

УДК 547.963

## РАСТВОРИМЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ МОЗГА. V. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ ИЗ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА\*

ШАРОЯН С. Г., НАЛБАНДЯН Р. М.

Из экстракта белого вещества головного мозга крупного рогатого скота выделено пять кислых медьсодержащих фракций с М 10, 18, 45, 150 и 500 кД. Три из них, относящиеся к сильно кислым белкам (М 10, 18 и 45 кД), получены в электрофоретически гомогенном состоянии. Для них определено содержание меди и зарегистрирован сигнал ЭПР. Помимо этих белков в слабо кислой фракции экстракта ткани мозга содержатся также Cu, Zn-супероксиддисмутаза (М 32 кД). В основных фракциях экстракта мозга медь не обнаруживается.

Многочисленными исследованиями установлено наличие в мозгу нескольких медьсодержащих белковых фракций [1—3], одна из которых имела крайне кислые свойства и была очищена до электрофоретически гомогенного состояния. Как оказалось, эта фракция представляет собой белок, состоящий из одной полипептидной цепи и содержащий один атом меди [3]. Подробно были изучены его магнитные свойства и реакции с катехоламинами [4, 5]. В то же время данные относительно других медьсодержащих белков мозга крайне ограничены. Изучение физико-химических свойств этих белков лимитируется отсутствием препаративных методов их получения. Основная задача исследования состояла в разработке удобного метода получения медьсодержащих белков из экстрактов мозга.

### Материалы и методы

Белки выделяли из ацетонно-эфирного порошка белого вещества мозга крупного рогатого скота, который получали по методу Шароян и соавт. [6]. В работе использовали ДЕАЕ-целлюлозу фирмы «Whatman», сефадексы G-50, G-75, G-100, G-200 и сефарозу 6B фирмы «Pharmacia», реактивы для электрофореза фирмы «Reanal», тетраэтилтиурмдисульфид (дисульфирам) фирмы «Sigma», синий декстран фирмы «Fogak». В качестве стандартных белков при гель-фильтрации применяли цитохром c из коры надпочечников, каталазу и церулоплазмин, выделенные в лаборатории физической химии белков Института биохимии

\* Первые четыре сообщения этой серии были опубликованы в сборнике «Вопросы биохимии мозга», Изд-во АН АрмССР, Ереван.

АН АрмССР, ферритин фирмы «Serva». Остальные реактивы были отечественного производства марок хч и чда.

Величину молекулярной массы белков оценивали методом гель-фильтрации. Гомогенность белковых фракций контролировали электрофорезом в 7%-ном ПААГ [7]. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [8] и по поглощению растворов при 280 нм, а меди—с помощью дисульфирама согласно методу Matsuba и соавт. [9]. Спектры поглощения белковых растворов регистрировали на спектрофотометрах «Model-26» и «Acta MIV» фирмы «Beckman». Большинство элюционных диаграмм получено с помощью проточной кюветы анализатора «Uvicord S» фирмы «LKB» с длиной оптического пути 0,25 см и фильтром при 276 нм. Спектры ЭПР в виде первой производной регистрировали в 3-мм трубках из плавленного кварца при температуре—160° на приборе «E-4» фирмы «Varian».

### Результаты и обсуждение

Для экстракции белков порошок белого вещества мозга суспендировали в 0,01 М ацетатном буфере, pH 6,0, из расчета 20 мл буфера на 1 г порошка. Суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма, гомогенат перемешивали в течение 5 ч на холоду и центрифугировали 80 мин при 6000 g. Прозрачный налосадочный раствор наносили на колонку с ДЕ-52 целлюлозой, уравновешенной 0,03 М ацетатным буфером, pH 6,0. Колонку промывали 200 мл порциями исходного и 0,05 М ацетатного буфера. Кислые белки элюировали 0,6 М буфером. Элюат диализовали против 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,5 и подвергали гель-хроматографии через колонку с сефадексом G-75 (средний) (3,5×70 см), уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Из элюционной диаграммы, приведенной на рис. 1, видно разделение белковой смеси на 3 основные фракции: высокомолекулярную (ВМ), среднемолекулярную (СМ) и низкомолекулярную (НМ). Все три фракции концентрировали отдельно на ДЕ-52 целлюлозе, белковую фракцию элюировали 0,6 М буфером. Элюаты диализовали против 0,1 М фосфатного буфера и снова подвергали гель-хроматографии: ВМ фракцию—через колонку с сефадексом G-200 (3×70 см), СМ и НМ фракции—через колонку с сефадексом G-75 (сверхтонкий) (1,8×52 см). Все колонки были уравновешены 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5. Соответствующие элюционные диаграммы приведены на рис. 2, а, в, с. Дальнейшей очистке подвергались только медьсодержащие фракции, помеченные на рис. 2 стрелками.

Для дальнейшей очистки фракции 1 (рис. 2, а) дважды применяли гель-хроматографию через колонку с сефарозой 6В, уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером. Конечная элюционная диаграмма представлена на рис. 3. Гель-фильтрация стандартных белков через те же колонки позволила оценить величину М фракции 1, равную примерно 500 кД. Описанная процедура не приводит к получению электрофоретически гомогенного препарата.

Фракцию 2 очищали вначале гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-100 (сверхтонкий), (1,8×50 см), уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером. pH 7,5. На элюционной диаграмме (рис. 4) указаны примерные величины молекулярной массы, соответствующие трем полученным фракциям. Анализ белковой фракции с M 45 кД показал, что она медь не содержит. Остальные две фракции были объединены и подвергнуты гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-200 (сверхтонкий), (1,8×52 см), уравновешенную 0,1 М KCl и 0,01 М фосфатным буфером. Как видно из элюционной диаграммы (рис. 5), выявляются две электрофоретически неомогенные медьсодержащие фракции с M 150 и 80 кД.

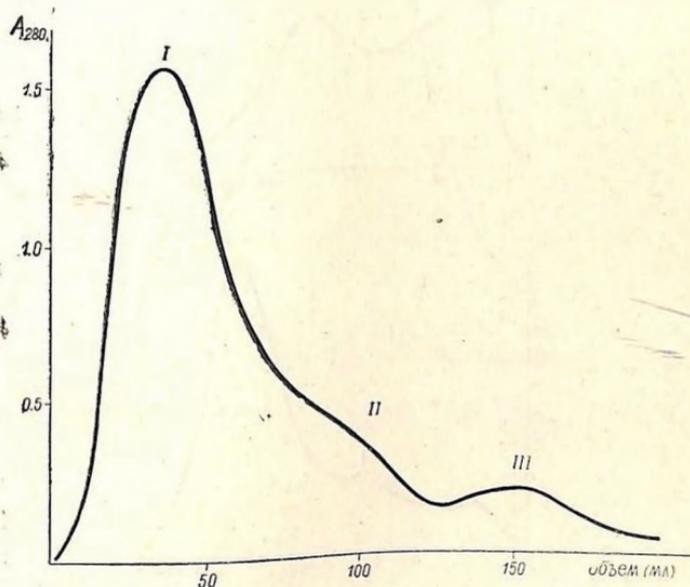


Рис. 1. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации 0,6 М элюата через сефадекс G-75 (средний). I—высокомолекулярная фракция (ВМ), II—среднемолекулярная фракция (СМ), III—низкомолекулярная фракция (НМ)

Фракции 1 и 2 содержат слабокислые белки с изоэлектрической точкой между 5 и 6, поэтому при их очистке использовали фосфатный буфер с pH 7,5. Для очистки же фракций 3, 4 и 5, как правило, применяли ацетатный буфер, pH 6,0.

Как показал анализ СМ фракции, основную часть в ней составляет описанный ранее [10] никкисодержащий белок (рис. 2, в). Дальнейшую очистку медьсодержащей фракции 3, полученной из СМ фракции, проводили с помощью гель-хроматографии через сефадекс G-75 (сверхтонкий) и ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе. Для очистки от менее кислых белков колонку с ДЕАЕ-целлюлозой промыва-

ли порциями буфера с последовательно возрастающей ионной силой вплоть до 0,15 М ацетатного буфера, рН 6,0. Многократное повторение отмеченных процедур приводило к получению электрофоретически гомогенного белка с  $M$  45 кД, который при электрофорезе движется вместе с маркером, что указывает на его сильно кислые свойства. Содержание меди в белке составляет 0,4% или 3 атома меди на молекулу белка.

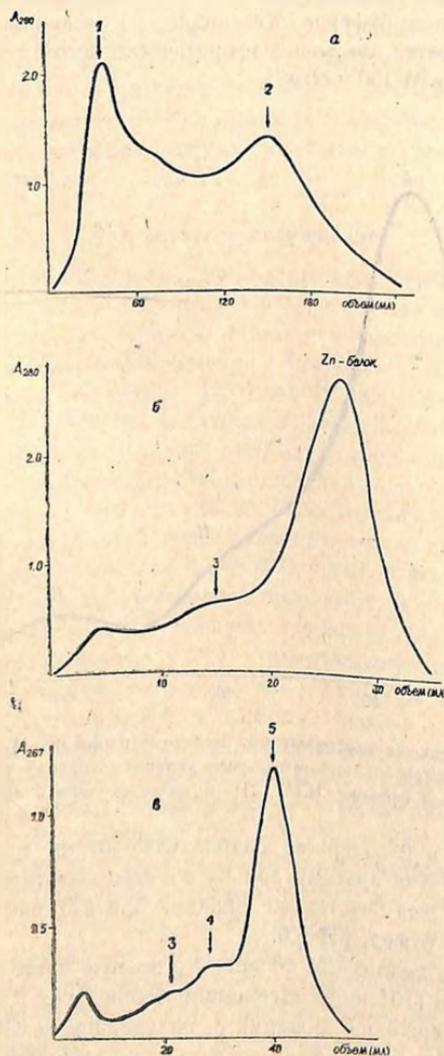


Рис. 2. Элюционные диаграммы при гель-фильтрации через сефадекс G-200 (средний) ВМ а), СМ (б) и НМ (в) фракций—через сефадекс G-75 (сверхтонкий)

Из НМ фракции получается медьсодержащая фракция (также отмеченная на рис. 2, с цифрой 3), которая по величине  $M$  и содержанию меди идентична фракции 3, выделенной из СМ фракции. Выход фракции 3 из СМ фракции (5 мг/1 кг массы сырой ткани) существенно отличается от выхода аналогичной фракции из НМ фракции (1 мг), то

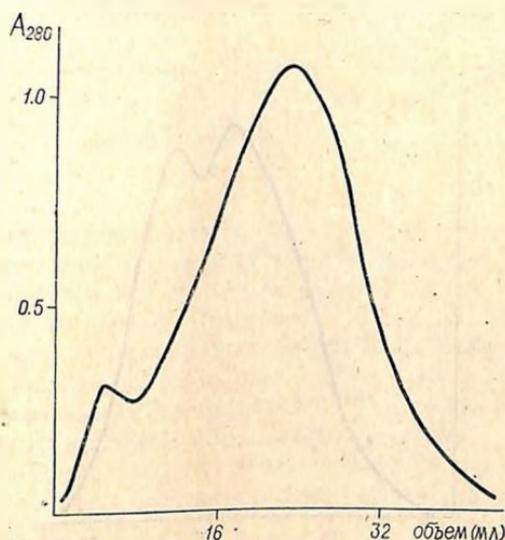


Рис. 3. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации фракции 1 через сефарозу 6В

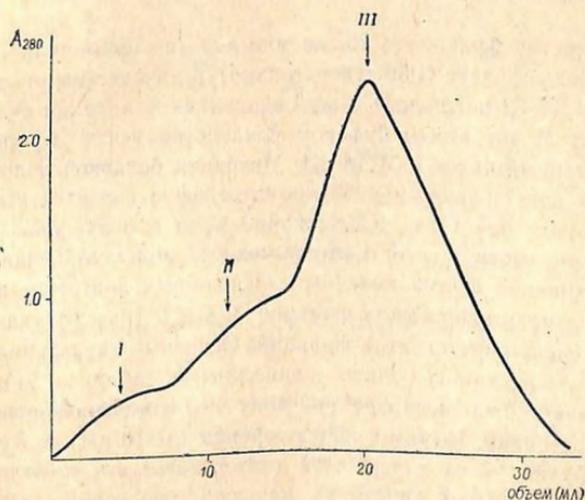


Рис. 4. Элюционная диаграмма при гель-фильтрации фракции 2 через сефадекс G-100 (сверхтонкий). I— $M > 100$  кД, II— $M = 80$  кД, III— $M = 15$  кД.

есть основная часть этого белка представлена в СМ фракции и лишь незначительная его доля в силу комплексных взаимодействий с более низкомолекулярными фракциями обнаруживается в ИМ фракции.

При очистке ИМ фракции получают три различные медьсодержащие фракции (рис. 2, с). Одна из них (фракция 5) оказалась описанным нами ранее нейрокупреном [3]—крайне кислым белком с  $M$  около 10 кД, содержащим один атом меди на молекулу.

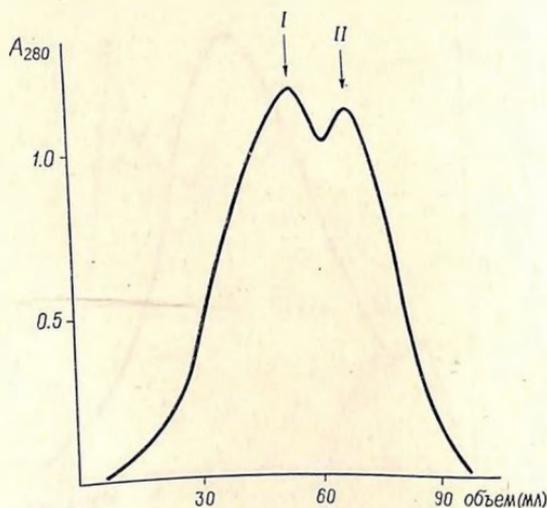


Рис. 5. Элюиционная диаграмма при гель-фильтрации фракции 2 через сефадекс G-200 (сверхтонкий). I— $M=150$  кД, II— $M=80$  кД.

Для очистки фракции 4 также многократно применяли гель-фильтрацию через сефадекс G-50 (сверхтонкий) и анионообменную хроматографию на ДЕ-52 целлюлозе. После промывания колонки с ДЕАЕ-целлюлозой 0,1 М ацетатным буфером удалось получить электрофоретически гомогенный белок с  $M$  18 кД. Миграция белковой полосы вместе с маркером при анионообменной хроматографии свидетельствует о его сильно кислых свойствах. Содержание меди в белке оказалось равным 0,4%, что соответствует 1 атому меди на молекулу белка.

Симметричная форма конечных элюиционных диаграмм и электрофореграммы медьсодержащих фракций 3, 4 и 5 (рис. 6) указывают на высокую степень очистки этих фракций. Основные характеристики описанных медьсодержащих белков приведены в таблице. Три из пяти медьсодержащих белковых фракций получены в электрофоретически гомогенном состоянии. Помимо нейрокупрена ( $M$  10 кД) в экстракте из белого вещества мозга содержатся также более высокомолекулярные медьсодержащие белки. Одним из вопросов, требующих дальнейшего изучения, является возможность образования агрегированных форм

медьсодержащих белков. Эта проблема может быть разрешена путем сравнения аминокислотных составов полученных белков.

Таблица

Характеристика пяти медьсодержащих фракций из головного мозга

Фракция	М (кД)	Электрофоретическая гомогенность	Содержание меди		Содержание белка в 1 кг сырой ткани (мг)
			%	число атомов на молекулу	
1	500	не гомоген.	не определяли		не определяли
2	150				
3	45	гомогенный	0,4	3	6
4	18		0,4	1	2
5	10		0,7	1	20

В трех электрофоретически гомогенных белках обнаружен сигнал ЭПР, принадлежащий к типу 2 [11] и свидетельствующий о том, что медь в этих белках (М 10, 18 и 45 кД) находится в двухвалентном парамагнитном состоянии. Подробное изучение физико-химических свойств этих фракций, дальнейшая очистка более высокомолекулярных фракций (М 150 и 500 кД) и их последующее исследование позволят высказать обоснованные предположения об их возможной биологической функции. В настоящее время неясно, аналогичны ли полученные нами медьсодержащие белки из мозга крупного рогатого скота медьсодержащим фракциям из печени и других тканей крысы, описанным Norton, Heaton [12].

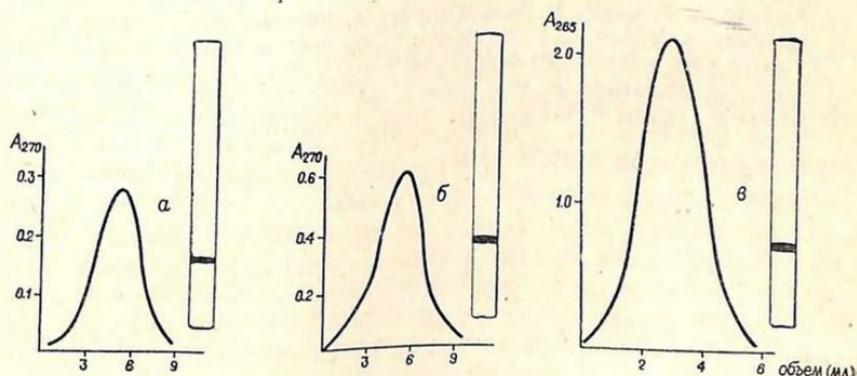


Рис. 6. Элюционные диаграммы и электрофореграммы медьсодержащих фракций 3 (а), 4 (б) и 5 (в) на последней стадии очистки

Таким образом, все полученные нами медьсодержащие белки мозга принадлежат к кислым белкам. Слабо кислые фракции, как оказалось, также содержат медьсодержащие белки, в частности фермент супероксиддисмутазу [9]. Ни одной медьсодержащей белковой фракции не было выявлено среди основных белков экстракта мозга.

# SOLUBLE METALLOPROTEINS OF BRAIN. COPPER-CONTAINING PROTEINS FROM WHITE MATTER OF BRAIN

SHAROYAN S. G., NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Five acidic copper-containing protein fractions with M 10, 18, 45, 150 and 500 kDa were purified from the extract of bovine brain white matter (the first three ones in electrophoretically homogeneous state). EPR-spectra and copper content of these fractions were assayed. Besides them there is a cuprozinc superoxide dismutase in the weakly acidic fraction. No copper was found in the basic protein fractions.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Porter H., Folch J. Arch. Neurol. Psychiatry, 77, 8-16, 1957.
2. Fushimi H., Hamison Ch., Ravin H. J. Biochem., 69, 1011-1053, 1971.
3. Sharoyan S., Shaljian A., Nalbandyan R., Buntatian H. Biochim. Biophys. Acta, 493, 478-487, 1977.
4. Шароян С. Г., Шалджян А., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 12, с. 81-91, 1977.
5. Gasparov V., Nalbandyan R., Buntatian H. FEBS Lett., 97, 37-39, 1979.
6. Шароян С. Г., Шалджян А., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван Изд-во АН АрмССР, 11, с. 105-115, 1976.
7. Davits B. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427, 1964.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
9. Matsuba Y., Takahashi Y. Anal. Biochem, 36, 182-191, 1970.
10. Шалджян А., Шароян С. Г., Налбандян Р. М., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 14, с. 5-14, 1980.
11. Malkin R., Malmstrom B. Adv. enzymol., 33, 177-244, 1970.
12. Norton D., Heaton F. Biochem. Soc. Trans., s. 425-427, 1977.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 8. 1 1983