



УДК 616-018:612.126

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ УЧАСТКА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С МЕДЬТРАНСПОРТНОЙ АТР-азой МЕНКЕСА

© 2000 г. Н. В. Цымбаленко, Н. А. Платонова, Л. В. Пучкова<sup>#</sup>, С. В. Мокшина, Л. К. Сасина,  
Н. Н. Скворцова\*, Б. С. Мищенко\*\*, Ц. А. Егоров\*\*\*, В. С. Гайцхоки

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,  
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12;

\* Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

\*\* Санкт-Петербургский государственный технический университет, Санкт-Петербург;

\*\*\* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 07.10.99 г. Принята к печати 05.04.2000 г.

Изучено взаимодействие церулоплазмина (ЦП, КФ 1.16.3.1), медьсодержащего белка плазмы крови, с двумя синтетическими пептидами P15 и P16, соответствующими по структуре нецитозольным участкам медьтранспортной АТР-азы P1-типа (АТР7А), предполагаемого продукта гена болезни Менкеса (*Atp7a*). Пентадекапептид (P15) и гексадекапептид (P16) синтезированы твердофазным методом. Они соответствуют фрагментам двух внеклеточных петель АТР7А: P16 – участку петли, которая предположительно участвует в переносе ионов меди, а P15 – не участвует. Методом белкового футпринтинга показано, что P16 связывается с фрагментом домена 6 молекулы ЦП. Кинетика связывания ЦП с P16 изучена методом аффинной хроматографии на макропористом диске с иммобилизованным P16, определена  $K_d$  ( $5 \times 10^{-6}$  М) этого взаимодействия. В работе обсуждается участие АТР7А в передаче ионов меди в непеченочные клетки.

*Ключевые слова:* церулоплазмин; АТР-аза Менкеса; транспорт меди.

### ВВЕДЕНИЕ

Основным, а возможно и единственным транспортером ионов меди по кровотоку к непеченочным клеткам у млекопитающих является церулоплазмин (ЦП, феррооксидаза, КФ 1.16.3.1), медьсодержащий гликопротеин плазмы крови [1]. На его долю приходится почти 95% меди, содержащейся в сыворотке крови. Зрелая молекула ЦП человека состоит из одной полипептидной цепи длиной 1046 а. о., в которой хорошо выражены 6 структурно-функциональных доменов [2, 3]. ЦП содержит 6 атомов меди в составе активных центров, обуславливающих ферментативные свойства этого белка. Положение атомов меди в активных центрах молекулы ЦП установлено методом рентгеноструктурного анализа. Они прочно, хотя и в разной степени, связаны с молекулой ЦП и не удаляются при обработке хе-

латирующей смолой Хелекс-100 [4]. С остатком His426 домена 3 связан седьмой атом меди [5], с доменами 4 и 6 – еще два лабильных атома меди [6]. Эти три атома меди удаляются из молекулы ЦП при обработке Хелексом-100. Часть из них теряется в процессе получения высокоочищенных препаратов ЦП. Вероятно, именно они передаются от ЦП в непеченочные клетки.

Обязательным условием передачи ионов меди через клеточную мембрану является высокоаффинное специфическое связывание ЦП с рецептором эндоцитозного типа, который локализован на клеточной поверхности [7, 8]. После интернализации пептидная часть ЦП обнаруживается в мембранных пузырьках [9], а лабильные атомы меди ЦП – в цитозольной фракции клетки [8]. При этом ионы меди поступают в клетки быстрее, чем пептидная часть ЦП. Это наблюдение указывает на существование дополнительного, помимо рецептора ЦП, участника переноса ионов меди через клеточные мембраны. Кандидатом на эту роль может быть медьтранспортная АТР-аза P1-типа (АТР7А) – предполагаемый продукт локуса болезни Менкеса (*Atp7a*).

Ген *Atp7a* идентифицирован методом позиционного клонирования; показано, что у взрослых

Сокращения: ЦП – церулоплазмин; *Atp7a* и *Atp7b* – соответственно локусы болезни Менкеса и Вильсона; АТР7А и АТР7В – белковые продукты генов *Atp7a* и *Atp7b* соответственно; P15 и P16 – пентадекапептид и гексадекапептид, соответствующие аминокислотным последовательностям (731–745) и (968–983) в АТР7А; СОКМ – система окисления, катализируемая металлом.

# Автор для переписки (тел.: (812) 234-33-56; факс: (812) 234-94-89; e-mail: ludmila@usr8.iem.ras.spb.ru).

млекопитающих он экспрессируется в непеченочных клетках, а в раннем периоде онтогенеза – и в печени [10–12]. Данные о функции белкового продукта гена *Atp7a* в метаболизме меди и о его локализации в клетке противоречивы. С одной стороны, существует мнение, что АТР7А участвует в выведении ионов меди из клетки [13]. С другой – показано [14], что мутации в генах этого типа АТР-аз приводят к дефициту меди в клетке (болезнь Менкеса). В пользу участия АТР7А в транспорте ионов меди в клетку веско свидетельствует тот факт, что новорожденные с мутацией в гене *Atp7a* (болезнь Менкеса) имеют фенотип медьдефицитного микроэлементоза [15]. С другой стороны, у здоровых новорожденных на фоне высокой экспрессии гена *Atp7a* в гепатоцитах происходит накопление меди в печени [16]. По данным иммуногистохимических исследований, АТР7А в основном локализована в мембранных пузырьках *транс*-сети аппарата Гольджи [17] и/или на плазматической мембране [18]. Сигнал доставки АТР7А из эндоплазматического ретикула в сеть аппарата Гольджи расположен в ее трансмембранных доменах 3 и 4, которые кодируются экзоном 10 гена *Atp7a* [18].

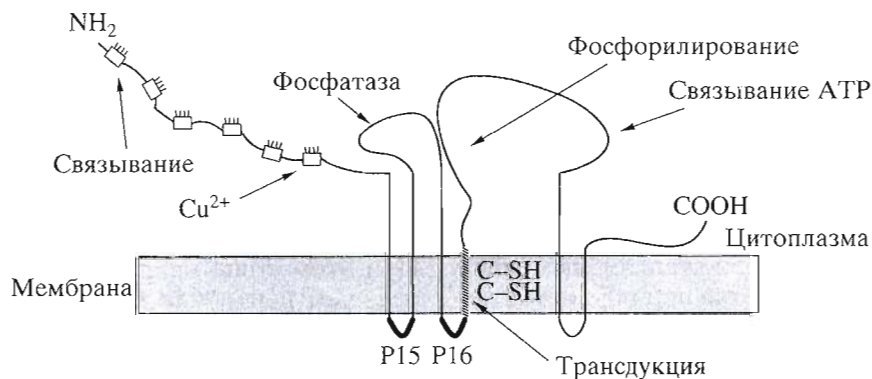
Исходя из вышеизложенного, мы предположили, что в связывании ЦП с клеточной поверхностью и переносе ионов меди кооперативно с рецептором ЦП участвует также и АТР7А. Для проверки выдвинутого предположения мы изучили взаимодействие ЦП с синтетическими пептидами, последовательности которых соответствуют фрагментам двух нецитозольных петель АТР7А, предположительно ориентированных во внеклеточное пространство.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами была использована модель АТР7А, построенная по данным анализа гидропатического профиля полипептида с аминокислотной последовательностью, установленной из нуклеотидной последовательности полноразмерной кДНК [10]. В соответствии с этой моделью (рис. 1), в связывании ЦП могут участвовать только нецитозольные участки АТР7А. Наиболее вероятным кандидатом для этого является петля, прилегающая к мембранному домену, который обогащен остатками цистеина и предположительно участвует в образовании трансдуцирующего канала. Полная петля состоит из 25 а. о. (последовательность  $^{963}\text{NFEIVETYFPGYNRSISRTEIIRF}^{987}$ ). Пептид, соответствующий центральному участку этой петли и содержащий 16 а. о. (P16:  $^{968}\text{ETYFPGYNRSISRTEI}^{983}$ ), был синтезирован твердофазным методом.

В качестве менее вероятного места связывания ЦП с АТР7А была выбрана 18-членная петля между трансмембранными доменами 1 и 2 АТР7А (последовательность  $^{728}\text{GWYFYIQAUKALKHKNTAN}^{745}$ ). Пептид, соответствующий ее С-концевому 15-членному участку (P15:  $^{731}\text{FYIQAUKALKHKNTAN}^{745}$ ), также был синтезирован твердофазным методом.

Оба пептида были испытаны на способность “защищать” молекулу ЦП от расщепления системой окисления, катализируемой металлом (СОКМ) [19, 20]. В предварительных опытах (данные не приводятся) было показано, что в использованных условиях (см. “Эксперимент. часть”) ЦП полностью расщепляется СОКМ. В присутствии P16, но не P15, сохраняется единственный пептид с  $M \approx 19\text{--}20$  кДа. При прямом секвенировании “защищенного” пептида, перенесенного на мембрану типа “Immobilon”, была установлена последовательность аминокислот



**Рис. 1.** Схема предполагаемой модели молекулы АТР7А [10]. Стрелками указаны домены, характерные для медьтранспортных АТР-аз: связывание АТР – домен, осуществляющий связывание АТР; фосфорилирование – домен, который подвергается фосфорилированию; фосфатаза – домен, обладающий АТР-азной активностью; связывание  $\text{Cu}^{2+}$  – шесть участков, содержащих консенсусную последовательность GMTCXXC, каждая из которых связывает 1 атом меди; трансдукция – трансмембранный домен, содержащий последовательность СРС, необходимую для переноса ионов меди через мембрану. Жирным выделены участки, соответствующие P15 и P16.

VFNPRRKL, которая совпадает с участком зрелого ЦП, начинающегося с остатка Val888 [2].

Использованный экспериментальный подход не позволяет установить, остается ли “защищенным” и P16, а также выявить низкомолекулярные пептиды ЦП. Поэтому в другой серии опытов реакцию расщепления комплекса ЦП–P16 СОКМ останавливали добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола до конечной концентрации 10%, что вызывало образование осадка. Осадок растворяли в 5 М гуанидингидрохлориде и анализировали методом оФВЭЖХ. Как видно из приведенной хроматограммы (рис. 2), продукты осадка представлены 9 пиками. Только в двух фракциях, которым соответствуют не полностью разделившиеся мажорные пики 6 и 7, обнаружены сходные по свойствам и близкие по молекулярной массе полипептиды. Во фракции, соответствующей пику 6, – главный полипептид с  $M$  18.6 кДа и минорный полипептид с  $M \sim 19$ –20 кДа. Пик 7 соответствует единственному полипептиду с  $M \approx 18.6$  кДа. При хроматографии супернатанта выявлен один главный пик, который по данным электрофореза соответствует полипептиду с  $M \approx 1.5$  кДа (см. рис. 2). Результаты прямого секвенирования пептида с  $M \approx 18.6$  кДа, перенесенного на мембрану, и пептида с  $M \approx 1.5$  кДа, обнаруженного в супернатанте, показали, что первый пептид на  $N$ -конце содержит последовательность FLVFDENSW, которая соответствует фрагменту зрелого ЦП, начинающегося с остатка Phe900, а второй содержит последовательность ETYFPGYN и однозначно может быть идентифицирован как P16, укороченный с  $C$ -конца не менее, чем на 3 а. о. (молекулярная масса интактного P16 соответствует 1.9 кДа). Таким образом, установлено, что при обработке смеси ЦП с P16 СОКМ не разрушенными остаются только домен 6 зрелой молекулы ЦП и P16, укороченный на 3 а. о.

Примерное мольное соотношение нерасщепленных пептидов было определено по соотношению масс пиков, вырезанных из хроматограммы, и по соотношению оптического поглощения. Соотношение оптического поглощения в суммарном пике (6 + 7) и пике, соответствующем P16, было примерно 8 : 1, а массы хроматографических пиков относились как 6.7 : 1, соответственно. Молекулярная масса P16 приблизительно в 10 раз меньше молекулярной массы домена 6, поэтому можно с осторожностью допустить, что ЦП и P16 взаимодействуют примерно в соотношении 1 : 1. Так как при хроматографировании неизбежно происходят потери, а методы, использованные для сравнительной количественной оценки “защищенных” пептидов, не являются независимыми, вывод об эквимольном взаимодействии P16 с ЦП остается предварительным.

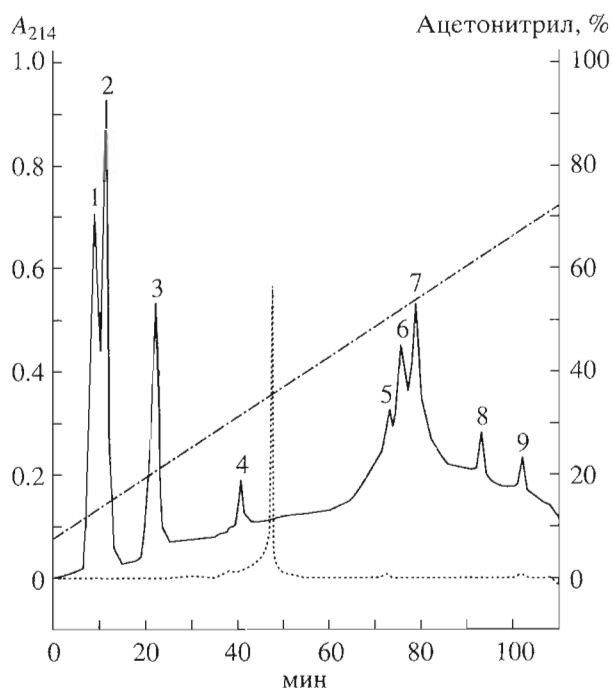
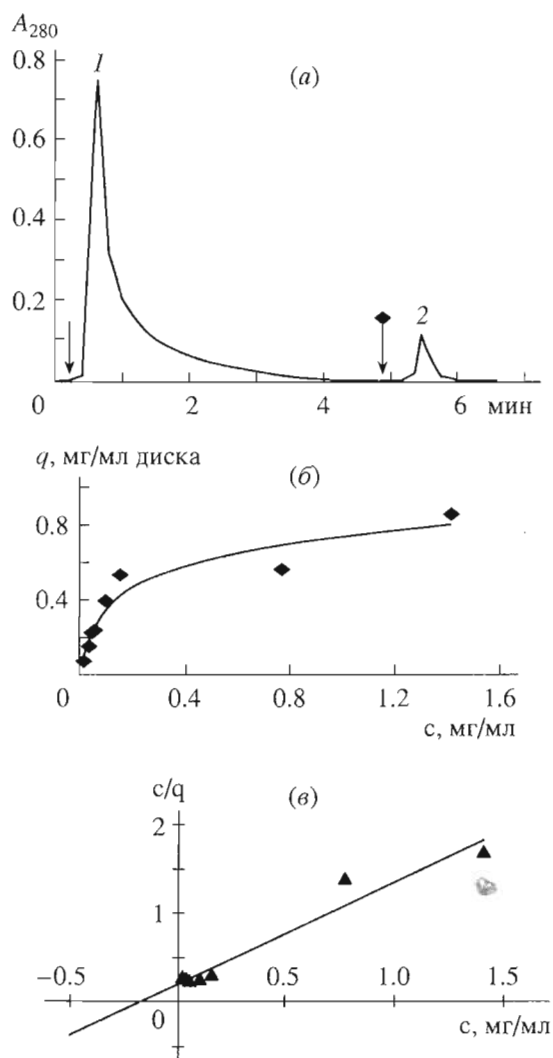


Рис. 2. оФВЭЖХ продуктов расщепления комплекса ЦП и P16 с помощью СОКМ.

Приведен профиль элюции осадка, растворенного в 5 М гуанидингидрохлориде (сплошная линия), и супернатанта (пунктирная линия); штрих-пунктирная линия – изменение концентрации ацетонитрила в элюирующем буфере.

Объяснение, каким образом пептид P16 защищает от действия СОКМ полноразмерный домен 6, возможно, заключено в пространственной организации этого домена. По данным рентгеноструктурного анализа, он является наиболее плотно упакованным участком ЦП [4]. Так как его фрагмент, включающий аминокислотную последовательность 900–945, образует выступающую петлю [4], легко доступную для действия СОКМ, но тем не менее остающуюся защищенной в присутствии P16, можно допустить, что именно с этим участком домена 6 связывается P16. Возможно, что это взаимодействие стабилизирует нативную конформацию всего домена, предотвращая его расщепление в условиях проведенных опытов.

Характер взаимодействия P16 с ЦП изучали методом хроматографии на макропористом диске монолитного типа, на который был адсорбирован P16 (см. “Эксперимент. часть”) (рис. 3а). Форма изотермы адсорбции ЦП на иммобилизованном P16 (рис. 3б) указывает на то, что процесс протекает по насыщающему типу и может быть отнесен к адсорбции типа Ленгмюра. Графическое определение  $K_d$  для взаимодействия ЦП с P16 было проведено с использованием линеаризированного уравнения Ленгмюра (рис. 3в). Получен-



**Рис. 3.** Взаимодействие ЦП с Р16, иммобилизованным на макропористом диске.

(а) Хроматография ЦП на макропористом ГМА-ЭДМА-диске с иммобилизованным Р16. Адсорбцию 0.2 мл раствора ЦП, 3.6 мг/мл, проводили в 0.01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7.0, содержащем 0.15 М NaCl. Десорбцию ЦП осуществляли 0.01 н. HCl. Скорость потока элюента при адсорбции и десорбции была постоянной (2 мл/мин). 1 – пик адсорбции (несвязавшийся ЦП), 2 – пик десорбции (связавшийся ЦП). Стрелка показывает начало адсорбции, стрелка с оперением – начало десорбции.

(б) Изотерма адсорбции ЦП на макропористом диске с иммобилизованным Р16. Концентрация адсорбируемого ЦП – от 0.02 до 1.4 мг/мл. Условия адсорбции и десорбции см. подпись к рис. 3а. По оси абсцисс: концентрация ЦП ( $c$ ), мг/мл; по оси ординат: количество ЦП, адсорбированного на ГМА-ЭДМА-диске ( $q$ ), мг/мл диска.

(в) Графическое определение  $K_d$  для взаимодействия Р16 и ЦП, выполненное с использованием линеаризованного уравнения Ленгмюра ( $q = q_m c / K_d + c$ ) в системе координат  $c/q - c$  ( $c$  – концентрация ЦП;  $q_m$  – максимальное количество ЦП, адсорбированного на ГМА-ЭДМА-диске, мг/мл диска).

ная экспериментально  $K_d$  ( $1.5 \times 10^{-6}$  М) значительно отличается от  $K_d$ , вычисленной для взаимодействия ЦП с рецептором ЦП различных клеток ( $K_d \approx 5-80 \times 10^{-9}$  М [8]), но близка к значению  $K_d$  ( $1.1 \times 10^{-6}$  М), рассчитанной для взаимодействия Р16 с антителами, полученными к конъюгату Р16 с гемоцианином [21]. В целом, данные этих опытов свидетельствуют о специфическом взаимодействии ЦП с Р16, что подтверждает результаты, полученные в экспериментах по “защите” ЦП пептидом Р16.

Известно, что после связывания ЦП с клеточной поверхностью он не теряет атомы меди, входящие в его активные центры [22]. Вероятно, что связывание ЦП с синтетическими пептидами не должно приводить к увеличению доступности этих атомов к хелатирующим агентам. Поэтому в отдельной серии опытов было изучено влияние синтетических пептидов на чувствительность атомов меди, входящих в состав ЦП, к воздействию твердого хелатирующего агента Хелекс-100. Результаты измерений показали, что обработка Хелексом-100 приводит к удалению двух атомов меди из молекулы ЦП (~7 атомов Cu/молекулу ЦП до обработки и ~5 атомов Cu/молекулу ЦП – после обработки). Предварительное связывание ЦП с Р15 или Р16 не влияет на количество атомов меди в ЦП, устойчивых к обработке Хелексом-100 (~5 атомов Cu/молекулу ЦП для Р15 и Р16 до и после обработки Хелексом-100). Экспериментально в использованном нами препарате ЦП определяется 7 атомов меди на 1 молекулу ЦП, что полностью согласуется с данными других авторов [5]. Теоретически же на 1 молекулу ЦП приходится 9 атомов меди (см. “Введение”). Такое расхождение, по-видимому, связано с тем, что в кровотоке, наряду с теоретическим ЦП, циркулируют апо-ЦП и ЦП, не содержащий лабильные атомы меди. К тому же в ходе выделения препарата ЦП теряется часть атомов меди. После обработки Хелексом-100 в препарате ЦП в среднем на молекулу ЦП приходится 5.3 атома меди (дробная величина получается из-за присутствия апо-ЦП). Эта экспериментальная величина позволяет сделать допущение, что в ЦП остается 6 атомов меди. Данные подтверждают, что специфическое взаимодействие ЦП с Р16 не влияет на сродство атомов меди, находящихся в его активных центрах. По-видимому, все 6 атомов, обуславливающих оксидазные свойства ЦП, остаются связанными с ЦП. Это наблюдение хорошо согласуется с данными, что ЦП после передачи ионов меди в клетки непеченочных органов сохраняет оксидазную активность [18]. Вероятно, при взаимодействии с Р16 конформация ЦП не нарушается.

В настоящее время в клетках различных организмов идентифицировано несколько десятков АТР-аз Р1-типа, среди которых особую группу составляют медьтранспортные АТР-азы [23].

Аминокислотные последовательности, гомологичные P15 и P16, обнаруженные в базах данных GenBank и SWISSPROT

Последовательность участка	Положение в белке	Ген	Организм
<b>Полная внеклеточная петля, содержащая P16</b>			
NFEIVET <u>Y</u> FPGYNRSISRTE <u>I</u> IRF*	963–987	<i>Atp7a</i>	<i>Homo sapiens</i>
NFEIVET <u>Y</u> FPGYNRSISRTE <u>I</u> IRF (100–100%)	954–978	<i>Atp7a</i>	<i>Mus musculus</i>
N <u>F</u> TIVET <u>Y</u> FPG <u>Y</u> <u>S</u> RSISRTE <u>I</u> IRF (92–96%)	955–979	<i>Atp7a</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
NFEIVE <u>A</u> YFPGYNRSISRTE <u>I</u> IRF (96–96%)	955–979	<i>Atp7a</i>	<i>Rat norvegicus</i>
<u>D</u> FG <u>V</u> V <u>Q</u> K <u>Y</u> F <u>P</u> N <u>P</u> N <u>K</u> H <u>I</u> S <u>Q</u> TE <u>V</u> IIRF (56–76%)	946–970	<i>Atp7b</i>	<i>Homo sapiens</i>
<u>D</u> FG <u>V</u> V <u>Q</u> K <u>Y</u> F <u>P</u> <u>S</u> <u>P</u> S <u>K</u> H <u>I</u> S <u>Q</u> TE <u>V</u> IIRF (52–76%)	948–972	<i>Atp7b</i>	<i>Mus musculus</i>
<u>D</u> FG <u>I</u> V <u>Q</u> K <u>Y</u> F <u>P</u> <u>S</u> <u>P</u> S <u>K</u> H <u>I</u> S <u>Q</u> TE <u>V</u> IIRF (56–76%)	939–963	<i>Atp7b</i>	<i>Rat norvegicus</i>
<u>D</u> FG <u>V</u> V <u>Q</u> K <u>Y</u> F <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> S <u>K</u> G <u>I</u> S <u>Q</u> A <u>E</u> V <u>V</u> L <u>R</u> F (40–72%)	925–949	<i>Atp7b</i>	<i>Ovis aries</i>
<b>P16</b>			
ET <u>Y</u> FPGYNRSISRTE <u>T</u> *	968–983	<i>Atp7a</i>	<i>Homo sapiens</i>
ET <u>Y</u> FPGYNRSISRTE <u>T</u> (100–100%)	960–975	<i>Atp7a</i>	<i>Mus musculus</i>
ET <u>Y</u> FPG <u>Y</u> <u>S</u> RSISRTE <u>T</u> (93–99%)	958–973	<i>Atp7a</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
E <u>A</u> YFPGYNRSISRTE <u>T</u> (93–93%)	960–975	<i>Atp7a</i>	<i>Rat norvegicus</i>
<b>Полная внеклеточная петля, содержащая P15</b>			
GWYFYIQAYKALKHKTAN*	728–745	<i>Atp7a</i>	<i>Homo sapiens</i>
GWYFYIQAYKALKHKTAN (100–100%)	719–736	<i>Atp7a</i>	<i>Mus musculus</i>
GWYFY <u>V</u> QAYK <u>S</u> L <u>R</u> H <u>G</u> M <u>A</u> N (72–88%)	690–707	<i>Atp7b</i>	<i>Ovis aries</i>
GW <u>P</u> FY <u>V</u> GAYKAL <u>R</u> N <u>K</u> <u>S</u> AN (96–88%)	211–228	–	<i>Bacillus subtilis</i>
G <u>R</u> YFY <u>V</u> A <u>S</u> WKA <u>K</u> H <u>G</u> N <u>A</u> N (55–77%)	476–493	–	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>P15</b>			
FYIQAYKALKHKTAN*	731–745	<i>Atp7a</i>	<i>Homo sapiens</i>
FYIQAYKALKHKTAN (100–100%)	723–737	<i>Atp7a</i>	<i>Mus musculus</i>
FYIQAYKALKHKTAN (100–100%)	721–735	<i>Atp7a</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
FYIQAYKAL <u>R</u> HKTAN (93–98%)	723–737	<i>Atp7a</i>	<i>Rat norvegicus</i>
F <u>Y</u> <u>V</u> QAYK <u>S</u> L <u>R</u> H <u>R</u> SAN (66–98%)	714–728	<i>Atp7b</i>	<i>Homo sapiens</i>
F <u>Y</u> <u>V</u> QAYK <u>S</u> L <u>R</u> H <u>R</u> SAN (66–99%)	716–730	<i>Atp7b</i>	<i>Mus musculus</i>
F <u>Y</u> <u>V</u> QAYK <u>S</u> L <u>R</u> H <u>R</u> SAN (73–98%)	707–721	<i>Atp7b</i>	<i>Rat norvegicus</i>

Замены в аминокислотной последовательности выделены курсивом и подчеркнуты, в скобках указана степень гомологии соответственно без или с учетом свойств заменяющей аминокислоты. Жирным выделен участок P16, образующий “шип”.

\* Последовательности, с которыми проведено сравнение в данном ряду.

Структура функциональных доменов (см. рис. 1) этих АТР-аз идентична у удаленных филогенетических групп. Они образуют два семейства: АТР-азы типа АТР7А (продукт локуса болезни Менкеса) и АТР-азы типа АТР7В (продукт локуса болезни Вильсона), которые при высокой структурной идентичности выполняют противоположные функции в метаболизме меди. Мутации в этих генах приводят к развитию альтернативных клинических фенотипов. При болезни Менкеса развивается дефицит меди в клетках, напротив, при болезни Вильсона медь накапливается в клетках печени и мозга [16]. Полученные нами данные позволяют считать, что фрагмент АТР7А, которому соответствует пептид P16, функционирует как место узнавания для ЦП. Если это так, то

именно последовательность P16, но не P15, должна быть специфичной для АТР7А позвоночных, то есть тех организмов, клетки которых используют ЦП в качестве источника ионов меди. Для проверки этого предположения был осуществлен поиск последовательностей, гомологичных P15 и P16, в компьютерных базах данных GenBank и SWISSPROT.

Результаты поиска представлены в таблице. Последовательности, гомологичные P15 и P16, обнаружены только в медьтранспортных АТР-азах. Участки, сходные с полными петлями между трансмембранными доменами 1 и 2, содержащей последовательность, соответствующую P15, обнаружены как в АТР-азах организмов удаленных филогенетических групп, так и в обеих медьтран-

спортных (АТР7А и АТР7В) АТР-азах млекопитающих. Последовательность, гомологичная полной нецитозольной петле между трансмембранными доменами 3 и 4, присутствует только в медьтранспортных АТР-азах млекопитающих, а центральная часть этой петли с последовательностью Р16 обнаружена лишь в АТР7А млекопитающих. Сопоставление участков, гомологичных Р16, в АТР7А и АТР7В млекопитающих одного и того же вида, убедительно показывает, что в АТР7А он консервативен, в то время как в АТР7В в нем обнаруживается более 50% замен. Таким образом, данные, приведенные в таблице, позволяют отнести участок с последовательностью Р16 к уникальным сайтам АТР7А. Это согласуется с высказанным предположением о возможном участии АТР7А в трансдукции лабильных ионов меди ЦП. Косвенно на участие внеклеточной петли, соединяющей трансмембранные домены 3 и 4, в связывании ЦП как источника ионов меди указывает присутствие в трансмембранном домене 4 последовательности  $^{1002}\text{CPC}^{1004}$ , которая обнаружена во всех АТР-азах Р1-типа, транспортирующих тяжелые металлы, и необходима для транспорта меди у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и нематоды *Caenorhabditis elegans* [24].

Последовательность аминокислот, соответствующая Р16, была подвергнута анализу по программе ВЮ+ для расчета вторичной структуры полипептидной цепи. Оказалось, что при всех способах укладки консервативный пентапептидный участок Р16,  $^{969}\text{YFPGY}^{973}$  (см. таблицу), складывается как изгиб, заданный Pro971, в котором боковые группы остатков Tyr969 и Tyr973 ориентированы таким образом, что создают на поверхности петли “шип”. Такая структура может быть подходящей для белок-белкового взаимодействия. Ранее было показано [25], что радиоактивные ионы меди, метаболически встроенные в ЦП и в составе комплекса  $\text{His}_2\text{Cu}^+$ , передаются в клетки плаценты человека, при этом ЦП успешно конкурирует с  $\text{His}_2\text{Cu}^+$  за одни и те же участки на клеточной поверхности. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют допустить, что этим участком может быть внеклеточная петля между трансмембранными доменами 3 и 4 АТР7А.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использован электрофоретически чистый препарат ЦП человека ( $A_{610}/A_{280}$  0.0045), произведенный Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера (Санкт-Петербург). Пептиды Р15 и Р16 синтезировали неавтоматическим твердофазным методом на носителе *n*-метилбензгидриламинопалистироле с использованием Вос/Vzl-стратегии и очищали методом офВЭЖХ на градиентном хроматографе модели 600 (Waters, США). Аминокислотный состав синтезиро-

ванных пептидов определяли с помощью аминокислотного анализатора “Amino Acid Analyzer T339M” (Mikrotechna, Чехия). Молекулярную массу пептидов устанавливали методом масс-спектрологии на времяпролетном масс-рефлектоне с источником ионов типа “Электроспрей” (сконструирован в Научно-исследовательском институте аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург).

**Связывание ЦП с синтетическими пептидами и обработка комплекса системой окисления, катализируемой металлом (СОКМ) (белковый футпринтинг).** 10 мкл раствора ЦП (10 мг/мл) смешивали с Р15 или с Р16 в молярных соотношениях 1 : 30, 1 : 60 и 1 : 90 и проводили инкубацию в 20 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, в течение 10 ч при 0°C. Инкубаты обрабатывали СОКМ, представляющей собой смесь равных объемов свежеприготовленных растворов (приведена конечная концентрация) 1 мМ  $\text{FeSO}_4$ , 20 мМ аскорбиновой кислоты, 2 мМ EDTA и 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в буфере MOPS, рН 7.2, в течение 10 мин при комнатной температуре [20].

В ряде опытов реакцию расщепления ЦП, вызванную СОКМ, останавливали добавлением смеси 16% SDS и 8%  $\beta$ -меркаптоэтанола в буфере для электрофореза [26]. Полученные фрагменты разделяли электрофорезом в ПААГ-SDS [26] и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (размер пор 0.45 мкм, Schleicher and Schull, США) стандартным методом полусухого электропереноса. Распределение белка в геле устанавливали путем окрашивания мембраны с помощью Ку-масси R-250. После окрашивания на мембране проявлялась единственная зона, соответствующая белку с  $M \sim 19$  кДа, только в тех пробах, в которых ЦП инкубировали с Р16. Количество “защищенного” пептида ЦП было пропорционально количеству добавленного Р16. В пробах, в которых ЦП инкубировали с Р15, СОКМ полностью расщепляла ЦП. Окрашенные зоны нитроцеллюлозной мембраны были использованы для прямого секвенирования “защищенного” пептида ЦП. *N*-Концевую аминокислотную последовательность пептидов устанавливали методом автоматического секвенирования по Эдману на пептидо-белковом секвенаторе модели 816 (Knauer, Германия), снабженном РН-аминокислотным анализатором, модель 120А (Applied Biosystems, США).

В другом ряде опытов ЦП связывали с Р16 в соотношении 1 : 60 в течение 10 ч при 0°C, затем в инкубационную смесь добавляли СОКМ. Через 10 мин реакцию расщепления останавливали добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола до конечной концентрации 10%. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин на микроцентрифуге (Beckman, США)

и растворяли в 5 М гуанидинхлориде. Растворенный осадок и супернатант анализировали методом офВЭЖХ на колонке Aquapore RP-300 размером 4.6 × 220 мм (Applied Biosystems, США) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте. Аликвоты из фракций, содержащих оптически активные продукты, подвергали электрофорезу в ступенчатом (10–16.5%) градиенте ПААГ-SDS. Электрофорез проводили в трициновой буферной системе, позволяющей разделять пептиды с молекулярной массой от 1 до 100 кДа [27]. После электрофореза пептиды переносили на мембраны типа “Immobilon” (Sigma, США), окрашивали Кумасси R-250 и секвенировали автоматическим методом по Эдману.

**Аффинная мембранная хроматография ЦП на монолитном макропористом диске с иммобилизованным P16.** P16 был иммобилизован на макропористом диске (3.0 мкмоль пептида на диск размером 25 × 2 мм<sup>2</sup>, объемом 1 мл, средний размер пор 800 нм) монолитного типа (фиксирован в специально сконструированном картридже, Saalentechnik Клауер GmbH, Германия) на основе сшитого этилендиметакрилатом глицидилметакрилата методом радикальной сополимеризации (ГМА-ЭДМА [28]). Содержание иммобилизованного P16 определяли по разнице содержания P16 в растворах до и после связывания с диском с помощью офВЭЖХ и УФ-спектроскопии. Макропористый диск с иммобилизованным P16, по данным хроматографии на нем BSA, не обладает неспецифической сорбцией [21]. Для проведения аффинной мембранной хроматографии ЦП на ГМА-ЭДМА-диске с иммобилизованным P16 использовали инструментальную систему LKB Wrotpma (Швеция), состоящую из перистальтического насоса “Microperplex 2132”, УФ-детектора “Uvicord S 2138” и самописца “1-Channel Recorder 2210”. Картридж с диском, на который иммобилизован P16, присоединяли к инструментальной системе. Через этот диск пропускали растворы ЦП различной концентрации в 0.01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl. Диск промывали этим же буфером, десорбцию ЦП осуществляли 0.01 н. HCl. Чтобы убедиться, что P16 в течение всего эксперимента оставался полностью иммобилизованным на диске, после проведения опыта определяли содержание P16, оставшегося на диске, методами офВЭЖХ и УФ-спектроскопии [21]. Процесс хроматографии фиксировался с помощью самописца, полученные результаты обрабатывали графическим методом. Константу диссоциации рассчитывали по линеаризованному уравнению Ленгмюра.

**Влияние P16 на прочность связывания атомов меди с ЦП.** Смесь 100 мкг ЦП с P16 или P15, взятых в молярных соотношениях 1 : 60, инкубировали в 20 mM калий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, в течение 10 ч при 0°C

с постоянным встряхиванием, затем в смесь добавляли примерно 100 мкг сухого Хелекса-100 (емкость ~ 0.33 ммоль Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/мл взвеси смолы, BioRad, Швеция). Хелекс-100 удаляли центрифугированием и в пробах измеряли концентрацию меди. Опыт повторяли трижды. Отклонения значений, полученных в разных опытах, составляли менее 3%. Концентрацию меди измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и зеэмановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре модели 4100ZL Perkin–Elmer (США).

Для расчета вторичной структуры и поиска гомологичных аминокислотных последовательностей использовали соответственно программу BIO+ и базы данных GenBank и SWISSPROT ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Авторы благодарят сотрудников Института высокомолекулярных соединений РАН Т.Б. Тенникову и Г.А. Платонову, выполнивших эксперименты по определению  $K_d$  для взаимодействия ЦП с P16. Работа поддержана грантом РФФИ № 98-04-49790, программой “Геном человека” (грант № 74-99), межвузовской научной программой “Университеты России – фундаментальные исследования” (№ 1316), грантом Совета поддержки ведущих научных школ России (№ 96-15-97742), ФЦП “Интеграция” (АО137).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Linder M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N. // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 67. P. 965S–971S.
2. Takahashi N., Ortel T.L., Putnam F.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 390–394.
3. Messerschmidt A., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 187. P. 341–352.
4. Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. // J. Biol. Inorg. Chem. 1996. V. 1. P. 15–23.
5. Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Lindley P.F., Fox P.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 11546–11551.
6. Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. // MEDLINE: Pubmed (MMDB Id: 5142 PDB Id: 1KCW).
7. Пучкова Л.В., Сасина Л.К., Алейникова Т.Д., Захарова Е.Т., Гайцхоки В.С. // Биохимия: 1997. Т. 62. С. 817–825.
8. Harris E.D. // Society Exp. Biol. Medicine. 1991. V. 28. P. 130–140.
9. Сасина Л.К., Пучкова Л.В., Гайцхоки В.С. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1377–1384.
10. Vulpe C., Levinson B., Whitney S., Packman S., Gitscher J. // Nature Genetics. 1993. V. 3. P. 7–13.
11. Mercer J.F.B., Livingston J., Hall B., Paynter J.A. // Nature Genetics. 1993. V. 3. P. 20–25.

12. Chelly J., Tumer Z., Tonnesen T., Petterson A., Ishikawa-Brush Y. // *Nature Genetics*. 1993. V. 3. P. 14–19.
13. Camakaris J., Petris M.J., Bailey L., Shen P., Lockhart P., Glover T.W., Barcroft C., Patton J., Mercer J.F. // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. P. 2117–2123.
14. Phung L.T., Ajlani G., Haselkorn R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 9651–9654.
15. Danks D.M., Campbell P.E., Stevens B.J., Mayne V., Cartwright P. // *Pediatrics*. 1972. V. 50. P. 188–201.
16. Bull P.C., Cox D.W. // *Trends in Genetics*. 1994. V. 10. P. 246–252.
17. Yamaguchi Y., Heiny M.E., Suzuki M., Gitlin J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 14030–14035.
18. Francis M.J., Jones E.E., Levy E.R., Ponnambalam S., Chelly J., Monaco A. // *Hum. Mol. Genet.* 1998. V. 7. P. 1245–1252.
19. Deans R.G., Fu S., Stocker R., Davies M.J. // *Biochem. J.* 1997. V. 324. P. 1–18.
20. Heyduk E., Heyduk T. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 9643–9650.
21. Verbina I.A., Puchkova L.V., Gaitskhoki V.S., Neifakh S.A. // *FEBS Lett.* 1992. V. 298. P. 105–109.
22. Platonova G.A., Pankova G.A., Il'ina I.Ye., Tennikova T.B. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 852. P. 129–140.
23. Lutsenko S., Kaplan J.H. // *Biochemistry*. 1995. V. 5. P. 15607–15613.
24. Yoshimizu T., Omote H., Wakabayashi T., Sambongi Y., Futai M. // *BioSci. Biotechnol. Biochem.* 1998. V. 62. P. 1258–1260.
25. Hilton M., Spenser D.C., Ross P., Ramsey A., McArdele H.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 245. P. 153–160.
26. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Schagger H., von Jagow G. // *Analyt. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
28. Tennikova T.B., Svec F. // *J. Chromatogr.* 1993. V. 646. P. 279–281.

## The Identification of the Ceruloplasmin Region Interacting with the Copper Transferring Menkes ATPase

N. V. Tsybalenko\*, N. A. Platonova\*, L. V. Puchkova\*\*, S. V. Mokshina\*, L. K. Sasina\*, N. N. Skvortsova\*\*, B. S. Mishchenko\*\*\*, Ts. A. Egorov\*\*\*\*, and V. S. Gaitskhoki\*†

\*Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

\*\*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 119004 Russia

\*\*\*St. Petersburg State Technical University, St. Petersburg, Russia

\*\*\*\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The interaction was studied of ceruloplasmin (Cp, EC 1.16.3.1), a copper-containing plasma protein, with two synthetic peptides P15 and P16 whose structures correlate with those of the noncytosolic regions of the copper transfer P1 type ATPase (ATP7A), apparently encoded by the Menkes disease gene (*Atp7a*). Pentadecapeptide P15 and hexadecapeptide P16 were synthesized using the solid phase method. They correspond to fragments of two extracellular loops ATP7A, of which one loop is apparently involved in the copper ion transfer (P16) whereas the other is not (P15). The protein footprinting showed that P16 binds to a fragment of the ceruloplasmin domain 6. Kinetics of the ceruloplasmin–P16 binding was studied by affinity chromatography on P16 immobilized on a macroporous disk, and the  $K_d$  value ( $1.5 \times 10^{-6}$  M) of this interaction was determined. The ATP7A involvement in the copper ion transfer to nonhepatocyte cells is discussed.

*Key words:* ceruloplasmin, Menkes ATPase, copper transport

† To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 234-3356; fax: +7 (812) 234-9489; e-mail: ludmila@usr8.iem.ras.spb.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.