

**ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА КРЫСЫ,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ,
ПОЛУЧАВШИХ С ПИЩЕЙ СОЛИ СЕРЕБРА**

© *A. H. Скворцов^{1,2}, Е. Ю. Ильчева², Е. А. Затуловский², А. Н. Савельев²,
Н. В. Цымбаленко³, М. М. Шавловский³, Л. В. Пучкова^{2,3}*

¹ Институт цитологии РАН,

² С.-Петербургский государственный политехнический университет

^{и 3} Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: *skvor@mail.cytspb.rssi.ru, colbug@mail.ru*

Абиогенные ионы Ag(I) благодаря сходству электронной структуры с ионами меди (I) способны конкурировать с Cu(I) за связывание с белками, транспортирующими медь из внеклеточного пространства к местам формирования купроэнзимов в клетке. У животных, получающих с кормом соли серебра, развивается дефицит внеклеточной меди, ассоциированной с церулоплазмином (ЦП), основным медьпереносящим белком сыворотки крови позвоночных. В работе представлены результаты изучения биохимических и физико-химических свойств ЦП сыворотки крови крыс, в течение 4 нед получавших с пищей AgCl (Ag-крысы). Методом ионообменной хроматографии из сыворотки крови Ag-крыс получен набор фракций ЦП (Ag-ЦП), элюированных ступенчатым градиентом NaCl. Для каждой фракции методами прямого определения ферментативной активности в геле оценена оксидазная и ферроксидазная активность и измерена кинетическим методом каталитическая активность в реакции окисления специфического хромогенного субстрата для холо-ЦП. Молекулярная масса, относительная электрофоретическая подвижность и соотношение апо- и холо-форм Ag-ЦП установлены методом иммуноблотинга. Продемонстрировано, что препараты Ag-ЦП не содержат продуктов спонтанной ограниченной протеолитической деградации, характерных для препаратов холо-ЦП. Фракции Ag-ЦП сопоставлены по оптическим спектральным свойствам, третичной структуре, устойчивости к тепловой денатурации, а также содержанию ионов меди и серебра с холо-ЦП сыворотки крови интактных крыс. Показано, что препарат Ag-ЦП содержит примерно 1—2 % ЦП, ферментативные и спектральные характеристики которого совпадают с холо-ЦП. В препарате Ag-ЦП соотношение [Ag] : [Cu] соответствует примерно 4 : 1. По данным кругового дихроизма и дифференциальной сканирующей калориметрии, третичная структура большинства молекул в Ag-ЦП нарушена, что, возможно, повышает их устойчивость к спонтанной ограниченной протеолитической деградации.

Ключевые слова: метаболизм меди, церулоплазмин, транспорт Cu(I)/Ag(I), Ag-церулоплазмин, ионообменная хроматография, круговой дихроизм, сканирующая калориметрия

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, КД — круговой дихроизм, ЦП — церулоплазмин, Ag-ЦП — ЦП, изолированный из сыворотки крови крыс, с дефицитом меди, вызванным добавлением хлорида серебра в корм.

Медь является структурным (Siebert et al., 2005) и катализитическим (Karlin, 1993; MacPherson, Murphy, 2007) кофактором жизненно важных ферментов и участвует в сигналинге (Mufti et al., 2007). В то же время свободные ионы меди провоцируют образование АФК (Linder, 2001), которые действуют подобно ионизирующему излучению. Поддерживают баланс меди и обеспечивают ее безопасный перенос медьютранспортные белки, благодаря которым в клетках и во внеклеточных пространствах свободных ионов меди нет (Rae et al., 1999; Van den Berghe, Klompm, 2009). Даже незначительное изменение структуры этих белков ведет к нарушению баланса меди, которое выражается в накоплении неиспользуемой меди в клетке и (или) в развитии дефицита метаболической меди. В результате падает активность купроэнзимов, нарушается

распределение железа, двунаправленный транспорт которого через мембранны контролируют мультимедные ферроксидазы, увеличивается уровень АФК, разрушается структура биополимеров, индуцируется фибрillогенез и развиваются нейродегенеративные заболевания (Gaggelli et al., 2006). Высокий уровень АФК также может провоцировать опухолевый рост (Walshe et al., 2003; Brown et al., 2007). Поэтому хелаторы меди рассматривают как перспективные противоопухолевые препараты (Daniel et al., 2007).

Вероятно, метаболизм меди связан с опухолевым ростом несколькими альтернативными путями. Так, поступление меди в клетку и ее связывание с X-сцепленным ингибитором апоптоза могут инициировать апоптоз (Mufti et al., 2007). Следовательно, медь может быть и противоопухолевым препаратом (Pang, Chau, 1999; Viola-Rhenals

et al., 2007; Marzano et al., 2009; Tisato et al., 2009). С другой стороны, новые поколения клеток нуждаются в постоянном притоке ионов меди. Возможно, поэтому опухолевый рост любой локализации и связанный с ним ангиогенез сопровождаются повышением в крови концентрации медьтранспортного белка церулоплазмина (ЦП, ферроксидаза, или железо(II) : кислород оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) (Cooper, 1983; Вавилова и др., 2005). Значит, можно ожидать, что блокирование путей доставки меди к опухоли приведет к снижению скорости ее роста. Недавно показано, что мембранные транспортеры меди участвуют в переносе противоопухолевого препарата цисплатина в клетки (Safaei, 2006). Не существует объяснения того, каким образом соединения Pt(II), подобные цисплатину, могут использовать высокоспецифичные для Cu(I) сайты связывания и каналы. Можно думать, что перенос меди и платины осуществляется по механизму симпорта. На это косвенно указывает тот факт, что дефицит меди снижает скорость поступления платины в клетки (Клотченко и др., 2008).

Изучение механизмов участия меди в перечисленных выше процессах нуждается в различных экспериментальных моделях. Одна из них может оказаться полезной — это животная модель с дефицитом меди, ассоциированной с ЦП. Почти 30 лет назад было показано, что у крыс добавление солей серебра в пищу вызывает падение оксидазной активности ЦП (Schreiber et al., 1980). Однако в печени у таких крыс (Ag-крыс) экспрессия генов медьтранспортных белков и купроэнзимов, удельное содержание меди, а также ферментативная активность внутриклеточных купроэнзимов не меняются (Клотченко и др., 2008). Таким образом, можно предположить, что Ag-крысы могут быть ценной моделью для изучения путей доставки меди к клеткам негепатоцитарных рядов и клеткам растущих опухолей, для исследования влияния дефицита меди на обмен железа и изучения взаимосвязи уровня меди и эффективности поступления в клетки платиновых препаратов. К тому же Ag-крысы могут быть использованы в качестве модели ацерулоплазминемии — наследственного моногенного аутосомно-рецессивного заболевания, развивающегося из-за мутаций в гене ЦП (Harris et al., 1995).

Представленная работа является этапом в разработке этой модели и посвящена биохимической и физико-химической оценке ЦП, который циркулирует в кровотоке Ag-крыс.

Материал и методика

Работу выполняли на взрослых крысах-самцах линии Вистар, приобретенных в питомнике РАН «Раполово» (Ленинградская обл.). Животные получали стандартный корм, в который добавляли AgCl из расчета 50 мг на 1 кг массы тела ежедневно (Ag-диета). Животных содержали при 20—25 °C и влажности 65 % со сменой светового режима через 12 ч. Корм и воду они получали без ограничения. После 4-недельного содержания на Ag-диете оксидазная активность сыворотки крови у крыс не выявлялась. После легкой анестезии диэтиловым эфиром у животных собирали кровь из шейных сосудов, после образования сгустка сыворотку отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин.

Реактивы, использованные в работе, произведены фирмой Sigma (США). Наборы для проведения хими-

люминесцентного иммуноблотинга приобретены у фирмы Amersham (Англия). Моноспецифические поликлональные антитела к ЦП крысы получены, как описано ранее (Platonomova et al., 2007).

Оксидазную активность церулоплазмина определяли спектрофотометрически с *p*-фенилендиамином (Ravin, 1961), а также прямым окрашиванием *o*-дианизидином поликарбамидных гелей (ПААГ) после фракционирования в них белков сыворотки крови (Owen, Smith, 1961). Электрофорез проводили в 8%-ном ПААГ в прерывистой системе pH без SDS.

Ферроксидазную активность белков выявляли окрашиванием 8%-ного ПААГ. После электрофореза в прерывистой системе pH без SDS гель помещали на 2 ч при 37 °C в свежеприготовленный раствор 0.008%-ной соли Мора, приготовленной на натрий-ацетатном буфере (100 mM, pH 5.0). Гель отмывали и в темноте насыщали водным раствором феррозина (15 mM, pH 7.0). Активность выявляли по исчезновению пурпурной окраски в местах локализации ферроксидаз (Chen et al., 2004).

Очищенный препарат ЦП из сыворотки крови контрольных и Ag-крыс получали методом ионообменной хроматографии в натрий-ацетатном буфере (буфер A, 50 mM, pH 5.5) на колонке с DEAE-сефарозой. Элюцию проводили ступенчатым градиентом раствора NaCl, приготовленным на буфере A (ступенька соответствовала 50 mM). Фракции, содержащие ЦП, идентифицировали по присутствию в них ЦП, который выявляли методом иммуноблотинга. ЦП-содержащие фракции сыворотки контрольных крыс объединяли и подвергали дополнительной очистке преципитацией в смеси этанола и хлороформа, как описано ранее (Manolis, Cox, 1980). Фракции, полученные из сыворотки Ag-крыс, процедуре дополнительной очистки не подвергали, их анализировали индивидуально.

УФ-спектры поглощения белковых растворов в оптическом диапазоне регистрировали с помощью спектрофотометра Specord-M40 (Carl Zeiss, Германия) в разборных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0.05 см. Кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах при 37.0 ± 0.2 °C. В оптические спектры белков вводили поправку на рассеяние путем вычитания вклада рэлеевского рассеяния ($1/\lambda^4$), оцененного по базовой линии спектра экстинкции $D(\lambda)$ в двойных логарифмических координатах.

Измерение скорости ферментативного окисления *o*-дианизидина очищенными препаратами ЦП производили следующим образом. Рабочий раствор *o*-дианизидина готовили разведением 1%-ного раствора *o*-дианизидина в 60 mM HCl в присутствии 2%-ного этанола 12 объемами натрий-ацетатного буфера (40 mM, pH 5.5) и выдерживали 1 сут в темноте при 25 °C. Для измерения оксидазной активности 10 мкл тестируемого образца добавляли в кювету 0.5 см, содержащую 1 мл рабочего раствора, прогретого до 37 °C, герметизировали и измеряли поглощение в течение 20—35 мин (15—25 точек). Стабильность рабочего раствора контролировали периодическим измерением препарата ЦП контрольных крыс (10 мг/мл). Оксидазную активность определяли путем линейной регрессии зависимости оптической плотности на длине волны 450 нм (D_{450}) от времени. Критерий Пирсона r^2 во всех случаях составил не менее 0.999, разброс результатов — не более 10 %. Оксидазную активность выражали в усл. ед., соответствующих изменению D_{450} в ре-

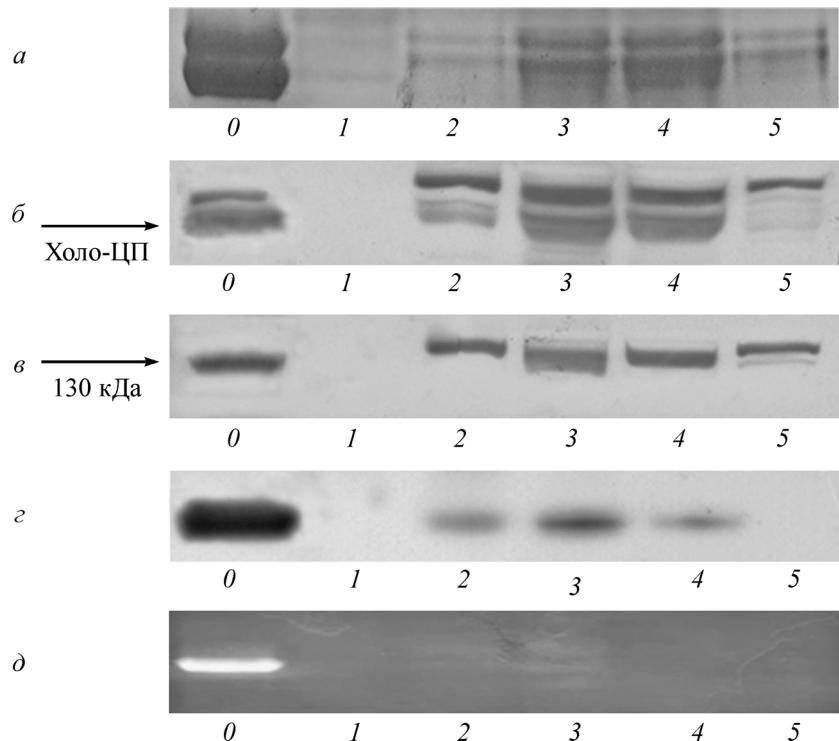


Рис. 1. Характеристики хроматографических фракций 1–5 церулооплазмина (ЦП), полученных элюированием ступенчатым градиентом NaCl. 0 — ЦП контрольных крыс, 1–5 — фракции Ag-ЦП, элюированные концентрациями NaCl, равными 100, 150, 200, 250 и 300 мМ соответственно. а — не денатурирующий электрофорез белков в 8%-ном ПААГ, объем образцов 5 мкл, окраска Serva Blue G; б — иммуноблот 8%-ного ПААГ с антителами к ЦП крысы, объем образцов 0.5 мкл; в — денатурирующий электрофорез белков в системе ДСН-меркаптоэтанол-ПААГ, иммуноблот G; г — окраска неденатурирующего 8%-ного ПААГ о-дианизидином, объем образцов 10 мкл, потемнение характеризует оксидазную активность ЦП; д — окраска неденатурирующего 8%-ного ПААГ солью Мора и феррозином, объем образцов 10 мкл, обесцвечивание характеризует ферроксидазную активность. Концентрация белка в образцах указана в таблице.

0 — ЦП контрольных крыс, 1–5 — фракции Ag-ЦП, элюированные концентрациями NaCl, равными 100, 150, 200, 250 и 300 мМ соответственно. а — не денатурирующий электрофорез белков в 8%-ном ПААГ, объем образцов 5 мкл, окраска Serva Blue G; б — иммуноблот 8%-ного ПААГ с антителами к ЦП крысы, объем образцов 0.5 мкл; в — денатурирующий электрофорез белков в системе ДСН-меркаптоэтанол-ПААГ, иммуноблот G; г — окраска неденатурирующего 8%-ного ПААГ о-дианизидином, объем образцов 10 мкл, потемнение характеризует оксидазную активность ЦП; д — окраска неденатурирующего 8%-ного ПААГ солью Мора и феррозином, объем образцов 10 мкл, обесцвечивание характеризует ферроксидазную активность.

акции окисления рабочего раствора на 1 см^{-1} за 1 ч при 37°C . Неспецифическое окисление составляло менее 10^{-5} усл. ед.

Спектры кругового диахроизма (КД) снимали на диахромографе Mark-V (Jobin-Yvon, Франция), калиброванном (+)-10-D-камфорсульфоновой кислотой. Измерения проводили в разборных кюветах 0.05 см (ближний УФ и видимый диапазоны) и кюветах 0.001 см (дальний УФ). Спектры в дальнем УФ-диапазоне приводили к средней молярной эллиптичности на аминокислотный остаток ($[\theta]$, град· $\text{см}^2/\text{дмоль}^{-1}$), в видимом и ближнем УФ-диапазонах рассчитывали молярную эллиптичность на молекулу белка $[\theta]_M$; принимали, что ЦП крысы имеет мол. массу 130 кДа и содержит 1040 остатков (Fleming, Gitlin, 1990). Вторичная структура была проанализирована с помощью программы CDNN 2.1 с использованием калибровочного набора из 33 белков (Bohm et al., 1992).

Кривые плавления измеряли на дифференциальном сканирующем калориметре ДСК-4 (СССР). Для плавления использовали раствор белка (1.5 мг/мл) в буфере А в присутствии 15 мМ NaCl; скорость нагревания составляла 1 К/мин. Данные корректировали путем вычитания кривой теплоемкости буфера, не содержащего белка.

Концентрацию металлов измеряли методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре Model 4100ZL (Perkin-Elmer, США). Все растворы готовили на деионизо-

ванной воде, дополнительно обработанной смолой Хелекс-100. Концентрацию белка определяли с помощью реактива Брэдфорд.

Результаты и обсуждение

У крыс Ag-диеты к концу 4-й нед вызывает падение оксидазной активности сыворотки крови почти до нуля (1.7 ± 0.51 мг на 100 мл ($n = 15$) против 53 ± 7.8 мг на 100 мл в контроле ($n = 5$) в пересчете на холо-ЦП). При этом общая концентрация меди снижается на 90 % (100 ± 11 мкг/л ($n = 5$) против 1240 ± 130 мкг/л в контроле ($n = 5$)). В то же время содержание иммунореактивного белка ЦП практически не меняется (Клотченко и др., 2008). С помощью специфических антител из сыворотки крови контрольных и Ag-крыс, получавших хлорид серебра в течение 10 сут и имеющих оксидазную активность сыворотки крови, сниженную примерно наполовину, преципитировали ЦП. Концентрацию меди и серебра определяли в исходной сыворотке, в непреципитированной фракции и в иммунопреципитате. Оказалось, что примерно 90 % меди в сыворотке животных и 90 % серебра в сыворотке Ag-крыс преципитируются антителами к ЦП. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что падение концентрации меди в крови Ag-крыс связано с замещением меди серебром в ЦП.

Из сыворотки Ag-крыс с нулевым уровнем оксидазной активности методом ионообменной хроматографии был получен набор фракций (Ag-ЦП), содержащих, по

Характеристика хроматографических фракций Ag-церулоплазмина

Номер фракции	[NaCl], мМ	[Белок] ^a , мг/мл	A_{280} , см ⁻¹	A_{610}/A_{280} ^b	Оксидазная активность, усл. ед.	Оксидазная активность, %	[Ag] : [Cu], моль/моль
I	100	Н. О.	Н. О.	—	0	0.0	Н. О.
II	150	6	6.8	—	0.086	1.9	1.9
III	200	23	23	0.0010	0.240	1.5	1.0
IV	250	22	22	0.0004	0.130	0.9	2.9
Холо-ЦП ^b	300	7	6.4	—	0.017	0.4	Н. О.
		22	19	0.04	12.7	100.0	То же

^a По Брэдфорд. ^b Поглощение, вычисленное с учетом поправки на рассеяние Рэлея. ^b ЦП, выделенный с помощью ионообменной хроматографии из сыворотки крови контрольных крыс. Н. О. — значение не определялось.

данным иммуноблотинга, полипептиды ЦП. Иммунореактивный ЦП выявлен во фракциях, элюируемых NaCl в концентрациях 150, 200, 250 и 300 мМ. Каждую полученную фракцию анализировали отдельно, так как ожидали, что препарат Ag-ЦП может содержать изоформы ЦП, различающиеся по своей аффинности к DEAE-сепарозе. Электрофоретический анализ фракций показал, что основная масса белков обнаруживается во фракциях, элюируемых 200 и 250 мМ NaCl, и распределяется двумя majorными зонами (рис. 1, *a*; см. таблицу), которые взаимодействуют с антителами к ЦП (рис. 1, *b*). Обе формы Ag-ЦП, различающиеся по электрофоретической подвижности, имеют одинаковую молекулярную массу, соответствующую примерно 130 кДа (рис. 1, *b*). Данные демонстрируют, что белок в составе Ag-ЦП проявляет устойчивость к спонтанной ограниченной протеолитической деградации, являющейся одним из специфических свойств ЦП (Moshkov et al., 1979).

Во фракциях Ag-ЦП, элюируемых 150, 200 и 250 мМ NaCl, при прямом тестировании в геле выявляется оксидазная активность (рис. 1, *c*). Интересно, что фракции, элюируемые 150 и 300 мМ NaCl и 200 и 250 мМ NaCl, содержащие попарно примерно одинаковую концентрацию белка, различаются по содержанию оксидазного ЦП (см. таблицу). Эти результаты позволяют считать, что оксидазная составляющая Ag-ЦП элюируется раньше, чем составляющая, не проявляющая оксидазной активности. Оксидазная активность во всех фракциях сохраняет специфический каталитический характер (рис. 2) и в пересчете на концентрацию белка снижается с номером фракции. В то же время достоверно регистрируемой ферроксидазной активности в препаратах Ag-ЦП выявить не удалось. На дорожках геля с фракциями Ag-ЦП можно увидеть только следы ферроксидазной активности (рис. 1, *d*).

Спектрофотометрический анализ препарата Ag-ЦП показал, что в соответствии с низким содержанием меди в Ag-ЦП выраженная полоса поглощения ЦП при 610 нм, обусловленная окисленной медью типа I, в спектрах Ag-ЦП очень слабая и выявляется только во фракциях с наибольшей концентрацией белка (рис. 3, *a*). Уменьшение отношения поглощения проб при 610 и 280 нм (A_{610}/A_{280}) препарата Ag-ЦП по сравнению с холо-ЦП приблизительно совпадает с уменьшением скорости катализа окисления *o*-дианизидина. Соотношение A_{230}/A_{280} для холо-ЦП и фракций Ag-ЦП составляет 8.2 ± 0.3 , поэтому можно считать, что составляющие Ag-ЦП существенно не различаются по молярному коэффициенту поглощения при 280 нм (ϵ_{280}), и поглощение A_{280} может служить достаточно надежным способом определения суммарной кон-

центрации белков в Ag-ЦП. Спектральной особенностью Ag-ЦП, отсутствующей в спектрах холо-ЦП (и примесного оксигемоглобина), является небольшая полоса в области 320—330 нм с $\epsilon \approx 1500 \text{ M}^{-1}/\text{см}^{-1}$, которая может быть обусловлена поглощением координированного серебра или не полностью сформированными медьсвязывающими сайтами.

Спектры КД холо-ЦП крысы и холо-ЦП человека (Noyer, Putnam, 1981) почти совпадают и характеризуются отрицательным КД в ароматической области и выраженным экситонным дублетом (400—650 нм) оптического перехода меди типа I при 610 нм (рис. 3, *b*). Анализ КД холо-ЦП крысы в области 190—240 нм с помощью алгоритма CDNN дает следующее предсказание вторичной структуры: 12 % α , 36 % β , 17 % поворотов и 35 % неупорядоченной структуры, что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа (Zaitseva et al., 1996) ЦП человека (8.4 % α и 34 % β). Фракции Ag-ЦП обладают в области 190—240 нм одинаковыми спектрами КД, отличия которых от спектра холо-ЦП очевидны даже без количественного анализа. Оценка содержания вторичной структуры дает 20 % α , 9 % β , 20 % поворотов и 51 % неупорядоченной структуры. Эти числовые оценки не следует рассматривать как надежные, но они однозначно свидетельствуют о существенном нарушении укладки полипептидов ЦП. КД Ag-ЦП в видимой области не детек-

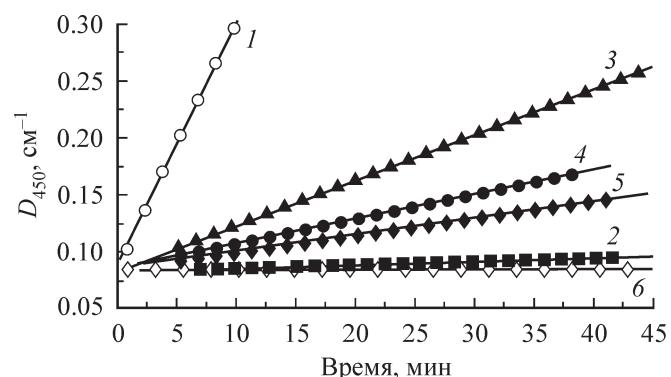


Рис. 2. Кинетические кривые реакции окисления насыщенного раствора *o*-дианизидина в натрий-ацетатном буфере (pH 5.5, 37 °C), катализируемой церулоплазмином.

По оси ординат — оптическая плотность при 450 нм (D_{450} , см⁻¹), характеризующая концентрацию продуктов окисления *o*-дианизидина. На 1 мл реагента вносили 10 мкл пробы белка. 1 — ЦП контрольных крыс (положительный контроль), 1 г/л; 2—5 — фракции Ag-ЦП, элюированные соответственно 150, 200, 250 и 300 мМ NaCl, 6 — 10 мМ CuSO₄ (отрицательный контроль).

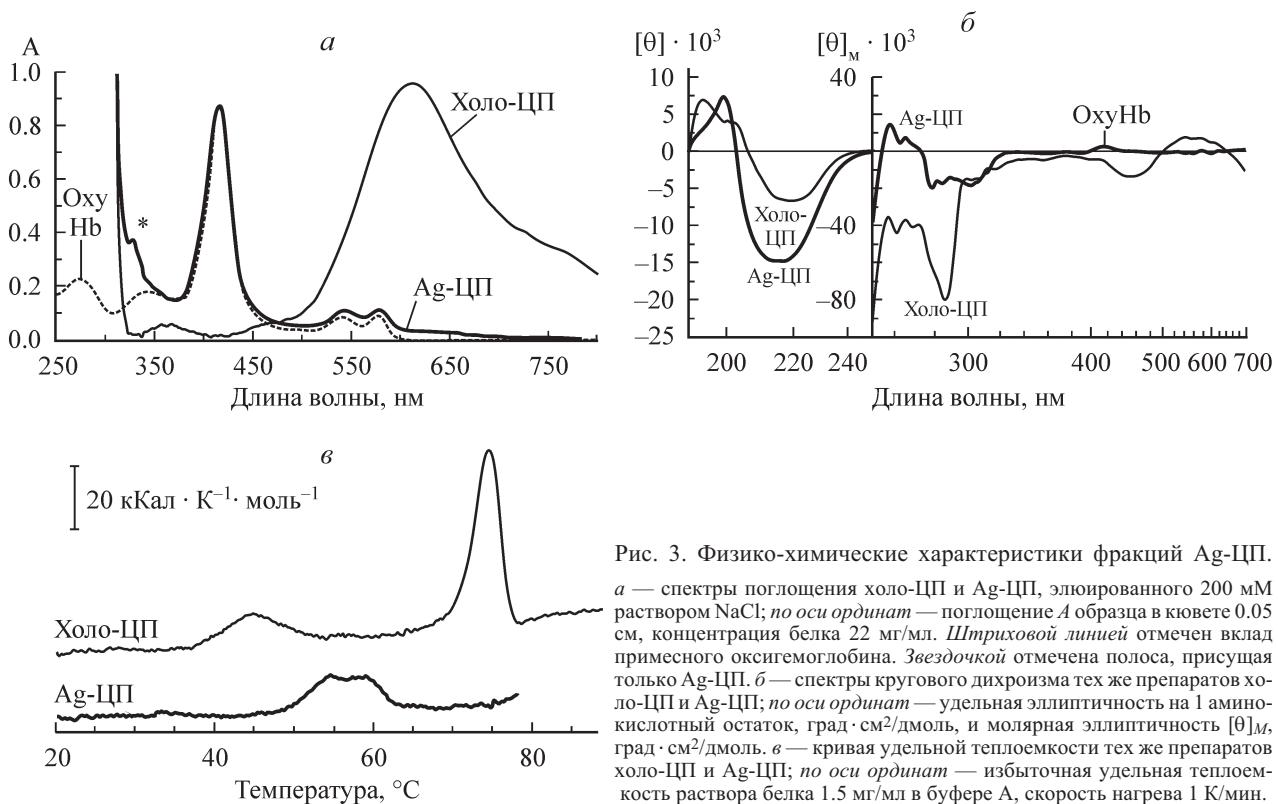


Рис. 3. Физико-химические характеристики фракций Ag-ЦП.
 а — спектры поглощения холо-ЦП и Ag-ЦП, элюированного 200 мМ раствором NaCl; по оси ординат — поглощение A образца в кювете 0.05 см, концентрация белка 22 мг/мл. Штриховой линией отмечен вклад примесного оксигемоглобина. Звездочкой отмечена полоса, присущая только Ag-ЦП. б — спектры кругового дихроизма тех же препаратов холо-ЦП и Ag-ЦП; по оси ординат — удельная эллиптичность на 1 аминокислотный остаток, град · см²/дмоль, и молярная эллиптичность $[\theta]_M$, град · см²/дмоль. в — кривая удельной теплоемкости тех же препаратов холо-ЦП и Ag-ЦП; по оси ординат — избыточная удельная теплоемкость раствора белка 1.5 мг/мл в буфере А, скорость нагрева 1 К/мин.

тируется, что находится в полном соответствии с отсутствием полосы меди типа I в спектре поглощения. КД Ag-ЦП в области 240—330 нм напоминает по форме спектр ЦП вблизи точки щелочной денатурации pH 10.5 (Noyer, Putnam, 1981) и спектр апо-CN-ЦП, лишенного ионов меди (Sedlak, Wittung-Stafshede, 2007). Однако необходимо отметить, что щелочно-денатурированный белок сохраняет оптическую активность в видимом диапазоне, а апо-CN-белок сохраняет вторичную структуру.

Изменение вторичной структуры Ag-ЦП подтверждается данными дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Нативный холо-ЦП обладает четким пиком теплоемкости при 74.3 °C, Ag-ЦП — двумя пиками с максимумами при 53.8 и 58.9 °C, которые характеризуются большой шириной и, наиболее вероятно, являются суммированием многих структурных переходов (рис. 3, в). Гетерогенность Ag-ЦП не позволяет считать эти пики двумя последовательными стадиями. Площадь под пиками теплоемкости Ag-ЦП в 2 раза меньше площади под основным пиком холо-ЦП, что указывает на меньшую энталпию денатурации Ag-ЦП. Точного расчета энталпии не проводили, поскольку процесс денатурации ЦП не обратим, однако ДСК однозначно подтверждает неправильную, более «рыхлую» структуру белков в Ag-ЦП по сравнению с холо-ЦП.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы. У крыс добавление серебра в стандартный корм вызывает развитие дефицита меди, ассоциированной с ЦП. Это происходит на фоне неизменяющегося уровня меди в диете. Несмотря на то что полупериод жизни ЦП крысы составляет около 4 сут (Gregoriadis et al., 1970), в препаратах ЦП обнаруживается примерно 1 % оксидазной активности от нормы и после 4-недельной Ag-диеты. Это свидетельствует о том, что при Ag-диете формируется холо-ЦП. Среднее содержание меди на одну мо-

лекулу белка во фракции ЦП Ag-крыс уменьшается в 50—100 раз. Если считать, что в аппарате Гольджи медь встраивается в активные центры формирующегося ЦП случайно, то вероятность формирования белка с четырьмя ионами меди, минимально необходимыми для проявления оксидазной активности, при наблюдаемом снижении содержания меди составляет 10^{-5} — 10^{-7} . Таким образом, наличие в препарате Ag-ЦП около 1 % белка с оптической полосой меди типа I и оксидазной активностью свидетельствует о кооперативном характере формирования холо-ЦП из апо-ЦП в аппарате Гольджи. Большая часть молекул ЦП, изолированного из сыворотки крови Ag-крыс, содержит атомы серебра и характеризуется нарушенной третичной структурой. Возможно, что обладающие «неправильной» третичной структурой молекулы ЦП, составляющие основную долю Ag-ЦП, утрачивают сайты расщепления, чувствительные к протеазам крови, и этим объясняется устойчивость Ag-ЦП к спонтанному протеолизу. Рассматриваемая модель предоставляет возможность изучать дефицит меди, ассоциированной с ЦП. С ее помощью могут быть идентифицированы клетки негепатоцитарных рядов, баланс меди которых полностью зависит от ЦП как донора меди.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01165) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Госконтракт 02.740.11.5141).

Список литературы

Вавилова Т. П., Гузарова Л. Н., Королева О. В., Медведев А. Е. 2005. Роль церулоплазмина в неопластических процессах. Биомед. химия. 51 (2) : 263—275.

- Клотченко С. А., Цымбаленко Н. В., Соловьев К. В., Скворцов А. Н., Затуловский Е. А., Бабич П. С., Платонова Н. А., Шавловский М. М., Пучкова Л. В., Броджини М. 2008. Влияние ионов серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медь-транспортных белков в печени крыс. Докл. РАН. 418 (4) : 549—552.
- Bohm G., Muhr R., Jaenicke R. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. Protein Eng. 5 : 191—195.
- Brown D. J. F., Milroy R., Preston T., McMillan D. C. 2007. The relationship between an inflammation based prognostic score (GPS) and changes in serum biochemical variables in patients with advanced lung and gastrointestinal cancer. J. Clin. Pathol. 60 : 705—708.
- Chen H., Attieh Z. K., Su T., Syed B. A., Gao H., Alaeddine R. M., Fox T. C., Usta J., Naylor C. E., Evans R. W., McKie A. T., Anderson G. J., Vulpe C. D. 2004. Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. Blood. 103 : 3933—3939.
- Cooper E. H. 1983. Plasma protein profile in neoplastic diseases. Ric. Clin. Lab. 13 : 57—69.
- Daniel K. G., Chen D., Yan B., Dou Q. P. 2007. Copper-binding compounds as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer. Front. Biosci. 12 : 135—144.
- Fleming R. F., Gitlin J. D. 1990. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue specific gene expression during development. J. Biol. Chem. 265 : 7701—7707.
- Gaggelli E., Kozlowski H., Valensin D., Valensin G. 2006. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). Chem. Rev. 106 : 1995—2044.
- Gregoriadis G., Morell A. G., Sternlieb I., Scheinberg I. H. 1970. Catabolism of desialylated ceruloplasmin in the liver. J. Biol. Chem. 245 : 5833—5837.
- Harris Z. L., Takahashi Y., Miyajima H., Serizawa M., MacGillivray R. T. A., Gitlin J. D. 1995. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 2539—2543.
- Karlin K. D. 1993. Metalloenzymes, structural motif, and inorganic models. Science. 261 : 701—707.
- Linder M. C. 2001. Copper and genomic stability in mammals. Mutat. Res. 18 : 141—152.
- MacPherson I. S., Murphy M. E. 2007. Type-2 copper-containing enzymes. Cell. Mol. Life Sci. 64 : 2887—2899.
- Manolis A., Cox D. W. 1980. Purification of rat ceruloplasmin, characterization and comparison with human ceruloplasmin. Prep. Biochem. 10 : 121—132.
- Marzano C., Pellei M., Tisato F., Santini C. 2009. Copper complexes as anticancer agents. Anticancer Agents Med. Chem. 9 : 185—211.
- Moshkov K. A., Lakatos S., Hajdu J., Zavodsky P., Neifakh S. A. 1979. Proteolysis of human ceruloplasmin. Some peptide bonds are particularly susceptible to proteolytic attack. Eur. J. Biochem. 94 : 127—134.
- Mufti A. R., Burstein E., Duckett C. S. 2007. XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis. Arch. Biochem. Biophys. 463 : 168—174.
- Noyer M., Putnam F. W. 1981. A circular dichroism study of undegraded human ceruloplasmin. Biochemistry. 20 : 3536—3542.
- Owen J. A., Smith H. 1961. Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis. Clin. Chim. Acta. 6 : 441—444.
- Pang J.-H. S., Chau L.-Y. 1999. Copper-induced apoptosis and immediate early gene expression in macrophages. Atherosclerosis. 146 : 45—52.
- Platonova N., Guolikhanda N., Tsymbaleno N., Zhiguleva E., Zhivulko T., Vasin A., Esvukova I., Puchkova L. 2007. Milk ceruloplasmin is a valuable source of nutrient copper ions for mammalian newborns. J. Trace Elem. Med. Biol. 21 : 184—193.
- Rae T. D., Schmidt P. J., Pufahl R. A., Culotta V. C., O'Halloran T. V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. Science. 284 : 805—808.
- Safaei R. 2006. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. Cancer Lett. 234 : 34—39.
- Schreiber V., Pribyl T., Jahodova J. 1980. Modulation of estradiol effects by silver nitrate: inhibition of the adenohypophyseal reaction, block of the ceruloplasmin increase and block of hypothalamic ascorbic acid depletion. Endocrinologie. 76 : 129—136.
- Sedlak E., Wittung-Stafshede P. 2007. Discrete roles of copper ions in chemical unfolding of human ceruloplasmin. Biochemistry. 46 : 9638—9644.
- Siebert X., Eipper B. A., Mains R. E., Prigge S. T., Blackburn N. J., Amzel L. M. 2005. The catalytic copper of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase also plays a critical structural role. Biophys. J. 89 : 3312—3319.
- Tisato F., Marzano C., Porchia M., Pellei M., Santini C. 2009. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. Med. Res. Rev. 30 : 708—749.
- Van den Berghe P. V. E., Klompen L. V. J. 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. Nutr. Rev. 67 : 658—672.
- Viola-Rhenals M., Rieber M. S., Rieber M. 2007. Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to Cu[DEDTC]₂. Biochem. Pharmacol. 74 : 841—850.
- Walshe J. M., Waldenstrom E., Sams V., Nordlinder H., Westermark K. 2003. Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease. Q. J. Med. 96 : 657—662.
- Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. 1996. The nature of the copper centers in human ceruloplasmin. J. Biol. Inorg. Chem. 1 : 15—22.

Поступила 19 V 2010

CHARACTERSTICS OF RAT CERULOPLASMIN FROM THE SERUM OF ANIMALS, WHICH RECEIVED SALTS OF SILVER WITH FOOD

A. N. Skvortsov,^{1,2} E. Yu. Ilyechnova,² E. A. Zatulovskiy,² A. N. Saveliev,² N. V. Tsymbalenko,³
M. M. Shavlovsky,³ L. V. Puchkova^{2,3}

¹ Institute of Cytology RAS, ² St. Petersburg State Polytechnical University,
and ³ Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;
¹ e-mail: skvor@mail.cytspb.rssi.ru, colbug@mail.ru

Abiogenic Ag(I) ions have electronic structure, similar to Cu(I) ions and can compete with Cu(I) for binding sites of proteins which transport copper from extracellular media to sites of cuproenzyme formation in the cell. Rodents receiving Ag-salts with food develop extracellular deficiency of copper associated with ceruloplasmin (Cp, the major copper-transporting protein in blood serum of vertebrates). The present work focuses on

the studies of biochemical and physicochemical properties of Cp, obtained from blood serum of rats, which received AgCl with food for 4 weeks (Ag-rats). Cp-fractions from blood serum of Ag-rats (Ag-Cp) were obtained by ion-exchange chromatography with stepped gradient of NaCl. Each fraction was tested for oxidase and ferroxidase activities by direct measurement of catalytic activity in the gel, and for specific activity in holo-Cp in oxidation of chromogenic substrate. Molecular mass, electrophoretic mobility and ratio of apo- and holo-forms in Ag-Cp fractions were evaluated by immunoblotting. Ag-Cp samples did not contain products of spontaneous partial proteolytic degradation, characteristic of holo-Cp samples. Fractions of Ag-Cp and holo-Cp (from blood serum of control rats) were compared by optical spectra, tertiary structure, susceptibility to thermal denaturation, and by atomic Cu and Ag content. Ag-Cp contained 1—2 % Cp, which is similar by spectral and catalytic properties with holo-Cp. [Ag] : [Cu] ration in Ag-Cp samples was about 4 : 1. As evidenced by circular dichroism and differential scanning calorimetric studies, the major apo-fraction of Ag-Cp lacked tertiary structure of native Cp and was significantly misfolded, which might explain its resistance to spontaneous partial proteolytic degradation.

Key words: copper metabolism, ceruloplasmin, Cu(I)/Ag(I) transport, Ag-ceruloplasmin, ion-exchange chromatography, circular dichroism, scanning calorimetry.