УДК 612.82:577.3:577.112.856

О БЕЛКОВОМ И ЛИПИДНОМ КОМПОНЕНТЕ ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ РАЗНЫХ СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

МАНУКЯН К. Г., СТЕПАНЯН А. А., КАЗАРЯН Т. И.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследованы субклеточная локализация и белковый и липидный компоненты протеолипидов (ПЛ), выделенных из разных субклеточных структур головного мозга крысы: миелина, синаптосом, митохондрий (несинаптических и синаптических), микросом. Выявлены определенные различия в белковом и аминокислотном составе ПЛ разных субклеточных образований, касающиеся в основном ПЛ миелина и митохондрий. Высказано предположение о существовании, по крайней мере, двух основных типов ПЛ в нервной ткани: миелинового и митохондриального. Первый характерен для миелина и белого вещества; к нему приближаются по своему белковому компоненту также ПЛ микросом. Второй характерен как для несинаптических, так и синаптических митохондрий. ПЛ синаптосом имеют свойства и того и другого.

Протеолипиды (ПЛ) представляют особую группу типично внутренних гидрофобных мембранных белков, связанных с липидами. Они являются необходимыми компонентами клеточных мембран нервной ткани (особенно миелина, богатого этими соединениями) и других органов, а также растительных и микробных клеток [1—3]. Полагают, что в зависимости от локализации ПЛ могут участвовать в выполнении ряда функций мембран, таких как модуляция жидкостности липидного бислоя и регуляция через это активности ферментов, транспорт протонов и ионов, в том числе и фосфатных, следовательно, и синтез АТР, связывание нейроактивных веществ и т. д. [2—7].

В связи с различной локализацией и предполагаемой ролью ПЛ в мембранных образованиях клетки возникает вопрос о сходстве и отличиях ПЛ, входящих в состав разных субклеточных структур. В настоящем сообщении суммированы полученные нами данные относительно субклеточного распределения ПЛ в нервной ткани, а также белкового и липидного компонента ПЛ, выделенных в виде очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из разных субклеточных образований мозга крысы.

Выделение субклеточных образований из целого мозга белых крыс производили по схеме, представляющей комбинацию нескольких методов, предложенных различными авторами [8]. Фракции субсинаптических частиц коры больших полушарий мозга изолировали из подвергнутых шоку синаптосом по De Robertis, Rodriguez de Lores Arnais [9].

ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов мозга и субклеточных образований методом эмульгирования-центрифугирования [10, 11]. Лиофилизированные осадки изолированных этим методом неочищенных ПЛ промывали для удаления менее прочно связанных липидов 300—600-кратным объемом смеси спирт-эфир 1:1 при —12 и +23°, что способствовало, вероятно, последовательному удалению из

неочищенных ПЛ не только наименее прочно связанных липидов, но и части несколько более прочно связанных. Полученные в результате ПЛ обозначали как «очищенные».

Исследование содержания белка ПЛ в липидных экстрактах разных субклеточных образований целого мозга показало, что большая часть ПЛ локализована в миелине. Белок ПЛ двух миелиновых фракций, отличавшихся по размерам миелиновых фрагментов и обозначенных как «легкий» и «тяжелый» миелин, составлял около 70% от ПЛ общего гомогената (5,35 мг/г влажной массы), из которых 17,6% приходилось на долю ПЛ «тяжелого» миелина и 51,2%—«легкого». Белок ПЛ митохондрий и синаптосом составлял 8,2 и 8,4, микросом—4,9, а ядер—1,9% от ПЛ общего гомогената.

Преобладающими в отношении белка ПЛ субфракциями синаптосом коры больших полушарий мозга являются митохондрии, на долю которых приходилось около 59% белка всех ПЛ синаптосом, составлявшего 0,35 мг/г влажной массы. 31,2% приходилось на долю ПЛ синаптических мембран и всего 1,7%—синаптических пузырьков. Содержание белка ПЛ синаптических митохондрий составляло 0,21 мг/г влажной массы коры мозга, почти вдвое ниже, чем несинаптических—0,4 мг/г, однако его процентное содержание в суммарных белках того и другого типа митохондрий было почти одинаковым (3,24 и 3,94% соответственно).

ПЛ общего гомогената и разных субклеточных образований мозга оказались в общем сходными по своему аминокислотному составу, который характеризовался преобладанием неполярных аминокислот и относительной бедностью кислыми и основными аминокислотами (табл. 1). На фоне общего сходства имелись некоторые отличия, касающиеся в основном миелина и митохондрий. ПЛ митохондрий как несинаптических, так и синаптических отличались от ПЛ миелина более высоким содержанием аспарагиновой кислоты, метионина, лейцина, изолейцина, пролина и более низким—цистеина, валина, треонина, тирозина. Различия были наиболее выражены в отношении серусодержащих аминокислот—метионина и цистеина. ПЛ синаптосом занимали промежуточное положение между ПЛ миелина и митохондрий. Как и митохондриальные ПЛ, они отличались более высоким содержанием пролина, изолейцина и более низким—тирозина. С другой стороны, по процентному содержанию серусодержащих аминокислот и лейцина они были ближе к ПЛ миелина. ПЛ несинаптических и синаптических митохондрий оказались очень сходными по аминокислотному составу.

Особенности аминокислотного состава ПЛ находят отражение в низком коэффициенте полярности этих белков, рассчитанном по Vanderkooi, Capaldi [12]. Для ПЛ, выделенных из общего гомогената и исследованных субклеточных образований мозга, он колебался в пределах 33,7—35,4 (табл. 1).

Определение с помощью электрофореза в ПААГ с ДДС-Na [13] белкового состава и величин M_r ПЛ, полученных из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга, показало, что они несколько

отличались также по своему белковому составу, который был гетерогенен.

На рис. 1 представлены кривые сканирования диск-электрофореграмм ПЛ разных субклеточных образований мозга. При электрофоретическом разделении ПЛ, полученных из общего гомогената мозга крысы, как и из белого вещества мозга крупного рогатого скота [14], были обнаружены 4 основных полосы. Первая, наиболее интенсивно окрашенная, с M_r 28,9±0,57 кД, соответствовала полосе ПЛ в миелине, вторая, тоже довольно интенсивная, с M_r 21±0,48 кД—белку ДМ-20, который также имеет протеолипидную природу и, как показали последние исследования, отличается от основного ПЛ выпадением определенной внутренней ами-

Таблица 1

Аминокислотный состав очищенных протеолипидов из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга (среднее из 2—4 определений)

Аминокислота	В моль/100 моль, найденных в гидролизате					
	Общий гомогенат	Миелин Мт	Миелин Мх	Митохондрии		Синаптосомы
				несинаптические	синаптические	
Аргинин	2,87	2,69	2,65	3,14	2,85	2,85
Гистидин	2,12	1,88	1,92	1,94	1,75	1,95
Лизин	4,95	4,71	4,83	5,28	4,81	4,98
Аспарагиновая	4,69	4,77	4,31	6,13	5,62	5,41
Глутаминовая	5,75	4,91	6,45	5,97	5,66	6,31
Цистеин	3,28	4,00	2,80	0,40	следы	5,37
Метионин	2,20	1,60	1,20	3,40	3,50	1,19
Серин	7,80	7,12	8,44	7,45	7,59	7,20
Треонин	7,31	7,42	8,57	6,08	5,76	7,23
Пролин	4,40	3,25	4,62	5,30	6,00	6,26
Глицин	10,33	10,91	11,15	10,80	13,40	10,99
Аланин	10,81	11,88	10,88	10,71	10,51	9,40
Валин	4,75	5,22	5,31	4,26	4,35	4,49
Лейцин	10,06	10,96	10,24	13,22	13,80	9,75
Изолейцин	6,37	5,22	5,07	6,29	6,46	6,46
Тирозин	5,65	5,60	3,99	3,48	0,99	3,26
Фенилаланин	6,67	7,86	7,57	6,15	6,94	6,90
Полярность	34,86	33,54	35,28	35,40	33,69	34,87

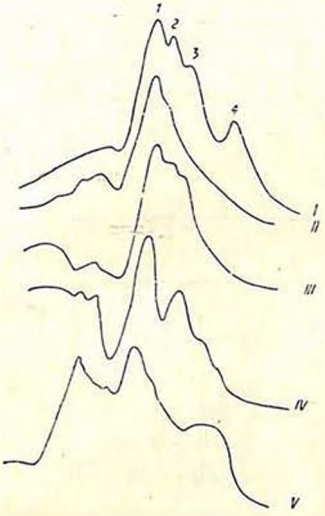
нокислотной последовательности [15]. Третья и особенно четвертая полосы с M_r 17,8±0,55 и 13,2±0,65 кД соответственно были менее выражены. Другие авторы также обнаружили несколько полос при изучении ПЛ из белого вещества мозга и других источников [2, 16], природа которых остается до сих пор неясной, тем более, что большинство этих ПЛ характеризуется присутствием только одной пары N- и С-концевых аминокислот.

Следует отметить, что и при исследовании белкового состава ПЛ основные различия выявились в отношении миелина и митохондрий.

При электрофоретическом разделении ПЛ, выделенных из миелина, были обнаружены две полосы: первая, интенсивно окрашенная, с M_r 26—30 кД соответствовала основной полосе ПЛ в белом веществе моз-

га и миелине, вторая, менее выраженная, с M_r 20—22 кД—белку ДМ-20. ПЛ митохондрий давали одну основную полосу с несколько более высокой M_r 29—35 кД и вторую тоже сравнительно хорошо выраженную низкомолекулярную полосу с M_r 13—17 кД. Кроме того, на диск-электрофореграммах ПЛ митохондрий обнаруживались две более высокомолекулярных полосы с M_r 44 и 55 кД, которые имелись и в ПЛ общего гомогената. Полосы, соответствующей белку ДМ-20, на диск-электрофореграммах ПЛ митохондрий практически не было. ПЛ микросом по своему белковому составу и величине M_r были в общем сходны с ПЛ миелина и белого вещества мозга.

Еще более отчетливо различия между двумя типами ПЛ и локали-



Кривые сканирования диск-электрофореграмм протеолипидов, изолированных из белого вещества головного мозга крупного рогатого скота (I) и субклеточных образований мозга крысы: «легкий» миелин (II), микросомы (III), общий гомогенат (IV), митохондрии несинаптические (V). *1*—протеолипид, *2*—белок ДМ-20. Гели окрашены амидо-черным 10В. А—620 нм. Движение слева направо

зация этих типов выявились при исследовании N- и С-концевых аминокислот ПЛ [17, 18], выделенных из разных отделов и разных субклеточных образований мозга. Как видно из табл. 2, N-концевой аминокислотой ПЛ миелина и белого вещества мозга является глицин, а С-концевой—фенилаланин. Соответствующими N- и С-концевыми аминокислотами ПЛ из несинаптических и синаптических митохондрий являются аспарагиновая кислота и лизин. В сером веществе больших полушарий, общем гомогенате мозга, где присутствуют и миелин и митохондрии, были найдены обе пары N- и С-концевых аминокислот. Ту же картину наблюдали в синаптосомах, где, по-видимому, присутствует миелиновый тип наряду с митохондриальным. N- и С-концевые аминокислоты микросомных ПЛ соответствовали миелиновому типу. Этого следовало ожидать, так как в этих субклеточных образованиях имеет в основном место синтез миелиновых ПЛ.

Таким образом, исследование белкового компонента выявило определенные различия между аминокислотным, белковым составом, а также

N- и С-концевыми аминокислотами ПЛ из разных субклеточных образований мозга, касающиеся главным образом ПЛ миелина и митохондрий.

Эти отличия четко проявились и при исследовании липидного компонента ПЛ, полученных из общего гомогената и разных субклеточных образований мозга. Был изучен фосфолипидный состав ПЛ, очищенных в разной степени от липидов [3]. Исследования показали, что фосфолипиды (ФЛ) составляют 30—50% массы неочищенных ПЛ из разных субклеточных образований и 8—25% от массы очищенных ПЛ в зависимости от условий очистки. Преобладающими ФЛ неочищенных ПЛ всех изученных субклеточных частиц оказались нейтральные ФЛ и главным образом фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, составлявшие каждый 25—36% от суммы всех связанных ФЛ. На фоне этого сходства наметились различия в соотношениях кислых ФЛ, которые станови-

Таблица 2

N- и С-концевые аминокислоты белка ПЛ из разных отделов и субклеточных образований мозга

Животное, отделы и субклеточные образования мозга	N-концевая	С-концевая
Крупный рогатый скот		
Белое вещество больших полушарий	глицин	фенилаланин
Серое вещество больших полушарий	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин
Крыса		
Общий гомогенат	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин
Миелин Мл	глицин	фенилаланин
Микросомы	глицин	фенилаланин
Митохондрии несинаптические	аспарагиновая	лизин
Митохондрии синаптические	аспарагиновая	лизин
Синаптосомы	глицин, аспарагиновая	фенилаланин, лизин

лись все более явными по мере отмывки, приводившей к последовательному удалению менее прочно связанных нейтральных ФЛ и концентрации кислых, главным образом фосфатидилсерина, дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита. Как и в случае белкового компонента, различия касались в основном ПЛ миелина и митохондрий.

Для очищенных ПЛ обеих фракций миелина, как и белого вещества мозга, было характерно преобладание фосфатидилсерина, составлявшего 36% от суммы ФЛ в ПЛ, очищенных при—12°, и 62% в ПЛ, очищенных при 23°. В меньших количествах содержались фосфатидилинозит 8—14% и дифосфатидилглицерин—8—11%. В отличие от ПЛ миелина, в очищенных ПЛ из несинаптических, а также синаптических митохондрий основным ФЛ являлся типично митохондриальный липид—дифос-

фатидилглицерин, составлявший 34—30% соответственно в ФЛ ПЛ, очищенных при —12°, и 46—33% в ФЛ ПЛ, очищенных при 23°. Меньший процент приходился на долю фосфатидилсерина—10—15%, фосфатидилхолина—22—16% и фосфатидилинозита—13—9%. ПЛ синаптосом, очищенные при —12°, характеризовались примерно одинаковым процентным содержанием фосфатидилсерина и дифосфатидилглицерина, которые были преобладающими ФЛ и составляли каждый около 23% от суммы ФЛ. В ПЛ синаптосом, очищенных при 23°, доминировал дифосфатидилглицерин—33,8% от суммы ФЛ, а фосфатидилсерин составлял 23,8%.

Таким образом, различия в фосфолипидном составе ПЛ из разных субклеточных образований мозга обусловлены в основном разницей в содержании двух кислых ФЛ: фосфатидилсерина и дифосфатидилглицерина, первый из которых характерен для миелиновых, второй—митохондриальных ПЛ.

Сопоставляя данные относительно белкового и липидного компонента ПЛ разных субклеточных образований мозга, можно прийти к заключению о существовании двух основных типов ПЛ в нервной ткани: миелинового и митохондриального. К первому приближаются по своему белковому и липидному компоненту ПЛ микросом. Второй характерен для несинаптических и синаптических митохондрий, а также митохондрий клеток других органов, в частности сердца [19]. ПЛ синаптосом имеют черты того и другого. Эти два типа являются, по-видимому, в основном, структурными компонентами мембран разных субклеточных образований нервной ткани, в которых, вероятно, играют и определенную функциональную роль. Однако не исключено присутствие в нервной ткани и других минорных ПЛ с иным белковым и липидным составом. Такие минорные низкомолекулярные ПЛ, выполняющие важные мембраносвязанные функции, выделены в настоящее время из различных животных тканей [2, 5, 6], а также из микробных клеток [2].

PROTEIN AND LIPID COMPONENT OF PROTEOLIPIDS FROM BRAIN DIFFERENT SUBCELLULAR STRUCTURES

MANUKYAN K. G., STEPANYAN A. A., KAZARYAN T. Y.
Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci, Yerevan

Data on subcellular localization, protein, lipid component of proteolipids (PL), isolated in the form of lipid-protein complexes free from lipid component to a different degree from total homogenate and different subcellular fractions of rat brain: myelin, synaptosomes, mitochondria (synaptic and non-synaptic), microsomes are presented. Differences in the protein and amino acid composition of myelin and mitochondrial PL are summarized. Data obtained point to the existence of at least 2 types of PL in nervous tissue—myelin and mitochondrial. The first type is characteristic for myelin and white matter, PL of mic-

rosomes is close to that type judged by the protein component. The 2nd type of PL is characteristic both for synaptic and nonsynaptic mitochondria. PL of synaptosomes shares the properties with both types of PL-s.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Folch—Pi J., Stoffyn P. J.* Ann. N. Y., Acad. Sci., v. 195, p. 86—107, 1972.
2. *Lees M. B., Sakura D. J., Sapirstein V. S., Curatolo W.* Biochim. et biophys acta, v. 559, p. 209—230, 1979.
3. *Манукян К. Г.* Нейрохимия, т. 1, с. 51—65, 1981.
4. *Schlesinger M. J.* Ann. Rev. Biochem., v. 50, p. 193—206, 1981.
5. *Fosteson M. T., Sapirstein V. S. J.* Membr. Biol., v. 63, p. 77—84, 1981.
6. *Blondin I. A.* Biochem. Biopys. Res. Communs., v. 87, p. 1087—1094, 1979.
7. *Зайцева Г. Н., Яхнин А. В.* Биохимия, т. 49, вып. 4, с. 577—584, 1984.
8. *Манукян К. Г., Асвонян К. А., Степанян А. А., Киракосян А. Г., Казарян Т. И.*— В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Буниятяна), т. 12, с. 68—80, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1977.
9. *De Robertis E., Rodrigues de Lores Arnais G.* — In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), New York —London, v. 2, p. 365, 1969.
10. *Folch J., Webster C. R., Lees M.* Feder. Proc., v. 18, part 1, p. 228, 1959.
11. *Манукян К. Г., Киракосян А. Г., Асвонян К. А.*—В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Буниятяна), т. 7, с. 140—149, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1972.
12. *Vanderkooi G., Capaldi R. A.* Ann. N. Y. Acad. Sci, v. 195, p. 135—138, 1972.
13. *Манукян К. Г., Киракосян А. Г., Асвонян К. А., Степанян А. А.*—В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Буниятяна), т. 11, с. 116—128, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
14. *Манукян К. Г., Степанян А. А.* Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Метаболизм белков центральной нервной системы», с. 89—90, Днепропетровск, 1978.
15. *Trifilieff E., Skalidis G., Helynk G., Lepage P., Sorokine O., Drosselaer A., Luu B. C. R.* Acad. Sci., Paris, t. 300, s. III, №7, p. 241—246, 1985.
16. *Chan D. S., Lees M. B.* Biochemistry, v. 13, p. 2704—2712, 1974.
17. *Казарян Т. И., Манукян К. Г.* Биол. журн. Армении, т. 34, № 5, с. 502—505, 1981.
18. *Казарян Т. И., Асвонян К. А., Манукян К. Г.* Биол. журн. Армении, т. 36, № 4, с. 322—325, 1984.
19. *Асвонян К. А., Манукян К. Г., Казарян Т. И.* Тезисы докл. IV Всесоюзн. симпозиума по биохимии липидов, с. 68, Киев 1983.

Поступила 9. IX 1986