

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 612.8.0.15:547.953.547.963

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ БЕЛКОВЫХ И ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРОТЕОЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

А.А. СТЕПАНЯН, К.Г. МАНУКЯН, К.Л. ЛЕВОНЯН, Т.И. КАЗАРЯН,
Л.Г. КИРАКОСЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА, 375044, Ереван

Изучались особенности белковых и липидных компонентов протеолипидов (ПЛ) головного мозга крысы. В составе ПЛ обнаружены четыре белка с молекулярной массой: I – 30,02; II – 24,99; III – 18,64; IV – 13,45 кДа. Найдены только две пары терминальных аминокислот: N-концевые – глицин, аспарагиновая к-та и C-концевые – фенилаланин, лизин. Показано, что менее прочно с белками ПЛ связаны нейтральные фосфолипиды (ФЛ), более прочно – кислые ФЛ и главным образом фосфатидилсерин и дифосфатидилглицерин. Полученные результаты свидетельствуют о преобладании в ткани мозга в основном двух типов ПЛ с особенностями белковых и липидных компонентов, характерными для ПЛ миелина и митохондрий.

Ուսումնասիրվել են առնետի գլխուղեղից անջատած պրոտեոլիպիդների (ՊԼ) սպիտակուցային և լիպիդային բաղադրիչների որոշ առանձնահատկությունները: ՊԼ կազմում հայտնաբերվել են չորս I - 30,02; II - 24,99; III - 18,64; IV - 13,45 կԴա մոլեկուլային զանգված ունեցող սպիտակուցներ: Բացահայտվել են միայն երկու զույգ ծայրային ամինաթթուներ N-ծայրային - գլիցին, ասպարազինաթթու և C-ծայրային - ֆենիլալանին, լիզին: Ցույց է տրվել, որ ՊԼ սպիտակուցների հետ թույլ կապված են չեզոք ֆոսֆոլիպիդները (ՖԼ) իսկ ավելի ամուր - թթու ՖԼ և հատկապես ֆոսֆատիդիլսերինը և դիֆոսֆատիդիլգլիցերինը: Ստացված տվյալները վկայում են, որ գլխուղեղի հյուսվածքում գերակշռում են հիմնականում երկու տիպի ՊԼ, որոնք իրենց սպիտակուցային և լիպիդային բաղադրիչների հատկություններով համապատասխանում են միելինային և միտոքոնդրիալ ՊԼ-ին:

Some characteristic features of protein and lipid moieties of proteolipids (PL) from rat brain were studied. In composition of PL four proteins with a molecular mass: I – 30,02; II – 24,99; III – 18,64; IV – 13,45 kDa were revealed. Only two pairs of terminal amino acids: N – terminal – glycine, aspartic acid and C-terminal – phenylalanine, lysine were found. It was shown that loosely bound with PL proteins were neutral phospholipids (PhL) and more tightly bound – acidic PhL, especially phosphatidylserine and diphosphatidylglycerol. The results obtained indicate the prevalence in brain tissue mainly of two types of PL with specific features of protein and lipid components characteristic for PL of myelin and mitochondria.

*Протеолипиды - белковые компоненты - липидные (фосфолипидные)
компоненты*

В связи с важной ролью, которая придается типично внутренним, гидрофобным мембранным белкам – протеолипидам (ПЛ) и связанным с ними липидам в структуре и функциях клеточных мембран нервной ткани (особенно миелина, очень богатого этими соединениями) и других тканей, а

также растительных и микробных клеток [7, 9, 11], представляет интерес исследование характерных особенностей ПЛ разных клеточных мембран с целью выявления сходства и различий между ними в зависимости от локализации и возможной функции. Однако многие вопросы, касающиеся структуры и функции ПЛ в различных мембранах, изучены пока недостаточно, что очень затрудняет более точное определение и классификацию этих белков.

В ходе исследований характерных особенностей ПЛ из разных органов и их субклеточных образований нами были получены данные относительно особенностей белковых и липидных компонентов ПЛ головного мозга крысы, которые представлены в настоящем сообщении. Ранее было показано, что в наибольших количествах и более прочно с протеолипидными белками (ПЛБ) связаны фосфолипиды (ФЛ) [3]. В связи с этим, наряду с некоторыми характеристиками белковых компонентов, изучали качественный состав и количественное содержание ФЛ во фракциях липидов, менее и более прочно связанных с ПЛБ головного мозга. Следует отметить, что связанные с белками липиды играют немаловажную роль в сохранении конформационной целостности ассоциированных с ними мембранных белков и осуществлении ими их функций [13].

Материал и методика. Опыты ставили на беспородных белых крысах массой 160-180 г. Животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг и на льду очищали от крови и мозговых оболочек. Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу Фолча, Лис [6]. Содержание ПЛБ определяли по методу Лис, Паксман [10]. ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов мозга методом эмульгирования-центрифугирования [4] с той разницей, что опускали последнее центрифугирование при 200 г. Осадки полученных этим методом «неочищенных» ПЛ (НПЛ) лиофилизировали, после чего промывали при -19° , -12° и $+23^{\circ}$ 2 раза 300-кратным объемом смеси: абсолютный этиловый спирт — обезвоженный этиловый эфир (1:1 об/об) для экстракции липидов, менее прочно связанных (МПС) с ПЛБ. Липиды, оставшиеся после промывания в «очищенных» таким образом ПЛ (ОПЛ), были обозначены как более прочно связанные (БПС). Осадки ОПЛ растворяли в смеси хлороформ:метанол: H_2O (2:1:0,2, по объему), определяли поглощение растворов при 278,5 нм, после чего растворы упаривали. Для расщепления связей между липидами и белками и дальнейшей экстракции более прочно связанных липидов из ОПЛ применяли методику Вахера и др. [13]. Липиды общих липидных экстрактов, МПС и БПС липидных фракций, выделенных из ПЛ, разделяли с помощью двумерной ТСХ на пластинах, покрытых силикагелем. Пятна отдельных ФЛ соскабливали с пластин в опытные пробирки и подвергали минерализации [2]. Электрофорез ОПЛ проводили в 10-12% ПААГ, содержащих 0,1% ДДС Na [5]. N- и C-концевые аминокислоты ПЛБ определяли методами, описанными ранее [1]. Статистическая обработка результатов проведена по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Белки ПЛ составляли 5,35 мг/г влажной массы и 4% от суммы всех белков головного мозга. Коэффициент поглощения выделенных препаратов ОПЛ равнялся 10,48 (табл. 1).

При диск-электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na ОПЛ головного мозга были обнаружены 4 полосы (рис. 1, табл. 2). Белки первых двух полос,

Таблица 1. Содержание ПЛ в головном мозге крысы

Протеолипиды, мг/г влажной ткани			Коэффициент поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ 278,5 нм
Белок ПЛ общих липидных экстрактов	НПЛ	ОПЛ (+23°)	ОПЛ (+23°)
5,35±0,05 (13)	21,04±1,06 (14)	5,11±0,18 (15)	10,48±0,18 (10)

Примечание: * В скобках число опытов.

Таблица 2. Белковый состав и терминальные аминокислоты ПЛБ из головного мозга крысы

Белковые полосы, молекулярная масса, кДа	Терминальные аминокислоты	
	N-концевые	C-концевые
I – 30,02±0,33 (28)	Глицин Аспарагиновая кислота	Фенилаланин Лизин
II – 24,99±0,26 (16)		
III – 18,64±0,37 (17)		
IV – 13,45±0,46 (4)		

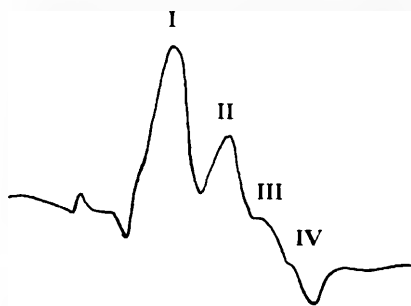


Рис.1. Данные сканирования белковых полос, полученных при разделении ОПЛ из головного мозга крысы с помощью диск-электрофореза в ПААГ с ДДСNa. $A=620$ нм. Нумерация пиков соответствует нумерации белковых полос в табл. 2 и в тексте.

преобладающие в количественном отношении, соответствовали по электрофоретической подвижности и молекулярной массе главному ПЛБ (I) и белку ДМ-20 (II) миелина [7]. Белки, сходные с ПЛБ I и IV полос по электрофоретической подвижности и кДа, были обнаружены нами при разделении ПЛ митохондрий, а с белком III полосы - при исследовании ПЛ белого вещества и микросом мозга [7, 12].

Несмотря на наличие четырех белковых полос, только две пары N- и C-терминальных аминокислот были обнаружены при исследовании ПЛ головного мозга. Одна из них – N-концевой глицин и C-концевой фенилаланин – соответствовала миелиновым [7], вторая – N-концевая аспарагиновая к-та и C-концевой лизин – митохондриальным ПЛБ. Наличие трех или четырех изоформ ПЛБ с одинаковыми N- и C-концевыми аминокислотами характерно для ПЛБ миелина [7], хотя в настоящее время показано, что некоторые представители этой семьи белков локализованы в нейронах и глие [14]. Все они являются продуктами одного гена и образуются в результате альтернативного сплайсинга мРНК главного ПЛБ миелина. Наиболее типичным представителем этих белков является белок

ДМ-20 — второй по содержанию ПЛБ миелина. Он отличается от главного ПЛБ миелина выпадением 35 аминокислот, соответствующих сегменту 116-150 главного гидрофильного домена этого белка [7, 9]. В связи с этим, белок ДМ-20 более гидрофобен и проявляет одинаковую способность связывать как кислые, так и нейтральные ФЛ, тогда как главный ПЛБ миелина обладает строгой специфичностью в отношении кислых ФЛ [7, 8].

Наряду с исследованием белковых компонентов, изучали качественный состав и количественное содержание

ФЛ МПС и БПС с ПЛБ головного мозга. Согласно полученным данным, 21% всех ФЛ общего липидного экстракта головного мозга связан с НПЛ, которые содержат весь комплекс связанных с ПЛБ липидов. Из них 19,2% приходится на долю МПС фракции липидов и 1,9% - БПС. ФЛ выделенных нами препаратов составляли 43,82% от массы НПЛ и 16,32% - от массы ОПЛ, полученных в результате промывания НПЛ спиртоэфирной смесью при +23°. Менее прочно с ПЛБ были связаны нейтральные ФЛ — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин. Они составляли в сумме 82,3% всех МПС ФЛ (рис.2). Те же ФЛ преобладали в ФЛ НПЛ. По своему фосфолипидному составу НПЛ и МПС фракции липидов были в общем сходны с ФЛ общего липидного экстракта. Различия касались кислых ФЛ и в основном дифосфатидилглицерина, процентное содержание которого во фракции МПС липидов было ниже, а в ФЛ НПЛ вдвое выше, чем в ФЛ общего липидного экстракта мозга. Примененное для выделения МПС липидов промывание НПЛ спиртоэфирной смесью при разных температурах (-19°, -12°, +23°) приводило к постепенному удалению нейтральных и части МПС кислых ФЛ. С полученными в результате промывания при +23° ОПЛ (на рис. 2 представлены только эти данные) были связаны почти исключительно кислые ФЛ и главным образом два из них - фосфатидилсерин и дифосфатидилглицерин, составлявшие 41,3% и

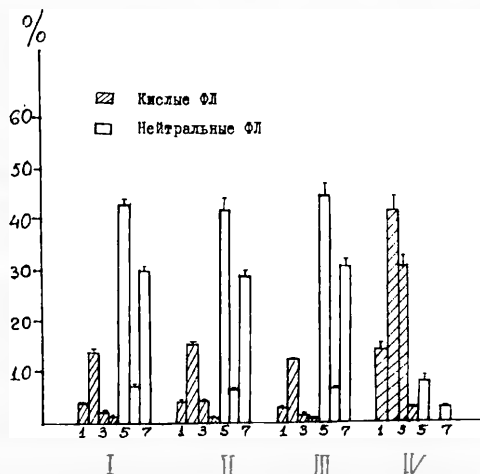


Рис.2. Содержание отдельных ФЛ общего липидного экстракта, НПЛ и ФЛ, менее и более прочно связанных с ПЛБ из головного мозга крысы. По оси ординат - % Р отдельных ФЛ от общей суммы Р ФЛ каждой фракции, принятой за 100%. По оси абсцисс - фракции: I - общий липидный экстракт; II - НПЛ; III - МПС фракция; IV - БПС фракция. ФЛ: 1 - фосфатидилинозит; 2 - фосфатидилсерин; 3 - дифосфатидилглицерин; 4 - фосфатидная кислота; 5 - фосфатидилхолин; 6 - сфингомиелин; 7 - фосфатидилэтаноламин. Сумма ФЛ каждой фракции (мкг Р/г влажной ткани). I - 1755,30; II - 368,79; III - 336,55; IV - 33,36. М ± m - среднее из 12-15 определений.

30,6% от суммы всех БПС ФЛ соответственно. На долю фосфатидилинозита приходилось 14,2%. В сумме кислые ФЛ составляли 89,1% всех ФЛ, входящих в состав ОПЛ. Из двух преобладающих БПС кислых ФЛ фосфатидилсерин характерен для ПЛ миелина головного мозга, где составляет около 70% от суммы всех БПС ФЛ [7], второй — дифосфатидилглицерин — для ПЛ митохондрий, составляя 43% всех БПС с ПЛБ ФЛ митохондрий мозга крысы.

Хотя ПЛ обнаружены во всех исследованных субклеточных образованиях нервной ткани, основная их масса сосредоточена в миелине, на долю которого приходится около 70% всех ПЛ общего гомогената мозга крысы [6]. Следовательно, основная часть ФС, связанная с ПЛБ головного мозга, имеет миелиновое происхождение, хотя этот ФЛ является также компонентом БПС с ПЛБ фракций ФЛ и других субклеточных образований мозга, в частности микросом [12].

Высокое содержание БПС фосфатидилсерина в ПЛ мозга объясняется в основном особенностями главного ПЛБ миелина. Этот белок, в гидрофильном домене которого присутствуют пять положительно и два отрицательно заряженных аминокислотных остатка, обнаруживает строгую специфичность в отношении кислых ФЛ, особенно фосфатидилсерина. В силу своих уникальных структурных особенностей, наличия чередующихся гидрофобных и гидрофильных доменов, главный ПЛБ миелина несколько раз (три или четыре) пересекает миелиновую мембрану и идеально приспособлен для взаимодействия с липидами. Поскольку гидрофильный фрагмент 116-150 этого белка, как полагают, выступает из липидного бислоя, он может через свои положительно заряженные аминокислотные остатки взаимодействовать с отрицательно заряженными липидами противоположного бислоя миелина, в частности с фосфатидилсерином. Можно предположить, что та часть кислых ФЛ, в частности фосфатидилсерина, которая взаимодействует с этим сегментом ПЛБ, связана более прочно, а та, которая ассоциирована с белком ДМ-20 по типу, возможно, гидрофобных взаимодействий, связана менее прочно. Что касается дифосфатидилглицерина, то этот ФЛ является в основном компонентом внутренней мембраны митохондрий [3].

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены некоторые характерные особенности белковых и липидных компонентов ПЛ головного мозга. Они свидетельствуют о преобладании в ткани мозга в основном двух типов ПЛ с особенностями, характерными для ПЛ миелина и митохондрий. Однако в небольших количествах ПЛ входят в состав и других субклеточных образований нервной ткани, где могут иметь иной белковый и липидный состав и функцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казарян Т.И., Левонян К.Л., Манукян К.Г. Биолог. журн. Армении, 36, 4, 322-325, 1984.
2. Киракосян Л.Г., Манукян К.Г., Левонян К.Л. Нейрохимия, 12, 2, 50-53, 1995.
3. Манукян К.Г. Нейрохимия. 1, 1, 51-65, 1982.
4. Манукян К.Г., Киракосян Л.Г., Левонян К.Л. В сб.: Вопросы биохимии мозга, 7, 140-149, Ереван, 1972.
5. Манукян К.Г., Киракосян Л.Г., Левонян К.Л., Степанян А.А. В сб.: Вопросы биохимии мозга, 11, 116-128, 1976.
6. Манукян К.Г., Левонян К.Л., Степанян А.А., Киракосян Л.Г., Казарян Т.И. В сб.: Вопросы биохимии мозга, 12, 68-80, Ереван, 1977.
7. Манукян К.Г., Степанян А.А., Левонян К.Л., Казарян Т.И., Киракосян Л.Г. Нейрохимия, 15, 1, 36-44, 1998.
8. Horvath L.I., Brophy P.J., March D. Biochemistry, 29, 11, 2635-2638, 1990.
9. Lees M.B. Neurochem. Res. 23, 3, 261-271, 1998.
10. Lees M.B., Paxman S. Anal. Biochem. 47, 2, 184-192, 1972.
11. Lees M.B., Sakura D.J., Sapirstein V.S., Curatolo W. Biochim. Biophys Acta, 553, 2-3, 96-107, 1979.
12. Manukian K.H., Kazarian T.I., Kirakosian L.G., Stepanian H.A., Levonian K.L. Нейрохимия, 20, 2, 101-104, 2003.
13. Vacher M., Waks M., Nicot C. J.Neurochem. 52, 1, 117-123, 1989.
14. Yoshida M., Kalinovsky A., Colman D.R. J.Neurochem. 69, Suppl. S82C, 1997.

Поступила 08.XII.2004