

УДК 577.122

## ЦЕРУЛОПЛАЗМИН: ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ И ФЕРРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

<sup>1</sup>Мошков К.А., <sup>2</sup>Зайцев В.Н., <sup>1</sup>Романовская Е.В., <sup>1</sup>Стефанов В.Е.

<sup>1</sup>Биолого-почвенный факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, e-mail: moshkovspbu@gmail.com;

<sup>2</sup>Centre for Biomolecular Sciences, University of St.-Andrews, North Haugh, St.-Andrews KY169ST, Scotland, UK

В статье обобщены собственные и известные из литературы результаты исследований механизмов ферроксидазной активности медьсодержащего фермента плазмы крови человека – церулоплазмينا (Fe(II):кислород оксидоредуктаза; КФ 1.16.3.1). Церулоплазмин катализирует последовательный перенос 4-х электронов от окисляемого субстрата на молекулу O<sub>2</sub>, которая в результате четырехэлектронного восстановления O-O связи превращается в молекулу H<sub>2</sub>O по схеме: 4Fe<sup>2+</sup> + O<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup> = 2H<sub>2</sub>O + 4Fe<sup>3+</sup>. Процесс внутримолекулярного переноса электронов происходит от окисляемых ионов Fe<sup>2+</sup> по цепи медь-связывающих центров от одноядерного центра T1Cu к триядерному кластеру, состоящему из центра T2Cu и биядерного центра T3Cu (место восстановления O<sub>2</sub> до H<sub>2</sub>O). Ионы Fe<sup>2+</sup> локализованы в т.наз. лабильных центрах связывания (M<sup>2+</sup>-центры связывания двухвалентных ионов металлов), расположенных вблизи центров T1Cu. Образовавшиеся в окислительной реакции ионы Fe<sup>3+</sup> далее перемещаются в M<sup>3+</sup>-центры связывания трехвалентных ионов металлов в непосредственной близости к белковой поверхности. В результате дальнейшего транспорта ионов Fe<sup>3+</sup> из глобулы церулоплазмينا они могут вступать в комплексы с апо-формой трансферрина.

**Ключевые слова:** медьпротеиды, церулоплазмин, ферроксидаза, структура, транспорт электронов

## CERULOPLASMIN: INTRAMOLECULAR ELECTRON TRANSFER AND FERROXIDASE ACTIVITY

<sup>1</sup>Moshkov K.A., <sup>2</sup>Zaitsev V.N., <sup>1</sup>Romanovskaya E.V., <sup>1</sup>Stefanov V.E.

<sup>1</sup>Faculty of Biology and Soils Sciences, St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, e-mail: moshkovspbu@gmail.com;

<sup>2</sup>Centre for Biomolecular Sciences, University of St.-Andrews, North Haugh, St.-Andrews KY169ST, Scotland, UK

Authors review the results of their research and data available from literature on the mechanism of ferroxidase activity of copper-containing human plasma enzyme ceruloplasmin (Fe(II): oxygen-oxidoreductase; EC 1.16.3.1). The described mechanism is based on the analysis of structural data and suggests that ceruloplasmin catalyzes consecutive transfer of 4 electrons from substrate to O<sub>2</sub> molecule which, by virtue of four-electron reduction of O-O bond, is then converted into H<sub>2</sub>O molecule according to the scheme: 4Fe<sup>2+</sup> + O<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup> = 2H<sub>2</sub>O + 4Fe<sup>3+</sup>. The process of intramolecular electron transfer proceeds from oxidized Fe<sup>2+</sup> ions along the chain of copper binding sites from mononuclear center T1Cu to trinuclear cluster, consisting of T2Cu center and dinuclear center T3Cu (site of O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O). Ions Fe<sup>2+</sup> are localized in labile binding centers (M<sup>2+</sup> centers of binding bivalent metal ions), located in proximity of T1Cu centers. Formed in the oxidation reaction, Fe<sup>3+</sup> ions are further transported to M<sup>3+</sup> centers of binding trivalent metal ions located in close proximity to the protein surface. As a result of subsequent transport from ceruloplasmin globule, Fe<sup>3+</sup> becomes capable of forming complexes with apo-transferrin.

**Keywords:** copper proteins, ceruloplasmin, ferroxidase, structure, electron transfer

В 1944 г. шведский исследователь Холмберг обнаружил в плазме крови человека фермент, сходный по свойствам с растительным медьпротеидом – лакказой [4]. Дальнейшее интенсивное изучение этого фермента показало, что он связывает почти 95% всей меди плазмы крови и характеризуется широким спектром оксидазной активности [5, 6]. Из-за синего цвета его концентрированных растворов этому ферменту было дано название «церулоплазмин» (blue substance from plasma). Он окисляет аскорбат, гидрохинон, ароматические диамины и дифенолы, биогенные амины – адреналин, норадреналин, серотонин, дофамин, ионы Cu<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup>. В итоге в Классификации ферментов ему было присвоено системати-

ческое наименование Fe(II):кислород оксидоредуктаза (КФ 1.16.3.1).

Также была обнаружена его способность дисмутировать супероксидные радикалы, связанная с глутатионом пероксидазная активность, активность как NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-синтазы и NO-оксидазы. Фермент может выступать в качестве прооксиданта, участвуя в окислении липопротеидов низкой плотности (см, например, обзоры [2, 16]).

Такая мультифункциональная природа церулоплазмينا, с одной стороны, и отсутствие данных о его истинной физиологической роли (ролях), с другой, позволило назвать его «загадочным синим белком» [8]. Начало конца этой загадки (the beginning of the end of an enigma [10]) было положено

исследованиями атомной структуры церулоплазмينا методом рентгеноструктурного анализа [1, 9, 10, 14, 19, 20]. Было установлено, что молекула церулоплазмينا (единичная полипептидная цепь, 1046 аминокислотных остатков) состоит из шести субглобул (доменов). По структурному сходству эти домены разделяются на две группы: нечетные домены 1, 3 и 5 и четные домены 2, 4 и 6. Топология укладки полипептидной цепи в этих доменах соответствует таковой в однодоменных «синих» медьпротеидах, относящихся к суперсемейству купредоксинов. Сам же церулоплазмин относится к семейству мультидоменных купредоксинов, в состав которого также входят такие белки, как лакказа, оксидазы CofA и CueO, аскорбатоксидаза, факторы свертывания крови V и VIII, гефестин, циклопен, билирубиноксидаза, белок Fet3p, нитритредуктаза, металлооксидазы и др. [15]. Представители этого семейства чрезвычайно широко распространены в природе: они обнаружены в археях, бактериях и эукариотах [7, 17].

Медь-связывающие центры белков купредоксинового семейства принято классифицировать по трем типам [13]. В центрах T1Cu (т.наз. «синих») в качестве лигандов иона Cu выявлены два остатка His, один – Cys и один – Met («каноническая четверка» остатков). Остаток Met в ряде медьпротеидов замещен на Leu, Phe или Glu. В центрах T2Cu (т.наз. «не синих») ион Cu координирован двумя остатками His и гидроксильной группой или молекулой H<sub>2</sub>O. Центры T3Cu (т.наз. биядерные) содержат два антиферромагнитно спаренных иона Cu<sup>2+</sup>, каждый из которых связан с тремя остатками His, а между этими ионами находится либо OH-группа, либо молекула O<sub>2</sub>. Причины этого будут объяснены ниже. Центры T1Cu и T3Cu сближены друг с другом, образуя т.наз. триядерный кластер.

В церулоплазмине центры T1Cu находятся только в четных доменах, а триядерный кластер – между доменами 1 и 6. Центры T1Cu в доменах 4 и 6 сформированы «канонической четверкой» лигандов – His637, H685, Cys680 и Met690 (домен 4) и His975, His1026, Cys1021 и Met1031 (домен 6), в то время как в домене 2 остаток Met замещен на очень слабо связанный с ионом Cu остаток Leu (His276, His324, Cys319 и Leu329) [20]. Скорее всего, ион Cu в центре T1Cu домена 2 постоянно находится в восстановленном состоянии – Cu<sup>+</sup> [11]. Требуется дополнительные исследования для выяснения вопроса о функциональной роли этого центра. Не исключено, что он функционально неактивен и является своеобразным «эволюционным реликтом». Расстояния между тремя центрами T1Cu очень

близки друг к другу и находятся в диапазоне 17,5–17,9 Å. Центр T1Cu в домене 6 находится на расстоянии 12,5–13 Å от ионов Cu<sup>2+</sup> биядерного центра, а все три иона Cu<sup>2+</sup> в триядерном кластере сближены на расстояние 3,4–4,5 Å. Указанное выше расстояние между центрами T1Cu в доменах 4 и 6 достаточно для эффективного переноса электронов, что обеспечивает одномоментное окисление более чем одной молекулы субстрата (рис. 1) [9, 11].

Строение триядерного кластера (Cu<sub>2</sub> + Cu<sub>3</sub> + Cu<sub>4</sub>) показано на рис. 2. Данные рентгеноструктурного анализа показали, что центр T<sub>2</sub>Cu (Cu<sub>4</sub>) находится в двух конфигурациях, отражающих различные стадии каталитического акта [1]. В одной конфигурации с ионом Cu этого центра связана OH-группа, в другой – молекула H<sub>2</sub>O (W148). В любой из этих конфигураций ион Cu координирован остатками His101 и His978.

В домене 6 предположительно существует дополнительный центр связывания двухвалентных ионов металлов (Co, Fe, Cu) – т.наз. «labile» центр [1, 9] (M<sup>2+</sup>-центр по терминологии [11]). В случае Cu<sup>2+</sup> лигандами такого иона могут служить остатки от домена 2: Glu272 и от домена 6: His940, Glu935 и Asp1025. Последний остаток характеризуется двумя альтернативными конфигурациями. В одной из них этот остаток ориентирован по направлению к M<sup>2+</sup>-центру, в другой – от этого центра, так что атом O (дельта 1) образует междоменную водородную связь с атомом N (дельта 2) остатка Asn271 домена 2. Степень заполнения этого центра – 50%. Также возможно участие по крайней мере трех молекул H<sub>2</sub>O (W111, W200 и W292) в связывании катиона этого центра. Учитывая, что в центрах T1Cu находятся три иона Cu и еще три – в триядерном центре, общее число связанных с церулоплазмином ионов Cu превышает шесть, что согласуется с данными, полученными ранее другими методами [3].

В домене 2 указанный для домена 6 мотив связывания двухвалентного катиона отсутствует; положение, эквивалентное остатку His940, занимает Tyr241.

В домене 2 указанный для домена 6 мотив связывания двухвалентного катиона отсутствует; положение, эквивалентное остатку His940, занимает Tyr241.

Что же касается домена 4, то в нем более вероятно существование дополнительного центра связывания молекулы H<sub>2</sub>O (W201). Она образует водородные связи с His602 (2,28 Å), Glu971 (2,35 Å) и со второй молекулой H<sub>2</sub>O (W321). Расстояние между W201 и W321 – 2,44 Å. В свою очередь, молекула W321 образует водородную связь с Glu597 [1].

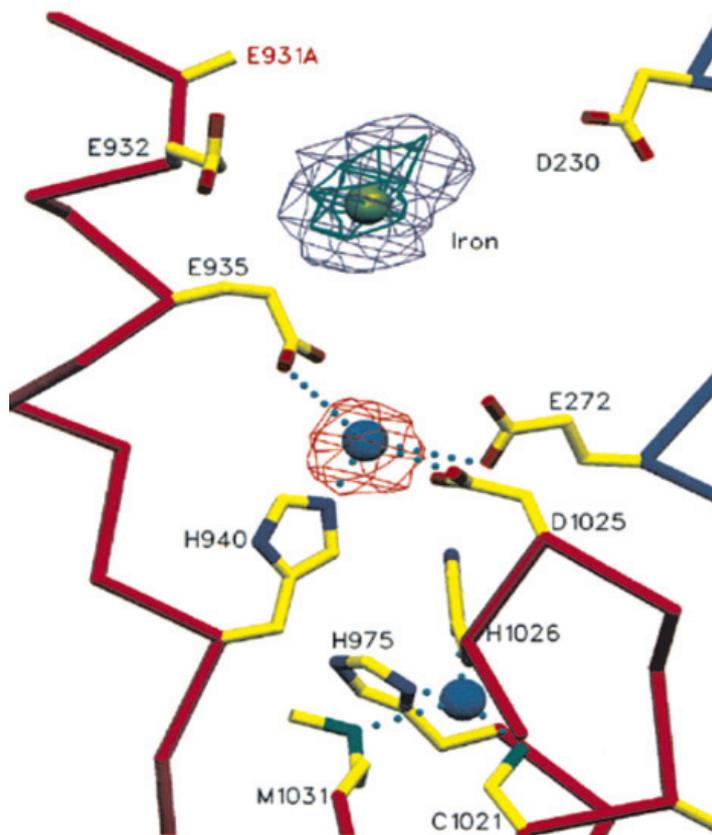


Рис. 1. Центры связывания ионов металлов в домене 6 церулоплазмينا [9]. Лиганды центра T1Cu (нижняя часть рисунка): His975, H1026, Cys1021 и Met1031; лиганды «labile»  $M^{2+}$ -центра (средняя часть рисунка): His940, Glu935, Asp1025 и Glu272; лиганды «holding»  $M^{3+}$ -центра (верхняя часть рисунка): Glu931, Glu932, Glu935 и Asp230

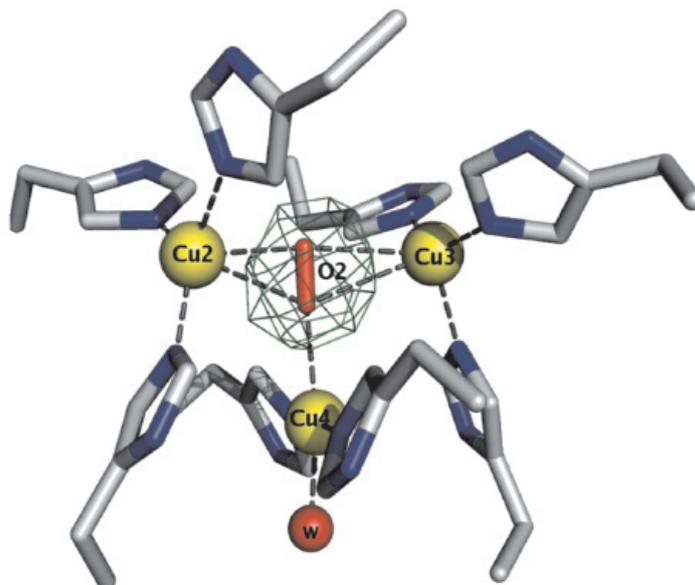


Рис. 2. Триядерный кластер в церулоплазмине между доменами 1 и 6 [1]. Лиганды иона Cu, в биядерном центре T<sub>1</sub>Cu: His163, His 980, His1020; лиганды иона Cu, в биядерном центре T<sub>3</sub>Cu: His103, H161 и His1022; лиганды иона Cu4 в центре T<sub>2</sub>Cu: His101 и His978. Показаны также связи молекул O<sub>2</sub> и воды (W148) с ионами Cu. Степень заполнения этого центра для молекулы H<sub>2</sub>O и гидроксильной группы – 50%

Опыты с вымачиванием кристаллов церулоплазмينا в растворах, содержащих соли Fe, показали, что ионы  $Fe^{2+}$  замещают ионы  $Cu^{2+}$  в  $M^{2+}$ -центре домена 6 и после окисления до  $Fe^{3+}$  меняют свое местоположение, переходя в т.наз. «holding» центр ( $M^{3+}$ -центры по терминологии [11]). Максимумы на карте электронной плотности, соответствующие этим центрам, имеют диффузную природу, что может быть объяснено тем, что существует популяция этих центров, немного отличающихся по своей структуре. В них могут занимать позиции не только один, но, видимо, и два катиона. В домене 6 возможными лигандами  $M^{3+}$ -центра служат остатки Glu931, Glu932, Glu935 и Asp230. В процессах транслокации из  $M^{2+}$ - в  $M^{3+}$ -центр домена 6 ключевую роль играет их общий остаток Glu935 [9].

Можно предположить, что именно ионы  $Fe^{3+}$ , перемещенные в  $M^{3+}$ -центры, которые, как установлено, находятся вблизи поверхности белковой глобулы, далее включаются в апо-форму Fe-транспортного белка, трансферрина. Возможный путь такого перемещения ионов  $Fe^{3+}$  будет рассмотрен далее более подробно.

Наиболее вероятные пути внутримолекулярного транспорта электронов можно описать следующим образом [11]:

1. Транспорт электрона, высвободившегося в результате реакции  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ , из  $M^{2+}$ -центра в центр T1Cu (домен 6) на расстояние 8,9 Å происходит, вероятнее всего, от Glu272 на His1026. Не исключены и два альтернативных пути на тот же лиганд центра T1Cu, His1026, – либо от Asp1025, либо от His940. Кинетические данные свидетельствуют против возможности прямого переноса электрона от  $M^{2+}$ -центра на триядерный кластер.

2. Транспорт электрона от центра T1Cu (домен 6) на биядерный центр T3Cu (расстояние 12,5 Å) может быть описан последовательностью: Cys1021 → Val1023 → His1022. Транспорт электрона на лиганд второго иона  $Cu^{2+}$  биядерного центра, His1020, имеет почти те же кинетические характеристики.

3. Транспорт электрона от центра T1Cu в домене 4 на такой же центр в домене 6 (расстояние 17,8 Å) может осуществляться тремя кинетически почти эквивалентными путями. Из них несколько более предпочтительными являются следующие два: His685 → Glu971 → Ile972 → His1026; His685 → Glu971 → Asn970 → Asp973 → His975.

4. Транспорт электрона на центр T2Cu. В этом случае существуют две возможности. Первая – от лиганда биядерного центра T3Cu, His980, непосредственно на His978

(расстояние 4,2 Å). Здесь не исключен путь от второго иона  $Cu^{2+}$  биядерного центра через гидроксидную группировку на первый ион  $Cu^{2+}$  и далее как описано выше. Вторая возможность – транспорт электрона от центра T1Cu: Cys1021 → His1020 → His978 (расстояние 14,4 Å). Эти данные свидетельствуют, что восстановление иона  $Cu^{2+}$  в центре T2Cu непосредственно связано с восстановлением пары ионов  $Cu^{2+}$  в биядерном центре.

Суммируя вышеизложенное, можно обосновать 7-стадийную схему внутримолекулярного электронного транспорта в молекуле церулоплазмينا. Первые три стадии представляют собой реакции восстановления центров T1Cu в доменах 4 и 6, сопряженные с переходом ионов  $Fe^{2+}$  в окисленное состояние, и быстрый внутримолекулярный перенос электрона между восстановленными и окисленными формами центров T1Cu в доменах 4 и 6. Стадия 4 соответствует восстановлению двухэлектронного акцептора – биядерного центра T3Cu в результате последовательного переноса двух электронов – одного от ранее восстановленного центра T1Cu и еще одного от иона  $Fe^{2+}$  (промежуточным продуктом этого процесса является полувосстановленный интермедиат биядерного центра). Альтернативой стадии 4 служит стадия 5, в которой два электрона от восстановленных центров T1Cu доменов 4 и 6 последовательно переносятся на биядерный центр, однако стадия 5 несколько менее вероятна, чем стадия 4. Восстановление центра T2Cu может происходить двояко: либо путем переноса электрона от восстановленного центра T1Cu домена 6 (стадия 6), либо путем переноса двух электронов от восстановленного биядерного центра на центр T2Cu и на ранее окисленный центр T1Cu домена 6 (стадии 6 и 7).

Все эти результаты позволяют конкретизировать выдвинутую еще в 1966 г. гипотезу [12] о том, что одна из основных физиологических функций церулоплазмينا заключается в окислении ионов  $Fe^{2+}$  и их последующем встраивании в апо-форму трансферрина. К настоящему времени накоплен значительный массив экспериментальных (хотя и косвенных) данных, свидетельствующих в пользу того, что церулоплазмин может образовывать белок-белковые аддукты с трансферрином и лактоферрином [16]. Что же касается конкретного пути транспорта окисленных ионов  $Fe^{3+}$  наружу из глобулы церулоплазмينا, то в недавней работе [18], использующей цитируемые выше данные расшифровки кристаллической структуры этого белка, была построена молекулярная модель комплекса церулоплазмينا

с N-долей лактоферрина. Согласно этой модели, ион  $Fe^{3+}$  достигает белковой поверхности по цепочке остатков:  $M^{3+}$ -центр (остатки Glu932 и Glu935)  $\rightarrow$  Glu753  $\rightarrow$  Asp921  $\rightarrow$  Asp297, после чего становится способным включаться в комплекс с лактоферрином.

#### Список литературы/References

1. Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. // *Acta Cryst.*, 2007, D63, pp. 240–248.
2. Bielli P., Calabrese L. Structure to function relationship in ceruloplasmin: a «moonlighting» protein. // *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, v. 59, pp. 1413–1427.
3. Ehrenwald E., Fox P.L. Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of plasma metalloproteinase. // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, v. 309, no. 2, pp. 392–395.
4. Holmberg C.G. On the presence of a laccase-like enzyme in serum and its relation to the copper in serum. // *Acta Physiol. Scand.*, 1944, v. 8, no. 2–3, pp. 227–229.
5. Holmberg C.G., Laurell C.-B. Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper containing protein, and a description of some of its properties. // *Acta Chem. Scand.*, 1948, v. 2, no. 7, pp. 550–556.
6. Holmberg C.G., Laurell C.-B. Investigations in serum copper. III. Coeruloplasmin as an enzyme. // *Acta. Chem. Scand.*, 1951, v. 5, no. 3, pp. 476–480.
7. Komori H., Higuchi Y. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. // *BioMol Concepts*, 2010, v. 1, pp. 31–40.
8. Laurie S.H., Mohammed E.S. Caeruloplasmin: the enigmatic copper protein. // *Coord. Chem. Rev.*, 1980, v. 33, no. 3, pp. 279–312.
9. Lindley P.F., Card G., Zaitseva I., Zaitsev V., Reinhammar B., Selin-Lindgren E., Yoshida K. An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. // *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1997, v. 2, pp. 454–463.
10. Lindley P., Card G., Zaitseva I., Zaitsev V.N. Ceruloplasmin: the beginning of the end of an enigma. // *Persp. Bioinorg. Chem.*, 1999, v. 4, pp. 51–89.
11. Machonkin T.E., Solomon E.T. The thermodynamic, kinetics, and molecular transfer in human ceruloplasmin. // *J. Amer. Chem. Soc.*, 2000, v.122, pp. 12547–12560.
12. Osaki S., Johnson D.A., Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. // *J. Biol. Chem.*, 1966, v. 241, no. 12, pp. 2746–2751.
13. Stoj C.S., Kosman D.J. Copper proteins: oxidases. // *Encyclopedia of Inorg. Chem.*, 2006, pp. 1–26.
14. Protein Data Bank, Available at: <http://www.resb.org/pdb/results/results.do?grid=AD946E1b&tabtoshow=Current>.
15. Superfamily 1.75. HMM library and genome assignments server (2013), Available at: <http://www.supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/index.html>.
16. Vashchenko G., MacGillivray R.T.A. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. // *Nutrients*, 2013, v. 5, pp. 2289–2313.
17. Vasin A., Klotchenko S., Puchkova L. Phylogenetic analysis of six-domain multi-copper blue proteins. // *PLOS Current Tree of Life.*, 2013, pp. 1–17.
18. White K.N., Conesa C., Sanches L., Amini M., Farnaud S., Lorvorlak C., Evans R.W. The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. // *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, v. 1820, pp. 411–416.
19. Zaitsev V.V., Zaitseva I., Papiz M., Lindley P.F. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. // *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, v. 4, no. 5, pp. 579–587.
20. Zaitseva I., Zaitsev V.N., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. The X-ray structure of human ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres. // *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1996, v. 1, pp. 15–23.

#### Рецензенты:

Кокряков В.Н., д.б.н., профессор, отдел общей патологии и патологической физиологии, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

Трусов А.А., д.ф.-м.н., профессор, зав. кафедрой молекулярной биофизики, физический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 31.01.2014.