СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 547.962,577.151.34

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. В. Р. Самыгина, А. В. Соколов*, М. О. Пулина*, Г. Бартуник**, В. Б. Васильев*

Институт кристаллографии РАН, Москва, Россия E-mail: lera@ns.crys.ras.ru *ГУ НИИ Экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург **Институт Макс–Планка, ДЕЗИ, Гамбург, Германия Поступила в редакцию 04.10.2007 г.

Впервые решены трехмерная структура церулоплазмина (ЦП) с незаполненными сайтами лабильного связывания металлов и структура ЦП с Ni²⁺ в лабильных сайтах с разрешением 2.6 и 2.95 Å соответственно. Для кристаллизации использован препарат стабильного при хранении ЦП, полученный с использованием ингибиторов протеиназ и очищенный от (пре)протеиназ. ЦП с Ni²⁺ впервые закристаллизован в ромбической пространственной группе. ЦП со свободными лабильными сайтами закристаллизован в тригональной кристаллической форме. Описаны различия межмолекулярных контактов, наблюдаемых в тригональной и ромбической кристаллических формах ЦП. Описаны конформационные изменения, сопровождающие связывание Ni²⁺. Сделано предположение, что лабильные сайты полифункциональны и способны как связывать потенциально токсичные для организма ионы металлов, так и участвовать в переносе электронов от субстратов на активный центр.

PACS: 87.15.B

ВВЕДЕНИЕ

Церулоплазмин (ЦП, ферро:О2-оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) является полифункциональной медьсодержащей оксидазой. ЦП был открыт в 1944 г. как белок плазмы крови человека, содержащий около 95% меди, выявляемой в плазме [1]. Было показано физиологическое значение ферроксидазной активности ЦП: катализируя окисление Fe²⁺, ЦП обеспечивает встраивание Fe³⁺ в апо-трансферрины, участвуя таким образом в метаболизме железа [2]. ЦП окисляет четыре иона Fe²⁺ и осуществляет четырехэлектронный перенос на кислород с образованием воды, препятствуя неферментативной реакции окисления железа, ведущей к появлению свободных радикалов. Наследственный дефект гена ЦП (ацерулоплазминемия) выражается в системном нарушении метаболизма железа и дегенерации нервной системы, поджелудочной железы и других тканей организма [3]. ЦП обладает также активностью супероксиддисмутазы [4], глутатион-зависимой пероксидазы [5], является физиологическим ингибитором прооксидантного фермента лейкоцитов – миелопероксидазы [6].

Первые кристаллы ЦП были получены еще в 1960 г. [7]. В 1996 г. была решена трехмерная структура ЦП с разрешением 3.1 Å. ЦП представляет собой мономер, состоящий из шести доменов, с которым прочно связаны шесть ионов меди [8]. Во 2-, 4- и 6-м доменах расположены гомологичные одноядерные центры связывания меди, трехъядерный центр расположен между 1-м и 6-м доменами. Кроме этого, были обнаружены еще два лабильных сайта связывания металлов, из которых в нативном ЦП заселена половина [9]. Исследование связывания в лабильных сайтах ЦП ионов Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} и Fe^{3+} позволило высказать гипотезу, согласно которой эти сайты играют важную роль в окислении железа [9]. Были установлены сайты связывания ингибитора (иона азида) и различных субстратов (биогенные и синтетические амины) [10]. Недавно была решена структура ЦП с разрешением 2.8 Å [11], что позволило впервые выявить сайты связывания Ca^{2+} и Na⁺.

Получение кристаллов ЦП высокого дифракционного качества затрудняют несколько обстоятельств. ЦП крупная мультидоменная молекула весом 132 кДа, из которых 7–8% приходится на углеводы. Этот белок чрезвычайно чувствителен к протеолитической деградации. Выделение недеградированного и стабильного ЦП со времени его открытия остается трудной задачей [12–15]. В препаратах ЦП присутствуют примеси протромбина [16], неидентифицированной металлопротеиназы [17], что делает необходимым использование ингибиторов протеиназ на всех стадиях выделения ЦП [18]. В процессе выделения ЦП склонен к агрегации, что также затрудняет кристаллизацию.

Мы выделяли ЦП при помощи разработанного ранее метода, позволяющего получить гомогенный, стабильный при хранении препарат недеградированного ЦП [19]. Согласно этому методу к плазме крови были добавлены ингибиторы протеиназ (ЭДТА и фенилметилсульфонилфторид). Для сорбции примесей неидентифицированных протеиназ и протромбина использовали аргинини гепарин-Сефарозу. Поскольку ранее сообщалось о присутствии в препаратах ЦП металлопротеиназы [17], мы решили оценить стабильность ЦП после добавления к плазме Ni²⁺.

В данной работе описаны особенности структуры ЦП с незаполненными лабильными сайтами (разрешение 2.6 Å, тригональная кристаллическая форма) и комплекса ЦП с ионами Ni²⁺ (разрешение 2.95 Å, ромбическая кристаллическая форма). Описаны различия межмолекулярных контактов для тригональной и ромбической кристаллических форм ЦП. Обсуждается специфическое связывание с ЦП ионов Ca²⁺. Определены конформационные изменения, происходящие при связывании ионов Ni²⁺ в лабильных сайтах, высказаны предположения о роли сайтов лабильного связывания металлов в ЦП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ЦП и анализ полученных препаратов. Препарат ЦП был выделен из плазмы крови с помощью аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [19]. Плазму крови здоровых доноров (3 л) разбавляли в 2 раза 100 мМ натрий-ацетатным буфером рН 5.5 с добавлением ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида до конечных концентраций 1 и 0.1 мМ соответственно. Такую плазму наносили на колонку с DEAE-Sephadex A-50 (10 \times 5 см), уравновешенную 50 мМ натрийацетатным буфером рН 5.5, отмывали тем же буфером до $A_{280} < 0.005$ в оттекающем растворе и элюировали с помощью линейного градиента NaCl (по 100 мл 0 → 0.4 М NaCl на 50 мМ натрийацетатном буфере рН 5.5). Окрашенные в голубой цвет фракции объединяли, охлаждали на льду, прибавляли к ним равный объем смеси этанол-хлороформ (9:1, v/v) и через 20 мин центрифугировали в течение 15 мин при 6000g (*T* = 4°C). Надосадочную жидкость отбирали, прибавляли к ней равный объем смеси этанол-хлороформ (9:1, v/v) и через 20 мин центрифугировали при тех же условиях. Голубой осадок, содержавший ЦП, растворяли в PBS (0.15 M NaCl, 10 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7.4) и центрифугировали 15 мин при 15000g ($T = 4^{\circ}$ С) для удаления нерастворенных примесей. Затем ЦП фильтровали через колонку с аргинин-сефарозой (10 × 2.5 см), уравновешенную PBS. При элюции PBS ЦП выходил с колонки в свободном объеме. После этого ЦП наносили на колонку с протамин-сефарозой (10× 2.5 см), уравновешенную PBS, промывали колонку до *A*₂₈₀ < 0.003 в оттекающем растворе и элюи-

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 53 № 4 2008

ровали 0.3 M NaCl в 30 мМ Tris-HCl буфере pH 7.4 при максимальной скорости. Фракции, содержавшие ЦП, объединяли, разбавляли в 3 раза водой и фильтровали через уравновешенную PBS колонку с гепарин-сефарозой (4 × 1 см). ЦП элюировали PBS в свободном объеме.

Другой препарат ЦП был выделен по той же схеме из плазмы крови, к которой вместо ЭДТА был добавлен NiCl₂ до конечной концентрации 1 мкМ.

Препараты ЦП сгущали при помощи ячейки Vivaspin 20 до конечной концентрации 80 мг/мл. Гомогенность выделенного ЦП проверяли электрофорезом в ПААГ без детергентов [20]. ЦП специфически окрашивали в геле при помощи одианизидина [21], что позволило выявить возможные олигомерные формы. Степень протеолитической деградации ЦП оценивали методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [22]. Концентрацию гомогенного ЦП определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты $A_{280} = 1.61$ мл/мг на 1 см и A₆₁₀ = 0.0741 мл/мг на 1 см [15]. Критерием качества очищенного ЦП служил коэффициент А₆₁₀/А₂₈₀, обусловленный соотношением ионов меди I типа и ароматических аминокислотных остатков в ЦП. Атомно-адсорбционный анализ проводили на приборе AAS-5000 Perkin Elmer.

Кристаллизация и сбор данных. Кристаллы комплексов ЦП получали при 4°С методом диффузии паров. Кристаллизационный раствор, аналогичный тому, что использовали ранее [21], содержал 3-7% PEG 20000 с добавлением 1-2% PEG 1000, 20 мМ CaCl₂, 200 мМ NaCl и 50 мМ натрийацетатный буфер рН 5.5. Кристаллы голубого цвета размером 0.08-0.2 мм появлялись через 5-7 дней. В качестве криопротектора использовали 30% глицерин или 28% РЕС 400. Связывание кальция и никеля в кристаллах подтверждалось методом рентгеновской флюоресценции. Сбор дифракционных данных проводили на станции синхротронного излучения BW6, DESY (Гамбург) при температуре 100 К с использованием детектора MAR CCD. Для точного определения сайтов связывания Ni²⁺ был снят набор данных с учетом аномального рассеяния при длине волны, соответствующей краю поглощения никеля. Для выбора оптимальных параметров съемки использовали программу BEST [23]. Обработка данных проведена по программам DENZO, SCALEPACK [24]. Характеристики дифракционных наборов приведены в табл. 1.

Решение и уточнение структур. Структуры были решены методом молекулярного замещения по программе MOLREP [25], моделью служили координаты ЦП, структура которого была решена с разрешением 3.1 Å [8]. Уточнение выполнено с использованием программы REFMAC и графической программы COOT [26, 27]. Финаль-

	ЦП-Ca ²⁺	ЦП-Ca ²⁺ + Ni ²⁺	ЦП-Ca ²⁺ + Ni ²⁺
Длина волны, Å*	0.97	0.97	1.48
Разрешение, Å	30–2.6	30–2.95	30–3.25
Разрешение в последнем слое, Å	2.64-2.6	3.0–2.95	3.31-3.25
Пр. гр.	P3 ₂ 21	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222
Параметры элементарной ячейки, Å	a = b = 210.78 c = 84.5	a = 74.84 b = 226.66 c = 233.7	a = 74.84 b = 226.66 c = 233.7
Количество рефлексов в независимой части	64294 (3104)*	34841 (1729)	60352 (3018)
Полнота, %	95.9 (93.4)	82.3 (83.2)	99.7 (100)
Ι/σ(Ι)	17.7 (1.75)	10.6 (2.64)	8.9 (3.6)
R _{merge}	4.5 (30.5)	5.7 (23.5)	8.7 (35.6)

Таблица 1. Характеристики экспериментальных наборов дифракционных данных

* В скобках приведены значения для последнего слоя разрешения.

ные *R*-фактор и *R*_{free}-фактор для ЦП, не содержащего ионов меди в лабильных сайтах, составил 21.4 и 26.5% соответственно. Для комплекса ЦП с Ni²⁺ финальный *R*-фактор (*R*_{free}-фактор) составил 18.6 (25.1%). Согласно графику Рамачандрана в абсолютно разрешенных областях находятся 86.6/87.1% значений торсионных углов φ и ψ аминокислотных остатков, в дополнительно разрешенных областях лишь 0.1/0.1% остатков соответственно для ЦП, не содержащего ионов меди в лабильных сайтах, и комплекса ЦП. Характеристики моделей приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика препарата ЦП. Полученный ЦП человека характеризовался соотношением $A_{610}/A_{280} = 0.052$, которое превышало аналогичный показатель для ЦП в предыдущих работах по кристаллизации (0.048) [8]. Анализ полученного ЦП с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза показал, что более 95% белка в препарате находит-

Таблица 2. Характеристики уточненных структур комплексов церулоплазмина

	ЦП-Ca ²⁺	ЦП-Ca ²⁺ + Ni ²⁺
Разрешение, Å	20-2.60	20–2.95
Количество неводородных атомов	8376	8376
R -фактор/ R_{free} -фактор, %	21.4/26.5	18.6/25.1
Отклонение длин связи для:		
расстояний	0.020	0.020
углов	1.45	1.48
Тепловой фактор, Å ²	47.8	48.4

ся в интактном состоянии, с $M \sim 132$ кДа (рис. 1 а). Электрофорез в ПААГ без детергентов не выявил в препарате каких-либо олигомерных форм ЦП (рис. 1 б, 1 в). ЦП, выделенный из плазмы с добавлением NiCl₂, имел такие же электрофоретические свойства, как и первый препарат. Добавление ионов Ni²⁺ к исходной плазме не вызывало усиления деградации ЦП в процессе выделения, что могло бы происходить в результате активации металлопротеиназы. В кристаллах, полученных из этого препарата ЦП, был обнаружен Ni²⁺. При помощи атомно-адсорбционного анализа было показано, что в обоих препаратах ЦП содержится 5.95 ± 0.05 молей меди на 1 моль белка. Хранение препаратов ЦП в течение 2 месяцев в присутствии бактериостатического агента (мертиолат натрия) при 37°С не вызывало протеолитической деградации ЦП по данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза.

Общая структурная организация ЦП. ЦП представляет собой псевдогексамер, состоящий из шести доменов, связанных псевдоосью третьего порядка. Каждый домен организован типично для купредоксинов – содержит В-баррел, имеющий длинную петлю между первым и последним β-слоями, которая покрывает вершину барреля (рис. 2). Существование на поверхности молекулы этих длинных, подвижных петель, не имеющих сильных связей с компактным ядром, вероятно, и делает ЦП столь чувствительным к протеолитической деградации. Ограниченный протеолиз ЦП трипсином приводит к появлению одних и тех же фрагментов, т.е. разрыв происходит всегда по определенным пептидным связям, расположенным после R481, R701, K887 [13, 15]. В результате замены этих аминокислотных остатков с помощью сайтнаправленного мутагенеза был получен ЦП человека устойчивый к протеолизу [28]. Остатки R481, R701, K887 являются консервативными сайтами



Рис. 1. Электрофоретический анализ препарата церулоплазмина человека (по 20 мкг на дорожку). Ds-Na-ПААГ-электрофорез (а), окраска Кумасси R-250, слева стрелками указано положение маркеров молекулярной массы в кДа; ПААГ-электрофорез без детергентов (б, в), б – окраска Кумасси R-250, в – окраска о-дианизидином.

протеолиза, поскольку в ЦП других видов животных петли, покрывающие вершины β-баррелей, содержат гомологичные перечисленным остатки. Кроме того, некоторые другие пептидные связи в этих петлях также уязвимы для протеолитической атаки, например эластазой [29].

Структура ЦП человека решена с максимально высоким на настоящий момент разрешением 2.6 Å. Детальность, точность структурной информации, получаемой посредством рентгеноструктурного анализа, прежде всего зависит от предела пространственного разрешения, до которого удалось произвести измерения. В случае ЦП повышение разрешения позволило установить положения некоторых аминокислотных остатков, которые ранее не были включены в модель. Более точно определена ориентация важного для каталитических свойств ЦП остатка Н980, являющегося лигандом иона меди в трехъядерном центре (рис. 7). Такую же ориентацию имел этот остаток в структуре ЦП, решенной при 2.8 Å [11]. В более ранней модели остаток Н980 был повернут на ~87° [8].

Несмотря на улучшение разрешения по сравнению с разрешением для известных ранее структур [8, 11] и использование недеградированного ЦП, определить положение аминокислотных остатков, входящих в междоменные петли 339– 346, 475–482, 885–891 и 1041–1046 не удалось. В то же время участок 700–709, содержащий сайт протеолиза R701, во всех известных структурах ЦП определяется достоверно. Причины такого исключения объяснены ниже.

Обнаружены связанные с ЦП три иона Na⁺ и один ион Ca²⁺, так же как и в структуре, решенной при 2.8 Å [11]. Центры связывания натрия располагаются между доменами 1 и 3, 3 и 4, 5 и 6. Ca²⁺ связывается в первом домене, и его лигандами являются D127 и D128, связывающие Ca²⁺ бидентатно, кислороды основной цепи K109, Q124 и две молекулы воды. Среднее расстояние до лигандов 2.42 Å.

Несмотря на то что согласно биохимическим данным с молекулой ЦП способно связаться 3–4 иона Ca²⁺ [30], не удалось идентифицировать в его структуре других сайтов для этого металла. Известно, что присутствие ионов Ca²⁺ в растворе влияет на связывание ЦП с AE-агарозой [30]. Считают, что избирательное сродство ЦП к хелатным сорбентам, к которым относится AE-агароза, обусловлено наличием на молекуле ЦП кластеров отрицательно заряженных аминокислот [31]. Действительно, на поверхности ЦП человека нами были выявлены такие эволюционно консервативные кластеры, расположенные в ви-



Рис. 2. Вторичная структура церулоплазмина: а – проекция вдоль оси 3-го порядка; б – проекция перпендикулярно оси 3-го порядка.



Рис. 3. Положение His980 в структурах ЦП с разрешением 2.95 Å (светло-серый) и 2.6 Å (темно-серый).

де широкой площадки: 242–255, 586–595, 605–616, 740–752, 924–933, 940–955 [19]. В наших экспериментах синтетические полианионные пептиды, соответствующие участкам D-Q-V-D-K-E-D-E-D-F-Q-E (586–597), E-V-E-W-D-Y-S-P-Q-R-E-W-E (740–752) и D-E-N-E-S-W-Y-L-D-D (924–933), вытесняли ЦП с AE-агарозы [32], что подтверждает важность именно этих участков для связывания с хелатным сорбентом. Влияние Са²⁺ на связывание ЦП с AE-агарозой, вероятно, обусловлено ионообменным эффектом, а не специфическим связыванием, как предполагалось ранее [30]. Единственный специфический сайт связывания Ca²⁺ локализован в 1-м домене молекулы, удаленном от перечисленных отрицательно заряженных кластеров.

Кристаллическая упаковка ЦП. ЦП был закристаллизован в двух различных пространственных группах. Тригональная кристаллическая форма была получена ранее [8, 11]. Ромбическую форму наблюдали впервые, она была получена для комплекса ЦП с никелем в тех же условиях кристаллизации, что и тригональная.

Обе кристаллические формы ЦП характеризовались высоким содержанием воды в ячейке, 70.0% – для тригональной формы и 67.3% – для ромбической. Это является одной из причин относительно невысокого разрешения, с которым удалось произвести сбор дифракционных данных для кристаллов ЦП. Возможно, получить более компактную кристаллическую упаковку также мешает наличие длинных подвижных петель на поверхности молекулы.

Как следствие, в кристаллах имеются достаточно большие каналы.

Тригональная форма имеет каналы практически треугольного сечения (рис. 5 а), проходящие вдоль осей третьего порядка, располагающихся в центре каналов. Размеры сечения ~110×110×110 Å. Контакты между молекулами образованы аминокислотными остатками из четырех зон (табл. 3). Самая обширная зона 697–716 включает R701, связанный водородными связями с остатками P829 и E834 соседней молекулы (рис. 6). В более ранних работах, когда метод выделения белка не позволял полностью ингибировать примесные



Рис. 4. Кристаллические упаковки ЦП: а – тригональная пр. гр.; б – ромбическая пространственная группа.



Рис. 5. Межмолекулярный контакт с участием R701 в тригональной кристаллической форме.

протеиназы, ЦП в кристаллах, вероятно, не был протеолизован по R701 именно благодаря участию содержащей его петли 697–716 в межмолекулярных контактах, образующихся при кристаллизации белка.

Ромбическая форма имеет другие области межмолекулярных контактов. Молекулы упакованы так, что вдоль короткой оси образуются два типа каналов, большой и малый, диаметром ~43.3 и 90.0 Å (рис. 5б). Аминокислотные остатки, принимающие участие в контактах, располагаются в 1-, 2-, 4-, 5- и 6-м доменах (табл. 3). При такой упаковке петля, содержащая R701, обращена в центр большого канала и соответственно не задействована в межмолекулярных контактах. Тот факт, что электронная плотность для области, содержа

щей этот остаток, хорошо определена, можно объяснить эффективным ингибированием протеиназ.

Лабильные сайты связывания металлов. Ранее было показано, что помимо трех одноядерных и одного трехъядерного центров связывания меди, в ЦП существуют также два так называемых лабильных сайта связывания металлов в доменах 4 и 6 [9–11]. В сайте, относящемся к домену 4, лигандами металла являются H602, E597, D684 и Е971 (из домена 6), в сайте, относящемся к домену 6 - H940, E935, D1025 и E272 (из домена 2). Лабильные сайты располагаются на расстоянии ~9 Å от одноядерных центров соответствующих доменов. По данным предыдущих исследований лабильные сайты заполнены в основном медью. Содержание железа составляет менее 1%, никеля – менее 1%, цинка – менее 2%, кальция – менее 4% [17].

В данной работе впервые получена структура ЦП, не содержащего ионов в лабильных сайтах, что, вероятно, связано с использованием ЭДТА при выделении белка. Таким образом, получена возможность выявлять конформационные изменения, сопровождающие связывание ионов в данных центрах.

В структуре ЦП со свободными лабильными сайтами D684 (домен 4) и D1025 (домен 6) развернуты наружу, в область межмолекулярных контактов, что делает доступным вход в лабильные сайты. Добавление соли никеля при выделении ЦП, согласно данным аномального рассеяния, привело к связыванию Ni²⁺ в обоих лабильных сайтах (рис. 6). Связывание ионов металлов сопровождается разворотом карбоксильных групп D684 и D1025 (рис. 7). Анализ аномальной разностной карты показал два сильных пика электронной плотности высотой 10*σ*. Сравнение тем-



Рис. 6. Пики аномальной разностной карты электронной плотности в сайтах связывания Ni²⁺.



Рис. 7. Конформационные изменения, наблюдаемые при связывании металлов в лабильных сайтах ЦП: а – в домене 6; б – в домене 4. ЦП-Са²⁺ – темно-серый; ЦП-Са²⁺ + Ni²⁺ – светло-серый.

пературных факторов позволило установить, что сайт в домене 6 заполнен никелем полностью, а сайт в домене 4 – на 50%. Сходное заполнение лабильных сайтов Cu^{2+} в структуре ЦП, решенной при 3.1 Å, описано ранее [10]. В структуре, решенной при 2.8 Å, только лабильный сайт в домене 6 на 50% заполнен медью, а сайт в домене 4 – свободен [11]. Возможно, потеря ионов меди произошла в процессе очистки. Таким образом ионы меди в лабильных сайтах легко их покидают и/или замещаются другими ионами. Интересно, что сайт в домене 4 во всех случаях оказывается заполнен в меньшей степени, чем сайт в домене 6, что может говорить о различных функциях этих сайтов.

Проведенные ранее исследования связывания различных ионов (Cu²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺) [9] в ла-

бильных сайтах [9] показали, что ионы Cu^{2+} , связавшиеся в лабильных сайтах доменов 4 и 6, замещаются ионами Co^{2+} . Ионы Fe^{2+} также способны замещать ионы меди в лабильных сайтах, но после окисления до Fe^{3+} они перемещаются в некие удерживающие сайты (постулированные П. Линдли и др. [9]). Что касается иона Fe^{3+} , то он замещает Cu^{2+} только в лабильном сайте домена 6 и также переходит в удерживающий сайт.

Никель связывается в лабильных сайтах аналогично ионам меди и кобальта. Поскольку концентрация никеля в плазме в норме крайне мала по сравнению с другими микроэлементами, то роль лабильных сайтов ЦП в обмене данного металла в норме вряд ли существенна. Однако при токсическом отравлении никелем или другими тяжелыми металлами активность ЦП уменьша-

Тригональная пр. гр.		Ромбическая пр. гр.			
молекула А	молекула В	расстояние	молекула А	молекула В	расстояние
Lys 557 NZ	Tyr 716 OH	3.04	Arg 774 NH2	Gln 985 OE1	2.50
Asn 697 ND2	Ser 771 OG	2.72	Thr 772 CG2	Glu 145 OE2	3.10
Arg 701 NH2	Pro 829 O	3.05	Thr 583 OG1	PHE 414 N	2.94
Arg 701 NH2	Glu 834 OE1	2.98	Arg 579 NH2	Thr 493 OG1	2.84
Arg 701 NE	Glu 834 OE2	3.15	Met 580 O	Lys 449 NZ	4.02
Glu 712 OE1	Asp 554 N	2.83	Arg 579 NH1	Pro 492 O	2.81
Lys 802 NZ	Asp 556 OD1	2.55	Ser 222 O	Asp 15 OD2	2.84
His 922 ND1	Ser 341 OG	3.55	Thr 219 O	Tyr 220 OH	3.13
Thr 837 N	Cys 699 O	3.16	Glu 223 OE1	Arg 46 NH2	3.23
Arg 125 NH1	Asp 122 OD1	2.83	Glu 223 OE2	His 20 N	2.49
Arg 125 NH2	Asp 122 OD2	2.85			

Таблица 3. Межмолекулярные контакты ЦП (Å)

ется [33]. Хроническая интоксикация крыс никелем вызывает компенсаторное увеличение содержания ЦП [34]. Возможно ЦП, связывая тяжелые металлы в лабильных сайтах, участвует в многокомпонентной биохимической системе их детоксикации.

Другое предположение о роли лабильных сайтов можно сделать на основании изучения ферментативных свойств ЦП. В работе по сайт-направленному мутагенезу аминокислотных остатков, формирующих лабильные сайты, показано, что замены в обоих доменах (Е597А/Н602А и Е935А/Н940А) снижают ферроксидазную активность ЦП [35]. Замены в домене 6 никак не сказывались на окислении синтетического диамина - одианизидина. Однако замена Е971А в лабильном сайте 4-го домена приводила к увеличению диаминооксидазной активности. В наших опытах не было замечено значимых различий в окислении о-дианизидина, катализируемом ЦП с ионами Ni²⁺ и без таковых. В ЦП сайт связывания биогенных аминов (адреналина, норадреналина, серотонина и дигидроксифенилаланина) располагается в 6-м домене вблизи лабильного центра связывания металлов (E935, H940, D1025 и E272) и одноядерного центра связывания меди. Сайт связывания синтетических ароматических диаминов располагается в 4-ом домене, также вблизи лабильного центра связывания металлов (Е597, Н602, D684 и Е971) и соответствующего одноядерного центра [10]. На основании этого можно с осторожностью предположить, что для окисления о-дианизидина решающее значение имеет не связывание каких-либо ионов в лабильных сайтах, а перенос электронов с данного субстрата через аминокислотные остатки на ионы меди каталитического центра ЦΠ.

Помимо ЦП лабильный сайт связывания меди, располагающийся на расстоянии 7.5 Å от одноядерного центра, был обнаружен в медьсодержащей оксидазе CueO [36]. Несмотря на то что лабильный сайт связывания CueO не приспособлен для связывания ионов Fe²⁺, данная оксидаза обладает слабой ферроксидазной активностью in vitro. Так же, как и аминокислотные замены в ЦП [35], замещение аминокислот в лабильном сайте CueO снижало оксидазную активность этого фермента [36]. Напротив, присутствие в неизмененных лабильных сайтах ионов меди увеличивало оксидазную активность CueO [36], а присутствие ионов железа увеличивало оксидазную активность ЦП [37]. Поскольку эти сайты в каждой из оксидаз приспособлены для лабильного связывания определенных ионов, последние, возможно, принимают участие в более эффективном переносе электронов на ион меди I типа, входящий в каталитический центр как ЦП, так и СиеО.

Вероятно, лабильные сайты ЦП являются полифункциональными: с одной стороны, они способны связывать потенциально токсичные для организма ионы металлов, а с другой – обеспечивать электронный перенос с ионов железа в процессе ферроксидазной реакции и принимать участие в переносе электронов от других субстратов ЦП. Это еще раз подтверждает, что ЦП – многофункциональный белок, участвующий в большом количестве различных процессов, происходящих в организме.

Авторы выражают благодарность Е.Т. Захаровой и М.М. Шавловскому (ГУ НИИ Экспериментальной Медицины РАМН, Санкт-Петербург) за ценные советы касательно стратегии очистки ЦП и полезное обсуждение результатов.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 06–04–48602, 05–04–48765) и программы Президиума РАН "Фундаментальные науки – медицине".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Holmberg C.G.* // Acta Physiol. Scand. 1944. V. 8. P. 227.
- 2. Osaki S. J. // Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 5053.
- Harris Z.L., Takahashi Y., Miyajima H., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2539.
- 4. *Plonka A., Metodiewa D., Zgirski A., et al. //* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. P. 978.
- 5. Kim I.G., Park S.Y. // FEBS Lett. 1998. V. 437. P. 293.
- Segelmark M., Persson B., Hellmark T., Wieslander J. // Clin. Exp. Immunol. 1997. V. 108. P. 167.
- Laurell C.-B. // The plasma proteins. / Ed. Putnam F.W. New York: Academic Press 1960. P. 362
- Zaitseva I., Zaitsev V., Card G. et. al. // J. Biol. Inorg. Chem. 1996. V. 1. P. 15.
- Lindley P.F., Card G., Zaitseva I. et. al. // J. Biol. Inorg. Chem. 1997. V. 2. P. 454.
- Zaitsev V.N., Zaitseva I., Papiz M., Lindley P.L. // J. Biol. Inorg. Chem. 1999. V. 4. P. 579.
- Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F. // Acta Cryst. D. 2007. V. 63. P. 240.
- Takahashi N., Ortel T.L., Putnam F.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 390.
- 13. Ryden L. // FEBS Lett. 1971. V. 18. P.321.
- 14. *McCombs M.L., Bowman B.H. //* Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 434. P. 452.
- 15. Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W. // Anal. Biochem. 1980. V. 102. P. 450.
- Bianchini A., Musci G., Calabrese L. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 20265.
- 17. *Ehrenwald E., Fox P.L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1994. V. 309. P. 392.
- 18. Moshkov K.A., Lakatos S., Hajdu J., et al. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 94. P. 127.

- Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. // Биоорган. химия. 2005. Т. 31. С. 269.
- 20. Davis B.J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404.
- 21. Owen C.A., Smith H. // Clin. Chim. Acta. 1961. V. 6. P. 441.
- 22. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
- 23. *Popov A.N., Bourenkov G.P. //* Acta Crystallog. Sect. D. 2003. V. 59. P. 1145.
- Otwinowski Z., Minor W. // Methods Enzymol. 1997.
 V. 276. P. 307.
- 25. Vagin A., Teplyakov A. // J. Appl. Cryst. 1997. V. 30. P. 1022.
- 26. Murshudov G.N., Vagin A.A., Lebedev A. et al. // Acta Cryst. D. 1999. V. 55. P. 247.
- 27. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126.
- 28. *Bielli P., Bellenchi G.C., Calabrese L. //* J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 2678.

- 29. Sang Q.A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1995. V. 37. P. 573.
- 30. Musci G., Bonaccorsi di Patti M.C., Petruzzelli R. et al. // Biometals. 1996. V. 9. P. 66.
- 31. Stern R.V., Caffrey J.M., Frieden E. // Biochem. Int. 1992. V. 27. P. 281.
- 32. Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т. и др. // Биохимия. 2006. V. 71. С. 208.
- 33. Srivastava R.C., Husain M.M., Srivastava S.K. et al. // Bull Environ Contam Toxicol. 1995. V. 54. P. 751.
- Cartana J., Arola L., Mas A. // Toxicology. 1991. V. 69. P. 133.
- 35. Brown M.A., Stenberg L.M., Mauk A.G. // FEBS Letters. 2002. V. 520. P. 8.
- Roberts S.A., Wildner G.F., Grass G. et al. // JBC. 2003. V. 278. P. 31958.
- 37. Curzon G. // Biochem. J. 1961. V. 79. P. 656.