

УДК 577.15.048

БИОХИМИЯ

Ю. Г. САНДАЛОВ, Р. Н. ГЛЕБОВ, Г. Н. КРЫЖАНОВСКИЙ,
Л. И. КРАЛЕНКОВА, Г. В. ТОЛСТИКОВА, В. И. ШВЕЦ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПИДОВ С СОКРАТИТЕЛЬНЫМ БЕЛКОМ МОЗГА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 3 VI 1975)

Предполагается, что секреция медиаторов нервными окончаниями определяется функционированием сократительного актомиозинподобного белка (АМПБ), локализованного в синаптических структурах и регулирующегося ионами Ca^{2+} , накопившимися в синаптоплазме при деполяризации пресинаптических мембран (пре-с.м.) ⁽¹⁾. Показано ⁽¹⁾, что миозиновый компонент (МПБ) контрактильного белка-комплекса может быть локализован в мембранах синаптических пузырьков, а актиновый компонент (АПБ) — в пре-с.м. Определенным доказательством участия АМПБ в секреции медиаторов являются наши данные ⁽²⁾ о торможении активности Mg-АТФазы и сокращения АМПБ мозга столбнячным токсином *in vitro*, который, как известно, действует на нервные окончания и блокирует выброс нейротрансмиттеров.

Учитывая достаточно жесткую связь компонентов АМПБ с мембранами синаптических структур, мы изучили характер взаимодействия некоторых липидов с АМПБ мозга.

Методика. АМПБ выделяли из ткани целого мозга крыс ⁽³⁾. После промывки 0,14 *M* NaCl, мозг гомогенизировали (5 мин., 0–4°) в 0,6 *M* KCl, содержащем 0,01 *M* NaHCO₃, pH 9,2 (объем: вес ткани = 4; 1). После 16 час. экстракции при 0–4° надосадочную жидкость (25 000 g, 60 мин.) разбавляли водой до 0,1 *M* KCl и проводили изоэлектрическое осаждение при pH 6,0–6,2. Осадок (15 000 g, 10 мин.) растворяли (1 час, 0–4°) в 0,6 *M* KCl, содержащем 0,05 *M* трис-HCl, pH 7,4 (среда А). После экстракции суспензию центрифугировали (15 000 g, 10 мин.), надосадочную жидкость снова разбавляли водой до 0,1 *M* KCl и выдерживали смесь в течение 1 часа. Затем вторично переосаждали АМПБ (25 000 g, 30 мин.) и растворяли в среде А, хранили при 0–4° в течение 2–3 дней. При использовании удаляли центрифугированием выпавшие при хранении нерастворимые агрегаты.

Из мозга быка выделяли фракцию суммарных липидов (СЛ) ⁽⁴⁾, цереброзиды ⁽⁵⁾, фосфатидилсерин (ФС) ⁽⁶⁾, ганглиозиды ⁽⁷⁾ и фосфатидилэтаноламин (ФЭА) ⁽⁸⁾; из яичных желтков — фосфатидилхолин (ФХ) ⁽⁸⁾. Идентификацию липидов проводили тонкослойной хроматографией, и.к. спектрами и дисперсией оптического вращения при сравнении с образцами синтетических липидов. Тонкую эмульсию липидов готовили на 0,01 *M* трис-HCl pH 7,4 и хранили при –10°. Степень агрегации (суперпреципитация) АМПБ изучали регистрацией оптической плотности (*E*) при 520 нм (2,5 мл, 20°) в среде, содержащей 1,5 мг белка; 0,02 *M* трис-HCl pH 7,4; 0,1 или 0,6 *M* KCl. После прерывания (5 мин., 20°) реакцию начинали добавлением Mg^{2+} или АТФ-Na₂ (предварительно нейтрализованного до pH 7,4). Значение *E*₅₂₀ фиксировали через 5–10 мин. после периодического перемешивания. Активность Mg-АТФазы определяли ⁽²⁾ по степени накопления в ходе реакции (20 мин., 37°) неорганического фосфата ⁽⁹⁾.

Результаты опытов и их обсуждение. Сократительные

свойства выделенного АМПБ мозга доказывали вискозиметрическим методом (рис. 1). В среде с высокой ионной силой (0,6 М КСl) при добавлении АТФ в низкой концентрации к опалесцирующему раствору АМПБ наблюдается обратимое и трехкратное изменение относительной вязкости (η) раствора. При этом за счет диссоциации геля АМПБ происходит быстрое

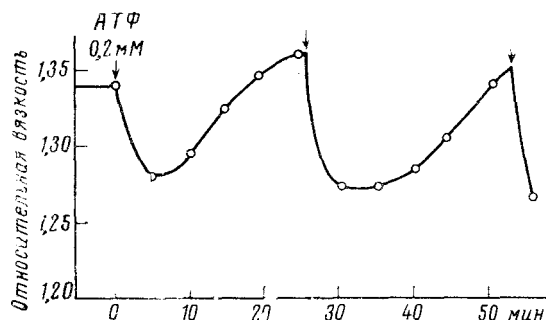


Рис. 1. Изменение относительной вязкости раствора АМПБ мозга при действии АТФ. Измерения в вискозиметре Освальда при 20° в среде А (2 мл). Нейтрализованный раствор АТФ-Na₂ добавляли по 0,01 мл (стрелки), конечная концентрация 0,2 мМ. Относительную вязкость (η) рассчитывали по отношению к скорости протекания среды А

(1—5 мин.) снижение η и затем медленное (в течение 35 мин.) восстановление η до исходного значения; вторая фаза этого процесса является стадией ассоциации АПБ и МПБ, т. е. сокращения и полимеризации АМПБ. Полученный эффект ранее был описан для АМПБ, выделенного из целого мозга (¹⁰) или из синапсоса мозга крыс (¹¹), для МПБ мозга (¹²). Нам также удалось для АМПБ вызвать явление синерезиса. Если раствор АМПБ в среде А продавливать через капилляр (шприц) в воду, то при последующем добавлении

АТФ-Na₂ и Mg²⁺ золь АМПБ в форме волокон сжимается, т. е. дегидратируется. Степень диссоциации-ассоциации АМПБ изучали нефелометрическим методом. Из рис. 2 видно, что с повышением концентрации Mg²⁺ от 0,25 до 4 мМ достоверно увеличивается (на 45 %) значение E_{520} суспензии АМПБ в среде с низкой ионной силой (0,1 М КСl) по сравнению с контрольной пробой, не содержащей Mg²⁺. Этот факт может свидетельствовать об увеличении степени агрегации АМПБ. Добавление АТФ к суспензии АМПБ приводит к значительному (до 40 % при 3—4 мМ АТФ) уменьшению E_{520} , т. е. просветлению суспензии, что можно объяснить диссоциацией АМПБ на МПБ и АПБ и частичной деполимеризацией АМПБ на мономеры. Расслабляющий эффект АТФ известен для АМПБ, выделенного из целого мозга (¹³) или из синапсосом (¹⁴), и используется для выделения АПБ мозга. Из рис. 2 также видно, что расслабляющее действие АТФ в отношении АМПБ при последующем добавлении в среду инкубации Mg²⁺ снимается. Полное снятие эффекта АТФ наблюдается при концентрациях Mg²⁺, значительно превышающих концентрацию АТФ. С другой стороны, действие ионов Mg²⁺ в отношении АМПБ, проявляющееся в увеличении E_{520} , при последующем добавлении АТФ также снимается, причем полное снятие эффекта наблюдается при соотношении Mg/АТФ=1. Из опытов следует, что варьируя условия добавления Mg²⁺ и АТФ, можно сдвигать обратимую реакцию ассоциация-диссоциация АМПБ в ту или иную сторону. Это обстоятельство позволяет предполагать, что эффект Mg²⁺, вероятно, имеет отношение как для полимеризации АМПБ, так и для образования комплексов АМПБ из АПБ и МПБ. Полученные нами данные не были ранее описаны для АМПБ мозга.

Нефелометрическим методом показано (табл. 1), что ФХ, СЛ и ганглиозиды при концентрациях 50—150 мкг на 1500 мкг белка АМПБ в пробах (2,5 мл) не влияют на изменение E_{520} в среде с низкой и высокой ионной силой. Однако ФЭА и гораздо в большей степени цереброзиды в аналогичных концентрациях и соотношении белок: липид увеличивают степень агрегации АМПБ, причем наиболее эффективно в среде с высокой ионной силой. Все исследованные липиды уменьшают в среднем на 50 % расслабляющий эффект АТФ в среде с низкой ионной силой. По-видимому, некоторые липиды обеспечивают более жесткую связь АПБ с МПБ в комп-

лексе АМПБ. Наибольший интерес в этом отношении вызывают гликолипиды — цереброзиды, поскольку известно, что АПБ нейротубулей аксоплазмы (нейротубулин) имеет гликопротеидную природу (¹⁴). Для того чтобы оценить характер взаимодействия липидов с АМПБ мозга, изучено их влияние на Mg-АТФазу препарата АМПБ. Оказалось (рис. 3), что ФХ, ФС и цереброзиды значительно тормозят активность Mg-АТФазы, причем наибольшим эффектом обладала фракция цереброзидов (50% торможения при концентрации липида

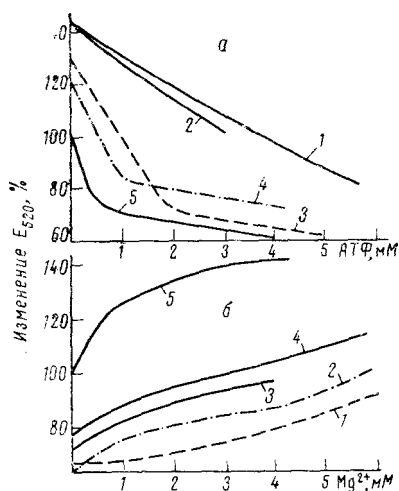


Рис. 2

Рис. 2. Влияние ионов Mg^{2+} и АТФ на агрегацию суспензии АМПБ в среде с низкой ионной силой. а — первоначальное добавление Mg^{2+} и последующее АТФ. 1 — $[Mg^{2+}] = 5$ мМ; 2 — $[Mg^{2+}] = 3$ мМ; 3 — $[Mg^{2+}] = 1$ мМ; 4 — $[Mg^{2+}] = 0,5$ мМ; 5 — $[Mg^{2+}] = 0$. б — первоначальное добавление АТФ и последующее Mg^{2+} . 1 — АТФ = 3 мМ; 2 — АТФ = 4 мМ; 3 — АТФ = 1 мМ; 4 — АТФ = 0,4 мМ; 5 — АТФ = 0. За 100% принято исходное значение $E_{520} = 0,13$ для суспензии АМПБ без АТФ и Mg^{2+} . Приведены средние значения 5—7 опытов

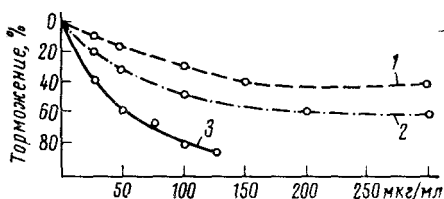


Рис. 3

Рис. 3. Влияние липидов на Mg-АТФазу АМПБ. Инкубационная среда (1 мл) содержала 5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТФ- Na_2 , 50 мМ трис-НСl pH 7,4, 250 мкг АМПБ, который при выделении суспендировали в 0,02 М трис-НСl pH 7,4. Активность Mg-АТФазы без липидов составляла 4,3 мкмол. P_i на 1 мг белка в час. 1 — ФХ, 2 — ФС, 3 — цереброзиды

Таблица 1

Влияние липидов на агрегацию АМПБ мозга

Липиды	Концентрация KCl, М	Содержание липидов, мкг на 2,5 мл	E_{520} эмульсии липида в 2,5 мл	E_{520} , %
Ганглиозиды	0,1	50	0,01	100
	0,1	150	0,02	114
	0,6	50	0,015	100
	0,6	150	0,02	100
Цереброзиды	0,1	50	0,01	121
	0,1	150	0,05	118
	0,6	50	0,005	130
	0,6	150	0,025	130
Суммарные липиды	0,1	50	0,01	107
	0,1	150	0,05	102
	0,6	50	0,015	105
	0,6	150	0,06	100
Фосфатидилэтаноламины	0,1	50	0,01	110
	0,1	150	0,03	115
	0,6	50	0,002	120
	0,6	150	0,025	130
Фосфатидилхолин	0,1	150	0,05	100
	0,6	150	0,06	100

Примечание. Пробы (2,5 мл) содержали соответствующий липид, 1500 мкг АМПБ, 20 мМ трис-НСl pH 7,4. Изменение E_{520} в % рассчитывали, измеряя E АМПБ + липид (по отношению к пробе с липидами без АМПБ) и E АМПБ без липида (по отношению к соответствующему раствору), в этом случае E АМПБ без липида в 0,1 М KCl составляет 0,13 в 0,6 М KCl 0,8. Приведены средние данные 4—5 опытов.

40 мкг/мл и содержания белка АМФБ 250 мкг/мл).

Полученные данные позволяют предположить, что лабильзация белок-липидных связей пре-с.м. при смене состояний покой — возбуждение (¹⁵) может определять характер взаимодействия актинового и миозинового компонентов в комплексе АМФБ.

Институт общей патологии и патологической
физиологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
4 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Berl, S. Puszkin, W. J. Nicklas, Science, v. 179, 441 (1973). ² Г. Н. Крыжановский, Р. Н. Глебов и др., Бюлл. эксп. биол., № 12, 24 (1974). ³ S. Puszkin, S. Berl et al., Science, v. 161, 170 (1968). ⁴ J. Folch et al., J. Biol. Chem., v. 226, 497 (1957). ⁵ T. Iamokawa, J. Biochem., v. 54, 444 (1963). ⁶ G. Royser et al., J. Am. Oil Chem. Soc., v. 42, 405 (1965). ⁷ G. Tettamanti et al., Biochim. et biophys. acta, v. 296, 160 (1973). ⁸ Ю. М. Кауров и др., В сб.: Биофизика мембран. Паланга, 1973. стр. 310. ⁹ O. H. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., v. 162, 421 (1946). ¹⁰ S. Berl, S. Puszkin, Biochemistry, v. 9, 2058 (1970). ¹¹ S. Puszkin, W. J. Niclas, S. Berl, J. Neurochem., v. 19, 1319 (1972). ¹² Б. Ф. Поглазов, Бюлл. эксп. биол., № 9, 56 (1961). ¹³ S. Puszkin, S. Berl, W. J. Nicklas, Biochim. et biophys. acta, v. 152, 396 (1972). ¹⁴ R. K. Margolis R. U. Margolis, M. L. Shelanski, Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 47, 432 (1972). ¹⁵ Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, Усп. физиол. наук, № 4 (1975).