофический ответ в сердечной мышце SHR сопровождался снижением в 1,8 раза общей активности кальпаинов, снижением генной экспрессии кальпаина, тайтина и увеличением фосфорилирования тайтина и генной экспрессии кальпастатина. При этом не было обнаружено достоверных изменений в содержании μ -кальпаина, кальпастатина и тайтина в сердечной мышце 12 и 15 недельных SHR.
- Атрофические изменения в скелетных мышцах SHR не приводили к снижению содержания тайтина и небулина, изменению уровня фосфорилирования тайтина, а также изменению содержания микро-кальпаина и кальпастатина. Не было обнаружено в этих мышцах изменений общей активности кальпаинов. Экспрессия генов тайтина и небулина в скелетных мышцах 12 и 15 SHR была повышена.
- Сделано предположение, что атрофические изменения в скелетных мышцах сопровождаются пропорциональным снижением содержания тайтина\небулина и ТЦМ.