

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОКУПРЕИНА МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

В. С. ГАСПАРОВ

Физиологическая функция нейрокупреина, одного из важнейших медьсодержащих белков мозга, точно не выяснена, однако показано, что окисленный нейрокупреин способен реагировать с адреналином с образованием адренохрома [4]. Это—кислый водорастворимый белок с изоэлектрической точкой 3,5 и одним атомом меди на молекулу белка. Молекулярный вес белка, определенный различными методами, равен 10,000. Белок, вероятно, содержит одну полипептидную цепь. Природа медьсвязывающих групп белка (т. е. окружение меди) неизвестна, однако исследованиями, проведенными методом электронного парамагнитного резонанса, установлена связь меди в белке по крайней мере с двумя азотсодержащими группами аминокислот, природа которых также неизвестна [6]. Результаты исследования скорости протонной релаксации воды раствора нейрокупреина привели к выводу о том [1], что медь расположена в участке белковой молекулы, доступном для воды, и более того, вода является одним из возможных лигандов меди.

В целях получения дополнительной информации о возможной природе других лигандов меди в белке нейрокупреин исследовался методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения.

Материал и методика. Нейрокупреин был получен из белого вещества мозга быка по методу, описанному ранее [6]. Препарат восстанавливали добавлением избытка дитионита натрия. Содержание белка определяли по методу Лоури [5], или из оптических и ЭПР спектров окисленного нейрокупреина. Для получения спектров ЯМР препараты белка лиофилизовали, затем растворяли в 98%-ном D₂O и растворы инкубировали при комнатной температуре 30—40 мин. Процедура лиофильной сушки и инкубации в D₂O была выполнена трижды, что привело почти к полному удалению обмениваемых протонов. Концентрация белка составляла 10⁻³ М, рD раствора было равно 5,0. Спектры ЯМР были получены на ЯМР-спектрометре на 360 Мгц фирмы «Брукер» (ФРГ) при 20°. Запись представляла собой накопление 1000 1,82-секундных сканирований. В качестве внутреннего стандарта использовали ДСС (2,2-диметил 2-силапентан-5 сульфидит натрия).

Результаты и обсуждение. Сравнивая спектры ЯМР окисленного и восстановленного нейрокупреина (рис.), можно прежде всего заме-

тять, что одни резонансные пики практически не изменяются при переходе от окисленного состояния к восстановленному, другие—претерпевают существенные изменения. Так, наблюдается уширение ряда линий в низкополевой области спектра у окисленного препарата по сравнению с восстановленным.

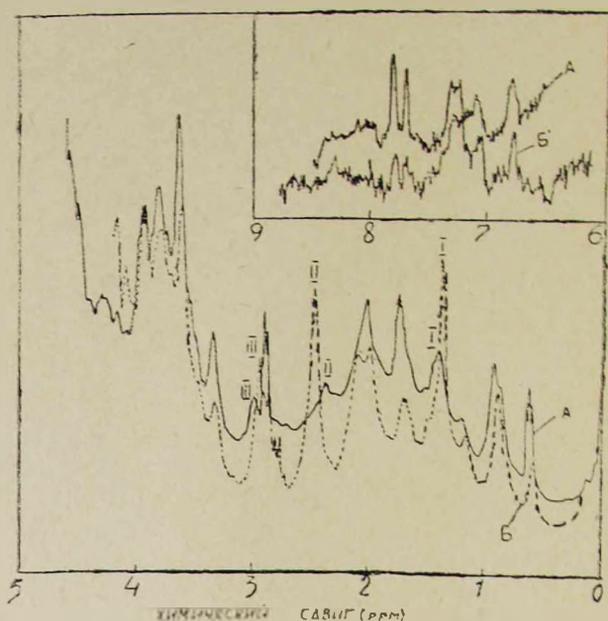


Рис. Спектры ЯМР (360 Мгц): (А) и (А') окисленного нейрокуперена соответственно в низкополевой и высокополевой областях рD 5,0; (В) и (В') восстановленного препарата рD 5,0. Концентрация окисленного препарата несколько выше восстановленного.

Заметное уменьшение интенсивности, уширение сигнала и перемещение химического сдвига в низкополевую область спектра наблюдается у глутаминна (рис., пик II). Величины химических сдвигов протонов глутамильной (пик II) CH_2 группы соответственно равны 2,38 и 2,42. Уширение линий и уменьшение интенсивности в окисленном препарате наблюдается также для протонов $\epsilon\text{-CH}_2$ группы лизина (пик III) и протонов CH_3 группы аланина. В окисленном белке, содержащем парамагнитный ион $\text{Cu}(\text{II})$, помимо основного механизма релаксации протонов [2, 3, 7], действует также механизм релаксации, обусловленный взаимодействием ядерного магнитного момента протона с парамагнитным центром, очевидно, эффективный только для протонов, находящихся достаточно близко к меди. Поэтому уширение некоторых пиков в окисленной форме свидетельствует о близости протонов данной группы к меди, и в частности, из приведенных спектров видно, что в результате восстановления меди наблюдается резкое изменение интенсивности и химического сдвига протонов CH_2 группы глутаминна. Можно полагать, что глутамин находится в непосредственной близости от меди

в белке. Что же касается лизина и аланина, то наблюдаемые изменения резонансных линий могут возникать в результате либо конформационных изменений в структуре белка, либо изменения магнитных свойств меди. Во всяком случае можно определенно считать, что восстановление белка приводит к резкому изменению подвижности лизина и аланина. Дальнейшее, более подробное изучение ЯМР спектров ней-рокупреина, особенно в зависимости от рН и наличия меди, возможно, позволит идентифицировать и другие лигандные аминокислоты меди в этом белке.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 28.11 1979 г.

**ՆԵՅՐՈՎԿՈՒՊՐԵԻՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ ԲԱՐՁՐ ԿԱՐԳԻ ԼՈՒԾՈՂՈՒԹՅԱՆ
ՄԻՋՈՒԿԱՅԻՆ ՄԱԿՆԻՍԱԿԱՆ ՌԵԶՈՆԱՆՍԻ ՄԵԹՈԴՈՎ**

Վ. Ս. ԳԱՍՊԱՐՈՎ

Հետազոտությունների ընթացքում ստացվել են բարձր կարգի լուծողու-
թյան միջուկային մագնիսական ռեզոնանսի 360 Մ հաճախականության
սպեկտրները՝ պղինձ պարունակող ուղեղի սպիտակուցներից և նեյրոկուպ-
րեինից, օքսիդացված և վերականգնված ձևերով:

Ստացված տվյալների հիման վրա առաջարկվում է սպիտակուցում պղինձի
ատրոֆին զլուտամինի հնարավոր մերձեցում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Гаспаров В. С.* ДАН АрмССР (в печати).
2. *Bloembergen N. J.* Chem. Phys., 27, 572—573, 1957.
3. *Dwek R. A.* Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Clavendon Press, Oxford, 1973.
4. *Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch.* FEBS Letters, in press.
5. *Lowry O. H., Rosebough N. I., Farr A. L., Ranadall R. J.* Biol. Chem., 19, 265, 1951.
6. *Sharoyan S. G., Shaljian A. A., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch.* Biochim Biophys. Acta, 493, 478—487, 1977.