



УДК 577.158.52

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ***Семисотлов Г. В., Мошков К. А., Туроверов К. К.,
Шавловский М. М.**Институт экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР,
Ленинград**Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград*

Удаление меди из церулоплазмينا (ЦП) плазмы крови приводит к двукратному возрастанию квантового выхода и к длинноволновому сдвигу спектра флуоресценции на 5 нм. Эти данные, результаты кислотно-щелочного флуориметрического титрования холо- и апо-ЦП и изменение характера кривых титрования после модификации гистидиновых остатков ЦП диэтилпирокрбонатом позволили сделать вывод о пространственной близости некоторых триптофановых остатков к остаткам гистидина, ответственным за каталитическую активность ЦП, и к ионам меди. Число триптофановых остатков этой группы достаточно велико. В холо-ЦП эти остатки «затушены» ионами меди, в апо-ЦП флуоресцируют с $\lambda_{\text{макс}}$ 343 нм и высоким квантовым выходом. Именно этими остатками определяется сложный характер кривых титрования. Другая группа триптофановых остатков не контактирует с ионами меди и определяет флуоресценцию холо-ЦП ($\lambda_{\text{макс}}$ 335 нм; $q = 0,17$). На флуоресценцию остатков этой группы не влияет изменение рН от 2,5 до 10.

Церулоплазмин (ЦП), медьсодержащий гликопротеид α_2 -глобулиновой фракции сыворотки крови, по своим каталитическим свойствам относится к классу так называемых голубых оксидаз [1, 2] и, по-видимому, выполняет в организме функцию переносчика меди [3]. Особый интерес к изучению ЦП вызван тем, что при тяжелом наследственном заболевании человека — гепатолентикулярной дегенерации (болезни Вильсона — Коновалова) — установлены аномалии структуры и биосинтеза этого белка [4—6].

Значительные размеры молекулы белка (M 130 000), наличие четвертичной структуры [7, 8], большое содержание меди (6—8 атомов) и ее гетерогенность [1] затрудняют исследования структуры ЦП. Поэтому, несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению ЦП (см. обзор [9]), многие вопросы его строения и функционирования остаются невыясненными. Тем не менее имеются определенные данные относительно некоторых аминокислотных остатков, входящих в каталитические центры ЦП. Так, двумя независимыми методами было показано, что остатки гистидина непосредственно связаны с ионами меди в активном центре ЦП [10, 11]. Для дальнейшего анализа структуры активного центра ЦП требовалось применение других методов исследования.

В настоящей работе был применен метод УФ-флуоресценции белка

Сокращения: ЦП — церулоплазмин, ДПК — диэтилпирокрбонат.

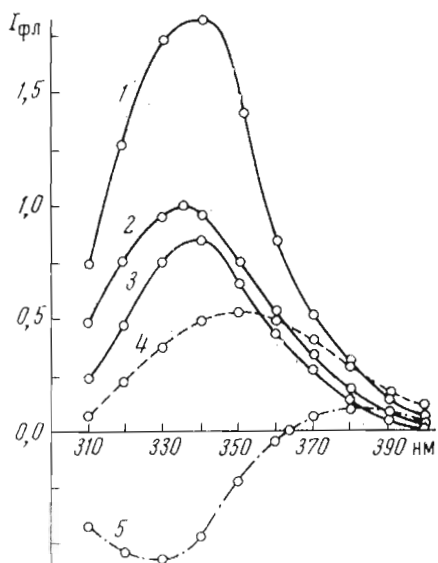


Рис. 1

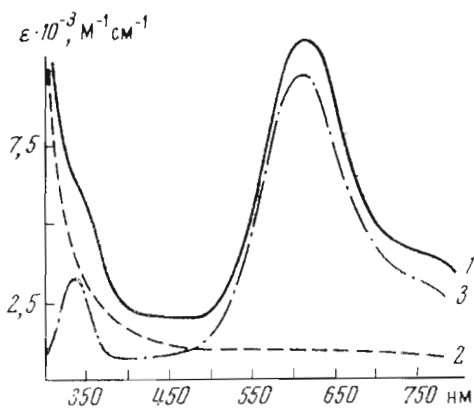


Рис. 2

Рис. 1. Спектры флуоресценции ЦП: 1 — апо-ЦП; 2 — холо-ЦП; 3 — разностный спектр флуоресценции (1—2); 4 — холо-ЦП в растворе 8 М мочевины; 5 — разностный спектр флуоресценции (4—2)

Рис. 2. Спектры поглощения ЦП: 1 — холо-ЦП; 2 — апо-ЦП; 3 — разностный спектр (1—2)

[12, 13]. Значительное число триптофановых (25—27) и тирозиновых (75) остатков в молекуле ЦП [14] осложняет его исследование методом флуоресценции. Однако целесообразность применения этого метода для анализа структуры ЦП в последнее время возросла в связи с появлением данных, свидетельствующих о характерных особенностях флуоресцентных свойств медьсодержащих белков [15—18], а также в связи с указаниями на участие триптофановых остатков в активных центрах ряда этих белков [16, 17].

Поскольку присутствие в белках ионов тяжелых металлов, и в частности меди, приводит к появлению новых характерных полос поглощения [1, 15], а также оказывает существенное влияние на флуоресцентные свойства белков этого класса [15—18], прежде всего было проведено сравнение спектроскопических свойств холо- и апо-ЦП.

Спектры флуоресценции и поглощения холо- и апо-ЦП. Сравнение спектров флуоресценции холо- и апо-ЦП показывает, что удаление меди из ЦП приводит к возрастанию квантового выхода флуоресценции почти в 2 раза (рис. 1). Этот эффект может быть обусловлен либо нарушением всей глобулярной структуры белка, либо увеличением вклада в суммарный спектр флуоресценции остатков триптофана, которые в холо-ЦП «затушены» или флуоресцируют с низким квантовым выходом.

Близкие значения коэффициентов седмексации и диффузии холо- и апо-ЦП [14], а также сохранение аномалий кривых ДОВ в области поглощения пептидных связей и ароматических аминокислотных остатков позволяют считать, что существенных нарушений глобулярной структуры ЦП при отщеплении меди не происходит. Характер разностного спектра флуоресценции (рис. 1, 3) также свидетельствует о том, что длинноволновый сдвиг спектра на 5 нм, наблюдающийся при удалении меди, обусловлен не переходом гидрофобных триптофановых остатков в более полярное окружение, а увеличением вклада в суммарный спектр флуоресценции ЦП триптофановых остатков, которые в холо-ЦП «затушены»

ионами меди, а в апо-ЦП флуоресцируют в длинноволновой области с $\lambda_{\text{макс}}$ 343 нм. В противном случае разностный спектр пересекал бы ось абсцисс, как, например, при денатурации ЦП в растворе 8 М мочевины (рис. 1, 5). Число «затухших» в холо-ЦП триптофановых остатков, по-видимому, велико, иначе трудно объяснить столь значительное (почти в 2 раза) возрастание квантового выхода флуоресценции ЦП при удалении меди.

Ввиду того что в холо-ЦП имеются хромофоры (диамагнитная медь типа III [4]), полоса поглощения которых ($\lambda_{\text{макс}}$ 332 нм) перекрывается со спектром флуоресценции (рис. 2), нельзя исключить возможности «тушения» части триптофановых остатков за счет миграции энергии по индуктивно-резонансному механизму.

Попытаемся оценить эффективность тушения флуоресценции по этому механизму. Расстояние между молекулами донора и акцептора, при котором вероятность переноса энергии возбуждения равна вероятности излучения, определяется соотношением [19]

$$(R_0)^6 = \frac{9 \ln 10 k^2 q}{128 \pi^3 n^4 N} \frac{\int F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda},$$

где k^2 — фактор, зависящий от взаимной ориентации донора и акцептора; n — показатель преломления среды; N — число Авогадро (моль⁻¹); q — квантовый выход донора в отсутствие акцептора; $F(\lambda)$ — спектр флуоресценции донора; $\varepsilon(\lambda)$ — спектр поглощения акцептора.

Величина критического радиуса миграции R_0 для ЦП, вычисленная по этой формуле, оказалась равной 24 Å, если считать, что $F(\lambda)$ — разностный спектр флуоресценции апо- и холо-ЦП (рис. 1, 3); $\varepsilon(\lambda)$ — спектр поглощения медного хромофора типа III в ближней УФ-области (рис. 2, 3) с величиной коэффициента экстинкции в максимуме ε_{332} 4100 М⁻¹см⁻¹ [1]; квантовый выход флуоресценции донора $q = 0,3$; фактор ориентации $k^2 = 2/3$ (для хаотично ориентированных подвижных диполей); $n = 1,5$.

Учитывая это значение R_0 и размеры молекулы ЦП $65 \times 65 \times 130$ Å [20], можно заключить, что триптофановые остатки, находящиеся в объеме, который составляет приблизительно $1/3$ общего объема молекулы ЦП, будут эффективно передавать энергию возбуждения на медные хромофоры типа III. Тот факт, что квантовый выход флуоресценции холо-ЦП в 2 раза меньше квантового выхода апо-ЦП, можно объяснить индуктивно-резонансной миграцией энергии только при определенных допущениях о неравномерном распределении триптофановых остатков в ЦП (преимущественное расположение их вблизи медных хромофоров типа III) и в предположении о значительном квантовом выходе флуоресценции этих остатков в апо-ЦП.

Необходимо, однако, отметить, что резкое увеличение квантового выхода флуоресценции при удалении металлов, характерное свойство подавляющего числа металлсодержащих [21—23], а также всех исследованных медьсодержащих [15—18] белков, проявляется даже в тех случаях, когда в белке отсутствуют хромофоры, способные выступать в качестве акцепторов энергии. Так, например, при удалении меди из азурина [16, 18] и стеллацианина [17] наблюдается резкое возрастание (в 3 раза) квантового выхода флуоресценции, несмотря на отсутствие условий для резонансной миграции энергии. Значительное тушение флуоресценции при связывании ионов ртути карбоангидразой [24] также происходит без появления каких-либо полос поглощения, перекрывающихся со спектром УФ-флуоресценции белка. Авторы ряда работ [16—18, 24] предполагают, что в этих случаях тушение флуоресценции — результат непосредственного контакта ионов металла и остатков триптофана. Подобная ситуация не исключена и в случае ЦП. Одним из подходов к решению этого вопроса может быть установление непосредственного контакта остатков трипто-

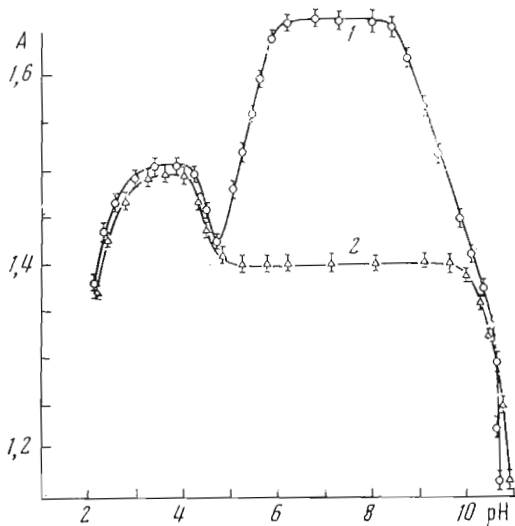


Рис. 3. Зависимость параметра A холо-ЦП (1) и апо-ЦП (2) от рН

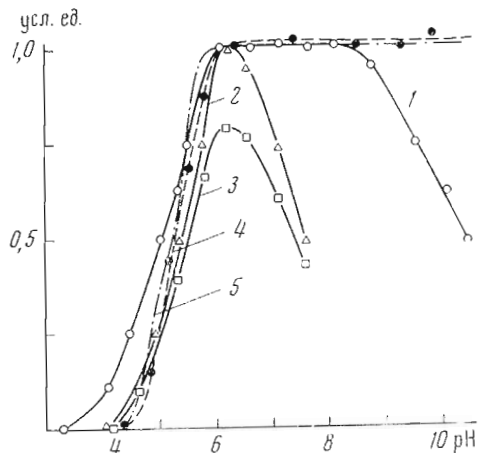


Рис. 4. Влияние рН на физико-химические свойства ЦП: 1 — поглощение при 610 нм; 2 — оксидазная активность холо-ЦП; 3 — оксидазная активность холо-ЦП, модифицированного ДПК; 4 — содержание меди в холо-ЦП; 5 — содержание меди в холо-ЦП, модифицированном ДПК. Значения всех величин для немодифицированного белка при рН 6 приняты за единицу

фана и тех аминокислотных остатков, которые участвуют в связывании меди в ЦП. По данным ряда работ [10, 11, 14, 25, 26], лигандами меди в ЦП являются остатки гистидина, доступные растворителю, легко модифицирующиеся и ответственные за каталитическую активность ЦП. Поскольку гистидиновые остатки в зависимости от степени их ионизации могут тушить флуоресценцию близлежащих остатков триптофана [27, 28], для доказательства их непосредственного контакта с остатками триптофана в ЦП были исследованы кривые флуориметрического титрования немодифицированных холо- и апо-ЦП, а также этих форм белка после модификации остатков гистидина диэтилпиокарбонатом (ДПК).

Кислотно-щелочное титрование немодифицированных холо- и апо-ЦП. В области рН 6—8,3 значения спектрального параметра A холо- и апо-ЦП различаются, что обусловлено, как уже отмечалось, более длинноволновым положением спектра флуоресценции апо-ЦП (рис. 3). При снижении рН

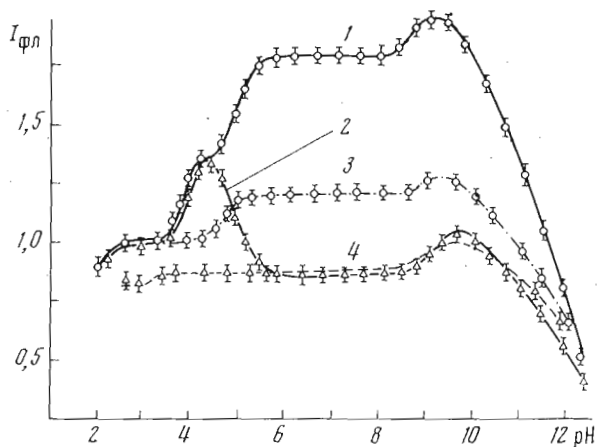


Рис. 5. Флуориметрическое титрование ЦП: 1 — апо-ЦП; 2 — холо-ЦП; 3 и 4 — модифицированные апо- и холо-ЦП, соответственно

от 6 до 4,7 происходит резкое уменьшение параметра A холо-ЦП почти до значения, характерного для апо-ЦП. Одновременно уменьшается каталитическая активность, содержание меди и интенсивность поглощения при 610 нм (рис. 4). При этом, по данным ДОВ, структура белка не претерпевает существенных изменений.

В области еще более низких рН кривые рН-зависимостей параметра A холо- и апо-ЦП практически совпадают. Сложный характер кривых титрования в этой области рН связан, по-видимому, с особенностями свойств белка вблизи его изоэлектрической точки (рН 4,4 [14]). Коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции (возрастание параметра A) в области рН 3,5—4,7 можно объяснить как конформационными превращениями, так и агрегацией белка.

В щелочной области рН наблюдается уменьшение параметра A обеих форм белка, но в случае холо-ЦП этот процесс начинается при рН 8,3, а для апо-ЦП — при более высоких рН (10). Можно предположить, что более раннее уменьшение параметра A холо-ЦП обусловлено тем, что при изменении характера связывания меди в ЦП (уменьшение специфического для ЦП поглощения при 610 нм — рис. 4, 1 — и образование биуретовых комплексов меди с пептидными связями белка [29, 30]) начинают флуоресцировать те триптофановые остатки, которые при нейтральных рН в холо-ЦП «затушены» ионами меди. Одновременное снижение параметра A холо- и апо-ЦП при рН ≥ 10 связано, по-видимому, с изменением структуры белка в результате щелочной денатурации. Нативное состояние ЦП сохраняется в области рН 6—8,3.

В области рН 2,5—4,7 квантовые выходы флуоресценции холо- и апо-ЦП, так же как и значения параметра A (рис. 3), совпадают (рис. 5). Этот факт указывает на то, что в данной области рН различия между холо- и апо-ЦП исчезают. Такое предположение подтверждается тем, что кривые флуориметрического титрования холо-ЦП, инкубированного в течение суток при рН 4,7, и апо-ЦП полностью совпадают. В области рН 6—8,3 интенсивность флуоресценции апо-ЦП примерно в 2 раза выше, чем холо-ЦП, что, как уже отмечалось ранее, обусловлено тушением флуоресценции некоторых триптофановых остатков ионами меди в холо-ЦП. В щелочной области (рН ~ 9) после небольшого увеличения интенсивность флуоресценции холо- и апо-ЦП резко уменьшается, что вызывается, по-видимому, щелочной денатурацией молекулы ЦП и миграцией энергии возбуждения триптофановых остатков на ионизированный тирозин [31].

Для дальнейшего обсуждения наибольший интерес представляет область рН 4,7—6, в которой характер кривых флуориметрического титрования холо- и апо-ЦП различается наиболее существенно. В этой области рН в случае холо-ЦП наряду с уменьшением параметра A до величины, характерной для апо-ЦП (рис. 3, 1), происходит увеличение интенсивности флуоресценции (рис. 5, 2), обусловленное, по всей вероятности, выходом меди из молекулы ЦП (рис. 4, 4). Однако, несмотря на отщепление меди, интенсивность флуоресценции холо-ЦП (рис. 5, 2) не достигает уровня апо-ЦП при нейтральных рН (рис. 5, 1). Очевидно, в области рН 4,7—6 одновременно происходят два конкурирующих процесса: возрастание интенсивности флуоресценции холо-ЦП в результате выхода меди и тушение флуоресценции, которое наиболее отчетливо проявляется на кривой титрования апо-ЦП (рис. 5, 1).

Поскольку, по данным ДОВ, в этой области рН структура апо-ЦП существенно не изменяется, можно предположить, что тушение вызвано протонизацией каких-то групп, расположенных вблизи триптофановых остатков и характеризующихся величиной $pK \sim 5,5$. Ранее было показано [27, 28], что в области рН 5—7 тушение флуоресценции триптофановых остатков в белках и модельных соединениях может быть вызвано протонизацией близлежащих гистидиновых остатков, причем pK этих остатков варьирует в широком диапазоне рН. Вполне вероятно, что и в ЦП группами, ответственными за тушение флуоресценции в области рН 5—6, являются остатки гистидина. Это предположение подтверждается результатами исследования флуориметрического титрования ЦП, модифицированного ДПК.

Кислотно-щелочное титрование модифицированных холо- и апо-ЦП. Установлено, что ДПК избирательно модифицирует гистидиновые остатки в ЦП [26]. Модификация до 30% всех гистидиновых остатков холо-ЦП не приводит к уменьшению содержания меди в ЦП и к изменению спектров поглощения ароматических и медных хромофоров. Однако при модификации снижается каталитическая активность и искажаются спектры ЭПР. Авторы работы [26] делают вывод, что доступные модификации остатки гистидина находятся в активном центре ЦП, т. е. вблизи ионов меди.

Проведенная нами обработка холо- и апо-ЦП посредством ДПК (200-кратный молярный избыток по отношению к белку) приводит к модификации 8 из 47 остатков гистидина. При этом, по данным ДОВ, существенных конформационных превращений ЦП не происходит. В то же время каталитическая активность холо-ЦП снижается на 20%, что согласуется с результатами работы [26].

При модификации квантовый выход флуоресценции апо-ЦП в диапазоне рН 6—8 уменьшается (рис. 5, 3). Это свидетельствует о том, что модифицированные остатки гистидина обладают «тушащим» действием. Поскольку продукты модификации гистидина не имеют полос поглощения, перекрывающихся со спектром флуоресценции триптофановых остатков, и, следовательно, индуктивно-резонансная миграция энергии отсутствует, эффект тушения может быть объяснен только непосредственным контактом триптофановых остатков и модифицированных групп гистидина.

Квантовый выход флуоресценции холо-ЦП в диапазоне рН 6—8 не изменяется при модификации (рис. 5, 4). Это значит, что с гистидиновыми остатками, подвергающимися модификации, контактируют только те триптофановые остатки, которые в холо-ЦП «затуснены» ионами меди. Об этом свидетельствует отсутствие повышения интенсивности флуоресценции модифицированного холо-ЦП при снижении рН от 6 до 4,7 (рис. 5, 4): остатки триптофана, флуоресценция которых обуславливает увеличение квантового выхода холо-ЦП в этой области рН, после модификации остаются «затусненными» продуктами реакции гистидиновых остатков с ДПК, несмотря на отщепление меди (рис. 4, 5).

Следовательно, на основании полученных результатов, а также данных предыдущих исследований [10, 11] можно сделать вывод о пространственной близости ионов меди, гистидиновых и триптофановых остатков в активных центрах ЦП.

Таким образом, триптофановые остатки в ЦП могут быть разделены на две группы. Остатки первой группы контактируют с ионами меди и поэтому в холо-ЦП «затушены» или флуоресцируют с низким квантовым выходом. Число этих остатков достаточно велико, так как иначе трудно объяснить двукратное возрастание квантового выхода при удалении меди. Максимум спектра флуоресценции этих остатков — 343 нм, и они определяют сложный характер кривых флуориметрического титрования холо- и апо-ЦП (рис. 3 и 5). Все или подавляющая часть триптофановых остатков этой группы находятся в контакте с остатками гистидина, которые ответственны за каталитическую активность ЦП и доступны действию ДПК.

Триптофановые остатки второй группы не контактируют с ионами меди и определяют флуоресценцию холо-ЦП. На флуоресцентные свойства этих остатков не влияет изменение рН от 2,5 до 10. Остатки этой группы менее доступны растворителю ($\lambda_{\text{макс}}$ 335 нм). Квантовый выход флуоресценции холо-ЦП равен 0,17, что указывает на относительно высокое значение квантового выхода остатков этой группы. По-видимому, в ближайшем окружении этих триптофановых остатков нет остатков гистидина или, по крайней мере, находящиеся вблизи гистидиновые остатки не подвергаются модификации и не протонируются в области рН 4,7 — 6.

Непосредственный контакт ионов меди и остатков триптофана, установленный как для сравнительно простых по своей организации медьсодержащих белков — азурина [16, 18] и стеллацианина [17], так и для более сложного белка, каким является ЦП, побуждает поставить вопрос о возможной общности структуры активных центров различных медьсодержащих белков.

Экспериментальная часть

Препараты ЦП, полученные из сыворотки ретроплацентарной крови по модифицированному методу Бромана и Кьеллина [32], были охарактеризованы по основным физико-химическим, иммунологическим и ферментативным свойствам.

ЦП седиментирует в аналитической ультрацентрифуге MSE (Англия) в виде единственной гомогенной компоненты с коэффициентом седиментации 7,3 S. Молекулярный вес, установленный методом высокоскоростного седиментационного равновесия [33] при концентрации белка 0,15 мг/мл и скорости вращения ротора 48 000 об/мин, равен 130 000.

Оксидазную активность ЦП определяли по методу Равина [34] при использовании в качестве субстрата *n*-фенилендиамина. Активность выражали в единицах прироста оптической плотности инкубационной смеси при 530 нм за 1 ч из расчета на 1 мг белка. Удельная активность ЦП составляет 29—35 ОЕ/мг·час.

При электрофорезе в полиакриламидном геле, проводимом как описано ранее [35], ЦП движется одной зоной, которая окрашивается как амидочерным, так и специфическим красителем на оксидазную активность — *o*-дианизидином.

При иммунодиффузии в агаре ЦП образует одну дугу преципитации со специфической кроличьей антисывороткой, причем дуга окрашивается *n*-фенилендиамином [6].

Содержание меди в препаратах ЦП, определенное с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Perkin — Elmer» (Англия), составляет 0,33—0,34%. Удаление меди из белка осуществляли путем диализа препаратов ЦП против раствора NaCN [14].

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, принимая величины $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ для холо- и апо-ЦП равными соответственно 14,8 и 13,6 [14, 36].

Спектры поглощения измеряли с помощью двухлучевого спектрофотометра «Hitachi», модель 356 (Япония). Спектры ДОВ в видимой и ближней УФ-частях спектра измеряли с помощью спектрополяриметра «Cary-60» (США), как описано ранее [30]. Параметры a_0 и b_0 уравнения Моффита — Янга для ЦП равны —252 и —64.

Образцы для проведения флуориметрического титрования готовили разведением в 40—50 раз концентрированного раствора ЦП, содержащего 0,15 М NaCl, до конечной концентрации 0,15 мг/мл 0,2 М фосфатно-цитратным буфером (рН 1,8—8,5) или 0,1 М боратным буфером (рН 8,6—11,5). Все буферные растворы содержали 0,05 М NaCl. После разведения образцы инкубировали при данном значении рН в течение суток при комнатной температуре. Величины рН в образцах контролировали непосредственно перед опытами. Кривые флуориметрического титрования являются результатами 6—8 независимых измерений. Доверительные интервалы определяли с помощью коэффициентов Стьюдента для 95%-ного уровня надежности.

Гистидиновые остатки в ЦП модифицировали с помощью ДПК при рН 6 [26]. Степень модификации определяли спектрофотометрически [26] и с помощью аминокислотного анализатора «Jeol» (Япония).

Все растворы готовили на дистиллированной и деионизованной воде. Для удаления ионов тяжелых металлов все буферные растворы фильтровали через колонку ионообменника «Chelex-100».

Измерения флуоресценции проводили на установке, конструкция и оптическая схема которой описаны ранее [37]. С целью автоматизации измерений, повышения их точности и объективности была применена новая система регистрации сигнала с ФЭУ. Напряжение с выхода усилителя постоянного тока (электронметр TR-1501) подавалось на преобразователь Ф-573, генерирующий высокочастотный синусоидальный сигнал с частотой, пропорциональной исходному напряжению. Эту частоту (усредненное значение за 1, 10 или 100 с) измеряли частотометром Ф-5080 с цифровой индикацией. Значения частот, пропорциональные исходному сигналу, подавались через транскриптор Ф-595 К на цифropечатающую машинку ЭУМ-23.

Положение спектров флуоресценции в большинстве случаев характеризовали при помощи параметра A , равного $(I_{320}/I_{365})_{296}$, где I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции при длинах волн 320 и 365 нм [38]. Поскольку возбуждение флуоресценции производили светом с длиной волны 296,8 нм, вкладом тирозиновых остатков можно пренебречь. Спектры флуоресценции и величины параметра A исправлены на спектральную чувствительность установки (для водного раствора d , l -триптофана величина A равна 0,38). Квантовые выходы флуоресценции определяли относительным методом [39], используя в качестве эталона раствор d , l -триптофана, квантовый выход которого принимали равным 0,2 [40].

При флуоресцентных исследованиях оптическая плотность белковых растворов не превышала 0,3 при 296,8 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malkin R., Malmstrom G. (1970) *Advances in Enzymol.*, **33**, 177—244.
2. Deinum J., Reinhammar B. (1974) *FEBS Lett.*, **42**, 241—245.
3. Bronan J. (1966) in *Molecular basis of some aspects of mental activity*. O. Wallas (ed.), vol. 2, p. 131, Acad. Press, N. Y. — London.
4. Neifakh S. A., Monakhov N. K., Shaposhnikov A. M., Zubzhitski Yu. N. (1969) *Experientia*, **25**, 337—344.
5. Shaposhnikov A. M., Zubzhitski Yu. N., Shulman V. S. (1969) *Experientia*, **25**, 424—426.

6. Neifakh S. A., Vasiletz I. M., Shavlovski M. M. (1972) *Biochem. Genet.*, **6**, 231—238.
7. Василец И. М., Мошков К. А., Кушнер В. П. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 246—253.
8. Shokey M. H. K. (1973) *Clin. Biochem.*, **6**, 9—14.
9. Василец И. М. (1973) *Успехи биол. химии*, **14**, 172—201.
10. Vasiletz I. M., Shavlovski M. M., Neifakh S. A. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **25**, 498—504.
11. Шавловский М. М., Василец И. М. (1972) *Биохимия*, **37**, 507—514.
12. Баренбойм Г. М., Доманский А. Н., Туроверов К. К. (1966) Люминесценция биополимеров и клеток, М.—Л.
13. Конев С. В. (1965) *Электронновозбужденные состояния биополимеров*, Минск.
14. Kasper C. V., Deutsch H. F. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2325—2337.
15. Bannister W. H., Dalgleish D. G., Bannister J. V. and Wood E. J. (1972) *Int. J. Biochem.*, **3**, 560—568.
16. Finazzi-Agrò A., Giovagnoli C., Avigliano L., Rotilio G. and Mondovi B. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 20—24.
17. Morpurgo L., Finazzi-Agrò A., Rotilio G. and Mondovi B. (1972) *Biochem. et biophys. acta*, **271**, 292—299.
18. Finazzi-Agrò A., Rotilio G., Avigliano L. (1970) *Biochemistry*, **9**, 2009—2014.
19. Förster T. (1959) *Faraday soc.*, **27**, 7—17.
20. Василец И. М., Каюшина Р. Л., Курапова И. П., Мошков К. А., Шавловский М. М., Нейфак С. А. (1973) *Бифизика*, **18**, 972—976.
21. Luk S. K. (1971) *Biopolymers*, **10**, 1229—1241.
22. Nagami K. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 364—369.
23. Lebrer S. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3613—3617.
24. Finazzi-Agrò A., Morpurgo L. and Mondovi B. (1974) *Biophys. Chem.*, **2**, 151—157.
25. Bannister W. H., Wood E. J. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 179—182.
26. Ulf Nylen, Pettersson G. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **27**, 578—584.
27. Черницкий Е. А., Мажуль В. М., Конев С. В. (1968) *Биофизика*, **13**, 581—586.
28. Shinitzky M., Goldman R. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 139—144.
29. Poillon W. N., Bearn A. G. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **127**, 407—427.
30. Мошков К. А., Кушнер В. П., Василец И. М. (1972) *Молекулярн. биология*, **6**, 52—62.
31. Cowgill R. W. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, **75**, 272—273.
32. Broman L., Kjellin K. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **82**, 101—109.
33. Yphantis D. A. (1964) *Biochemistry*, **3**, 297—317.
34. Ravin H. A. (1956) *Lancet*, **1**, 726—727.
35. Василец И. М., Шавловский М. М. (1972) *Биохимия*, **37**, 258—265.
36. Erickson J. O., Gray R. D., Frieden E. (1970) *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **134**, 117—121.
37. Гусев Е. В., Туроверов К. К., Розанов Ю. М., Волосов Н. С. (1974) в сб. *Функциональная морфология, генетика и биохимия клетки*, с. 364—366, Л.
38. Туроверов К. К., Щелчков Б. В. (1970) *Биофизика*, **15**, 965—972.
39. Parker C. A., Ress W. T. (1960) *Analyst*, **85**, 587—600.
40. Teall F. W. L., Weber G. (1957) *Biochem. J.*, **65**, 476—482.

Поступила в редакцию
22.VIII.1975

THE STUDY OF THE HUMAN CERULOPLASMIN STRUCTURE BY UV-FLUORESCENCE

SEMISOTNOV G. V., MOSHKOV K. A., TUROVEROV K. K., SHAVLOVSKI M. M.

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

Removal of copper from ceruloplasmin (CP) resulted in two-fold increase of quantum yield and in the 5 nm long-wave shift of fluorescence spectrum. These data together with the results of acid-base fluorimetric titration of holo- and apo-CP, as well as the changes of titration curves after diethyl pyrocarbonate modification of histidine residues in CP allow to make a conclusion that some tryptophan residues are in spatial vicinity to both histidine residues responsible for CP catalytic activity and to copper atoms. The number of residues in this group is rather high. These residues in holo-CP are quenched by copper atoms while in apo-CP they give a fluorescence with λ_{\max} 343 nm and relatively high quantum yield. The other group of tryptophan residues is not in contact with copper atoms and determines the fluorescence of holo-CP (λ_{\max} 335 nm, $q = 0,17$); its fluorescence is insensitive to pH changes over the range 2.5—10.0.