



УДК 577.158.1:547.963.4+543.422:

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДНЫХ ХРОМОФОРОВ
АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА

Мошков К. А., Яковлев А. С.

*Институт экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР,
Ленинград*

Маслов В. Г.

Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова, Ленинград

Облучение растворов церулоплазмينا человека видимым и ближним ультрафиолетовым светом вызывает обесцвечивание медных хромофоров, восстановление ионов Cu^{2+} , уменьшение оксидазной активности, специфическую фрагментацию полипептидной цепи и ее ковалентное сшивание. Характер этих процессов в сильной степени зависит от присутствия O_2 и от температуры, при которой производилось облучение: 77 или 285 К. Аэробная инкубация растворов церулоплазмينا, предварительно обесцвеченного в анаэробных условиях, приводит к регенерации главной полосы поглощения медных хромофоров при 610 нм на 90% и к реактивации белка на 35%. В процессе облучения при 77 К возникают свободные радикалы, один из которых по параметрам спектра ЭПР соответствует радикалу CN_2 . При размораживании облученных растворов эти радикалы исчезают, причем с различной скоростью. Облучение растворов апоцерулоплазмينا не приводит к каким-либо фотохимическим процессам. Фотоиндуцированное образование радикалов CN_2 можно объяснить, предположив, что одним из лигандов иона Cu^{2+} в медьсодержащем центре первого типа является остаток метионина. Такое предположение свидетельствует в пользу структурной гомологии этих центров в церулоплазмине, растительном пластоцианине и бактериальном азурине.

Медьгликопротеид α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови — церулоплазмин (КФ 1.16.3.1) осуществляет межорганный транспорт меди, окисляет ионы Fe^{2+} до Fe^{3+} , которые в таком состоянии встраиваются в апотрансферрин, и является одним из регуляторов уровня биогенных аминов в организме [1, 2]. Актуальность исследования строения церулоплазмينا вызвана тем, что при тяжелом наследственном заболевании человека — гепатолентикулярной дегенерации наблюдаются мутационные изменения этого белка [2]. В препаратах очищенного церулоплазмينا, выделенных от больных, было обнаружено изменение первичной структуры по данным анализа пептидных карт, снижение удельной оксидазной активности [3], а также искажение формы спектра дисперсии оптической активности в полосах поглощения медных хромофоров активных центров [4]. Кроме того, установлено подавление биосинтеза церулоплазмينا в полирибосомах из печени гомозиготов по его мутантному гену [5].

Молекула церулоплазмينا представляет собой единую полипептидную цепь с M 130 000. В процессе выделения и при хранении она подвергается спонтанной протеолитической фрагментации по наиболее доступным пеп-

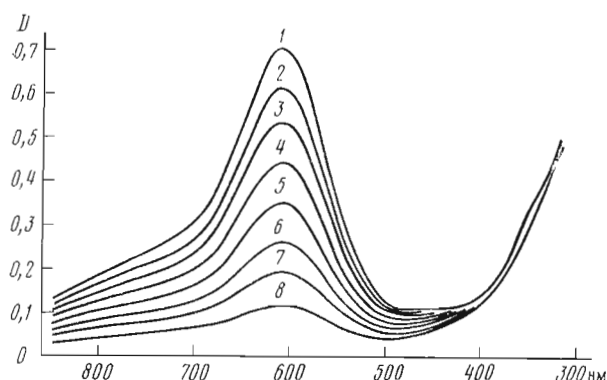


Рис. 1. Изменения спектра поглощения церулоплазмينا в процессе облучения в аэробных условиях при 285 К: 1 — исходный спектр; 2–8 — спектры, снятые после облучения в течение 14, 25, 45, 66, 94, 131 и 221 мин

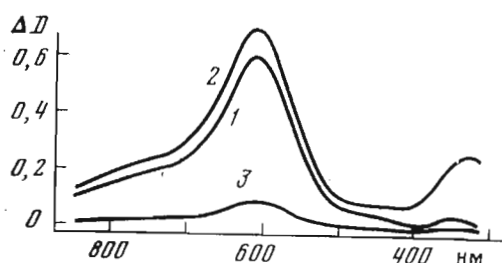


Рис. 2. Разностные спектры поглощения церулоплазмينا (исходный минус облученный при 285 К): 1 — после облучения в течение 221 мин в аэробных условиях; 2 — после облучения в течение 101 мин в анаэробных условиях; 3 — после облучения в течение 101 мин в анаэробных условиях и аэробной инкубации в течение 2 ч

тидным связям с образованием шести полипептидов с M 16 000—18 000 и 21 500—23 000, причем электрономикроскопически в глобуле церулоплазмينا выявлено шесть симметрично расположенных доменов [6]. Комплексы ионов Cu в молекуле белка, общее количество которых оценивается равным 6—7 г·атом/моль [7], различаются по спектральным свойствам. Два комплекса первого типа (так называемые синие ионы Cu^{2+}), реокисляемые с различной скоростью, характеризуются интенсивными полосами поглощения в видимой части спектра и сверхтонкой структурой спектра ЭПР с аномально низкой константой расщепления по сравнению с низкомолекулярными комплексами Cu^{2+} . Комплекс второго типа (так называемый не синий ион Cu^{2+}) по параметрам спектров поглощения и ЭПР сходен с простыми тетрагональными комплексами Cu^{2+} . К третьему типу комплексов относится одна или две пары ионов Cu^{2+} со взаимно скомпенсированными спинами, не дающие вклада в спектр ЭПР и обуславливающие полосу поглощения при 320 нм [8—10]. Приведенная стехиометрия ионов Cu в церулоплазмине не является окончательно установленной [7].

Методами фотоокисления в присутствии фотосенсибилизатора метиленового синего, химической модификации путем йодирования и резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния было установлено, что среди лигандов ионов Cu активных центров церулоплазмينا имеются атомы азота имидазольных групп остатков гистидина и атомы серы остатков цистеина [11—13], а в непосредственном контакте с остатками гистидина, ответственными за каталитическую активность белка, находятся остатки триптофана [14]. Сопоставление этих данных с результатами исследования

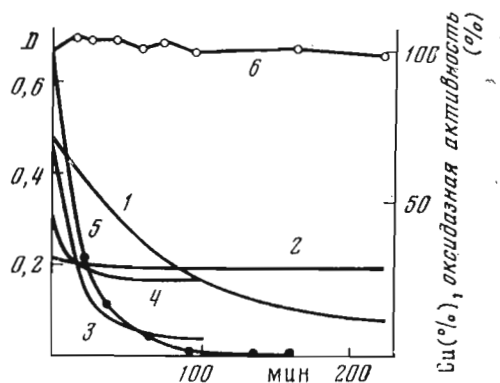


Рис. 3. Кинетика изменения интенсивности поглощения церулоплазмينا при 610 (1) и 355 нм (2) при облучении в аэробных условиях, интенсивности поглощения при 610 (3) и 320 нм (4) при облучении в анаэробных условиях, оксидантной активности (5) и содержания меди (6) при облучении в аэробных условиях

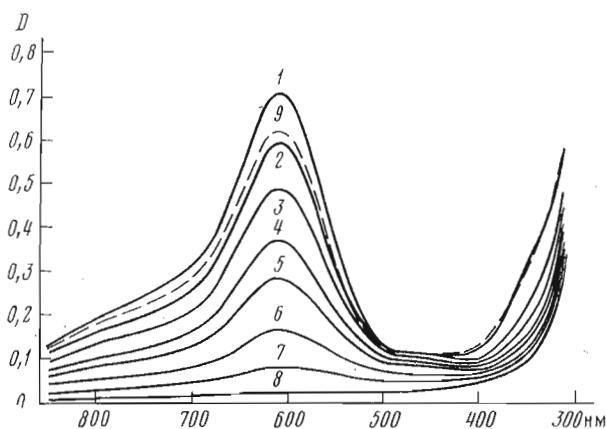


Рис. 4. Изменения спектра поглощения церулоплазмينا в процессе облучения в анаэробных условиях при 285 К: 1 — исходный спектр; 2—8 — спектры, снятые после облучения в течение 3, 9, 13, 17, 26, 44 и 101 мин; 9 — спектр церулоплазмينا, облученного в течение 101 мин, после 2 ч аэробной инкубации

сравнительно простых по своей организации медьпротеидов — азурина и стеллацианина, молекулы которых содержат только по одному «синему» иону Cu^{2+} , навело нас на мысль о возможной структурной общности активных центров церулоплазмينا и этих белков [14].

В настоящей работе продолжены исследования строения активных центров церулоплазмينا из плазмы крови человека. При этом использовали новый подход, заключающийся в анализе тех фотохимических изменений белка, которые возникают в результате поглощения медными хромофорами активных центров церулоплазмينا квантов видимого и ближнего ультрафиолетового света.

Облучение этим светом раствора белка в 0,04 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5, при 285 К в аэробных условиях приводит к уменьшению интенсивности полос поглощения медных хромофоров белка (рис. 1), причем в разностном спектре поглощения церулоплазмينا (исходный минус облученный) можно видеть два максимума при 610 и 355 нм (рис. 2, 1). Судя по разложению спектра поглощения церулоплазмينا на составляющие [10], эти максимумы соответствуют двум полосам поглощения медных

хромофоров первого типа. На рис. 3, 1, 2 приведена кинетика выцветания полос при 610 и 355 нм. В процессе облучения оксидазная активность падает до нуля (рис. 3, 5), а содержание меди в церулоплазмине (рис. 3, 6) и удельное поглощение при 280 нм остаются практически без изменений. После инкубации обесцвеченного раствора белка вплоть до 3—4 сут при комнатной температуре и доступе воздуха степень регенерации оксидазной активности не превышает 5—10%. Выцветание медных хромофоров первого типа в аэробных условиях является необратимым; небольшая регенерация синей окраски белкового раствора, наблюдающаяся после прекращения облучения при малых суммарных дозах, быстро уменьшается по мере выцветания.

Спектры поглощения церулоплазмينا, представленные на рис. 4, показывают, что выцветание медных хромофоров происходит и в анаэробных условиях. Это соответствует развиваемому в работе [15] представлению о том, что выцветание обусловлено процессами фотовосстановления ионов Cu^{2+} . Однако в противоположность этой работе из наших данных следует, что в анаэробных условиях выцветание полосы при 610 нм идет быстрее, чем в присутствии O_2 (рис. 3, 1, 3). Это различие можно объяснить тем, что в анаэробных условиях не имеет места реокисление ионов Cu^+ , которое приводило бы к регенерации поглощения медных хромофоров во время облучения. Впуск воздуха в кювету с раствором церулоплазмينا, облученным в анаэробных условиях, приводит через некоторое время, зависящее от интенсивности аэрации раствора (1—3 ч в наших условиях), к регенерации полосы поглощения при 610 нм на $90 \pm 5\%$ и к реактивации белка на $35 \pm 5\%$ (рис. 2, 3 и рис. 4, 9).

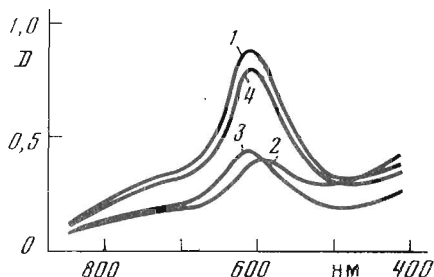
В ближнем ультрафиолете спектральные изменения церулоплазмينا при облучении в аэробных и анаэробных условиях имеют различный характер (рис. 2, 1, 2). В анаэробных условиях происходит выцветание как хромофоров первого типа с максимумом в коротковолновой области при 355 нм, так и хромофоров третьего типа, характеризующихся, по данным работы [10], полосой поглощения при 320 нм. Вследствие выцветания этих хромофоров результирующий максимум в разностном спектре находится при 325 нм (рис. 2, 2). После впуска воздуха в кювету с анаэробно облученным церулоплазмином наблюдается регенерация полосы поглощения при 320 нм на $100 \pm 2\%$ (рис. 2, 3 и рис. 4, 9).

Приведенные результаты показывают, что при аэробном облучении полоса при 355 нм хромофоров первого типа выцветает необратимо, а хромофоры третьего типа, которые, как известно, непосредственно взаимодействуют с O_2 [8], способны под действием O_2 к обратимому переходу из фотовосстановленного в окисленное состояние, что сопровождается полной регенерацией полосы поглощения при 320 нм. Нельзя, впрочем, исключить возможность того, что O_2 не только окисляет восстановленную форму хромофоров третьего типа, но и служит ингибитором процесса их фотовосстановления. Следует отметить, что обнаружение в диапазоне 300—400 нм по крайней мере двух полос поглощения с существенно различными фотохимическими свойствами, которые, следовательно, относятся к хромоформным центрам различной природы, противоречит выводу Фримана и Даниеля [16] о том, что спектр поглощения медных хромофоров церулоплазмينا содержит в этом диапазоне лишь одну полосу при 323 нм, обусловленную хромофорами третьего типа.

Для получения более подробной информации о механизме фотохимического обесцвечивания медных хромофоров церулоплазмينا, в частности для выяснения роли диффузионных процессов, было предпринято исследование его фотопревращений в замороженных растворах (0,04 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,5; 66% глицерина) при температуре 77 К. Из рис. 5, 1, 2 видно, что облучение замороженных растворов церулоплазмينا при этой температуре в аэробных условиях приводит, как и в случае жидких растворов, к уменьшению интенсивности полосы поглощения при

610 нм. Вместе с тем фотореакция при 77 К имеет ряд особенностей. Во-первых, обесцвечивание происходит со значительно меньшей скоростью, чем в жидких растворах. Во-вторых, степень выцветания хромофоров первого типа с полосой при 610 нм существенно меньше, чем в жидких растворах: даже после очень длительных экспозиций интенсивность этой полосы все еще составляет 25–30% от исходной величины. При этом максимум полосы в процессе облучения смещается от 610 до 594 нм (рис. 5, 1, 2). В-третьих, по мере облучения появляется новое бесструктурное поглоще-

Рис. 5. Спектры поглощения замороженных растворов церулоплазмينا при 77 К: 1 — спектр раствора до облучения; 2 — спектр после 10 мин облучения светом в области 320–400 нм в анаэробных условиях; 3 — спектр того же раствора после нагревания до 293 К в анаэробных условиях и последующего замораживания; 4 — спектр того же раствора после размораживания, аэробной инкубации в течение 6 ч и последующего замораживания



ние в виде очень широкой полосы, простирающейся от 320–350 до 600–700 нм (рис. 5, 2). Если облучение производить в анаэробных условиях, то размораживание раствора без выпуска воздуха в кювету приводит к исчезновению новой широкой полосы и к сдвигу остаточной полосы до ее обычного положения при 610 нм без существенного изменения интенсивности (рис. 5, 3). После выпуска воздуха в кювету полоса при 610 нм регенерирует более чем на 90% (рис. 5, 4). Размораживание облученного в аэробных условиях раствора церулоплазмينا также приводит к регенерации полосы при 610 нм примерно на 90%, однако стадии ее сдвига до обычного положения и увеличения интенсивности поглощения уже не могли быть четко разделены.

Поведение полосы поглощения при 610 нм в процессе размораживания в анаэробных условиях не позволяет объяснить ее сдвиг в коротковолновую область спектральной неоднородностью поглощающих центров и избирательным фотопревращением центров, ответственных за длинноволновую компоненту этой полосы. Этот сдвиг также не может быть объяснен простым наложением новой широкой полосы поглощения, о которой говорилось выше. По-видимому, смещение и выцветание являются различными по характеру результатами фотопревращения центров: смещение в отличие от выцветания полностью обратимо и не требует O_2 для регенерации.

Чтобы проследить за изменениями парамагнитных медных хромофоров при облучении и выявить возможные промежуточные радикальные продукты фотореакции, нами было предпринято исследование спектров ЭПР растворов церулоплазмينا при 77 К. Было обнаружено, что по мере облучения происходит уменьшение сигнала медных хромофоров (рис. 6, 1, 2). Кроме того, появляется новый сигнал, состоящий из четырех основных компонент (рис. 6, 2, 3). Подобные изменения в спектрах ЭПР наблюдались в работе [17], в которой установлено, что облучение вызывает уменьшение сигнала ЭПР только хромофоров первого типа. Вид появляющегося при облучении сигнала ЭПР позволил нам предположить, что он обусловлен более чем одним парамагнитным продуктом. Это предположение удалось подтвердить следующими экспериментами. Если образец после облучения подвергнуть нагреванию до 163 К в течение 1 мин, то сигнал уменьшается по интенсивности и изменяется по форме (рис. 6, 4). Разность между кривыми 4 и 3 на рис. 6, соответствующая той компоненте сигнала ЭПР, которая исчезает при нагревании образца до 163 К, имеет вид квартета с соотношением интенсивностей, близким к 1:3:3:1, и расщеплением около 22 Гс (сигнал I), т. е. по параметрам соответствует ме-

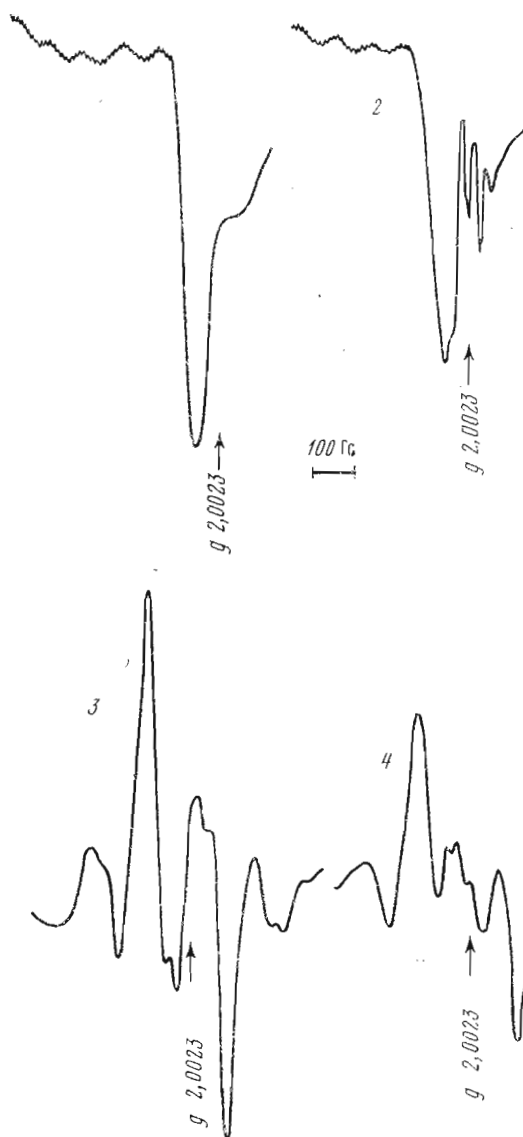


Рис. 6. Спектры ЭПР замороженных растворов церулоплазмينا при 77 К: 1 – спектр раствора до облучения; 2 – спектр после 2 мин облучения светом в области 320–400 нм; 3 – новый сигнал ЭПР, возникающий после 20 мин облучения светом в области 320–400 нм; 4 – спектр того же раствора после нагревания до 163 К в течение 1 мин и последующего охлаждения до 77 К (сигнал II); 5 – разность между кривыми 4 и 3 (сигнал I)

тельному радикалу (рис. 6, 5). Сигнал, остающийся после нагревания образца до 163 К (сигнал II), имеет более сложный вид (рис. 6, 4). При нагревании образца до 173 К он исчезает в течение нескольких минут. Не исключено, что и он обязан более чем одному парамагнитному продукту, хотя четких доказательств этого нам пока получить не удалось.

Приведенные на рис. 6, 3–5 спектры ЭПР имеют сходство со спектрами, наблюдавшимися при облучении полипропилена ультрафиолетовым светом при 77 К [18]. Последние, как было показано, являются наложением двух сигналов: квартета от метильного радикала, исчезающего после выдерживания образца в течение 2 сут при 77 К, и более устойчивого сигнала, напоминающего описанный нами выше сигнал II. Однозначная интерпретация этого сигнала пока отсутствует [18].

Нами было обнаружено, что соотношение между сигналами I и II изменяется в процессе облучения образца. В первые моменты облучения вклад сигнала I превышает 50%. При более длительных экспозициях по мере увеличения общей интенсивности радикального сигнала ЭПР относительный вклад сигнала I уменьшается. Не исключено, что это обстоятельство помешало авторам работы [17], в которой применялись очень длительные

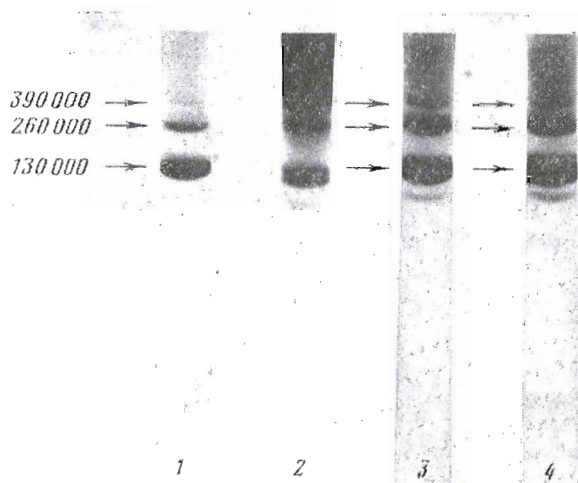


Рис. 7. Электрофорез образцов церулоплазмينا в градиентном (3–30%) полиакриламидном геле: 1 — образец белка до облучения; 2 — облученный в аэробных условиях при 285 К; 3 — облученный в анаэробных условиях при 285 К; 4 — облученный в аэробных условиях при 77 К. Оксидазоположительные зоны отмечены стрелками; указаны значения молекулярных весов белковых зон

экспозиции, выявить сигнал I как принадлежащий отдельному парамагнитному продукту.

Размораживание раствора церулоплазмينا на воздухе приводит к постепенной регенерации исходного спектра ЭПР, обусловленного медными хромофорами. Если этот образец снова подвергнуть облучению при 77 К, то, как и при облучении исходного образца, наблюдается уменьшение сигналов медных хромофоров и появление нового сигнала ЭПР. Последний, однако, даже при малых экспозициях практически не содержит сигнала I, т. е. представляет собой только сигнал II.

Какие изменения претерпевает макромолекула церулоплазмينا во время облучения? В опытах по скоростной седиментации в аналитической ультрацентрифуге было замечено, что в растворе белка, облученного в аэробных условиях при 285 К, помимо 7S-компоненты, представляющей собой нативный белок, имеется дополнительная гетерогенная компонента с коэффициентом седиментации около 16S явно агрегационного происхождения. Для более детальной характеристики индуцированной светом агрегации белка мы применили метод электрофореза в градиентном полиакриламидном геле. Из электрофореграммы (рис. 7, 1) видно, что нативный церулоплазмин разделяется на три оксидазоположительные зоны, главная из которых соответствует M 130 000, а минорные — 260 000 и 390 000. Минорные зоны представляют собой, очевидно, небольшую примесь димерных и тримерных агрегатов белка. Присутствие минорной димерной фракции в растворах церулоплазмينا было обнаружено нами ранее методом малоуглового рентгеновского рассеяния [19]. Для белка, облученного в аэробных условиях при 285 К (рис. 7, 2), характерно появление интенсивных зон, которые по величинам молекулярного веса соответствуют димерам, тримерам и более высокомолекулярным агрегатам. На электрофореграмме видны также компоненты с молекулярным весом, меньшим, чем у нативного церулоплазмينا, что указывает на фрагментацию белка при фотохимических превращениях его медных хромофоров. Вероятно, агрегацией с участием этих фрагментов можно объяснить окрашивание полиакриламидного геля на белок между главными зонами. Все белковые зоны церуло-

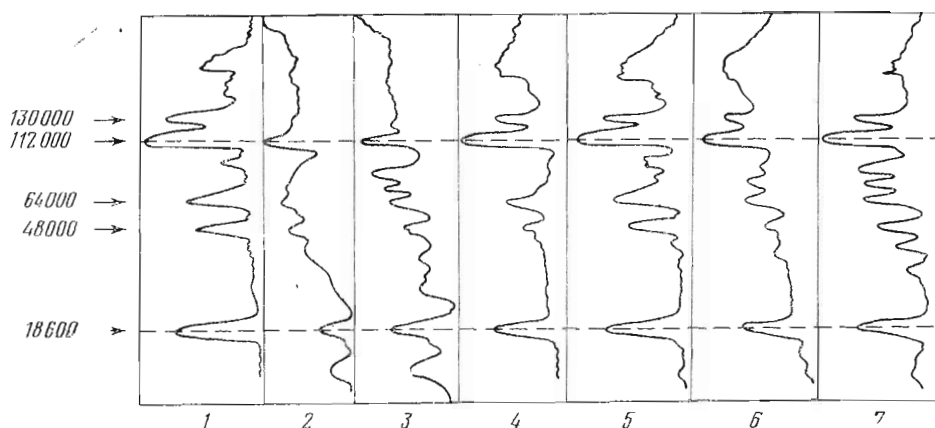


Рис. 8. Электрофорез образцов церулоплазмينا в 5,6% полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия: 1 — образец белка до облучения; 2 и 3 — белок, облученный в аэробных условиях при 285 К; 4 и 5 — облученный в анаэробных условиях при 285 К; 6 и 7 — облученный в аэробных условиях при 77 К. В образцы 3, 5 и 7 перед нанесением на гель добавляли дитиозеритрит до конечной концентрации 50 мМ. Полипептидные компоненты церулоплазмينا до облучения отмечены стрелками; рядом указаны значения молекулярных весов, взятые из нашей работы [6]. Для наиболее низкомолекулярного протеолитического фрагмента величина молекулярного веса уточнена по данным определения аминокислотной последовательности [21]

плазмина, обесцвеченного в аэробных условиях при 285 К, лишены оксидазной активности.

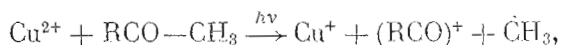
Облучение церулоплазмينا в анаэробных условиях при 285 К (рис. 7, 3) или в аэробных условиях при 77 К (рис. 7, 4) приводит к появлению лишенных оксидазной активности зон, большая часть которых соответствует величинам молекулярного веса, меньшим, чем у нативного белка. Таким образом, фотофрагментация церулоплазмينا может происходить и в отсутствие O_2 , а также при резком замедлении диффузионных процессов в замороженной матрице. Обращает на себя внимание тот факт, что фотофрагментация церулоплазмينا в жидком (в анаэробных условиях) и замороженном растворе имеет различный характер. Белковые зоны, обладающие оксидазной активностью (рис. 7, 3, 4), по величинам молекулярного веса соответствуют нативному церулоплазмину (M 130 000) и его димерам. При нанесении большего количества белка на гель удалось выявить и слабую оксидазоположительную тримерную зону. Образцы церулоплазмينا, облученного в анаэробных условиях при 285 К или в аэробных условиях при 77 К, характеризуются значительно меньшим относительным содержанием высокомолекулярных форм, чем образец белка, облученный в аэробных условиях при 285 К (рис. 7, 2–4), что может указывать на важную роль O_2 в процессе фотоиндуцированной агрегации.

Для выяснения природы фотоиндуцированной агрегации церулоплазмينا нами был использован метод электрофореза в 5,6% полиакриламидном геле, содержащем 1% додецилсульфата натрия. Из рис. 8 следует, что инкубация облученного белка перед нанесением на гель в 1% растворе додецилсульфата натрия при 100°С в течение 2–3 мин (условия, обычно используемые для разрушения всех нековалентных взаимодействий в белке [6]) не приводит к исчезновению агрегатов. Очевидно, агрегация является следствием поперечного ковалентного сшивания отдельных фрагментов церулоплазмينا. Обработка облученного белка перед нанесением на гель дитиозеритритом — агентом, восстанавливающим дисульфидные связи, приводит к частичному уменьшению содержания высокомолекулярных форм (рис. 8). Заметим, что восстановление дисульфидных связей в необлученном церулоплазмине не изменяет картину электрофо-

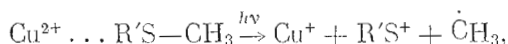
реза, так как между его протеолитическими фрагментами такие связи отсутствуют [6].

Уменьшение содержания высокомолекулярных форм в облученном церулоплазмине под действием дитиоэритрита может быть объяснено тем, что часть фотоиндуцированных ковалентных сшивок между фрагментами церулоплазмينا представляет собой дисульфидные связи. При этом нужно иметь в виду, что под действием дитиоэритрита восстанавливаются собственные дисульфидные связи церулоплазмينا, которые могут соединять фрагменты белка, возникающие при облучении. Эти фрагменты к тому же могут быть сшиты ковалентными связями другой природы. То, что такие связи определенно существуют в облученном белке, вытекает из факта неполного исчезновения высокомолекулярных форм после восстановления. На основании сказанного можно ожидать, что восстановление дисульфидных связей в облученном церулоплазмине будет приводить к изменению на электрофореграмме тех полипептидных компонент, которые имеют молекулярный вес меньше 130 000 (нефрагментированная полипептидная цепь белка). Такое изменение действительно наблюдается на рис. 8.

Поскольку облучение апоцерулоплазмينا не приводит ни к изменениям картины электрофоретического разделения белка, ни к появлению каких-либо сигналов ЭПР, то, следовательно, процессы сшивания и фрагментации полипептидных цепей, а также уменьшение сигнала апоцерулоплазмينا и появление нового радикального сигнала связаны с фотовосстановлением медных хромофоров при облучении белка. В работе [20] было описано образование радикалов $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ при облучении комплекса лизоцим — Cu^{2+} —GlcNAc стехиометрии 1 : 1 : 1. Авторы этой работы считают, что данные радикалы возникают в результате реакции



где $\text{RCO}-\text{CH}_3$ — тримерная или пентамерная молекула N-ацетилглюкозамина. В нашем же случае представляется наиболее вероятным рассматривать в качестве соединения, которое одновременно может служить и донором свободного метильного радикала, и восстановителем иона Cu^{2+} , тиоэфирную группировку остатка метионина, координационно связанную с этим ионом. Тогда суммарная реакция может иметь вид



где $\text{R}'\text{S}-\text{CH}_3$ — остаток метионина.

Эта реакция, продуктом которой является помимо свободного радикала $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ весьма реакционноспособный катионный остаток $\text{R}'\text{S}^+$, в принципе дает объяснение одного из возможных механизмов описанного выше явления сшивания полипептидных цепей церулоплазмينا за счет образования дисульфидных связей. Эффекту же специфической фрагментации полипептидных цепей, характер которой зависит от того, в каких растворах производилось облучение, жидких или замороженных (рис. 7 и 8), пока трудно дать однозначное объяснение. Можно предпологать, что этот эффект связан либо с превращениями метильного радикала, либо с фотопереносом электрона от иона Cu^+ на карбонил пептидной группы, что, согласно работе [20], может приводить к разрыву связи $\text{C}-\text{N}$ в анион-радикале пептидной группы $-\text{CO}-\text{N}^-\dot{\text{H}}$.

Несмотря на отсутствие в литературе прямых экспериментальных данных о том, что остаток метионина является лигандом меди в церулоплазмине, мы можем привести ряд аргументов для обоснования такого предположения. Кингстон с соавт. [21] установили полную аминокислотную последовательность протеолитического фрагмента церулоплазмينا с M 18 600 и показали, что положение трех остатков (метионина-144, гистидина-139 и цистеина-134) с учетом нескольких делеций совпадает с поло-

жением соответствующих остатков в полипептидных цепях пластоцианина на синезеленой водоросли *Anabaena variabilis* и азурина из бактерии *Pseudomonas aeruginosa* — белков, содержащих только по одному «синему» иону Cu^{2+} . При сравнении первичных структур пластоцианинов восьми видов растений со структурами азуринов девяти видов бактерий обнаружено, что данные остатки входят в число 10 консервативных. Сами же эти белки характеризуются высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей и произошли в результате дивергентной эволюции [22, 23]. Методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением было показано, что лигандами иона Cu^{2+} первого типа в пластоцианине из листьев тополя являются остатки метионина-92, гистидина-87, цистеина-84 и гистидина-37 [24], а в азурине из *Pseudomonas aeruginosa* — остатки метионина-124, гистидина-117, цистеина-112 и гистидина-46 [25]. Именно эти остатки относятся к числу консервативных, и первые три из них гомогичны соответствующим остаткам в С-концевом участке протеолитического фрагмента церулоплазмينا с M 18 600 [21]. Введением единственной делеции в полипептидную цепь этого протеолитического фрагмента белка можно добиться того, чтобы остаток гистидина-69 занял гомологичное положение с остатками гистидина-37 в пластоцианине и гистидина-46 в азурине.

Таким образом, сопоставление данных рентгеноструктурного анализа пластоцианина и азурина и определения первичной структуры этих белков и фрагмента церулоплазмينا свидетельствует в пользу того, что в состав медьсодержащего центра церулоплазмينا первого типа, расположенного на протеолитическом фрагменте с M 18 600, входит остаток метионина.

Экспериментальная часть

Препараты церулоплазмينا были выделены из сыворотки ретроплацентарной крови человека по методу [26], за тем исключением, что кристаллизацию белка посредством диализа относительно 0,025 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,25, производили дважды с промежуточным растворением микрокристаллического осадка в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, pH 7,0, +0,3 М NaCl. Стерильные растворы церулоплазмينا в 0,04 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,27, с концентрацией белка 107 мг/мл хранили при 4—5°С в запаянных ампулах, которые вскрывали непосредственно перед опытами.

Константа седimentации и молекулярный вес церулоплазмينا, определенные в аналитической центрифуге Spinco, модель E (США), равны $7,2 \pm 0,1 S$ и $130\,000 \pm 4000$ соответственно. Величина отношения поглощения D_{610}/D_{280} для исходных растворов белка составляет $0,049 \pm 0,002$. Эти данные, а также результаты электрофоретического анализа (рис. 7, 1) указывают на 100% степень чистоты использованных в работе препаратов церулоплазмينا [7].

Удельная оксидантная активность церулоплазмينا относительно *n*-фенилендиамина, установленная по методу Равина [27], составляет $29—35 D_{530}/\text{мг белка/ч}$.

Содержание меди в церулоплазмине определяли при помощи атомно-абсорбционного спектрометра Perkin-Elmer (Англия). Перед определением растворы белка фильтровали через колонку с ионообменником Chelex-100. Для удаления меди из церулоплазмينا белковый раствор диализовали против 0,04 М натрий-ацетатного буфера (pH 5,5), 0,05 М NaCN в течение 24 ч при 4—5°С. Далее раствор белка диализовали против того же буфера, не содержащего NaCN.

Концентрацию холо- и апоцерулоплазмينا определяли спектрофотометрически, принимая величины $D_{1\%}^{1\text{см}}$ при 280 нм соответственно равными 15,3 [7] и 13,6 [28].

Вакуумирование растворов белка осуществляли путем проведения последовательных циклов замораживания кюветы в жидком азоте, откачки диффузионным насосом и размораживания. Общее число таких циклов составляло в среднем 18—20. Данная процедура не приводит к уменьшению оксидазной активности церулоплазмينا.

Облучение растворов белка в 0,04 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5, производили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см светом ртутной лампы высокого давления с мощностью 450 Вт с люминесцирующим покрытием, расположенной на расстоянии 4 см от поверхности кюветы. Облучение производили через светофильтр БС-6, пропускающий свет с длиной волны длиннее 310 нм ($T_{310} < 1\%$). Кювета во время облучения находилась в держателе, термостатируемом проточной водой. Температура растворов составляла $12 \pm 1^\circ \text{C}$. Облучение замороженных растворов в том же буфере, содержащем 66% глицерина, осуществляли в кювете с длиной оптического пути 1,3 мм в кварцевом дюаре фокусированным светом лампы ДКСШ-1000. Облучение производили через комбинацию стеклянных фильтров, пропускающую свет в области 320—400 нм.

Спектры поглощения жидких растворов церулоплазмينا измеряли с помощью спектрофотометра Hitachi, модель 356 (Япония), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Перед регистрацией каждого спектра кювету с раствором белка выдерживали 20 мин в темноте. Спектры поглощения замороженных растворов измеряли в дюаре с жидким азотом в кюветах с длиной оптического пути 1,3 мм на спектрофотометре Shimadzu SV-50A (Япония).

Спектры ЭПР регистрировали при температуре жидкого азота на ЭПР-спектрометре ЭПР-2М (СССР).

Исходными растворами для приготовления градиентного (3—30%) полиакриламидного геля служили растворы А и Б следующего состава. Раствор А: 19,5 г акриламида, 520 мг N,N'-метиленабисакриламида, 6,5 мл трис-глицинового буфера (6 г триса, 28,8 г глицина, вода до 1 л, pH 8,5), 9,75 г сахарозы, 33 мг $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,02 мл TEMED (10% раствор в воде), вода до 65 мл. Раствор Б: 6,5 мл трис-глицинового буфера, 3,25 г сахарозы, 33 мг $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,11 мл TEMED (10%). Этими растворами при помощи смесителя и перистальтического насоса заполняли стеклянные трубочки размером $7 \times 0,7$ см. Время полимеризации геля в трубочках составляло около 2 ч. Электродным буфером служил трис-глициновый буфер, предварительно разведенный в 10 раз. Электрофорез проводили при напряжении 130 В в течение 22—24 ч при температуре $4\text{--}5^\circ \text{C}$. После проведения электрофореза для выявления белковых зон гели окрашивали раствором ку-масси бриллиантового синего R-250 (500 мг/л 7% уксусной кислоты), а для выявления зон, обладающих оксидазной активностью, — раствором о-данизидина [29]. С целью более точного сопоставления в различных образцах церулоплазмينا величин молекулярного веса для белковых зон, обладающих оксидазной активностью, в ряде опытов проводили электрофорез исходного образца церулоплазмينا и смеси исходного и облученного образцов белка и, кроме того, использовали образцы церулоплазмينا, обесцвеченные в различной степени (наделение интенсивности полосы поглощения при 610 нм составляло от 48 до 60% от исходного значения).

Электрофорез церулоплазмينا в 5,6% полиакриламидном геле, содержащем 1% додецилсульфата натрия, проводили по методу Файрбэнкса и др. [30] с некоторыми модификациями, приведенными в нашей работе [6].

Авторы выражают глубокую благодарность проф. С. А. Нейфаху (Институт экспериментальной медицины АМН СССР) за руководство работой и проф. Ф. Патнему (Университет штата Индиана, Блумингтон, США) за любезно предоставленную возможность ознакомиться со статьей [21] до ее опубликования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Poulik M. D., Weiss M. L. (1975) in: *The Plasma Proteins* (Putnam F. W., ed.), 2d ed., v. 2, pp. 51-108, Acad. Press, N. Y.
2. Нейфах С. А., Шавловский М. М. (1978) в кн.: *Прогресс в медицинской генетике*, с. 106-150, «Медицина», М.
3. Neifakh S. A., Vasiletz I. M., Shavlovski M. M. (1972) *Biochem. Genetics*, **6**, 231-238.
4. Бахарловский В. Г., Мошков К. А., Шавловский М. М., Нейфах С. А. (1977) *Генетика*, **13**, 1294-1304.
5. Gaitskhoki V. S., Kisselev O. I., Moshkov K. A., Puchkova L. V., Shavlovski M. M., Shulman V. S., Vacharlovski V. G., Neifakh S. A. (1975) *Biochem. Genetics*, **13**, 533-550.
6. Мошков К. А., Каримова Х. М., Нейфах С. А., Лакатош С., Хайду Я., Заводски П., Самсонидзе Т. Г., Киселев Н. А. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 395-407.
7. Rydén L., Björk I. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3411-3417.
8. Fee J. A. (1975) in: *Structure and Bonding* (Dunitz J. D., Hemmerich P., Holm R. H., Ibers J. A., Jorgensen C. K., Neillands J. B., Reinen D., Williams R. J. P., eds.), v. 23, pp. 1-60, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - N. Y.
9. Peisach J. (1978) in: *Mechanisms of Oxidizing Enzymes* (Singer T. P., Ondarza R. N., eds.), pp. 285-306, Elsevier, North Holland - N. Y.
10. Leeuwen Van F. X. R., Gelder Van B. F. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **87**, 305-342.
11. Vasiletz I. M., Shavlovski M. M., Neifakh S. A. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **25**, 498-504.
12. Шавловский М. М., Василец И. М. (1972) *Биохимия*, **37**, 507-514.
13. Miskowski V., Tang S.-P. W., Spiro T. G., Shapiro E., Moss T. H. (1975) *Biochemistry*, **14**, 1244-1250.
14. Семисотнов Г. В., Мошков К. А., Туроверов К. К., Шавловский М. М. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 413-421.
15. Herve M., Garnier A., Tosi L., Steinbuch M. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 797-801.
16. Freeman S., Daniel E. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **534**, 132-140.
17. Henry Y., Peisach J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7751-7756.
18. Рэнби Б., Рабер Я. (1978) *Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров*, с. 82-84, «Мир», М.
19. Василец И. М., Каюшпа Р. Л., Куранова И. П., Мошков К. А., Шавловский М. М., Нейфах С. А. (1973) *Биофизика*, **18**, 972-976.
20. Куроптева З. В., Нулатова М. К., Авдеева О. С. (1978) *Биофизика*, **23**, 979-985.
21. Kingston I. B., Kingston B. L., Putnam F. W. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1668-1672.
22. Rydén L., Lundgren J.-O. (1976) *Nature*, **261**, 344-346.
23. Ulrich E. L., Markley J. L. (1978) *Coord. Chem. Rev.*, **27**, 109-140.
24. Colman P. M., Freeman H. C., Guss J. M., Murata M., Norris V. A., Ramshaw J. A. M., Venkatappa M. P. (1978) *Nature*, **272**, 319-324.
25. Adman E. T., Stenkamp R. E., Sieker L. C., Jensen L. H. (1978) *J. Mol. Biol.*, **123**, 35-47.
26. Morell A. G., Hamer Van Den C. J. A., Scheinberg J. H. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3494-3496.
27. Ravin H. A., Harvard M. D. (1956) *Lancet*, **270**, 726-727.
28. Erickson J. O., Gray R. D., Frieden E. (1970) *Proc. Soc. Exptl Biol. and Med.*, **134**, 117-121.
29. Owen J. A., Smith H. (1961) *Clin. chim. acta*, **6**, 441-444.
30. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.

Поступила в редакцию
4.VI.1979

PHOTOCHEMICAL INVESTIGATION OF COPPER CHROMOPHORES OF THE ACTIVE SITES IN HUMAN CERULOPLASMIN

MOSHKOV K. A., YAKOVLEV A. S., MASLOV V. G.

*Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Leningrad: S. I. Vavilov State Optical Institute, Leningrad*

Visible and ultraviolet light irradiation of human ceruloplasmin solution results in bleaching of the type 1 and 3 copper chromophores, reduction of copper(II), decrease in oxidase activity of ceruloplasmin, as well as in specific fragmentation of its polypeptide chains, and their covalent cross-linking. These processes considerably depend upon the temperature (77 or 285 K) and the presence of O₂ in solution. Aerobic incubation of

anaerobically irradiated solution of ceruloplasmin results in the 90% -- restoration of the 610 nm absorption band and the 35%-recovery of oxidase activity. During irradiation at 77 K, new free radicals are generated, one of which according to EPR parameters corresponds to CH_3 . Upon thawing of the irradiated protein solution, these radicals disappear at different rates. No photochemical changes are observed in the case of apo-ceruloplasmin. Assuming that a methionine residue is one of the copper ligands in the type 1 copper site in ceruloplasmin, one can rationalize the photogeneration of CH_3 radicals and the photoreduction of copper(II). This assumption seems to be an argument for the structural homology of these sites in human ceruloplasmin, plant plastocyanin and bacterial azurin.
