



УДК 577.1+547.963.02

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ГОМОЛОГИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА
ЧЕЛОВЕКА*Васильев В. В., Шавловский М. М., Нейфах С. А.,**Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР, Ленинград**И розоровский В. Н., Раишконецкий Л. Г.**Лаборатория энзимологии Академии медицинских наук СССР, Москва*

В препаратах нативного церулоплазмينا человека при диссоциации постоянно обнаруживается компонент с M 130000 (F_1) и фрагменты с M 110000 (F_2), 64000 (F_3), 48000 (F_4), 22000 (F_5) и 16000 (F_6). В таких препаратах определяются два типа N-концевых аминокислотных последовательностей. Препаративно с помощью гель-фильтрации получены фракции, содержащие $F_1+F_2+F_3$, F_3+F_4 , F_5 и F_6 . Показано, что аминокислотный состав F_1-F_5 сходен, а N-концевые аминокислотные последовательности совпадают, но отличаются от аминокислотного состава и последовательности F_6 . При ограниченном триптическом протеолизе выявлено накопление во времени F_5 с одновременным уменьшением содержания более высокомолекулярных полипептидов. Предполагается, что в состав молекулы церулоплазмينا человека входит несколько гомологичных фрагментов с M 22000 (F_5) и C-концевой полипептид с M 16000 (F_6).

Голубой медьгликопротеид α_2 -глобулиновой фракции сыворотки крови человека, церулоплазмин, был выделен и охарактеризован Холмбергом и Лауреллом [1]. Интерес к изучению структуры, биосинтеза и физиологической функции этого белка возрос после того, как было обнаружено, что у больных с наследственным заболеванием, основанным на моновенной мутации, болезнью Вильсона — Кошовалова, нарушен обмен жизненно важным микроэлементом — меди и вместе с тем резко снижено содержание церулоплазмينا в крови [2, 3]. Так как этот белок выполняет медьтранспортные функции [4], то можно было предполагать, что его дефект является первичным результатом мутации. Действительно, нами было показано, что дефицит церулоплазмينا обусловлен нарушением его биосинтеза [5, 6] и изменением структуры [7].

До сих пор остается неясным вопрос о структуре церулоплазмينا. Вместе с тем от решения этого вопроса зависит дальнейшее изучение природы вильсоновской мутации. Высказывались предположения, что в состав белка входит различное число отдельных полипептидов (восемь [8–11], четыре [12–14], два [15, 16]), и, наконец, что этот белок состоит из одной полипептидной цепи [17–19]. Расхождения в результатах отдельных авторов, вероятнее всего, связаны с особенностями структуры и крайней нестабильностью определенных пептидных связей нативного церулоплазмينا. В этом отношении особенно интересны работы Ридена [17, 20], согласно которым полипептиды, обнаруживаемые в коммерческих и свежевыделенных препаратах белка, появляются в результате спонтан-

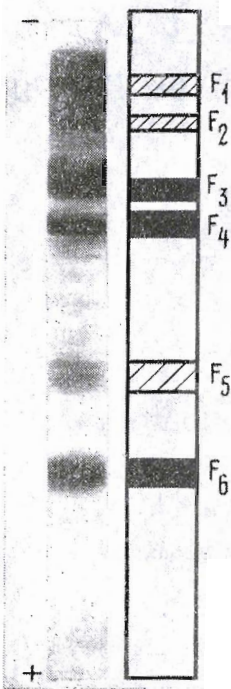


Рис. 1. Электрофорез исходного препарата церулоплазмينا в 15% полиакриламидном геле в присутствии 1% ДДС

теолитические фрагменты белка и исследовать их состав и N-концевые аминокислотные последовательности. При этом нашей целью было проследить, не существует ли в молекуле церулоплазмينا внутренней структурной гомологии, т. е. явления, которого в данном белке до сих пор никто не отмечал.

Из сыворотки крови человека были получены препараты нативного церулоплазмينا. Выделенный белок имел высокую оксидазную активность, при электрофорезе в нативных условиях мигрировал в виде единичной белковой зоны, обладающей специфической оксидазной активностью, и по соотношению D_{610}/D_{280} , равном 0,046, соответствовал препаратам высокой степени очистки [11].

При электрофорезе выделенного препарата в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС), как и в предыдущей работе [19], выявилось значительное число белковых зон, материал различался по молекулярным массам. Главных зон, которые в дальнейшем были подвергнуты детальному анализу, насчитывалось шесть; они, по данным сравнения с соответствующими маркерными белками, отвечали полипептидам с M 130 000, 110 000, 64 000, 48 000, 22 000 и 16 000. В дальнейшем полипептид с M 130 000, т. е. полную молекулу церулоплазмينا, мы будем обозначать как компонент F_1 , полипептиды с M 110 000, 64 000, 48 000, 22 000 и 16 000 — как фрагменты F_2 , F_3 , F_4 , F_5 и F_6 (см. рис. 1). Картина разделения полипептидов хорошо воспроизводима и не зависит от предварительного восстановления и карбоксиметилирования белка. Обработка препаратов церулоплазмينا денатурирующими агентами типа мочевины также не отражается на характере электрофоретического разделения полипептидов. Необходимо отметить, что церулоплазмин является гликопротеином и, следовательно, в состав всех или некоторых полипептидов входят углеводные цепи. В то же время известны факты аномального

но протекающего ограниченного протеолиза, а молекула белка представляет собой единичную полипептидную цепь. Недавно подобный результат получен и в работе [21]. Один из полипептидных фрагментов с M 16 000 был исследован в работе [14]. Авторы выделили фрагмент в чистом виде и определили его N-концевую 21-членную аминокислотную последовательность.

В нашей лаборатории найдено [19], что сами препараты церулоплазмينا, полученные в виде седиментационно и электрофоретически гомогенного белка, проявляют небольшую протеолитическую активность и что действием фенилметилсульфонилфторида эту активность можно почти полностью подавить. Под влиянием очень небольшой и трудноотделимой примеси протеаз молекулы церулоплазмينا спонтанно распадаются на ряд полипептидов, выявляемых только в присутствии денатурирующих агентов. Таким образом, выделенные многими авторами полипептиды в действительности оказались искусственно получаемыми продуктами протеолиза, а нативная молекула, по-видимому, представляет собой единичную полипептидную цепь.

Ряд свойств церулоплазмينا — относительно большая молекулярная масса, одноцепочечное строение и способность легко распадаться на фрагменты — напоминает свойства некоторых белков: имеющих доменную структуру [22]. Это навело нас на мысль попытаться выделить отдельные про-

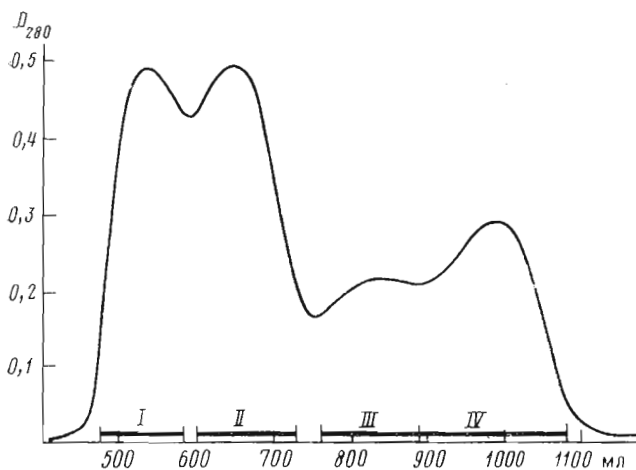


Рис. 2. Профиль элюции при гель-фильтрации в присутствии 8 М мочевины восстановленного карбоксиметилированного церулоплазмينا на колонке с сефадексом G-200 (5×100 см). Отмечены объединенные фракции

поведения углеводсодержащих полипептидов при электрофорезе в присутствии ДДС. Кроме того, метод электрофоретического определения молекулярной массы полипептидов характеризуется ошибкой порядка 10%. В связи с этим приведенные молекулярные массы полипептидов являются лишь ориентировочными, что, однако, не сказывается на вытекающих из часей работы основных выводах.

Учитывая существенные различия полипептидов по молекулярной массе, мы предприняли попытку разделить их методом гель-фильтрации в присутствии 8 М мочевины. Из рис. 2 видно, что восстановленный карбоксиметилированный церулоплазмин в таких условиях элюируется в виде четырех фракций (I—IV). Электрофоретический анализ в присутствии ДДС показал, что фракция I содержит компонент F_1 и фрагменты F_2 и F_3 , фракция II — фрагменты F_3 и F_4 , фракция III — фрагмент F_5 и фракция IV — фрагмент F_6 (рис. 3). Таким образом, при гель-фильтрации на сефадексе в денатурирующих условиях не происходит полного отделения полипептидов друг от друга. Наблюдается лишь групповое деление высокомолекулярного полипептидного материала. Рехроматография отдельных фракций не позволила получить каждый из высокомолекулярных полипептидов в отдельности. Поэтому дальнейшему анализу были подвергнуты индивидуальные фрагменты F_3 и F_6 , а также материал фракций I и II.

В качестве предварительного этапа исследования был определен аминокислотный состав материала всех фракций (таблица). С целью сопоставления аминокислотного состава отдельных фракций был произведен перерасчет на молекулярную массу фрагмента F_5 . При сравнении относительного содержания отдельных аминокислотных остатков удалось выявить существенное сходство между фракциями I и II и фрагментом F_5 . В то же время аминокислотный состав фрагмента F_6 уникален и существенно отличается от состава других полипептидов по содержанию целого ряда аминокислотных остатков. Число остатков каждой аминокислоты во фрагменте F_6 , исключая метионин, не превышает числа остатков в полипептидах большей молекулярной массы. Полученный результат указывает на сходство аминокислотного состава всех полипептидов, за исключением фрагмента F_6 и на возможность повторяемости фрагмента F_5 в структуре более высокомолекулярных полипептидов. Ввиду важности такого вывода этот вопрос подвергли детальному исследованию.

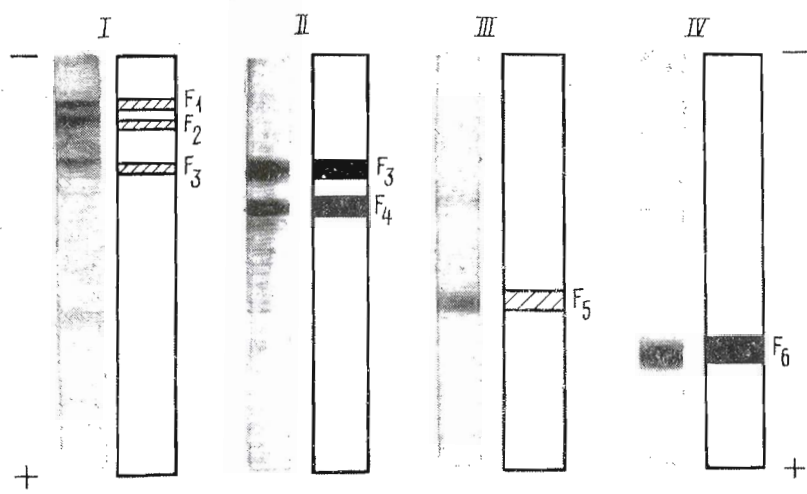
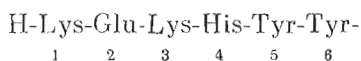


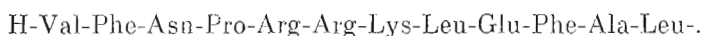
Рис. 3. Электрофорез отдельных фракций и фрагментов церулоплазмينا в 15% полиакриламидном геле в присутствии 1% ДДС. Римские цифры соответствуют номерам фракций на рис. 2

С целью анализа такой возможности были определены N-концевые аминокислотные остатки и последовательности в исходном церулоплазмине и в отдельных фракциях дансильным и фенолтиогидантоиновым методами. Качественный анализ исходного белка подтвердил наличие только двух N-концевых аминокислот: лизина и валина. При анализе отдельных фракций и фрагментов был установлен следующий факт. Оказалось, что во фракциях I ($F_1+F_2+F_3$) и II (F_3+F_4) и во фрагменте F_5 определяется одна и та же аминокислотная последовательность, которая начинается с лизина. В то же время аминокислотная последовательность фрагмента F_6 начинается с валина и совершенно уникальна. В дальнейшем последовательности, начинающиеся с лизина и валина, мы будем обозначать как А- и В-последовательности соответственно.

А-последовательность:



В-последовательность:



При анализе препаратов исходного церулоплазмينا на секвенаторе были также обнаружены только две N-концевые последовательности — А и В, деградируемые параллельно.

Как указывалось выше, в препаратах исходного церулоплазмينا всегда присутствует компонент F_1 , который по молекулярной массе (130 000) полностью соответствует нативной молекуле белка и представляет собой единую ковалентно связанную структуру, возможно единичную полипептидную цепь. Очевидно, что все остальные полипептиды являются продуктами ступенчатой деградации этой высокомолекулярной полипептидной цепи. Для получения данных о характере распределения отдельных фрагментов в молекуле исходного белка было решено исследовать продукты его ограниченного триптического гидролиза.

Препараты нативного церулоплазмينا подвергали трипсинолизу через разные интервалы времени. Действие трипсина в аллквотах ингибировали фенолметилсульфонилфторидом, и пробы после соответствующей обработки (см. «Экспер. часть») подвергали электрофоретическому анализу

Сравнение аминокислотного состава отдельных фракций (рис. 2) и фрагментов церулоплазмينا человека

Аминокислоты	Фрагменты				Аминокислоты	Фрагменты			
	F ₁ +F ₂ +F ₃ (фракция I)	F ₃ +F ₄ (фракция II)	F ₅	F ₆		F ₁ +F ₂ +F ₃ (фракция I)	F ₃ +F ₄ (фракция II)	F ₅	F ₆
Asp	25	23	30	20	Met	3	3	3	5
Thr	17	17	18	9	Phe	10	10	8	6
Ser	14	14	14	10	Leu	16	15	17	7
Glu	26	26	25	22	Tyr	12	14	13	7
Pro	14	12	11	7	Phe	11	12	11	10
Gly	16	18	16	12	Lys	16	15	14	5
Ala	12	13	12	4	His	8	9	7	9
Val	10	10	12	8	Arg	10	9	10	6

Примечание. Значения даны в виде числа аминокислотных остатков. Для фракций I и II перерасчет произведен на молекулярную массу фрагмента F₅, равную 22000. Содержание цистеина и триптофана не определялось. Неполный гидролиз и разрушение аминокислот не учитывались.

(рис. 4). Обнаружено, что через 5 мин после начала гидролиза трипсином полностью исчезает компонент F₁ и фрагмент F₂, заметно уменьшается содержание фрагментов F₃ и F₄. В то же время нарастает содержание фрагмента F₅. Через 10 мин после начала реакции выявляются лишь фрагменты с *M* 22 000 и 16 000. С другой стороны, в ходе гидролиза содержание фрагмента F₆ снижается. Через 20 мин после добавления трипсина остается практически только фрагмент F₅.

С целью анализа N-концевых аминокислотных последовательностей продуктов ограниченного протеолиза препараты исходного церулоплазмينا гидролизовали трипсином в течение 10 мин. На этой стадии продуктами реакции являются лишь фрагменты с *M* 22 000 и 16 000. При изучении продуктов трипсинолиза нам удалось обнаружить только две последовательности, которые соответствовали А- и В-последовательностям в исходных препаратах церулоплазмينا. Часть А-последовательности, как и следовало ожидать, учитывая специфику протеолитического действия трипсина, начиналась не с лизина, а со следующей аминокислоты — глутаминовой. Таким образом, ограниченный гидролиз нативного белка трипсином приводит к образованию фрагмента с *M* 22 000, который и по N-концевой аминокислотной последовательности полностью соответствует аналогичному фрагменту F₅, получаемому в результате спонтанной деградации церулоплазмينا.

Результаты проведенных исследований подтвердили имевшиеся ранее сведения [13, 19] о том, что нативный церулоплазмин в исчерпывающих условиях диссоциации (1% ДДС, 1% дитиотреит) распадается на полипептиды с *M* от 16 000 до 110 000. Так как применяемые условия диссоциации церулоплазмينا не могут приводить к разрыву пептидных связей, можно предположить, что обнаруживаемые фрагменты являются продуктами специфического ограниченного протеолиза, происходящего в процессе выделения препаратов белка. Впервые к аналогичному выводу о существовании в препаратах церулоплазмينا фрагментов, образующихся вследствие реакций ограниченного протеолиза единичной полипептидной цепи с *M* 130 000, пришел Риден [17]. Анализ N-концевых последовательностей аминокислот в исходном белке показывает, что, несмотря на присутствие значительного числа различающихся по молекулярной массе фрагментов, существует лишь два типа последовательностей — А и В. Последовательность В, установленная нами для фрагмента F₆, соответствует последовательности, найденной в работе [14], с той разницей, что нам удалось уточнить природу остатка в положении 3 — по нашим данным, это аспарагин.

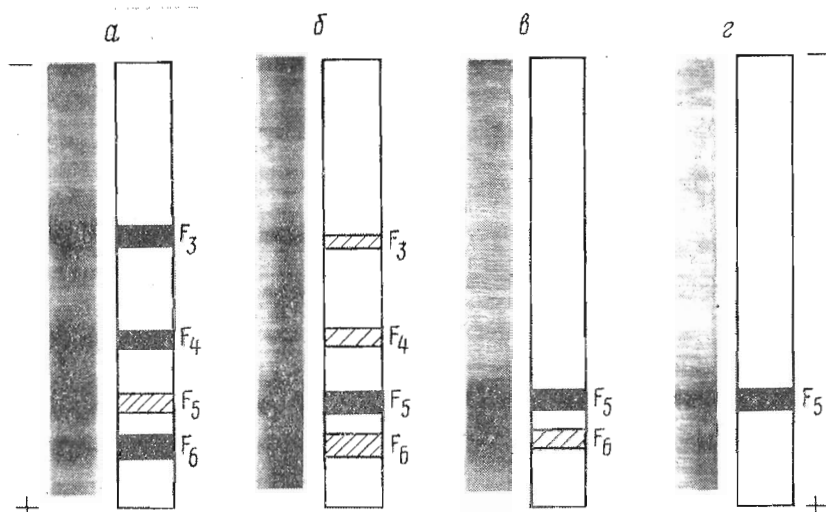


Рис. 4. Электрофорез продуктов ограниченного триптического гидролиза нативного церулоплазмينا в полнакриламидном геле в присутствии ДДС при времени гидролиза 2 (а), 5 (б), 10 (в) и 20 мин (г)

При исследовании различающихся по молекулярной массе фрагментов церулоплазмينا, выделенных с помощью грубого фракционирования методом гель-фильтрации, нами получены весьма существенные данные, относительно которых в литературе до сих пор не было никаких сведений. Во-первых, установлено совпадение аминокислотного состава всех полипептидов белка, за исключением наиболее низкомолекулярного — фрагмента F_6 . Во-вторых, обнаружена идентичность N-концевых аминокислотных последовательностей (A-последовательность) для всех высокомолекулярных фрагментов и компонента F_1 .

Эти данные позволили нам предположить, что в состав молекулы церулоплазмينا человека входят две структурные единицы с M 22 000 и 16 000, причем фрагмент с M 22 000 является повторяющейся единицей. Такое предположение подтверждается результатами опытов по ограниченному триптическому расщеплению нативного белка. При гидролизе компонент F_1 и все высокомолекулярные фрагменты деградируют до фрагмента с M 22 000. Этот фрагмент по N-концевой последовательности (A-последовательность) соответствует аналогичному продукту спонтанного протеолиза. Таким образом, фрагмент с M 22 000 является структурной единицей, повторяющейся в более крупных полипептидах кратное число раз. Молекулярная масса компонента F_1 и фрагментов F_2 , F_3 и F_4 хорошо согласуется с теоретически вычисленной молекулярной массой для соответствующего числа ковалентно связанных гомологичных полипептидов с M 22 000.

Образование фрагментов с M 22 000 в результате ограниченного протеолиза свидетельствует о том, что они связаны между собой пептидными связями, особенно доступными действию трипсина и других протеаз. Максимальная молекулярная масса полипептида с N-концевой последовательностью аминокислот A-типа, аналогичной аминокислотным последовательностям всех фрагментов с M от 22 000 до 110 000, составляет по данным электрофореза в присутствии ДДС величину порядка 130 000, что соответствует молекулярной массе нативного церулоплазмينا.

Итак, мы приходим к следующему заключению относительно структуры церулоплазмينا человека. Исходная негидратированная молекула представляет собой, по-видимому, единичную полипептидную цепь

с M 130 000. Эта цепь состоит из шести ковалентно связанных субструктур или доменов, большая часть которых характеризуется структурной гомологией и имеет M 22 000. Малый фрагмент с M 16 000 скорее всего является С-концевым, а не N-концевым полипептидом, как указывалось в работе [20].

Экспериментальная часть

Гомогенные препараты церулоплазмينا получали как описано ранее [23].

Восстановление и карбоксиметилирование. Церулоплазмину восстанавливали дитиотреитом (0,17 мкмоль/мг белка) в 6 М хлоридате гуанидина, содержащем 2 мМ EDTA и 0,1 М трис-HCl, pH 8,5, при концентрации белка 20 мг/мл и затем карбоксиметилировали иодацетатом (0,55 мкмоль/мг белка) при 37° в течение 2 ч. Избыток реагента отделяли при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-25 в 0,05 М NH_4HCO_3 . Полученные препараты лиофилизовали.

Аналитический электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле по методу [24]. В качестве белков-маркеров использовали рибонуклеазу, лизоцим, мнгоглобин, α -амилазу, аспарагиназу, бычий сывороточный альбумин. Образцы для исследования готовили в 1% дитиотреите и 1% ДДС и прогревали 2 мин при 100°. Перед анализом пробы разбавляли в 10 раз.

Гель-фильтрацию для препаративного получения фрагментов церулоплазмينا проводили на колонке с сефадексом G-200 (5×100 см) в 8 М мочеvine, содержащей 0,1 М трис-HCl, pH 8,1, при скорости элюции 10 мл/ч. Поглощение элюата (λ 280 нм) регистрировали при помощи Uvicord LKB (Швеция). Собранные фракции освобождали от мочевины и соли на колонке с сефадексом G-25 в 0,05 М NH_4HCO_3 . Полученный материал лиофилизовали.

Анализ аминокислотного состава. Образцы белка (~300 мкг) гидролизовали 6 н. HCl в присутствии 0,1% 2-меркаптоэтанола в ампулах, запаянных под вакуумом, при 110° в течение 24 ч. Количественный аминокислотный анализ производили на анализаторе LKB 3201.

N-Концевые аминокислотные остатки определяли дансильным методом [25]. Дансильпроизводные аминокислот идентифицировали методом ТСХ на пластинках с полиамидом [26] в четырех системах растворителей [27].

Анализ аминокислотных последовательностей в образцах (10 мг на анализ) производили на автоматическом белковом секвенаторе Beckman 890 C с использованием быстрой программы Beckman № 0721172 C. Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот идентифицировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 [28]. Идентификацию аргинина и гистидина производили на аминокислотном анализаторе после гидролиза фенилтиогидантоиновых производных в 6 н. HCl при 130° в течение 24 ч [29].

Ограниченный триптический гидролиз нативного церулоплазмينا производили в 0,1% NH_4HCO_3 , добавляя трипсин, обработанный ТРСК (фермент — субстрат, 1 : 100), при 20°. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты и добавляли фенилметилсульфонилфторид в концентрации 0,1 М. Образцы обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофилизовали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Holmberg C. G., Laurell C. B. (1948) Acta chem. scand., 2, 550—556.
2. Scheinberg I. H., Gitlin D. (1952) Science, 116, 484—485.
3. Scheinberg I. H., Sternlieb J. (1965) Ann. Rev. Med., 16, 119—134.
4. Broman L. (1967) in: Molecular Basis of Some Aspects of Mental Activity (Waller O., ed.), vol. 2, № 9, p. 131. Acad. Press.
5. Neifakh S. A., Monakhov N. K., Shaposhnikov A. M., Zubzhitski Yu. N. (1969) Experimentia, 25, 337—344.

6. Gaitskhoki V. S., Kisselev O. I., Moshkov K. A., Puchikova L. V., Shavlovski M. M., Shulman V. S., Vakharlovski V. G., Neifakh S. A. (1975) *Biochem. Genetics*, **13**, 533-550.
7. Neifakh S. A., Vasilets I. M., Shavlovski M. M. (1972) *Biochem. Genetics*, **6**, 231-238.
8. Poulík M. D. (1962) *Nature*, **194**, 842-844.
9. Poulík M. D. (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 476-501.
10. Kasper C. B., Deutch H. F. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2325-2337.
11. Poillon W. N., Bearn A. G. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **127**, 407-427.
12. Simons K., Bearn A. G. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 260-270.
13. Freeman S., Daniel E. (1973). *Biochemistry*, **12**, 4806-4810.
14. McCombs M. L., Bowman B. H. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **434**, 452-461.
15. Shokeir M. H. K. (1973) *Clin. Biochemistry*, **6**, 9-14.
16. Васи́лец И. М., Кушнер В. П., Мошков К. А., Нейфах С. А. (1973) Докл. АН СССР, **208**, 729.
17. Rydén L. (1971) *FEBS Lett.*, **18**, 321-325.
18. Rydén L. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 380-386.
19. Мошков К. А., Каримова Х. М., Нейфах С. А., Лакатош С., Хайду Я., Заводски П., Самсошидзе Т. Г., Киселев Н. А. (1979) Биорг. химия, **5**, 395-407.
20. Rydén L. (1975) in: *Protides of the Biological Fluids, Proc. of the XXII Colloquium Brugge 1974* (Peeters H., ed.), pp. 633-639.
21. Kingston B., Kingston B. L., Putman F. W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5377-5381.
22. Geisow M. (1977) *Nature*, **270**, 476-477.
23. Васи́лец И. М., Коннова Л. А., Кушнер В. П., Божков В. М., Здродовская Е. П., Муха Г. В. (1968) Биохимия, **33**, 1285.
24. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406.
25. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 379-380.
26. Woods K. R., Wang K.-T. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 369-370.
27. Jörnvall H. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **14**, 521-534.
28. Jeppson J., Sjöquist J. S. (1967) *Anal. Biochem.*, **18**, 264.
29. Sundby F., Frandsen E. K. (1972) *FEBS Lett.*, **26**, 289-293.

Поступила в редакцию
31.X.1978
После доработки
17.I.1979

INTRAMOLECULAR HOMOLOGY IN HUMAN CERULOPLASMIN

VASILIEV V. B., SHAVLOVSKY M. M., NEIFAKH S. A., PROZOROVSKY V. N.,
RASHKOVETSKY L. G.

*Research Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Leningrad; Enzymology Laboratory,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The native human ceruloplasmin preparations dissociated into a component of MW of 130 000 (F₁) and five fragments having MW of 110 000 (F₂), 64 000 (F₃), 48 000 (F₄), 22 000 (F₅), and 16 000 (F₆). Two types of N-terminal amino acid sequences were determined in these preparations. Four fractions containing F₁+F₂+F₃; F₃+F₄; F₅, and F₆ were obtained by preparative gel filtration. It was shown that both the amino acid composition and the N-terminal amino acid sequences of F₁-F₅ coincide but differ from those of F₆. In the course of limited tryptic digestion the F₅ concentration was increasing with a simultaneous drop in the level of the fragments of higher MW. It was suggested that the molecule of human ceruloplasmin contains several homologous polypeptides with MW 22 000 (F₅) and the C-terminal polypeptide with MW of 16 000 (F₆).