

И. М. ВАСИЛЕЦ, В. П. КУШНЕР, К. А. МОШКОВ, С. А. НЕЙФАХ

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА (СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ) ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 24 V 1972)

Церулоплазмины (ЦП) — группа медьсодержащих гликопротеидов, обладающих оксидазной и ферроксидазной активностью и принимающих участие в транспорте меди в животном организме ⁽¹⁾. У человека ЦП входят в состав α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови. Особый интерес к ЦП человека связан с дефицитом этого белка у большинства больных, страдающих наследственной гепатолентикулярной дегенерацией (болезнью Вильсона — Кановалова), при которой наблюдаются глубокие нарушения обмена меди в организме. В предыдущих наших исследованиях ⁽²⁾ было найдено, что при этом заболевании изменена первичная структура ЦП. Возможно, что нарушение регулирования биосинтеза ЦП не является первичным эффектом мутации, а происходит вследствие мутационных изменений структуры ЦП. В связи с этим особое значение приобретает изучение молекулярной структуры ЦП и, в частности, — четвертичной структуры.

Литературные данные по этому вопросу ⁽³⁾ носят предварительный характер и базируются на недостаточно строго проведенных исследованиях. Так, Пойлон и Бирн производили диссоциацию ЦП в условиях, при которых не исключена возможность гидролиза полипептидных цепей белка. При изучении четвертичной структуры авторы работали не с индивидуальными фракциями ЦП, а с суммарными препаратами белка, хотя известно, что ЦП у человека представлен двумя молекулярными формами ⁽⁴⁾. Эти формы идентичны по каталитическому действию, но различаются по ряду физико-химических свойств, по аминокислотному составу и по набору пептидов. Наконец, во всех цитированных выше работах гидродинамические характеристики и молекулярные веса (мол. вес) субъединиц были определены без учета полидисперсности и неидеальности растворов белка, как правило, при одной концентрации, что недопустимо, особенно при наличии конформационных изменений, сопровождающих диссоциацию. Измерения вязкости и дисперсии оптического вращения ⁽⁵⁾ ясно показывают, что после диссоциации ЦП существенно изменяется конформация и свернутость полипептидных цепей в субъединицах белка. Поэтому измеряемое на опыте снижение седиментационных коэффициентов нельзя интерпретировать лишь как уменьшение мол. веса. Растворы ЦП после диссоциации нельзя также рассматривать как идеальные и гомодисперсные. При сукцинировании, часто применяемом для индукции распада ЦП на субъединицы, значения кажущегося мол. веса M_{app} , определенных равновесными седиментационными методами, зависят от концентрации белка, времени установления равновесия и отличаются более чем на 10% по измерениям у дна и у мениска методом Арчибальда ⁽⁶⁾.

Учитывая вышесказанное, мы производили исследования субъединичного состава ЦП человека только на одной молекулярной форме, ЦП-1. Эта форма выходит первой при градиентной элюции К-фосфатным буфером, рН 6,8, на колонке с гидроксилпатитом ($3,7 \times 40$ см) цельного ЦП, полученного по методу Бромана ⁽⁷⁾ из ретраплацентарной сыворотки крови человека. Белок подвергали диссоциации пятью различными способами (табл. 1). Седиментационные опыты проводили на аналитических ультра-

Т а б л и ц а 4

Молекулярные характеристики при различных способах диссоциации церулоплазмينا человека (ЦП-1)

Способы обработки белка и характеристика растворов	Коэффициент седиментации $S_{20, w}$, ед. Сведберга	Коэффициент диффузии $D_{20, w}$, 10^7 см ² /сек	Молекулярный вес		Примечания
			по формуле Сведберга $M_S, D = \frac{RT}{(1 - v\rho)} \cdot \frac{S_{20, w}}{D_{20, w}}$	по методу Арчибальда (*)	
Нативный в 0,1 М К-фосфатном буфере рН 6,8 ± 0,2 М КСl	7,4	4,4	148 000	$M_{app} = 151\,000 \pm 5000$	$M_{мениск}^{app} = M_{дно}^{app}$ с точн. 6%
Сукцинированный (15 : 1) в 0,1 М К-фосфатном буфере рН 6,8 ± 0,02 М КСl	3,4 ($c = 0,7\%$)	—	—	$M_{app} \approx 50\,000 \div 80\,000$	Сильная гетерогенность
В 0,05 М Na-боратном буфере рН 12,3 (двое суток диализа)	3,8	4,6	70 000	$1/M_{app} = (1,12 \pm 0,44) \cdot 10^{-5}c$ $M_w = 89\,000 \pm 7000$	$M_M^{app} = M_D^{app}$ с точн. 8%
Сукцинированный (15 : 1) в 0,05 М Na-боратном буфере рН 12,3 (двое суток диализа)	3,3	3,0	93 000	$1/M_{app} = (1,21 \pm 2,4) \cdot 10^{-5}c$ $M_w = 83\,000 \pm 7000$	$M_M^{app} = M_D^{app}$ с точн. 8%
8 М мочевины в 0,1 М К-фосфатном буфере рН 6,8 ± 0,02 М КСl (четыре суток диализа)	3,0	—	—	$1/M_{app} = (1,18 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}c$ $M_w = 85\,000 \pm 7000$	$M_M^{app} = M_D^{app}$ с точн. 8%
Восстановленный меркаптоэтанолом в 6 М НСl-гуанидине; лиофильно высушен и растворен в 0,05 М Na-боратном буфере рН 12,3	3,6	4,0	76 000	$1/M_{app} = (1,24 \pm 0,42) \cdot 10^{-5}c$ $M_w = 81\,000 \pm 7000$	$M_M^{app} = M_D^{app}$ с точн. 8%

центрифугах «Спинко», модель Е, или УЦА-6. Скоростная седиментация осуществлялась при 40 000 — 60 000 об/мин и 20°. Седиментационные коэффициенты $s_{20, w}$ приводили к условиям воды обычным способом, а удельный парциальный объем принимали равным $\bar{v} = 0,713 \text{ см}^3/\text{г}$ ⁽⁸⁾. Мол. веса по методу Арчибалда определялись при скоростях вращения ротора 5784—7928 об/мин и 20°. Для расчета использовали известное соотношение

$$M_{app} = \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \cdot \frac{dc/dr}{cr}$$

(см. ⁽⁹⁾). M_{app} измеряли при концентрациях раствора от 0,2 до 0,8%, строили концентрационную зависимость и в случаях не сильной гетерогенности экстраполяцией к $c = 0$ определяли M_w , ибо $1/M_{app} = 1/M_w + 2Bc$, где B — второй вириальный коэффициент, c — концентрация, а M_w — средневесовой мол. вес ⁽¹⁰⁾. Начальную концентрацию белка определяли каждый раз в отдельном опыте с границеобразующей кюветой капиллярного типа. Одновременно в этом же опыте по уширению пика ⁽¹¹⁾ определялся коэффициент диффузии: $D = 1/4\pi t \cdot 1/A^2(Q/H)^2$, где Q и H — площадь и высота пика, соответственно, A — коэффициент увеличения оптической системы, t — время. Коэффициент диффузии приводили к условиям воды: $D_{20, w} = D_{293/293} + T^0\eta/\eta_{20, w}$.

Из рассмотрения табл. 1, в которой приведены условия диссоциации и характеристика растворов белка, легко установить, что независимо от условий диссоциации, которые были весьма разнообразны, мол. вес субъединиц оставался в пределах 70 000 — 93 000. Таким образом, в любом случае исходный ЦП-1 распадался только до полумолекул.

Распад молекулы ЦП на 2 субъединицы под действием сукцинангидрида и щелочи согласуется с результатами работы Пойлона и Бирна ⁽³⁾. Исследуя восстановленный β-меркаптоэтанолом и ампютиллованный в 8 *M* мочевины ЦП, Симонс и Бирн ⁽³⁾ получили после гель-фильтрации на сефадексе Г-200, а также при хроматографии на биогеле Р-150 или электрофорезе в полиакриламидном геле несколько отличающихся по подвижности фракций, которые после растворения в 20% уксусной кислоте анализировались в ультрацентрифуге по методу Юфантиса ⁽¹²⁾. Для двух близких фракций β' и β'', полипептидные цепи которых на N-конце содержали лизин, авторы нашли мол. вес. $58\,900 \pm 5900$, а для фракции α с N-концевым валином $15\,900 \pm 600$, соответственно. Симонс и Бирн предложили модель четвертичной структуры ЦП человека в виде тетрамера α₂β'β''. Чтобы удовлетворить экспериментальным данным по диссоциации ЦП на две субмолекулы при сукцинировании, действии щелочи, 8 *M* мочевины и 6 *M* HCl-гуанидина, а также данным по половинному в сравнении с максимумом содержанию пептидов в триптических гидролизатах ЦП ⁽¹³⁾, следовало считать, что к каждой β-цепи с помощью S—S-связи присоединена α-цепь и эти практически идентичные пары αβ удерживаются уже с помощью нековалентных взаимодействий. Объяснить же, почему при N-концевом анализе определяется равное количество валина (N-конец α-цепей) и лизина (N-конец β-цепей), по 1 молу на 1 моль исходного ЦП ⁽¹⁴⁾, можно лишь весьма искусственным путем, считая, что в одной полумолекуле α-цепь соединяется своим C-концом с N-концом β-цепи, а в другой полумолекуле, напротив, N-конец α-цепи соединен с C-концом β-цепи, при этом N-концы цепей в месте соединения по неизвестным причинам не определяются. Но даже если отвлечься от этой трудности и принять модель Симонса и Бирна, то при диссоциации восстановленного β-меркаптоэтанолом ЦП в 6 *M* HCl-гуанидине после диализа белка против 0,05 *M* щелочного буфера pH 12,3, где агрегация невозможна (см. последнюю строчку табл. 1), мы должны были бы получить в растворе набор α и β-цепей, который давал бы, принимая во внимание значения их мол. весов, средневесовой мол. вес $M_w = 50\,000$ (максимальная оценка). По нашим

же данным, $M_w = 81\,000 \pm 7000$, что решительно опровергает температурную модель $\alpha_2\beta'\beta''$ по Симонсу и Бирну.

Пусть все же ЦП состоит из 4 субъединиц: двух больших и двух малых с мол. весами M и μ соответственно. Возникает вопрос: каков может быть верхний предел мол. веса малых субъединиц, который невозможно зарегистрировать методом Арчибальда при полученной в нашей работе степени точности ± 7000 ?

Молекулярный вес исходной молекулы ЦП составим так: $M_{\text{ЦП}} = 2M + 2\mu$. Средневесовой мол. вес этой системы равен: $M_w = 2M^2 / M_{\text{ЦП}} + 2\mu^2 / M_{\text{ЦП}}$. Выразим величину $M - M_w$ как функцию μ :

$$M - M_w = -4 / M_{\text{ЦП}} (\mu - M_{\text{ЦП}} / 8)^2 + M_{\text{ЦП}} / 16.$$

Тогда максимальный возможный вес малой субъединицы μ_{max} находится из условия $M - M_w = \Delta M_{\text{экс}}$.

Следовательно,

$$\mu_{\text{max}} = -\sqrt{-M_{\text{ЦП}} / 4(\Delta M_{\text{экс}} - M_{\text{ЦП}} / 16)} + M_{\text{ЦП}} / 8.$$

При $\Delta M_{\text{экс}} = 7000$ и $M_{\text{ЦП}} = 160\,000$ $\mu_{\text{max}} = 9000$. Максимальная весовая доля триптических малых субъединиц составляет 11,3%. Их можно было бы «увидеть», произведя опыт с большой концентрацией белка и регистрируя процесс седиментации с помощью весьма чувствительной методики ультрафиолетового поглощения. Подобный опыт при концентрации белка 0,8% был нами произведен и не обнаружил каких-либо медленно седиментирующих компонентов для восстановленного и карбоксиметилированного в 6 M HCl-гуанидине ЦП-1, диализированного против 0,05 M Na-боратного буфера pH 12,3.

Таким образом, можно констатировать, что молекула нативного ЦП человека содержит только 2 субъединицы близкого мол. веса.

Такой же результат был получен для ЦП свиньи⁽¹⁵⁾, однако субъединицы ЦП свиньи абсолютно идентичны друг другу и на N-конце содержат тирозин, а на C-конце — серин. В случае ЦП человека N-концевые аминокислотные остатки не одинаковы (валин и лизин), что свидетельствует о наличии двух типов субъединиц, хотя и находящихся в равном количественном соотношении⁽¹⁴⁾. Поскольку при анализе пептидных карт триптического гидролизата восстановленного и карбоксиметилированного ЦП-1 выявляется только 60—65 пептидов⁽¹³⁾ при 120 остатках лизина и аргинина, по которым происходит триптический гидролиз, необходимо допустить в качестве наиболее вероятного вывода, что имеющиеся в молекуле ЦП-1 человека две субъединицы отличаются лишь небольшим участком полипептидной последовательности у N-конца.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступило
24 IV 1972

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. H. Scheinberg, In: The Biochemistry of Copper, N. Y.—London, 1966, p. 513; L. Broman, In: Molecular Basis of Some Aspects of Mental Activity, 2, N. Y.—London, 1966. ² С. А. Нейфах, И. М. Василец, М. М. Шавловский, Молек. биол., 5, 917 (1971). ³ M. D. Poulík, Nature, 194, 842 (1962); M. D. Poulík, Ann. N. Y. Acad. Sci., 151, 476 (1968); W. N. Poillon, A. G. Bearn, Biochim. et biophys. acta, 127, 407 (1966); K. Simons, A. G. Bearn, Biochim. et biophys. acta, 175, 260 (1969). ⁴ R. Richterich, A. Temperli, H. Aebi, Biochim. et biophys. acta, 56, 240 (1962); H. F. Deutsch, G. B. Fisher, J. Biol. Chem., 239, 3325 (1964). ⁵ К. А. Мошков, И. М. Василец, В. П. Кушнер, Молек. биол., 6, 52 (1972). ⁶ И. М. Василец, К. А. Мошков, В. П. Кушнер, Молек. биол., 6, 246 (1972). ⁷ L. Broman, Acta Soc. med. upsaliensis, 69, Suppl. 7, 78 (1964). ⁸ С. В. Каспер, Н. F. Deutsch, J. Biol. Chem., 238, 2325 (1963). ⁹ В. О. Шпикитер, В кн.: Современные методы в биохимии, 1, Медицина, М., 1964. ¹⁰ H. Fujita, H. Inagani et al., J. Phys. Chem., 66, 4 (1962). ¹¹ K. Kawahara, Biochemistry, 8, 2551 (1969). ¹² D. A. Yphantis, Biochemistry, 3, 297 (1964). ¹³ М. М. Шавловский, И. М. Василец, Биохимия, 35, 1031 (1970). ¹⁴ Л. А. Роннова, М. М. Шавловский, И. М. Василец, Биохимия, 34, 1008 (1969). ¹⁵ H. Mukasa, S. Kajiyama et al., Biochim. et biophys. acta, 168, 132 (1968).