

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ МЕДИ

© 2021 г. М. В. Петухов^{1,2}, А. В. Соколов³, В. А. Костевич³, В. Р. Самыгина^{1,4,*}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

³ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: lera@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 22.04.2020 г.

После доработки 02.05.2020 г.

Принята к публикации 27.05.2020 г.

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния исследована олигомеризация медьсодержащей ферроксидазы церулоплазмينا при наличии не связанной с белком меди в растворе. Церулоплазмин является мономером с молекулярной массой ~132 кДа. Добавление хлорида меди в концентрации 10 мкМ приводит к димеризации 60% белка. Анализ межсубъединичных контактов показал, что димеризация может препятствовать образованию белок-белковых комплексов церулоплазмينا с белками лейкоцитов миелопероксидазой и пероксидазой эозинофилов. Образование этих комплексов является частью защитной реакции организма на воспалительные процессы. Также, вероятно, димерный церулоплазмин теряет способность связывать и окислять один из субстратов – *p*-фенилендиамин.

DOI: 10.31857/S0023476121050179

ВВЕДЕНИЕ

Олигомеризация белков может являться причиной некоторых нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и других [1, 2]. Триггерами олигомеризации могут служить ионы металлов. Индуцированная металлами агрегация может встречаться как у частично разупорядоченных белков, так и у глобулярных. Например, ионы хрома, кобальта и никеля способствуют агрегации альбумина [3]. Часто встречаются данные, свидетельствующие о том, что агрегацию белков способны вызывать ионы цинка и меди [4–7]. Медь присутствует в организме человека в концентрации 16–20 мкМ в крови, 15 мкМ в синаптической щели и 0.5–2.5 мкМ в спинномозговой жидкости [8]. Ее концентрация в спинномозговой жидкости повышена в 2.2 раза у пациентов с болезнью Альцгеймера [9]. При болезни Альцгеймера концентрация так называемой свободной (диализуемой) меди в плазме крови достигает 5 мкМ [10].

Церулоплазмин (ЦП) – медьсодержащая многофункциональная гликозилированная ферроксидаза с молекулярной массой (ММ) ~132 кДа, циркулирующая в растворимой форме в плазме крови. Благодаря способности превращать токсичное двухвалентное железо в трехвалентное он

является природным антиоксидантом. ЦП содержит от 40 до 70% меди плазмы крови [11]. Большинство исследований такими методами, как гель-фильтрация, электрофорез в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях и малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), показывают, что ЦП млекопитающих является мономером [12–15]. Ранее в литературе была описана так называемая димерная изоформа ЦП с молекулярной массой ~200 кДа [16]. Димер ЦП был обнаружен в плазме крови здоровых доноров и секретировался культурой гепатоцитов (HepG2). Опыты, в которых при кросс-сшивке мономерного ЦП с помощью дитиобиссукцинимидилпропионата образовался продукт с ММ ~200 кДа, а при ограниченном протеолизе мономерного и димерного ЦП образовались идентичные фрагменты, позволили заключить, что обнаруженная ими изоформа ЦП является димером, а не продуктом посттрансляционной модификации или альтернативного сплайсинга [16]. Полипептидная цепь белка свернута в глобулу, состоящую из шести доменов, расположенных в форме псевдогексамера, соединенных длинными петлями. Благодаря ионам меди в структуре ЦП помимо ферроксидазной активности обладает свойствами оксидазы, NO-оксидазы, NO₂-синтазы, су-

Таблица 1. Структурные параметры ЦП, полученные по данным МУРР

	R_g , нм	D_{\max} , нм	V_p , нм ³	ММ, кДа	χ^2	Объемные доли мономер : димер
Эксперимент	4.2 ± 0.1	15 ± 1	305 ± 10	190 ± 20	4.03	$(0.4 \pm 0.01) : (0.6 \pm 0.01)$
Мономер ЦП	2.9	9.0	195	129.1*		
Димер ЦП	4.2	15	390	258.2**		

* [28].

** Значение получено исходя из молекулярной массы (ММ) мономера в [28].

пероксиддисмутазы. Структурные исследования показывают, что ЦП человека содержит шесть–восемь центров связывания меди, из которых шесть основных сайтов всегда заполнены, а заполнение двух лабильных сайтов наблюдается не всегда [13]. ЦП крысы содержит на один лабильный сайт больше [17]. Обнаружено, что при избытке меди ЦП подвержен олигомеризации. Было исследовано олигомерное состояние ЦП в растворе методом МУРР в присутствии хлорида меди и обнаружена частичная димеризация белка. В результате была получена трехмерная модель димера низкого разрешения, определены зоны контактов мономер–мономер.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка церулоплазмينا. Для получения препарата мономерного ЦП с $A_{610}/A_{280} > 0.049$ плазму крови с добавлением 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 0.1 мМ фенолметилсульфонил фторида (PMSF) подвергали хроматографии на UNOsphere Q и неомидин-агарозе [18]. Далее ЦП концентрировали до 80 мг/мл с помощью центрифужной ячейки Vivaspin 20 ($M > 100$ кДа), трижды заменяя 0.1 М Neres-NaOH pH 7.5.

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Предварительные измерения малоуглового рассеяния ЦП были проведены на станции БиоМУР Курчатовского центра синхротронного излучения [19]. Финальные измерения МУРР были проведены на станции EMBL P12 BioSAXS (кольцо PETRA-III синхротрона DESY, Гамбург, Германия) [20] в диапазоне векторов рассеяния $0.023 < s < 5.0 \text{ нм}^{-1}$ ($s = 4\pi \sin \theta / \lambda$, где 2θ – угол рассеяния и $\lambda = 0.124$ нм – длина волны). Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M (фирма DECTRIS, Швейцария). Время экспозиции одного образца – 20 кадров по 0.05 с каждый. При сравнении временных кадров радиационного повреждения зафиксировано не было. Данные были собраны при концентрации ЦП 1.5–7.0 мг/мл (11–53 мкМ) как в присутствии 10 мкМ CuCl_2 , так и без добавления соли меди. Первичную обработку экспериментальных данных проводили в соот-

ветствии со стандартными процедурами [21]. В частности, усреднение сигнала от буфера и его вычитание осуществляли с использованием программы PRIMUS [22]. Рассеяние в нулевой угол $I(0)$ и радиус инерции R_g вычислены с помощью приближения Гинье [23]. Программу обратного фурье-преобразования GNOM [24] использовали для оценки максимального размера частиц D_{\max} . Эффективные ММ частиц в растворе получены путем сравнения с рассеянием на эталонном образце бычьего сывороточного альбумина (66 кДа). В качестве дополнительного контроля ММ использовали исключенный (породовский) объем V_p [25, 26].

Олигомерное равновесие. Альтернативные модели димера ЦП, полученные с помощью докинга, применяли для приближения экспериментальных данных образца, содержащего мономеры и димеры. Анализ смесей мономер–димер осуществляли по программе OLIGOMER [22], которая приближает данные рассеяния линейной комбинацией кривых рассеяния компонентов смеси. Варьируемыми параметрами являются объемные доли компонентов, а приближение осуществляется путем минимизации невязки χ^2 между экспериментальными данными $I_{\text{exp}}(s)$ и рассчитанной кривой $I_{\text{calc}}(s)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная кривая МУРР для раствора ЦП с добавлением 10 мкМ хлорида меди показана на рис. 1. Соответствующие общие параметры растворенных частиц приведены в табл. 1. В табл. 1 также приведены теоретические значения R_g , D_{\max} , V_p для кристаллографической модели и ММ мономера по данным масс-спектрометрии [27], поскольку этот метод намного точнее определяет ММ белка, чем теоретические расчеты по кристаллографической модели (118 кДа) или аминокислотной последовательности ЦП (122.2 кДа) из-за гликозилирования, типичного для белков млекопитающих [27]. Полученные экспериментально для образца церулоплазмينا ММ и V_p свидетельствуют о том, что в растворе находятся как мономеры, так и димеры ЦП в со-

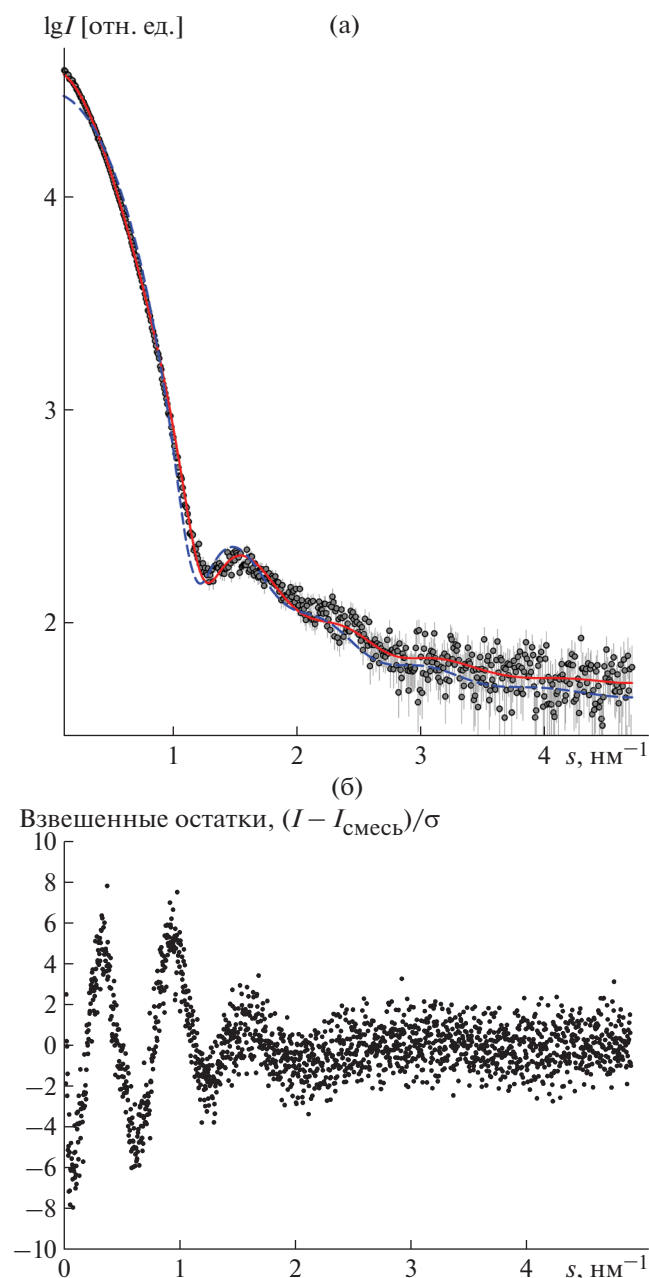


Рис. 1. Кривые МУРР раствора церулоплазмينا (а): кружки — экспериментальные данные, штриховая линия — приближение кристаллографической моделью мономера, сплошная линия — приближение смесью мономера и димера в соотношении 40 : 60%; распределение взвешенных аминокислотных остатков в случае приближения смесью $(I(s) - I_{\text{смесь}}(s))/\sigma(s)$ (б).

отношении 40 : 60%. Действительно, кривая МУРР, рассчитанная для мономера ЦП, систематически отличается от экспериментальных данных в области малых и средних углов. Олигомерное равновесие в смеси было охарактеризовано с помощью линейной комбинации кривых рассеяния, рассчитанных для кристаллографической модели

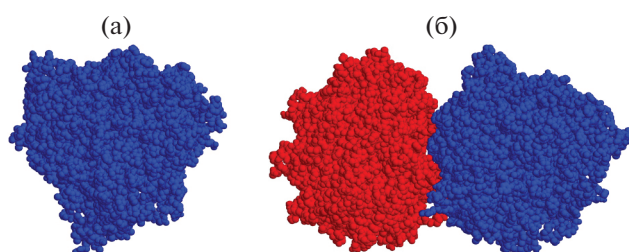


Рис. 2. Кристаллографическая модель мономера церулоплазмينا (а) и оптимальная модель димера, полученная докингом (б).

ЦП (код pdb 4enz) и моделей димера, построенных с использованием сервера ClusPro [28]. Всего было рассмотрено двадцать возможных вариантов димеризации ЦП. При помощи программы OLIGOMER и докинга найден оптимальный вариант димера, а также определены объемные доли мономера и димера, которые совпали со значениями, полученными из анализа ММ и V_p . На рис. 2, 3 представлена оптимальная модель димера, а на рис. 1 — приближение экспериментальных данных МУРР смесью 40% кристаллографического мономера с 60% оптимального варианта димера. Несколько высокое значение χ^2 , видимо, связано с недооцененными ошибками эксперимента. Контакт мономеров расположен далеко от сайтов связывания меди, как основных, так и лабильных.

Анализ областей димеризации позволил приблизительно определить основные зоны контактов. Петля 698–710 субъединицы *A* взаимодействует с доменом III субъединицы *B*. С этим доменом взаимодействует, вероятно, и Trp669 субъединицы *A* (рис. 4). Trp669 и Ser662 относятся к сайту связывания *p*-фенилендиамина. Этот аро-

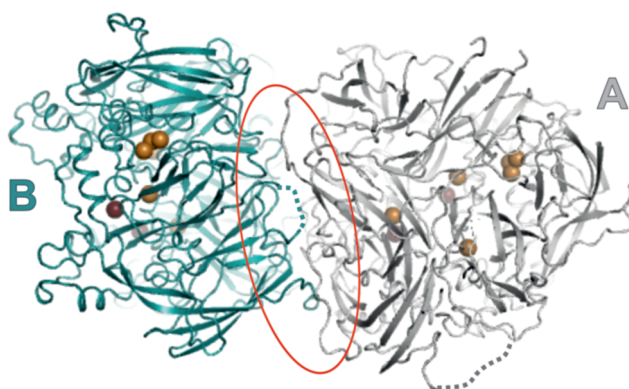


Рис. 3. Модель димера церулоплазмينا: ионы меди изображены сферами, темным цветом показаны ионы в лабильных сайтах связывания меди, зона контакта мономер–мономер выделена овалом, *A* и *B* — субъединицы.

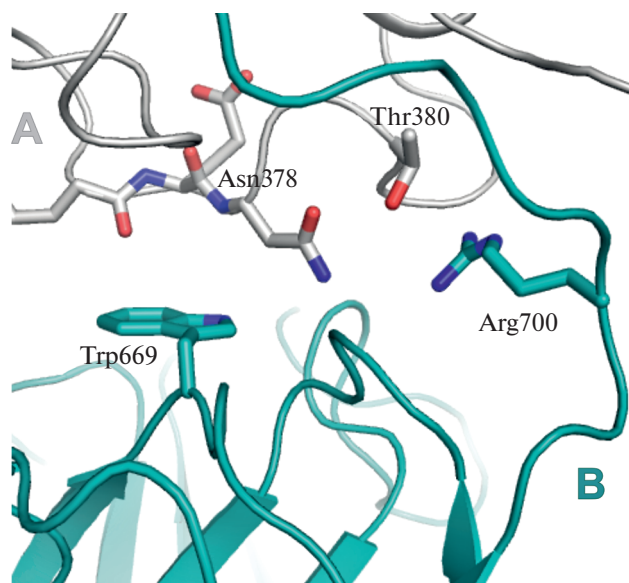


Рис. 4. Внутримерный контакт в области *p*-фенилендиаминсвязывающего сайта.

матический амин является классическим субстратом для измерения оксидазной активности ЦП [29, 30]. Следовательно, образование димера может блокировать связывание этого субстрата и, соответственно, его окисление.

Другой контакт расположен в области петли 885–890, соединяющей домены V и VI субъединицы A с доменом IV субъединицы B. Способность ионов металлов вызывать агрегацию конкретного белка зависит от многих параметров. В их число входят тип металла и белка, внутриклеточная концентрация ионов металла, структура белка, содержание и взаимное расположение

потенциальных лигандирующих групп в боковых цепях аминокислот. К таким группам относятся тиоловая, имидазольная и карбоксилатная [31]. Предпочтительным кандидатом на роль лиганда ионов меди является гистидин [32]. Используемый метод не позволяет точно определить сайты связывания металла, тем более что в зонах контактов расположены преимущественно лабильные междоменные петли, которые могут иметь различные конформации. Конформацию одного из участков ЦП, а.а 885–890, предположительно вовлеченного в межмолекулярное взаимодействие, ни разу не удалось установить при рентгеноструктурном анализе [13].

Аминокислотные последовательности областей зон межмолекулярных контактов не содержат гистидины. Однако потенциальный сайт связывания иона меди с типичными лигандами может быть сформирован боковыми цепями Glu704 (субъединицы B) и Met580 (субъединицы A), расположенными на α -спирали (рис. 5а). Другой потенциальный сайт включает в себя Glu 419 (субъединицы A) и Glu712 (субъединицы B) (рис. 5б). Аргинин также является предпочтительным лигандом для Cu^{2+} [32], и нельзя исключить, что Arg701 (субъединицы B) (рис. 5а) может быть вовлечен в связывание ионов металла, как и соседний Arg700 (рис. 4). Потенциальная роль димеризации ЦП под действием ионов меди вытекает из анализа областей олигомеризации. Петля 885–890 участвует в обнаруженных *in vivo* белок-белковых взаимодействиях ЦП [13], ингибируя в них миелопероксидазу и пероксидазу эозинофилов [33]. Таким образом, ЦП предотвращает синтез хлорноватистой кислоты (НОС) и окисление ряда ароматических субстратов. НОС является мощным антибактериальным агентом и частью

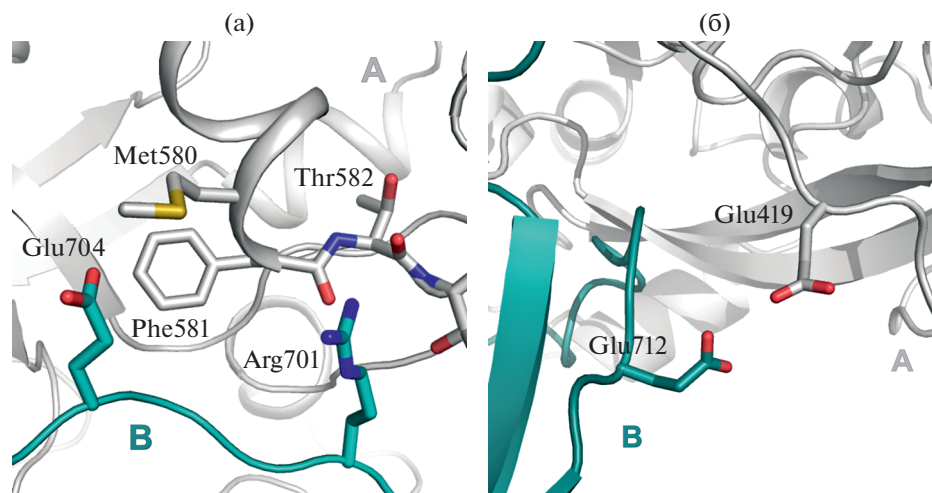


Рис. 5. Потенциальные сайты связывания ионов свободной меди: а – контакт в области Met580, б – контакт в области Glu419.

врожденного иммунного ответа. Однако НОСИ повреждает все виды биополимеров, и ее избыток может приводить к галогенирующему стрессу, сопровождающему хронические воспалительные заболевания, в том числе атеросклероз [13, 34]. Расположение в области димеризации петли 885–890 экранирует ее и, предположительно, будет мешать образованию упомянутых выше белок-белковых комплексов, лишая ЦП ингибирующего действия на миелопероксидазу и пероксидазу эозинофилов. Таким образом, в результате действия избытка ионов меди эффективность реализации части функций ЦП может существенно снижаться.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (грант № МД-1901.2020.4) в части выделения и очистки ЦП, Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части обработки малоугловых данных и при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (Приказ № 1360) в части измерения экспериментальных кривых МУРР и моделирования димера ЦП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chiti F., Dobson C.M.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. V. 75. P. 333. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
2. *Soto C.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. V. 4. P. 49. <https://doi.org/10.1038/nrn1007>
3. *Hedberga X.Y.S., Dobryden I., Chaudhary H. et al.* // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2019. V. 173. P. 751. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.061>
4. *Brown D.R., Qin K., Herms J.W. et al.* // *Nature.* 1997. V. 390. P. 684. <https://doi.org/10.1038/37783>
5. *Atwood C.S., Moir R.D., Huang X. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 12817. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12817>
6. *Paik S.R., Shin H.J., Lee J.H. et al.* // *Biochem. J.* 1999. V. 340. P. 821.
7. *Morgan C.J., Gelfand M., Atreya C. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 309. P. 339. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4661>
8. *Brown D.R., Qin K., Herms et al.* // *Nature (London).* 1997. V. 390. P. 684. <https://doi.org/10.1038/37783>
9. *Multhaup G., Schlicksupp A., Hesse et al.* // *Science.* 1996. V. 271. P. 1406. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1406>
10. *Squitti R., Quattrocchi C.C., Salustri C. et al.* // *Prion.* 2008. V. 2. P. 23. <https://doi.org/10.4161/pri.2.1.6297>
11. *Lindely M.C.* // *Metallomics.* 2016. V. 8. P. 887. <https://doi.org/10.1039/C6MT00103C>
12. *Sabatucci A., Vachette P., Vasilyev V.B. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371. P. 1038. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.089>
13. *Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G. et al.* // *PlosOne.* 2013. V. 8. P. e67145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067145>
14. *Sokolov A.V., Dadinova L.A., Petoukhov M.V. et al.* // *Biochem. (Moscow).* 2018. V. 83. P. 701. <https://doi.org/10.1134/S000629791806007X>
15. *Samygina V.R., Sokolov A.V., Pulina M.O. et al.* // *Crystallography Reports.* 2008. V. 53. P. 655. <https://doi.org/10.1134/S1063774508040172>
16. *Sato M., Schilsky M.L., Stockert R.J. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 2533.
17. *Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G. et al.* // *Metallomics.* 2017. V. 9. P. 1828. <https://doi.org/10.1039/C7MT00157F>
18. *Соколов А.В., Костевич В.А., Романико Д.Н. и др.* // *Биохимия.* 2012. Т. 77. С. 775.
19. *Peters G.S., Zakharchenko O.A., Konarev P.V. et al.* // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2019. V. 945. P. 162616. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2019.162616>
20. *Blanchet C.E., Spilotos A., Schwemmer F. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2015. V. 48. P. 431. <https://doi.org/10.1107/S160057671500254X>
21. *Feigin L.A., Svergun D.I.* *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering.* New York: Plenum Press. XIII, 1987. 335 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6624-0>
22. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2003. V. 36. P. 1277. <https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
23. *Guinier A.* // *Ann. Phys. (Paris).* 1939. V. 12. P. 161. <https://doi.org/10.1051/anphys/19391120161>
24. *Svergun D.I.* // *J. Appl. Cryst.* 1992. V. 25. P. 495. <https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
25. *Porod G.* // *General Theory, in Small-Angle X-ray Scattering / Eds. Glatter O., Kratky O.* London: Academic Press, 1982. P. 17.
26. *Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2012. V. 45. P. 342. <https://doi.org/10.1107/S0021889812007662>
27. *Boivin S., Aouffen M., Fournier A. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 288. P. 1006. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5881>
28. *Kozakov D., Hall D.R., Xia B et al.* // *Nature Protocols.* 2017. V. 12. P. 255. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
29. *Ravin H.A.* // *J. Lab. Clin. Med.* 1961. V. 58. P. 161.
30. *Varfolomeeva E.Y., Semenova E.V., Sokolov A.V. et al.* // *Free Radical Res.* 2016. V. 50. P. 909. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1197395>
31. *Tamás M.J., Fauvet B., Christen Ph. et al.* // *Curr. Genet.* 2018. V. 64. P. 177. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0748-x>
32. *Wu Zh., Fernandez-Lima A., Russel D.H.* // *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* 2010. V. 21. P. 522. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.12.020>
33. *Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T. et al.* // *Free Radical Res.* 2015. V. 46. P. 800. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1005615>
34. *Panasenko O.M., Torkhovskaya T.I., Gorudko I.V. et al.* // *Biochem. (Moscow).* 2020. V. 85. (S. 1.) P. 34. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140035>