



УДК 577.156.2

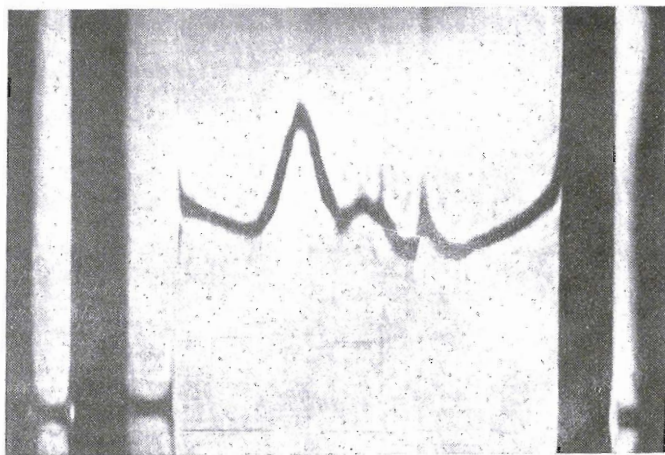
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА
ПО ДАННЫМ ИССЛЕДОВАНИЯ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА
И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ***Мошков К. А., Каримова Х. М. *, Нейфах С. А.**Институт экспериментальной медицины Академии медицинских наук СССР,
Ленинград**Лакатош С., Хайду Я., Заводски П.**Институт биохимии Академии наук ВНР, Будапешт, Венгрия**Самсонидзе Т. Г., Киселев Н. А.**Институт кристаллографии Академии наук СССР, Москва*

Исследована диссоциация препаратов церулоплазмينا человека, выделенных в присутствии и в отсутствие ингибиторов протеолитических ферментов. Установлено, что молекула церулоплазмينا представляет собой единичную полипептидную цепь, содержащую по крайней мере 5 пептидных связей, которые являются центрами специфической протеолитической фрагментации, приводящей к образованию 6 главных полипептидных фрагментов с M 16 000 и 21 500—23 000. Эта фрагментация происходит в процессе выделения и хранения белка и вызвана действием следовых количеств протеаз. При ограниченном гидролизе нативного белка трипсином возникают полипептиды с теми же значениями молекулярных весов. По данным электронно-микроскопического анализа предложено, что молекула церулоплазмينا состоит из 6 «субъединиц» (или доменов), которые несколько отличаются друг от друга по величине и расположению которых в глобуле подчиняется точечной группе псевдосимметрии 32.

На долю голубого гликопротеида церулоплазмينا (ЦП) (КФ 1.16.3.1), содержащего 6 атомов меди, приходится 95—98% всей меди сыворотки крови млекопитающих. ЦП является мультифункциональным белком [1]: он участвует в транспорте меди, необходим для мобилизации железа из депо и включения его в апотрансферрин и благодаря своей оксидазной активности служит регулятором уровня биогенных аминов в плазме крови и в других тканях животного организма. В сыворотке крови человека обнаружены две формы ЦП, различающиеся по содержанию углеводовных цепей. Главная форма, так называемая ЦП-I, составляет около 85% суммарного количества ЦП сыворотки. Нарушение структуры и биосинтеза ЦП связано с тяжелым наследственным заболеванием человека — гепатолентикулярной дегенерацией (болезнью Вильсона — Коновалова) [2—4].

* Стажер-исследователь Института биохимии АН УзССР (Ташкент).

Сокращения: ЦП — церулоплазмин; ДДС — додецилсульфат натрия; ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид.



а

Рис. 1. Анализ препарата IV ЦП-I методом скоростной седиментации (0,05 М фосфатный буфер, рН 6,8, с 0,1 М NaCl, концентрация белка 5 мг/мл, скорость вращения ротора 52 000 об/мин, 20°) (а) и электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле (б)



б

Литературные данные о числе и величине полипептидных цепей, выявляемых в процессе диссоциации ЦП, весьма противоречивы. Были предложены октамерная [5—7], тетрамерная [8—10], димерная [11, 12] и одноцепочечная [13, 14] модели структуры этого белка. Вывод Ридена [13] о том, что наблюдаемые при диссоциации белка «субъединицы» фактически являются протеолитическими фрагментами единичной полипептидной цепи белка, был поставлен под сомнение работой Фримаца и Даниеля [9].

Расхождение результатов анализа и гетерогенность препаратов ЦП, полученных разными методами и хранившихся в разных условиях, предполагают крайнюю нестабильность этого белка и возможное изменение его под действием протеолитических ферментов. В связи с этим мы предприняли детальное сравнительное исследование диссоциации образцов ЦП, выделенных как в присутствии, так и в отсутствие ингибиторов протеаз (фенилметилсульфонилфторид — ФМСФ и ϵ -аминокапроновая кислота), и воспользовались при этом наиболее точными методами определения молекулярных весов. Одновременно методом электронной микроскопии была исследована пространственная организация молекулы ЦП.

Молекулярный вес и гетерогенность нативного ЦП. Было произведено сравнение 4 различных препаратов ЦП.

Препарат I: а) кровь от здоровых доноров собирали в стеклянные сосуды, содержащие ФМСФ (предварительно растворенный в абсолютном этаноле) в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. После свертывания крови (2 ч, 20°) сыворотку отделяли центрифугированием; б) свежую донорскую кровь собирали в сосуды, содержащие 0,01 М NaCl, 10% цитрат и 0,002% ϵ -аминокапроновую кислоту (конечные концентрации), и спустя 10 мин добавляли ФМСФ до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М; в) ФМСФ добавляли к хранившейся в течение 1 сут при 1—2° крови, которая содержала 0,01% NaCl и 10% цитрат. Сыворотку (способ «а») или плазму (способы «б» и «в») сразу же использовали для выделения ЦП. Поскольку препараты ЦП, выделенные в случаях «а», «б» и «в», не различались ни по основным физико-химическим параметрам (молекулярный вес, коэффициент седиментации, спектр поглощения, оксидазная активность), ни по распределению белковых зон при электрофорезе в присутствии ДДС, в даль-

Влияние ДДС на молекулярный вес ЦП-I (препарат III)

Условия опыта	Отношение связывания (ДДС/белок, г/г) (±5%)	Коэффициент седиментации, S (±5%)	Молекулярный вес	
			комплекса ДДС/белок (±8%)	белка в комплексе
0,15 мг/мл ДДС, 20°, 24 ч	0,4 : 1	6,9	190 000	135 000
3 мг/мл ДДС, 80°, 4 ч	1,38 : 1	5,93 3,45	120 000 44 000	49 000 18 000

Таблица 2

Фракционирование ЦП-I (препараты I, II и III) посредством электрофореза в присутствии ДДС

Номер зоны на рис. 3	Компонент, обозначение по схеме $H_2N-c-e-a-COOH$	Молекулярный вес *		Относительное содержание	Относительное молярное содержание
		Электрофорез (±15%)	Седиментационное равновесие (±3%)		
7	<i>сва</i>	130 000			
6	<i>св</i>	110 000	112 000	5,3	2,4
5		100 000			
4	<i>ва</i>	76 000			
3	<i>с</i>	65 000	64 000	1,3	1,0
2	<i>в</i>	52 000	48 000	1,0	1,0
1	<i>а</i>	18 000	16 000	1,3	3,6

* Молекулярные веса были определены при помощи калибровочной кривой (см. «Эксперим. часть»), а для сравнительно выделенных компонентов (препарат III) — методом седиментационного равновесия.

нейшем мы будем обозначать все эти препараты общим названием «препарат I».

Препарат II был получен в присутствии ФМСФ ($5 \cdot 10^{-5}M$) из хранившейся в течение 1—2 недель при -20° сыворотки ретроплацентарной крови. Все растворы, использованные для выделения препаратов I и II, содержали ФМСФ в этой же концентрации.

Препарат III был получен в отсутствие ингибиторов протеолиза из хранившейся в течение 1—2 недель при -20° сыворотки ретроплацентарной крови. Время выделения препаратов ЦП I—III составляло в среднем 5—6 сут. Все опыты с препаратами ЦП были произведены в течение двух недель после их получения.

Препарат IV отличался от препарата III тем, что опыты с ним были проведены спустя 10 месяцев его хранения в стерильных условиях при $4-5^\circ$.

Препараты I—III при скоростной седиментации мигрируют в виде единичного и симметричного пика с коэффициентом седиментации $S_{20,w} = 7,3 S$. Эти препараты не отличаются друг от друга также по величине молекулярного веса, определенного методом высокоскоростного седиментационного равновесия: все образцы гомогенны и имеют $M 128 000 \pm 4000$. Применение метода низкоскоростного седиментационного равновесия дает близкое значение: $130 000 \pm 2000$. При электрофорезе в полиакриламидном геле при оптимальном разрешении эти препараты движутся одной зоной. В отдельных случаях препараты содержали небольшую примесь апо-формы ЦП. Оксидантная активность препаратов I—III составляет 38—40, 32—34 и 29—32 $OE_{530 \text{ нм}}/мг$ белка/ч соответственно. Величина отношения оптических плотностей OE_{610}/OE_{280} для всех трех препаратов равна 0,043—0,045.

Препарат IV гетерогенен как по данным скоростной седиментации, так и по данным электрофореза (рис. 1 а, б). Гетерогенность этого препарата

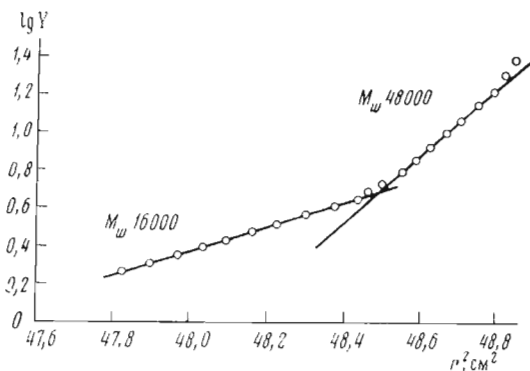


Рис. 2. Расчет молекулярных весов компонентов ЦП-I (препарат III) в растворе ДДС по данным высокоскоростного седиментационного равновесия [15]. Условия: 0,1 М фосфатный буфер (рН 6,8) + 0,1 М NaCl + 10 мг/мл ДДС + 0,01 М дитиотреит, начальная концентрация белка 0,3 мг/мл, скорость вращения ротора 22 000 об/мин, 20°

вызвана появлением низкомолекулярных фрагментов, а также частичной агрегацией молекул. Оксидазная активность препарата IV составляет 16—17 ОЕ_{530 нм}/мг белка/ч.

Диссоциация ЦП. В опытах по диссоциации ЦП (препарат III) с помощью ДДС было установлено, что процесс связывания детергента с белком происходит в две стадии. На первой стадии, когда концентрация ДДС не превышает 0,2 мг/мл, величина отношения связывания ДДС/белок составляет 0,4 : 1. При повышении концентрации ДДС величина отношения возрастает до 1,38 : 1. При низком отношении связывания белок имеет коэффициент седиментации 6,9 и M 135 000 (табл. 1), т. е. диссоциация ЦП отсутствует. При более высоком отношении связывания ДДС/белок происходит разделение полипептидных цепей, которые образуют набухшие глобулы с вовлеченными внутрь молекулами детергента (табл. 1). В опытах по высокоскоростному седиментационному равновесию диссоциированного ЦП (рис. 2) было обнаружено, что в белке имеются два полипептидных компонента с M в среднем 16 000 и 48 000, а также ряд более высокомолекулярных компонентов, одновременное определение молекулярных весов которых этим методом не представлялось возможным.

Определение молекулярных весов полипептидных компонентов ЦП. Для идентификации всех полипептидных компонентов ЦП (препараты I—IV) был применен метод электрофореза в геле, содержащем ДДС (рис. 3). Дополнительное введение мочевины до концентрации 6 М в гель и образцы белка не вызывает изменения электрофоретического распределения зон. Образцы ЦП с интактными и восстановленными дисульфидными связями характеризовались идентичными картинками электрофореза. Как следует из рис. 3 и табл. 2, в препарате I обнаруживаются два главных компонента с M 130 000 (№ 7) и 110 000 (№ 6), а также минорный компонент с M 18 000 (№ 1). Препараты II и III давали сходные картины электрофореза в отношении как числа, так и величины подвижности зон, но эти электрофореграммы различались по относительной интенсивности зон: зоны, соответствующие полипептидным цепям низкого молекулярного веса, были менее интенсивны в тех препаратах белка, в которых вероятность протеолитической фрагментации была меньше (рис. 3, II и III). Картина диссоциации изменялась только после длительного хранения препарата без подавления протеолиза. Из рис. 3, IV видно, что в препарате IV компоненты с M 130 000 (№ 7), 110 000 (№ 6) и 100 000 (№ 5) полностью исчезают, а относительное содержание компонентов с M 65 000 (№ 3) и 52 000 (№ 2) уменьшается. Одновременно увеличивается содержание компонентов с M 18 000 (№ 1) и появляются новые интенсивные зоны с M 21 500—23 000 (смесь по крайней мере двух компонентов) и 42 000. При нанесении на гель больших количеств белка (~100—200 мкг) дополнительно выявляется малоинтенсивный компонент с M 36 000 (рис. 3, IV). Все электрофоретические зоны дают положительную реакцию при специфическом окрашивании гелей на углеводы.

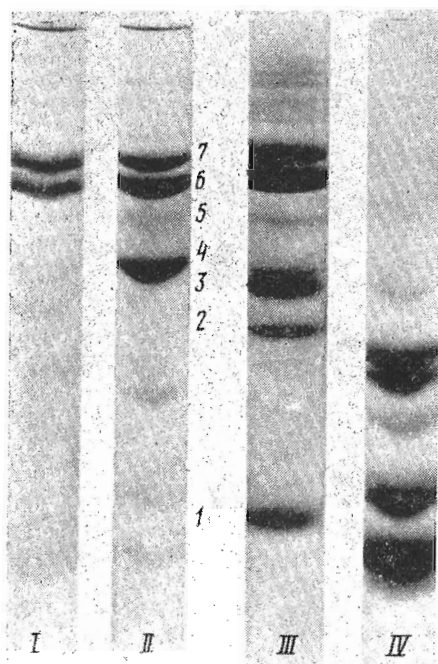


Рис. 3. Электрофорез препаратов I—IV в 5,6% полиакриламидном геле в присутствии 1% ДДС. Молекулярные веса обозначенных цифрами полипептидных компонентов приведены в табл. 2

Поскольку точность определения молекулярных весов с помощью электрофореза в присутствии ДДС составляет около $\pm 15\%$, мы выделили компоненты № 1, 2, 3 и 6 (табл. 2) посредством препаративного электрофореза в геле, содержащем ДДС (рис. 4 а), и определили значения их молекулярных весов более точным методом высокоскоростного седиментационного равновесия (табл. 2). Выделенные компоненты были подвергнуты аналитическому электрофорезу в геле в присутствии ДДС. Компоненты 1 (M_w 16 000) и 2 (M_w 48 000) были гомогенны. Компоненты 3 (M_w 64 000) и 6 (M_w 112 000) содержали следовые количества соседних, более низкомолекулярных компонентов (рис. 4 б), что может быть связано с недостаточно высокой степенью препаративного разделения.

Протеолитическая активность в очищенных препаратах ЦП. Для проверки предположения о том, что самопроизвольная фрагментация препаратов ЦП обусловлена существованием в препаратах протеазы (или протеаз) в следовых количествах, нами был применен высокочувствительный метод определения протеолитической активности [16], согласно которому производится измерение прироста флуоресценции флуорескамина, связывающегося с первичными аминогруппами протаминсульфата во время его протеолиза. Как следует из результатов этих опытов, в препарате IV действительно имеется примесь протеаз, хотя их активность относительно протаминсульфата чрезвычайно низка — порядка 12%. Для сравнения укажем, что 10^{-6} мг трипсина при инкубации с протаминсульфатом в течение 12 ч вызывает прирост интенсивности флуоресценции связывающегося с протаминсульфатом флуорескамина на 45%. Характерно, что добавление к образцам ЦП свежей цельной плазмы крови, которая имеет нулевой уровень протеолитической активности, приводит к ингибированию протеаз в препарате ЦП. Протеолитическая активность препарата ЦП также практически полностью подавляется действием ФМСФ.

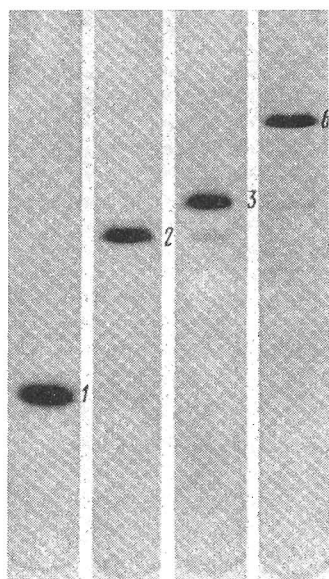
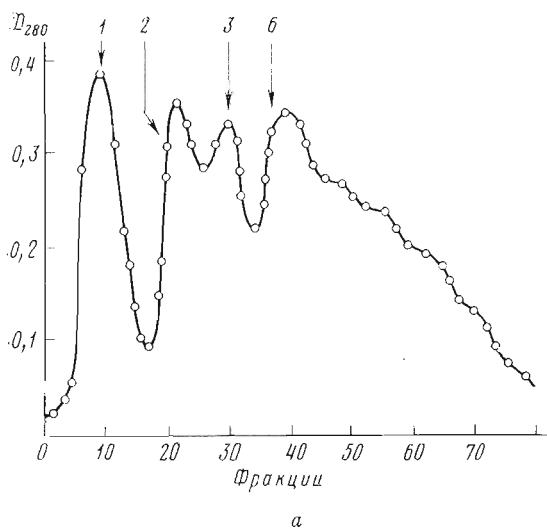


Рис. 4. Preparативный электрофорез в 5,6% полиакриламидном геле ЦП-I (препарат III) в присутствии 1% ДДС: цифрами обозначены фракции, для которых было произведено определение молекулярного веса методом высокоскоростного седиментационного равновесия (см. табл. 2) и которые были подвергнуты аналитическому электрофорезу в присутствии ДДС (а). Аналитический электрофорез в присутствии 1% ДДС компонентов 1, 2, 3 и 6, выделенных посредством препаративного электрофореза (б). Условия см. «Эксперим. часть»

Триптический гидролиз ЦП. Для того чтобы выяснить, какие продукты образуются при ограниченном гидролизе ЦП протеазой с заведомо известной специфичностью — трипсином, — были поставлены опыты по изучению кинетики триптического гидролиза ЦП методом количественного аналитического электрофореза в присутствии ДДС. Из-за невозможности проведения количественного анализа каждой из близкорасположенных зон в случае полипептидов с M 21 500—23 000 и 36 000—42 000 было определено изменение их суммарного содержания. Из рис. 5 видно, что в процессе гидролиза доля высокомолекулярных компонентов (M 100 000, 85 000, 64 000 и 48 000) уменьшается, а низкомолекулярных (M 36 000—42 000, 21 500—23 000 и 16 000) увеличивается. Обработка трипсином не приводит к появлению новых, нехарактерных для исходного препарата белка электрофоретических зон. В процессе фрагментации оксидазная активность ЦП уменьшается (на 55—60% за 20 мин гидролиза).

Электронно-микроскопический анализ. С целью установления особенностей пространственной организации нативной молекулы ЦП, которые могут обуславливать высокоспецифический характер протеолитической фрагментации полипептидной цепи, мы провели исследование ЦП (выделение из свежей крови без применения ФМСФ) методом электронной микроскопии. На микрофотографиях негативно контрастированных препаратов ЦП из раствора наблюдались разнообразные по форме частицы с размерами от 50 до 85 Å. Мы попытались, как это обычно делается при исследованиях негативно контрастированных препаратов белка, отобрать и классифицировать характерные изображения.

Можно отметить пять типов изображений. К первому типу (рис. 6 а) мы отнесли округлые частицы с размерами 80—90 Å в одном направлении и 65—75 Å — в перпендикулярном ему (отношение этих размеров в инди-

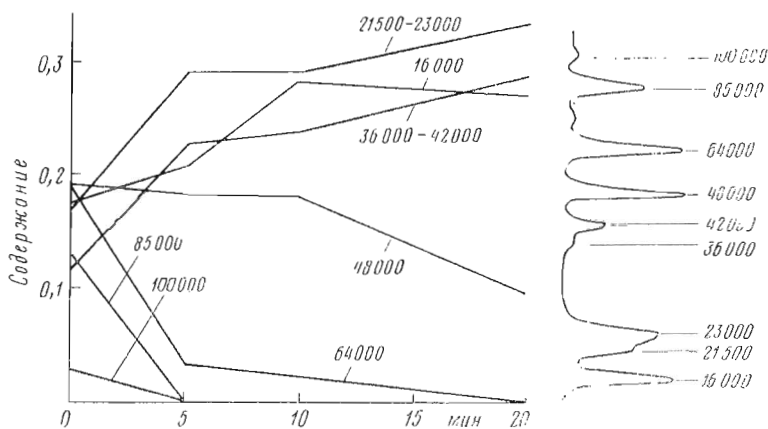


Рис. 5. Изменение относительного содержания компонентов препарата ЦП-1 (препарат белка хранился в стерильно запаянных ампулах при 4–5° в течение 7 месяцев) при гидролизе трипсином. Справа — электрофореграмма исходного образца ЦП-1, не обработанного трипсином. Указаны значения молекулярных весов

видуальных частицах составляет около 1,2). На периферии этих частиц удается наблюдать до шести доменов. В средней части изображений этого типа наблюдается сгущение контрастера. Иногда оно проявляется как размытое кольцо, а в редких случаях состоит из очень небольших пятен контрастера, формирующих своеобразную звезду. Ко второму типу изображений относятся напоминающие деформированную цифру 8 (рис. 6 б) частицы длиной около 85 Å при ширине 50 Å. Третий тип (рис. 6 в) образован четырьмя доменами, расположенными по вершинам прямоугольника. Иногда домены сливаются попарно, и тогда изображения формируются двумя полосками белковой материи. Ширина частиц около 50 Å — примерно та же, что и ширина частиц второго типа, а длина ~70 Å. Отношение длин частиц второго и третьего типов примерно такое же (~1, 2), как и отношение диаметров частиц первого типа. Четвертый тип частиц (рис. 6 г) во многом напоминает изображения третьего типа. Наблюдаются четыре домена, формирующие квадрат с размерами 65—70 Å. Главная особенность этих частиц — более четко выявляемая контрастером крестообразная полость в средней части. Для пятого типа частиц (рис. 6 д) характерны четыре небольших пятна контрастера, расположенные по вершинам параллелепипеда. Длина и ширина частиц этого типа приблизительно 65—70 Å.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что ЦП в кровяном русле существует в виде одноцепочечного белка с M 130 000*. В процессе выделения препарата I происходит расщепление цепи по единичной пептидной связи, которое затрагивает лишь небольшую часть всех молекул ЦП. В результате этого образуются два фрагмента с M 16 000 и 112 000 (рис. 3, I). Вероятно, для полного подавления гидролиза по этой особо доступной действию протеаз пептидной связи требуются значительно более высокие концентрации ФМСФ или применение ингибиторов другой специфичности.

В случае препаратов II и III гидролизуются по крайней мере еще одна пептидная связь и фрагмент с M 112 000 частично распадается на полипептиды с M 48 000 и 64 000 (рис. 3, II и III). Частичное расщепление этих связей *in vitro* приводит к изменениям каталитических свойств белка, так как величины оксидазных активностей препаратов I, II и III несколько различаются. Поскольку полипептидные фрагменты выво-

* Когда наша статья была подготовлена к печати, появилась работа [17], авторы которой приходят к такому же выводу. Предварительное сообщение о наших данных было сделано на XI конференции ФЕБО (Копенгаген, август 1977 г.) [18].

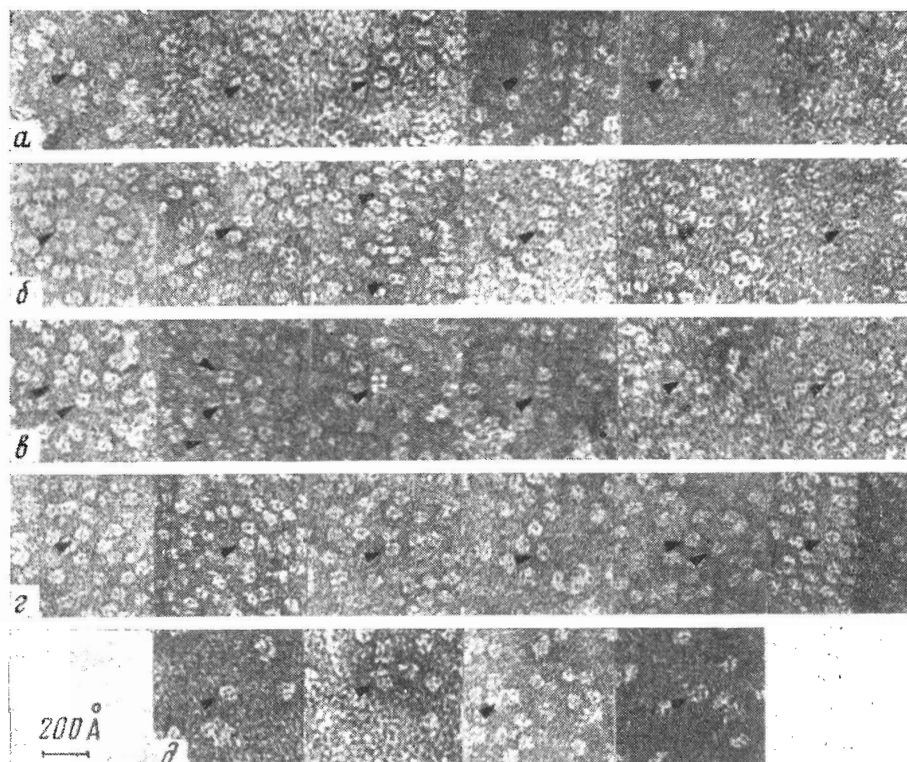


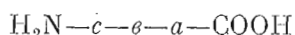
Рис. 6. Молекулы ЦП-I из раствора (характерные изображения указаны стрелками): *a* — первый тип (округлые или шестигранные частицы); *б* — второй («восьмерка»); *в* — третий (четыре домена по вершинам прямоугольника); *г* — четвертый (крестообразная полость в средней части); *д* — пятый тип (четыре точки в средней части)

бождаются только под действием ДДС и гуанидин·НСI в высоких концентрациях, можно считать, что фрагменты прочно стабилизированы в составе глобулы системой нековалентных взаимодействий. Все фрагменты ЦП представляют собой гликопептиды, и дисульфидные связи между ними отсутствуют.

Можно заключить, что гетерогенность, наблюдавшаяся разными авторами при диссоциации ЦП, — результат специфической фрагментации по определенным пептидным связям. Этот вывод подтверждается тем фактом, что число фрагментов невелико и их молекулярные веса являются строго определенными во всех препаратах. Кроме того, в образцах ЦП, выделение которых производилось без ингибиторов протеолиза (препарат IV), обнаружены только два типа N-концевых аминокислотных остатков — валин и лизин [5, 19]. О специфичности протеолитической фрагментации свидетельствует также и тот факт, что процесс диссоциации в препаратах I, II и III развивается одним и тем же путем: по мере увеличения степени протеолиза относительное содержание более высокомолекулярных компонентов уменьшается, а более низкомолекулярных возрастает. Распад фрагментов с M 48 000 и 64 000 с уменьшением молекулярного веса приблизительно в 2 и 3 раза соответственно (полипептид с M 42 000 можно считать промежуточным продуктом этого процесса, так его молекулярный вес составляет $2/3$ молекулярного веса фрагмента с M 64 000) происходит только после длительного хранения белка без ингибитора протеолиза (препарат IV), но и здесь процесс носит явно специфичный характер. В этом случае наблюдается заметное падение оксидазной активности и частичное самопроизвольное высвобождение фрагментов из глобулы, сопровождающееся агрегацией белка (рис. 1*a* и *б*).

Опыты по триптическому гидролизу ЦП показали, что даже в случае довольно сильно фрагментированного белка протеолиз имеет ограниченный характер, так как он приводит к образованию фрагментов, молекулярные веса которых не отличаются от значений, полученных при исследовании самопроизвольной фрагментации. Из рис. 5 видно, что на протяжении первых 10 мин гидролиза резко уменьшается содержание полипептида с M 64 000, возрастает содержание полипептида с M 16 000, а содержание полипептида с M 48 000 практически не изменяется. Поэтому можно считать, что полипептид с M 16 000 входит также в состав полипептида с M 64 000.

На основании данных анализа разделения фрагментов при электрофорезе в присутствии ДДС (табл. 2), результатов исследования триптического гидролиза ЦП (рис. 5) и приведенных в работе [17] сведений об N -концевых дипептидных последовательностях полипептидов ЦП схему протеолитической фрагментации полипептидной цепи белка можно представить в виде



где a , e , c — сегменты полипептидной цепи белка с M 16 000, 48 000 и 64 000, расположенные между наиболее доступными к протеолитической атаке пептидными связями. В свою очередь сегменты с M 48 000 и 64 000 содержат еще по одной и двум пептидным связям соответственно, чувствительность которых к протеолизу ниже (протеолитическая фрагментация в препарате IV). Гидролиз этих менее доступных связей приводит к образованию наиболее низкомолекулярных фрагментов (M 16 000 и 21 500—23 000). Согласно этой схеме, набор полипептидных фрагментов, выявляемых при электрофорезе в присутствии ДДС (рис. 3), сводится к различным линейным комбинациям этих шести наиболее низкомолекулярных фрагментов.

Самопроизвольный характер фрагментации препаратов ЦП можно объяснить присутствием в этих препаратах следовых количеств протеаз. Протеолитическая активность в препаратах ЦП ингибируется действием добавленной к ЦП нефракционированной плазмы крови. Очевидно, в этом случае подавление осуществляется эндогенными ингибиторами плазмы [20]. Из этого следует, что в кровяном русле гидролиз полипептидной цепи ЦП не имеет места. Можно предположить, что в процессе выделения ЦП из плазмы происходит удаление эндогенных ингибиторов протеаз, баланс между протеазами и ингибиторами нарушается и ЦП в условиях *in vitro* подвергается специфическому протеолизу по наиболее доступным пептидным связям.

Обращаясь к данным электронно-микроскопического исследования, можно предположить, что повышенная доступность небольшого числа пептидных связей к действию протеаз объясняется пространственным расположением отдельных частей глобулы ЦП. Изображения первого типа (рис. 6а) можно охарактеризовать псевдоосью симметрии 3-го порядка. Изображения второго и третьего типов (рис. 6б и в) представляют собой, по-видимому, боковые проекции молекул, когда они просматриваются перпендикулярно псевдооси 3-го порядка. При этом, судя по размерам, второй тип — это вид перпендикулярно большему диаметру частиц, а третий — перпендикулярно меньшему диаметру. Оба типа изображений характеризуются осью 2-го порядка. Из электронно-микроскопических исследований других ферментов с разрешением 20—30 Å [21, 22] известно, что такие проекции характерны для негативно контрастированных молекул с точечной группой симметрии в расположении субъединиц или доменов.

Отсюда следует важный вывод о том, что молекула ЦП имеет строение, свойственное белкам с субъединичной или доменной структурой. Можно попытаться охарактеризовать пространственное расположение доменов

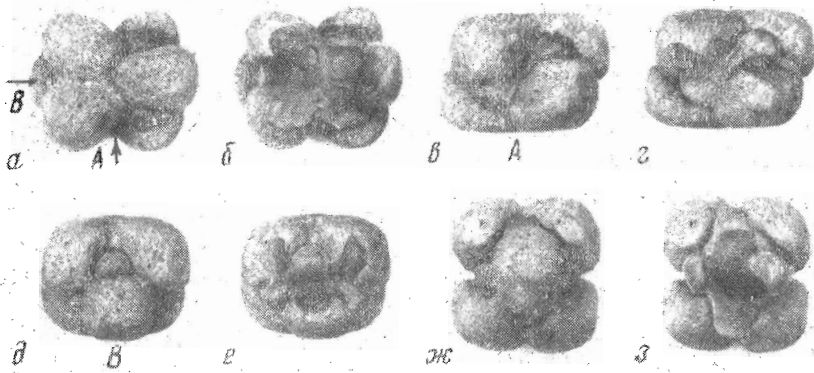


Рис. 7. Гипотетическая модель ЦП-1: *a* — модель, просматриваемая вдоль псевдооси 3-го порядка; *б* — модель «а», на которую наложена фотография внутренней полости; *в* — модель, просматриваемая вдоль оси 2-го порядка (стрелка А); *г* — модель «в» с изображением внутренней полости; *д* — модель, просматриваемая вдоль другой оси 2-го порядка (стрелка В); *е* — модель «д» с изображением внутренней полости; *ж* — модель в ориентации, соответствующей частицам четвертого типа (рис. 6г); *з* — модель «ж» с изображением внутренней полости

в глобуле ЦП и более детально. Тот факт, что изображения первого типа иногда характеризуются псевдоосью 3-го порядка, а в боковых проекциях белок распределяется на двух уровнях, говорит в пользу точечной группы псевдосимметрии 32. Псевдосимметрия может объясняться неравными размерами доменов, что согласуется с данными определения молекулярных весов протеолитических фрагментов цепи белка. Такой же тип симметрии отмечен и для структуры глицил-тРНК-синтетазы [22]. Методом проб и ошибок была построена гипотетическая модель (рис. 7). Модель состоит из шести доменов, расположенных по три на двух уровнях. Два из этих доменов в каждом уровне сближены. Когда модель просматривается вдоль псевдооси 3-го порядка (рис. 7*a*), она напоминает частицы первого типа. Это сходство увеличивается наличием в модели внутренней полости, которая в реальных частицах может быть заполнена контрастером. Из модели следует, что наиболее вероятным местом для скопления контрастера являются шесть промежутков между доменами. Заполняемые контрастером, они могут создавать видимость звезды или кольца, которые действительно иногда наблюдаются в этой проекции. Чтобы проиллюстрировать высказанные соображения, на изображение модели наложено изображение внутренней полости в соответствующей проекции. Когда модель просматривается вдоль оси 2-го порядка (рис. 7*в* и *г*), она имеет вид цифры 8. Скопления контрастера в промежутках между доменами настолько сближены, что сливаются по три и на снимках с низким разрешением могут формировать два пятна контрастера, как это действительно наблюдается в изображениях второго типа (рис. 6*б*). Когда модель просматривается вдоль другой оси 2-го порядка, длина ее меньше (рис. 7*д* и *е*). Скопления контрастера в промежутках между доменами сливаются. В результате в этой проекции модель похожа на частицы третьего типа.

Когда модель темного наклонена (рис. 7*ж* и *з*), внутренняя полость проецируется как крест. В этом положении модель соответствует изображениям четвертого типа (рис. 6*г*). Изображение пятого типа (рис. 6*д*) можно трактовать с помощью модели, находящейся в положении на рис. 7*ж*, если предположить, что контрастер совсем не проникает в центральную часть молекулы.

Известны электронно-микроскопические исследования ЦП [23], в которых делается вывод, что его молекулы характеризуются цилиндрической формой. Отношение диаметра цилиндра (102 Å) к высоте равно 1,71.

Эти размеры согласуются с нашими наблюдениями. Хотя приведенная модель упаковки доменов в глобуле ЦП является в значительной степени предварительной, «рабочей», требующей дополнительных доказательств, она достаточно убедительно свидетельствует о том, что молекула ЦП обладает структурными признаками, характерными для молекул белков с доменной структурой. Анализ наиболее характерных изображений частиц на микрофотографиях позволяет заключить, что молекула ЦП построена из доменов, расположенных с точечной группой псевдосимметрии 32. По нашим данным, число доменов в молекуле ЦП равно шести, что совпадает с числом наиболее низкомолекулярных протеолитических фрагментов. Поскольку нами установлено, что между этими фрагментами полипептидной цепи дисульфидные связи отсутствуют, то, следовательно, все шесть таких связей ЦП [24] участвуют в стабилизации третичной структуры фрагментов.

Полученные в работе результаты дают нам возможность высказать гипотезу о том, что локализация наиболее подверженных протеолитической атаке пептидных связей, соединяющих шесть главных сегментов единичной полипептидной цепи ЦП, связана с пространственным расположением шести доменов, выявленных при электронно-микроскопических исследованиях.

Экспериментальная часть

Молекулярную форму ЦП, так называемую ЦП-I, выделяли из свежей донорской крови или из хранившейся сыворотки ретроплацентарной крови по методу Бромана и Кьеллина [24, 25]. Бактериостатическим агентом служил мертиолат натрия (Geelawson Chem. Ltd.), содержащийся во всех растворах в концентрации $10^{-3}\%$.

Концентрацию ЦП определяли спектрофотометрически согласно прописи из работы [5].

Оксидазную активность ЦП определяли по методу Равина [26] с применением *p*-фенилендиамина в качестве субстрата.

Опыты по скорости седиментации и седиментационному равновесию производили при помощи аналитических ультрацентрифуг MOM 3170 (Венгрия) и Spinco, модель E (США), снабженных оптической системой Филпота — Свенссона и интерферометром Рэля. Точность поддержания скорости вращения ротора была ± 20 об/мин, а температуры $\pm 0,1^\circ$. Для подготовки препарата к раствору белка добавляли гуанидин-НСI до 6 М концентрации, через 24 ч инкубации при комнатной температуре образец диализовали против 1% раствора ДДС. Молекулярные веса и молекулярно-весовые распределения определяли методом высокоскоростного седиментационного равновесия по Ифантису [15], а также при помощи более точного метода низкоскоростного седиментационного равновесия. Для расчетов использовали значение парциального удельного объема ЦП, равное 0,715 мл/г [27]. Определение молекулярного веса комплексов белка с ДДС (Sigma) методом седиментационного равновесия производили согласно Тенфорду и др. [28], применяя найденные в работе [28] значения парциального удельного объема ДДС.

Степень связывания ДДС с белком определяли согласно работе [29].

Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли как описано в работе Жертена и др. [30].

Приготовление образцов для электрофореза в 5,6% полиакриламидном геле, содержащем 1% ДДС (аналитический и препаративный варианты). К белковому раствору добавляли равный объем раствора следующего состава (раствор А): 30% сахара, 0,01% пиронин G, 2% ДДС, 80 мМ трис, 40 мМ ацетат натрия, 10 мМ EDTA (pH 7,4). Смесь инкубировали 4 ч при 80° или 5 мин при 100° в герметически закрытых пробирках. Для восстановления дисульфидных связей в белке применяли раствор А, содержащий 100 мМ дитиозритрит.

Аналитический электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии 1% ДДС производили по методу Файрбенкса и др. [31]. Для определения молекулярных весов полипептидных компонентов использовали калибровочную кривую, построенную по данным электрофореза белков (Serva) известного молекулярного веса: бычьего сывороточного альбумина (69 000), каталазы (60 000), овальбумина (43 000), альдолазы (39 500), химо tripsина (25 000), ферритина (18 500) и цитохрома с (14 000). В качестве маркера применяли пиронин G. Количество белка 7—70 мкг/гель. При использовании в электрофорезе мочевины (Fluka) ее концентрация в гелях, электродных буферных растворах и образцах белка составляла 6 М. С целью количественного определения относительного содержания белка в электрофоретических зонах гели сканировали в микроденситометре G II (Carl Zeiss) и посредством сопряженного с ним компьютера «Наири-2» интегрировали площадь под пиками. Точность определения площади — 2%.

Идентификацию гликопептидных компонентов в полиакриламидном геле после проведения электрофореза в присутствии ДДС осуществляли по методу, описанному в работе [32].

Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем 1% ДДС, производили в аппарате Canalco Prep — Disc^R (США), снабженном колонкой PD-320. Высота столбика геля составляла 8 см, сила тока 60 мА, длительность электрофореза 4 ч. Для элюции применяли электродный буфер (см. [31]), объем фракций 4 мл), содержащий 5 мМ дитиотреит. На гель наносили около 4 мл раствора белка с концентрацией 10 мг/мл.

Триптический гидролиз ЦП производили с использованием трипсина, обработанного толуолсульфонилаланилхлорметилкетонем (Serva). К раствору белка (10 мг/мл) в 0,01 М трис-HCl-буфере (рН 7,4) добавляли трипсин (Serva) в соотношении субстрат — фермент, равном 100 : 1. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, к ним добавляли равный объем раствора А, содержащего $5 \cdot 10^{-5}$ М ФМСФ, и смесь нагревали на водяной бане при 100° в течение 5 мин. Затем раствор наносили на гель и производили аналитический электрофорез, как описано выше.

Протеолитическую активность в препаратах ЦП измеряли по методу [16] при использовании протаминсульфата (Sigma) в качестве субстрата. Для анализа брали по 0,1 мл стерильного раствора протаминсульфата с концентрацией 75 мг/мл. Бактериостатическим агентом служил мертиолат натрия в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ %. Для статистически достоверного определения следовых количеств протеаз в препаратах ЦП время инкубации реакционной смеси при 37° было увеличено до 4 сут. Интенсивность флуоресценции флуорескамина (Serva) регистрировали при помощи спектрофлуориметрической приставки к спектрофотометру EPS-3T (Hitachi). Длина волны возбуждающего света 365 нм, регистрация осуществлялась при 485 нм. Точность определения 3%.

При электронно-микроскопических исследованиях для контрастирования использовали 2% раствор уранилацетата. Микрофотографии получали на электронном микроскопе JEM-100C (Япония) при увеличении 50 000 и ускоряющем напряжении 80 кВ.

Авторы благодарят В. С. Гуревича (Институт экспериментальной медицины АМН) за техническую помощь и В. М. Божкова (Институт цитологии АН СССР) за предоставление программы для ЭВМ «Наири-2».

ЛИТЕРАТУРА

1. Frieden E., Hsieh H. S. (1976) in: Adv. Enzymol. (Meister A., ed.), John Wiley, vol. 44, p. 187—236.
2. Neifakh S. A., Monakhov N. K., Shaposhnikov A. M., Zubzhitski Yu. N. (1969) Experientia, 25, 337—344.

3. Gaitskhoki V. S., Kisselev O. I., Moshkov K. A., Puchkova L. V., Shavlovski M. M., Shulman V. S., Vacharlovski V. G., Neifakh S. A. (1975) *Biochem. Genet.*, **13**, 533—550.
4. Neifakh S. A., Vasiletz I. M., Shavlovski M. M. (1972) *Biochem. Genet.*, **6**, 231—238.
5. Kasper C. B., Deutsch H. F. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 2325—2337.
6. Poulík M. D. (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 476—501.
7. Poillon W. N., Bearn A. G. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **127**, 407—427.
8. Simons K., Bearn A. G. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 260—270.
9. Freeman S., Daniel E. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4806—4810.
10. McCombs M. L., Bowman B. H. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **434**, 452—461.
11. Василец И. М., Кушнер В. П., Мошков К. А., Нейфах С. А. (1973) *Докл. АН СССР*, **208**, 729—732.
12. Shokeir M. H. K. (1973) *Clin. Biochem.*, **6**, 9—14.
13. Rydén L. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 380—386.
14. Lowenstein H. (1975) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **7**, 1—9.
15. Yphantus D. A. (1964) *Biochemistry*, **3**, 297—317.
16. Seelich T., Astrup T., Furlan M., Beck E. A. (1977) *Biochem. Med.*, **17**, 202—214.
17. Kingston I. B., Kingston B. L., Putnam F. W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5377—5381.
18. Lakatos S., Hajdu J., Moshkov K. A., Závodszy P. (1977) *Abstracts of 11th FEBS Meeting*, C-3, 216, 8/9.
19. Гонцова Л. А., Василец И. М., Шавловский М. М. (1969) *Биохимия*, **34**, 1008—1014.
20. Laurell C.-B., Seppsson S.-O. (1975) in: *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control* (Putnam F. W., ed.), 2d ed., vol. 1, pp. 229—259, Acad. Press, N. Y.—San Francisco—London.
21. Josephs R. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 147—153.
22. Киселев Н. А., Стельмащук В. Я., Сургучева И. Т., Сургучев А. П. (1976) *Докл. АН СССР*, **229**, 217—219.
23. Trip A. J., Van Bruggen E. F. J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **263**, 31—40.
24. Rydén L., Björk I. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3411—3417.
25. Broman L., Kjellin K. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **82**, 101—109.
26. Ravin H. A. (1956) *Lancet*, **1**, 726—727.
27. Magdoff-Fairchild B., Lovell F. M., Low B. W. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3497—3499.
28. Tanford C., Nozaki Y., Reynolds J. A. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2369—2376.
29. Gráf L., Szalontai B., Barát E., Závodszy P., Borvendég J., Herman I., Cseh G. (1974) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, **9**, 309—317.
30. Hjertén S., Jerstedt S., Tiselius A. (1965) *Anal. Biochem.*, **11**, 219—223.
31. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.
32. Clarke J. T. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 428—433.

Поступила в редакцию
3.VIII.1978

MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMAN CERULOPLASMIN AS REVEALED BY LIMITED PROTEOLYSIS AND ELECTRON MICROSCOPY

MOSHKOV K. A., KARIMOVA Kh. M., NEIFAKH S. A., LAKATOS S.,
HAJDU J., ZÁVODSZKY P., SAMSONIDZE T. G., KISELEV N. A.

*Institute for Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Leningrad; Institute of Biochemistry, Hungarian
Academy of Sciences, Budapest; Institute of Crystallography,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The dissociation of the homogeneous human ceruloplasmin preparations isolated from fresh donor blood in the presence of the proteolytic inhibitors and from stored retroplacental blood serum both with and without inhibitors was investigated by means of electrophoresis and analytical ultracentrifugation. The ceruloplasmin molecule is a single polypeptide chain (M 130 000) with at least five peptide bonds being in vitro the points of specific proteolytic fragmentation, yielding six main fragments of molecular weights 16000 and 21500-23000. Spontaneous specific fragmentation of the ceruloplasmin molecule is due to trace amounts of proteases which seemingly originate from blood plasma. Limited tryptic hydrolysis of ceruloplasmin resulted in the appearance of polypeptides having the same molecular weights as above fragments. Analysis of the electron microscopic images allows to propose a tentative model for ceruloplasmin: six «subunits» (or domains) somewhat different in size are arranged with 32 point group pseudosymmetry.