



УДК 547.931.1 : 543.422.27.8

РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ  
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА  
И ЕГО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ*Зайцев В. Н., Мошков Е. А., Шавловский М. М.,  
Нейфак С. А.**Институт экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР, Ленинград;**Институт кристаллографии  
Академии наук СССР, Москва*

Результаты физико-химического изучения церулоплазмينا (ЦП) человека, ЦП, лишеного остатков сиаловых кислот (бЦП) и ЦП, ингибированного азидом Na ( $\text{NaN}_3$  — ЦП) указывают на сходство конформаций молекул нативного белка и его двух модифицированных форм. Проведено предварительное рентгеноструктурное исследование монокристаллов нативного ЦП, бЦП и  $\text{NaN}_3$  — ЦП.

Медьсодержащий гликопротеид плазмы крови — ЦП — впервые был выделен в чистом виде и получен в кристаллическом состоянии Холмбергом и Лауреллом [1]. В состав молекулы ЦП входит 8 атомов меди и несколько олигосахаридных цепей, имеющих в качестве концевых углеводных остатков сиаловые кислоты [2]. Белок обладает каталитическими свойствами, осуществляя окисление ряда биологически важных соединений, а также синтетических субстратов, в частности *n*-фенилендиамина [3]. Основная физиологическая функция ЦП заключается в транспорте меди из печени, в которой происходит образование апобелка и встраивание меди в молекулу белка, ко всем клеткам, синтезирующим медьсодержащие ферменты [4]. Наследственный дефицит ЦП в плазме крови и в печени [5] человека приводит к развитию тяжелого расстройства обмена меди (гепатолентикулярная дегенерация или болезнь Вильсона [6, 7]). Функциональная недостаточность ЦП при этом заболевании обусловлена нарушением синтеза белка в печени и изменением его структуры [5, 8, 9].

Для выяснения природы молекулярных изменений ЦП при этом заболевании наиболее полную информацию могут дать методы рентгеноструктурного анализа [10]. Результатом рентгенографического исследования монокристаллов нативного ЦП [11] явилось установление содержания двух молекул ЦП с *M* 132 000 в асимметричной части ячейки с пространственной группой *I* 4. Столь большой молекулярный вес, приходящийся на независимую часть ячейки, в значительной степени затрудняет проведение дальнейших кристаллографических исследований с высоким разрешением. Поэтому мы предприняли поиск новых, более удобных для рентгеноструктурного исследования кристаллических форм ЦП. В настоящем сообщении представлены некоторые характеристики модифицированных

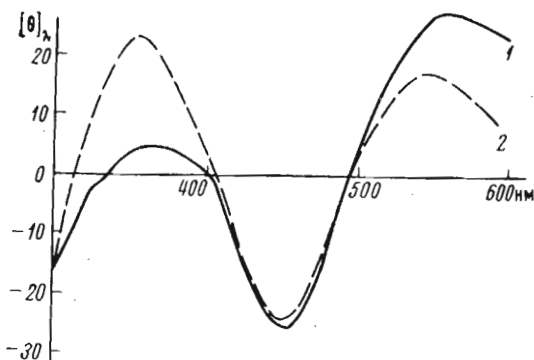


Рис. 1

Рис. 1. Спектры КД нативного ЦП (1) и  $\text{NaN}_3$  — ЦП (2)

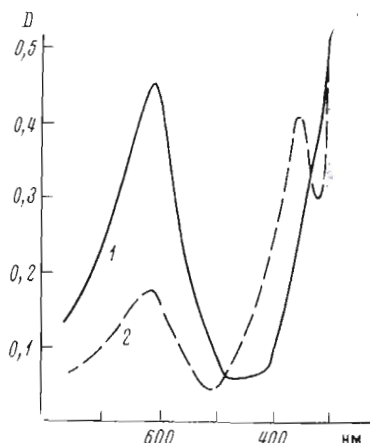


Рис. 2

Рис. 2. Спектры поглощения нативного ЦП (1) и  $\text{NaN}_3$  — ЦП (2)

форм белка, описано получение крупных монокристаллов препаратов ЦП и приведены результаты рентгенографического изучения этих кристаллов.

Нативный ЦП кристаллизуется на холоду из 0,025 M Na-ацетатного буфера (рН 5,0) в виде микроскопических игл голубого цвета. Кристаллические препараты белка характеризуются соотношением оптических плотностей  $D_{610}/D_{280} = 0,045-0,046$ , что указывает на 99—100%-ную степень очистки. При электрофорезе кристаллические препараты нативного ЦП мигрируют в виде единичной узкой зоны, обладающей специфической ферментативной активностью. Седиментограммы образцов ЦП характеризуются одним симметричным пиком с константой седиментации 7,3 S. Обработка нативного ЦП вирусной нейраминидазой сопровождается отщеплением 60—70% остатков сиаловых кислот; при этом происходит некоторое снижение ферментативной активности и замедление скорости миграции белка при электрофорезе, в то время как другие параметры практически не изменяются. Обработка нативного ЦП азидом Na приводит к полному подавлению ферментативной активности и к изменению оптических свойств белка.  $\text{NaN}_3$  — ЦП, так же как и нативный ЦП, на холоду кристаллизуется в виде микроскопических тетрагональных призм игольчатой формы, в то время как ЦП, обработанный нейраминидазой (бЦП), в аналогичных условиях образует кристаллы в виде гексагональных пластинок, которые по форме идентичны описанным ранее [12].

Спектр КД нативного ЦП (рис. 1) состоит из положительной полосы с максимумом при 550 нм, отрицательной полосы при 450 нм и положительной полосы при 360 нм с плечом при 330 нм. При длинах волн  $< 335$  нм дихроичное поглощение становится отрицательным. Точки пересечения линии нулевого поглощения находятся при 495 и 400 нм. Удаление сиаловых кислот из ЦП не приводит к изменению спектра КД. По данным ДОВ параметры уравнений Моффита ( $a_0$  и  $b_0$ ) и Шехтера — Блаута ( $A_1$  и  $A_2$ ) для нативного ЦП и бЦП равны  $a_0 = -252$ ,  $b_0 = -64$ ,  $A_1 = 135$ ,  $A_2 = -322$ . Судя по величинам дисперсионных параметров, содержание  $\alpha$ -спиральных участков в нативном ЦП и бЦП невелико и составляет 10—20%. Приближительная оценка содержания  $\beta$ -конформации в белке по номограмме Гольдзака [13] с учетом аминокислотного состава [14] показывает, что на долю этого типа структуры приходится не более 20%. Таким образом, по данным ДОВ и КД вторичная структура и микроокружение меди в нативном ЦП и бЦП идентичны. Спектры поглощения и КД  $\text{NaN}_3$  — ЦП меняются только в области поглощения медных хромофоров (рис. 1,

2), что указывает на связывание  $N_3^-$  с  $Cu$  активного центра. Комплексообразование азида  $Na$  с ЦП, по-видимому, не сопровождается существенными структурными изменениями молекулы белка. Связывание азида  $Na$  с ЦП полностью обратимо: азид  $Na$  может быть удален из комплекса диализом или с помощью гель-фильтрации. После его удаления белок вновь приобретает спектр, характерный для интактного ЦП. В процессе диализа суспензии кристаллов  $NaN_3$  — ЦП против буфера, не содержащего азида  $Na$ , окраска кристаллов изменяется от зеленой до голубой.

Учитывая структурную идентичность нативного ЦП, бЦП и  $NaN_3$  — ЦП наряду с некоторыми физико-химическими отличиями (см. таблицу), мы решили провести определение кристаллографических характеристик крупных монокристаллов этих форм белка. Монокристаллы нативного ЦП образуются в течение 1—3 сут (см. раздел «Экспериментальная часть») в форме тетрагональных призм интенсивно голубого цвета. Наиболее крупные кристаллы размером до 4 мм в длину и 2 мм<sup>2</sup> в сечении образуются при рН 5,5—5,6. Для интервала рН 5,7—5,8 характерно образование звездобразных друз. Форма и размеры полученных кристаллов (рис. 3) полностью совпадают с описанными ранее [11]. При комнатной температуре кристаллы постепенно растворяются в течение 10—12 сут, при этом рН маточного раствора повышается до 6,2. Хранение пробирок с кристаллами при 4° с периодическим добавлением небольших количеств 0,05 М  $Na$ -ацетатного буфера (рН 5,0) увеличивает время жизни кристаллов до 2 месяцев. В запаянных капиллярах для рентгеновских исследований с каплей маточного раствора кристаллы белка растворяются в течение суток. В капиллярах над 0,05 М  $Na$ -ацетатным буфером (рН 5,0) кристаллы стабильны в течение 2 недель. Мы обнаружили также, что кристаллы остаются без видимых изменений в капиллярах над 50%-ным раствором сульфата аммония в течение 2—3 недель. В ходе рентгеновского эксперимента, однако, выяснилось, что использование 50%-ного раствора сульфата аммония ведет к исключительно плохому качеству дифракционных пятен на рентгенограммах.

Монокристаллы  $NaN_3$  — ЦП имеют зеленый цвет, однако по форме роста и габитусу они гомологичны кристаллам нативного ЦП, что указывает на изоморфизм этих кристаллов. При инкубации кристаллов в 0,025 М  $Na$ -ацетатном буфере (рН 4,5) в течение 3—5 ч цвет кристаллов  $NaN_3$  — ЦП изменяется на голубой, характерный для кристаллов нативного ЦП.

Монокристаллы бЦП в форме гексагональных пластинок голубого цвета появляются на 2—3 сут роста при комнатной температуре в интервале рН 4,9—5,2 и на 7—10 сут достигают максимальных размеров — 0,5 × 0,5 × 0,4 мм (рис. 3). В кварцевых капиллярах над маточным раствором кристаллы бЦП обесцвечиваются и растворяются через 2—3 сут. В капиллярах над 0,05 М  $Na$ -ацетатным буфером (рН 5,0) кристаллы остаются стабильными в течение 2 недель. Получение крупных кристаллов бЦП, пригодных для рентгенографического исследования, до сих пор описано не было.

Плотность кристаллов нативного ЦП, измеренная методом флотации, равна  $1,106 \pm 0,002$  г/см<sup>3</sup>, (среднее из 5 измерений). Близкое значение получено для плотности кристаллов  $NaN_3$  — ЦП —  $1,105 \pm 0,002$  г/см<sup>3</sup> (среднее из 6 измерений). Плотность кристаллов бЦП составляет  $1,135 \pm 0,007$  г/см<sup>3</sup> (среднее из 8 измерений). Сравнительно большая ошибка определения плотности кристаллов бЦП может быть связана с тем фактом, что эти кристаллы имеют меньшие размеры, чем кристаллы нативного ЦП. Как следствие этого скорость высыхания кристаллов бЦП на воздухе при внесении в колонку выше, чем для кристаллов нативного ЦП. Действительно, Лоу и соавт. [15] показали, что плотность кристалла  $\beta$ -лактоглобулина весом 10 мг увеличивается на 0,002 г/см<sup>3</sup> за каждую минуту пребывания на воздухе вне маточного раствора, в то время как для кристалла весом 1 мг плотность увеличивается на 0,006 г/см<sup>3</sup> за минуту.

Параметры	ЦП	бЦП	$\text{NaN}_3$ — ЦП
$D_{610}/D_{230}$	0,045—0,046	0,045	0,018
Содержание $\text{Cu}$ , %	0,34	0,34	0,33
Оксидазная активность, ед. акт.	25	21	0
$s_{20, w}$ , S	7,3	7,4	7,2
$d_{20, w} \cdot 10^7$ см <sup>2</sup> /с	4,4	3,9	4,0
$M$	151 000	158 000	152 000
Содержание сиаловых кислот, %	2,2	0,6	2,3

Прецессионные рентгенограммы кристаллов нативного ЦП и бЦП представлены на рис. 4. Параметры ячейки кристаллов нативного ЦП измерены по рентгенограммам  $hk0$  (рис. 4, а) и  $h0l$  и уточнены с помощью дифрактометра:  $a = b = 268,2 \pm 0,5 \text{ \AA}$ ,  $c = 129,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ . Поле максимального разрешения рентгенограмм —  $6 \text{ \AA}$ . Симметрия рентгенограмм и систематические погасания общего типа ( $h + k + l = 2n$ ) позволяют отнести кристаллы к пространственной группе  $I$  4. Этот результат, так же как и результат измерения плотности влажных кристаллов нативного ЦП, полностью согласуются с данными, полученными ранее [11].

Для кристаллов  $\text{NaN}_3$  — ЦП не удалось, ввиду их большой лабильности в капиллярах, получить прецессионные рентгенограммы с большим разрешением. Из сравнения 2°-прецессионных рентгенограмм  $hk0$  и  $h0l$  кристаллов  $\text{NaN}_3$  — ЦП с соответствующими рентгенограммами кристаллов нативного ЦП следует вывод об изоморфизме этих кристаллов.

Параметры ячейки кристаллов бЦП, измеренные по рентгенограммам  $hk0$  (рис. 4) и  $h0l$  равны:  $a = b = 215,0 \pm 1,0 \text{ \AA}$ ,  $c = 84,2 \pm 0,1 \text{ \AA}$ . Объем ячейки  $V_{\text{бЦП}} = 3,32 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$ . Симметрия рентгенограмм:  $hk0$  —  $6mm$ ,  $hkl$  —  $3m$ ,  $hhl$  —  $mm$ . Систематические погасания общего типа отсутствуют, погасания для рефлексов типа  $00l$  —  $l = 3n + 1$  наблюдаются лишь в зоне максимального разрешения рентгенограмм ( $7 \text{ \AA}$ ), поэтому выбор пространственной группы неоднозначен —  $P3_121$  ( $P3_221$ ) или  $P321$ .

Для вычисления числа молекул белка, содержащихся в асимметричной части ячейки, использовалось соотношение:

$$M_{\text{вас}} = V_{\text{ас}} \rho_{\text{б}} (\rho_{\text{к}} - \rho_{\text{ж}}) / (\rho_{\text{б}} - \rho_{\text{ж}}) \cdot 1,66,$$

где  $M_{\text{вас}}$  — молекулярный вес, содержащийся в асимметричной части ячейки,  $V_{\text{ас}}$  — объем асимметричной части,  $\rho_{\text{б}}$ ,  $\rho_{\text{к}}$  и  $\rho_{\text{ж}}$  — плотность сухих и влажных кристаллов белка и кристаллизационной жидкости соответственно. Принимая  $\rho_{\text{б}} = 1,401 \text{ г/см}^3$  [11, 16] и  $\rho_{\text{ж}} = 1,000 \text{ г/см}^3$ , получаем для кристаллов нативного ЦП значение  $M_{\text{вас}} = 266 000$ , что соответствует содержанию 2 молекул белка в асимметричной части ячейки. Расчет  $M_{\text{вас}}$  для кристаллов бЦП при тех же значениях  $\rho_{\text{б}}$  и  $\rho_{\text{ж}}$  дает величину 157 000, что указывает на содержание 1 молекулы белка в асимметричной части ячейки. К аналогичному выводу можно прийти, рассматривая отношение объемов ячеек обеих кристаллических форм —  $V_{\text{цп}}/V_{\text{бцп}}$ . Значение этого отношения с учетом разницы в коэффициентах заполнения белком ячейки (0,34 — для кристаллов нативного ЦП и 0,41 — для кристаллов бЦП) оказывается равным  $2/3$ , т. е. отношению числа молекул в ячейках кристаллов нативного ЦП и бЦП для случая содержания 1 молекулы бЦП в асимметричной части ячейки кристаллов.

Рентгенографическое исследование кристаллов нативного ЦП и его двух модифицированных форм показывает пригодность этих кристаллов для рентгеноструктурного анализа. Более высокая симметрия простран-

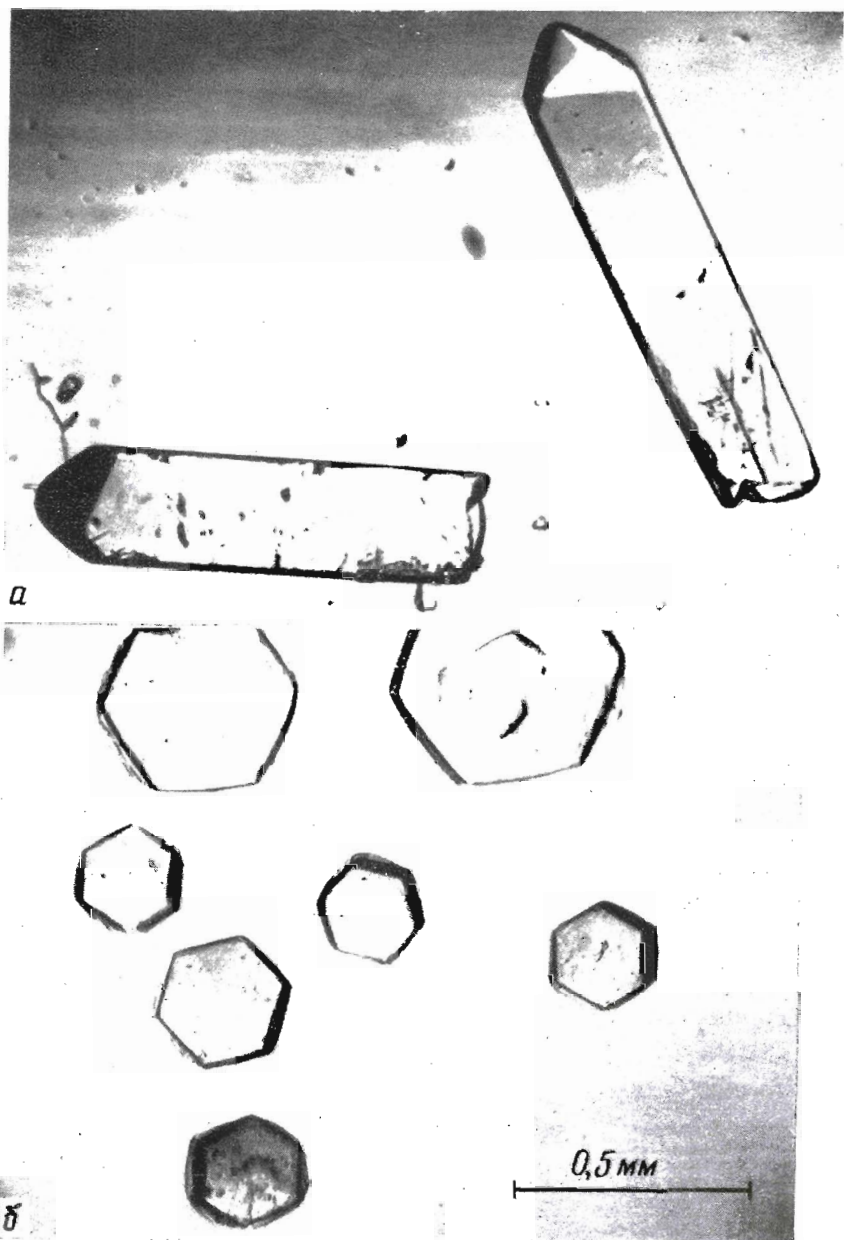


Рис. 3. Кристаллы нативного ЦП (а) и БЦП (б)

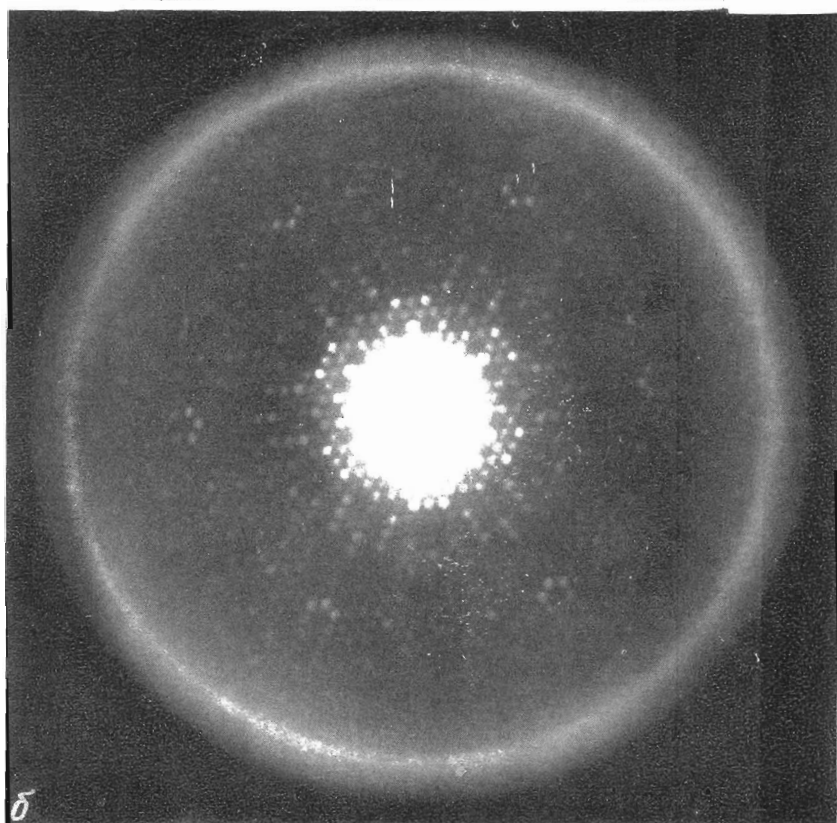
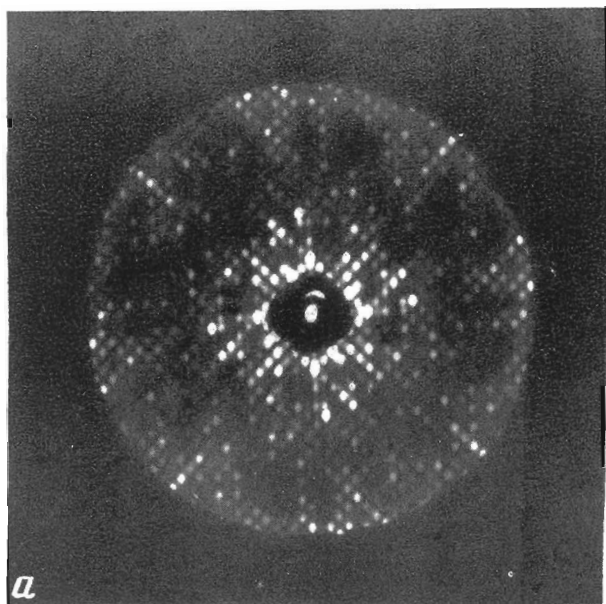


Рис. 4. Прецессионные рентгенограммы  $hk0$  кристаллов нативного ЦП (а), бЦП (б):  
а — угол прецессии  $\mu 4^\circ$ , экспозиция 3 ч; б —  $\mu 6^\circ$ , экспозиция 12 ч.

ственной группы бЦП и наличие лишь одной молекулы бЦП в независимой части ячейки кристаллов бЦП дают основание считать кристаллы бЦП более перспективными для проведения рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением. Исследование кристаллов бЦП может дать полную информацию о строении молекулы нативного ЦП, поскольку, по нашим данным и результатам работ [12, 17], конформация молекулы ЦП и состояние его активного центра при отщеплении сиаловых кислот не претерпевают существенных изменений.

### Экспериментальная часть

*Препараты нативного ЦП* получали из сыворотки ретроплацентарной крови по методу, описанному ранее [18], и подвергали кристаллизации путем диализа 5—7%-ных растворов белка против 0,025 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0). Образующиеся мелкие кристаллы осаждали центрифугированием и растворяли в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 7,0), содержащем 0,3 М NaCl. Полученные препараты ЦП (концентрация 10—12%) использовали в дальнейшей работе после центрифугирования при 20 000 об/мин в течение 1 ч.

*Препараты бЦП* получали, инкубируя исходные растворы нативного ЦП при 37° с суспензией вируса гриппа Гонконг А-2 или вируса болезни Нью-Кастла (300—400 мкг/см<sup>3</sup>), обладающих высокой нейраминидазной активностью. Через 12 ч вирусные частицы осаждали центрифугированием при 20 000 об/мин и белок диализовали против 0,045 М Na-ацетатного буфера, рН 7,0.

*Препараты NaN<sub>3</sub> — ЦП* получали, добавляя в исходный раствор нативного ЦП азид Na в молярном соотношении NaN<sub>3</sub> : белок, равном 10 : 1.

*Скоростную седиментацию* препаратов ЦП проводили в аналитической центрифуге MSE (Англия) при скорости вращения ротора 60 000 об/мин и температуре 20,0 ± 0,05°. Парциальный удельный объем белка принимали 0,713 см<sup>3</sup>/г [11].

*Коэффициенты диффузии (d)* препаратов ЦП определяли в интерференционном диффузомере Цветкова [19] при температуре 20,0 ± 0,02°.

*Измерения ДОВ и КД* проводили в спектрополяриметре «Cary-60» (США). Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути от 0,01 до 0,1 дм, концентрацию белка изменяли от 0,1 до 3%. Для описания ДОВ в видимой и близкой ультрафиолетовой частях спектра и расчета степеней α-спиральности находили параметры  $a_0$  и  $b_0$  уравнения Моффита — Янга [20], а также параметры  $A_1$  и  $A_2$  уравнения Шехтера — Блаута [21].

*Спектры поглощения* снимали в двухлучевом спектрофотометре «Hitachi», модель 356 (Япония).

*Электрофорез* проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле, в триглицидном буфере (рН 8,5).

*Концентрацию ЦП* измеряли по специфическому поглощению при  $\lambda$  280 и 610 нм, принимая  $D_{1\text{ см}, 280}^{1\%} = 14,8$  и  $D_{1\text{ см}, 610}^{1\%} = 0,68$ .

*Ферментативную активность ЦП* определяли по методу Равина [22], используя в качестве субстрата *n*-фенилендиамин. За единицу активности принимали прирост оптической плотности при 530 нм ( $D_{530}$ ) за 1 ч в пересчете на 1 мг белка.

*Содержание сиаловых кислот* в образцах определяли с помощью резорцинового метода Свеннерхольма [23], используя в качестве стандарта *N*-ацетилнейраминную кислоту.

*Содержание меди в ЦП* определяли в атомном абсорбционном спектрофотометре «Perkin-Elmer» (США) после озоления препаратов в смеси серной и хлорной кислот.

*Получение крупных монокристаллов нативного ЦП и  $\text{NaN}_3$  — ЦП.* Препараты исходного ЦП диализовали против 0,045 М Na-ацетатного буфера (рН 7,0) и далее раствор подкисляли при комнатной температуре 0,3 М Na-ацетатным буфером (рН 4,0), тщательно следя за изменением рН. В интервале рН 5,8—5,5 отбирали алиquotы раствора в маленькие пробирки, которые оставляли в защищенном от света месте при комнатной температуре. Кристаллы  $\text{NaN}_3$  — ЦП получали аналогичным образом, добавляя азид Na в подготовленный для кристаллизации раствор нативного белка в молярном соотношении  $\text{NaN}_3$  : белок, равном 10 : 1.

*Получение крупных монокристаллов бЦП.* 10—12%-ные растворы бЦП диализовали против 0,045 М Na-ацетатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,1 М NaCl. Раствор белка осторожно подкисляли до значений рН 5,8—4,8 с помощью 0,3 М Na-ацетатного буфера (рН 4,0), и алиquotы белка оставляли при комнатной температуре в защищенном от света месте.

*Плотность влажных кристаллов белка* определяли в колонке (70 × × 2 см), заполненной смесью бромбензола ( $\rho$  1,50 г/см<sup>3</sup>) и ортоксилотола ( $\rho$  0,86 г/см<sup>3</sup>), по методу Линдерстрёма-Ланга [24]. Для сокращения времени установления градиента плотности в колонке создавали преформированный градиент с помощью смесителя. Калибровку градиента плотности производили каплями раствора KI известной концентрации. Плотность растворов KI определяли пикнометрически с точностью  $\pm 10^{-4}$  г/см<sup>3</sup>. Кристаллы вносили в колонку на жгутике из ваты, смоченном маточным раствором. Такой способ внесения до некоторой степени предохраняет кристаллы от быстрого высыхания на воздухе. Определение положения кристалла производили спустя 5—10 мин после достижения кристаллом равновесного положения.

*Рентгеновскую съемку кристаллов* проводили прецессионным методом в аппаратах с вращающимся анодом «Rigaku Denki» (Япония) и «Elliott» (Великобритания) на  $\text{Cu } K_\alpha$ -излучении. Кристаллы белка помещали в кварцевые капилляры с каплей 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0). Время экспозиции прецессионных рентгенограмм для кристаллов нативного ЦП и бЦП составляло от 3 до 14 ч при расстоянии кристалл — пленка 100 мм, коллиматоре первичного пучка 0,3 мм и угле прецессии 4—6°. На рентгенограммах кристаллов не обнаруживалось видимых изменений в интенсивности дифракционных пятен в течение 48 ч непрерывного облучения («Elliott», 40 кВ — 40 мА, проекция фокуса 0,2 × 0,2 мм). Кристаллы  $\text{NaN}_3$  — ЦП после помещения в кварцевые капилляры стандартным способом с каплей маточного раствора или 0,03—0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0—5,2) обесцвечивались и растворялись в течение 5—6 ч; в связи с этим съемку кристаллов  $\text{NaN}_3$  — ЦП производили с углом прецессии 2,0—2,5°, что сокращало время экспозиции до 1—2 ч.

Авторы благодарны Б. К. Вайнштейну и Э. Г. Арутюняну (Институт кристаллографии АН СССР) за полезные советы и внимание к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Holmberg C. G., Laurell C. B. (1948) Acta chem. scand., 2, 550—556.
2. Jamienson G. A. (1965) J. Biol. Chem., 240, 2019—2027.
3. Holmberg C. G. (1964) Scand. J. Lab. Clin. Med., 3, 103—113.
4. Broman L. (1966) «Molecular basis of some aspects of mental activity» Acad. Press, N. Y.—London, v. 2, 131—150.
5. Neifakh S. A., Monakhov N. K., Shaposhnicov A. M., Zubzhitski Yu. N. (1969) Experientia, 25, 337—344.
6. Scheinbetg J. N. (1952) Science, 3018, 484—485.
7. Cartwright G. E., Marcowitz H., Shields G. S., Wintrobe M. M. (1960) Amer. J. Med., 28, 555—563.
8. Shaposhnicov A. M., Zubzhitsky Yu. N. (1969) Experientia, 25, 424—426.
9. Neifakh S. A., Vasiletz I. M., Shavlovski M. M. (1972) Biochem. Genetics, 6, 231—238.
10. Вайнштейн Б. К. (1966) Успехи физических наук, 88, 527—563.



11. Magdoff—Fairchild B., Lovell F. M., Low B. W. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3497—3498.
12. Morell A. G., Stenlieb I., Scheinberg I. H. (1969) *Science*, **166**, 1293—1294.
13. Godsack D. E. (1969) *Biopolymers*, **7**, 299—313.
14. Kasper C. B., Deutsch H. F. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2325—2337.
15. Low B. W., Richards F. M. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 1660—1666.
16. Eisenberg D. (1970) in «*The Enzymes*» Acad. Press. N. Y. — London 3rd, vol. 1, 1—89.
17. Jonson C. A., Loevstad R. A., Walaas E., Walaas O. (1970) *Experientia*, **26**, 134—135.
18. Василец И. М., Коннова Л. А., Кушнер В. П., Божков В. М., Зодоровская Е. П., Муха Г. В. (1968) *Биохимия*, **33**, 1285—1295.
19. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. (1963) *Структура макромолекул в растворах*, стр. 370—378, «Наука», Л.
20. Moffitt W., Yang I. T. (1956) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **42**, 596—603.
21. Shecter E., Blout E. R. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 794—800.
22. Ravin H. A., (1956) *Lancet*, **1**, 726—727.
23. Svennerholm L. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 604—614.
24. Linderstrom—Lang K. (1937) *Nature*, **139**, 713—714.

Поступила в редакцию  
12.II.1975

## AN X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC STUDY OF HUMAN CERULOPLASMIN AND ITS MODIFIED FORMS

ZAYTSEV V. N., MOSHKOV K. A., SHAVLOVSKY M. M.,  
NEIFAKH S. A.

*Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences,  
of the USSR, Leningrad, Institute of Crystallography, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Some crystallographic parameters of large single crystals of human copper-containing serum protein ceruloplasmin (CP) and of its modified forms were studied. It was shown that CP treated with viral neuraminidase (asialoCP) was crystallized in the form of hexagonal plates while native CP and sodium azide-inhibited CP ( $\text{NaN}_3\text{CP}$ ) formed tetragonal prisms. Conformations of native CP,  $\text{NaN}_3\text{CP}$  and asialoCP were similar despite some differences in electrophoretic mobility and optical properties (absorption, ORD and CD spectra in the region of absorption bands of copper chromophores). The unit cell dimensions of native CP crystals as measured from X-ray precession photographs HKO and HOL are:  $a=b=268.2 \text{ \AA}$ ,  $c=129.1 \text{ \AA}$ . The space group is I4. The average value of the crystal density is  $1.106 \pm 0.002 \text{ gm/cm}^3$ . The asymmetric unit consists of two molecules. The crystals of native CP and  $\text{NaN}_3\text{CP}$  are isomorphous. The unit cell dimensions of the trigonal asialoCP crystals are:  $a=b=215.0 \text{ \AA}$ ,  $c=84.2 \text{ \AA}$ . The space group is determined from the precession photographs HKO, HOL, HHL, HK1 ambiguously: P 3<sub>1</sub>21 or P 3<sub>2</sub>1. The average value of crystal density is  $1.135 \pm 0.007 \text{ gm/cm}^3$ . The asymmetric unit consists of one molecule. The suitability of crystalline forms of CP for the X-ray structure analysis is discussed.