

ЭФФЕКТЫ МЕДИ И ЦИНКА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ γ -ГЛОБУЛИНОМ

Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., Голуб А.Е., Денисова Е.А.,
Воробьева У.А.

Лаборатория межклеточных взаимодействий НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва

Резюме. С использованием молекулярной ультрафильтрации и дифференциальной спектрофотометрии в ультрафиолете оценивали конформационные изменения человеческого сывороточного γ -глобулина при связывании катионов меди и цинка. Содержание свободных металлов в фильтрате оценивали по реакции с диэтилдитиокарбаматом натрия и о-фенантролином, соответственно. Показана общность биологических свойств меди и цинка в условиях их связывания с молекулой белка и установлены существенные различия между катионами в использованной экспериментальной системе. Так, подтверждена более высокая активность меди на внешних связях молекулы γ -глобулина и тропность цинка к внутренним областям белковой глобулы. Описаны сайты связывания металла, различающиеся параметрами взаимодействия с катионами и своей пространственной локализацией. Предложены подходы к анализу динамики заполнения металлом сайтов разной пространственной локализации. Обсуждаются вопросы конформационного состояния молекулы γ -глобулина в ходе связывания катионов, а также перспективы использования полученных данных в клинико-иммунологических исследованиях.

Ключевые слова: γ -глобулин, медь, цинк, связывание.

Cheknev S.B., Babaeva E.E., Golub A.E., Denisova E.A., Vorobieva U.A.

THE EFFECTS OF COPPER AND ZINC IONS DURING THEIR BINDING WITH HUMAN SERUM γ -GLOBULIN

Abstract. Conformational changes of human serum γ -globulin were studied during and after its binding with copper and zinc ions, using molecular ultrafiltration and differential spectrophotometry. The contents of non-bound metals in the filtrate were evaluated, resp., with sodium diethyl thycarbamate and o-phenanthroline. It has been shown that copper and zinc exhibited common biological properties during their interactions with protein, but the binding differed sufficiently under similar experimental conditions. E.g., it was confirmed that copper was more active at the external sites of γ -globulin molecule, whereas zinc demonstrated tropicity for the areas of protein intraglobular compartments. The metal-binding sites have been described that differ in their parameters of interactions with cations and their spatial location within globular domains. Approaches are suggested for dynamic analysis of saturation for these differently located sites by the metal ions. We discuss the issues of altered conformational state of the γ -globulin molecule during the binding of cations, as well as potential usage of these data in clinical immunology. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 5-6, pp 615-622)

Введение

Изучение вопросов структурной динамики и функциональной пластичности биомолекул показывает, что значительная часть межмолекулярных взаимодействий и регуляторных эффектов, опосредуемых иммуоактивными белками плазмы крови, реализуется за счет конформационных изменений, циркулирующих или экспрессированных на

клеточной мембране биополимеров [6, 12, 13]. Указанные изменения могут вызываться как непосредственно макромолекулярными соединениями, иницирующими определенный тип взаимодействий, так и катионами металлов, входящими в состав нативной структуры белков и гликопротеинов, присоединенными в ходе предшествующих межмолекулярных контактов или хелатированными случайным образом из микроокружения [11, 12, 17].

Ранее нами установлена способность катионов меди и цинка связываться с белками γ -глобулиновой фракции плазмы, вызывая при этом выраженные конформационные преобразования молекулы γ -глобулина и естественно меняя эффекторный потенциал белка [1, 2, 8]. Поскольку сами медь и цинк, при-

Адрес для переписки:

Чекнёв Сергей Борисович,
123098, г.Москва, ул. Гамалеи, дом 18,
НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН.
Тел.: (495)190-43-88, факс (495)193-61-83.
E-mail cheknev@niem.ru

существующие в плазме крови, способны напрямую регулировать функции клеток иммунной системы [16, 18, 20, 21] и часть таких же эффектов одновременно опосредуется белками γ -глобулиновой фракции [6, 22], в примембранном пространстве лимфоцита могут возникать регуляторные влияния, обусловленные воздействием самого γ -глобулина, металла и γ -глобулина, связавшего металл и им модифицированного.

Вопрос о том, какой из внутриклеточных сигнальных путей будет активироваться или тормозиться каждым из компонентов этой физиологической системы иммунорегуляции, прежде не рассматривался. Как будут меняться взаимоотношения указанных факторов в той или иной патологической ситуации – тоже неизвестно. Ясно только, что множественность эффектов, опосредуемых этими регуляторами, по отдельности или в совокупности, не может оставаться вне интереса иммунологов, поскольку понятно: изменение вектора транспорта и обмена металлов в микроокружении клетки с необходимостью повлечет за собой изменение клеточных функций, замкнутых на воздействие любого из названных биологически активных компонентов.

В данной работе, на основании уже имевшихся и последних полученных результатов, предпринята попытка оценить взаимодействие γ -глобулина с катионами меди и цинка с точки зрения динамики процесса, особенностей связывания с белком исследуемых катионов, происходящих при этом конформационных преобразований макромолекулы и возможных последствий этих преобразований, имея в виду формирование и поддержание определенного эффекторного потенциала γ -глобулина.

Материалы и методы

Использовали препарат человеческого сывороточного γ -глобулина (Serva или ICN) в 0,15 М растворе NaCl (рН 7,12-7,2) с концентрацией белка 100 мкг/мл. Освобожденные от крупных ассоциатов мембранной фильтрацией (0,45 мкм, Millipore) образцы γ -глобулина инкубировали в течение 1 час при 37°C с осветленными (0,22 мкм, Millipore) водным сульфатом меди (Merck) или хлоридом цинка, примененными в диапазоне концентраций металлов от 0,25 до 4,0 и до 6,0 мкг/мл соответственно. В качестве контроля использовали образцы γ -глобулина, инкубированные в тех же условиях, но без солей указанных металлов.

По истечении срока инкубации опытные и контрольные образцы в объеме 5,0 или 7,0 мл подвергали молекулярной ультрафильтрации на конусах CF-25 (Amicon) в режиме 300 g, 10-15 мин, 20°C. Объем в конусах доводили до первоначального 0,15 М раствором NaCl и фильтрацию повторяли в прежнем режиме. Супернатанты поднимали из конусов, вновь доводили до исходного объема и анализировали

спектрофотометрически в ультрафиолете, в диапазоне длин волн от 190 до 320 нм с шагом 10 нм, в полуавтоматическом режиме с использованием дифференцирующего спектрофотометра PU 8730 UV/VIS (Philips). Спектрофотометрический контроль образцов осуществляли также на всех предшествующих этапах исследования.

Содержание свободной меди в фильтрате оценивали реакцией комплексообразования с диэтилдитиокарбаматом натрия (конечная концентрация 10^{-3} М) в 0,15 М растворе NaCl (рН 9,0-9,2) с использованием спектрофотометрии при длине волны 440 нм.

Содержание в фильтрате свободного цинка оценивали по реакции с о-фенантролином в 0,15 М растворе NaCl (нейтральный рН) с использованием спектрофотометрии при длине волны 226 нм. Постановку реакции осуществляли, подбирая разведение о-фенантролина так, чтобы уровень его поглощения обеспечивал линейную зависимость показателей оптической плотности образующегося с цинком комплекса от концентрации цинка в исследуемом диапазоне. Использованные концентрации о-фенантролина составили от $3,0 \times 10^{-5}$ до $7,0 \times 10^{-5}$ М.

Расчет показателей изменения оптической плотности и молярных отношений в растворе осуществляли на основании концентрации γ -глобулина, установленной спектрофотометрически при длине волны 280 нм (коэффициент экстинкции 0,7). Кислотность образцов контролировали с помощью электронного рН-метра-иономера Эксперт-001 (Эко-никс-Эксперт).

Результаты

Как установлено нами ранее, взаимодействие γ -глобулина с катионами меди и цинка характеризуется насыщением белка металлом [8]. При этом спектральные изменения раствора γ -глобулина в присутствии надфизиологических концентраций меди оказываются более выраженными, чем при взаимодействии белка с катионами цинка: прирост оптической плотности в реакции с медью значительно больше; насыщающая концентрация меди – меньше; получение соответствующего меди спектрального эффекта требует применения на порядок большей концентрации цинка [8].

Поскольку разворачивание молекулы белка в периглобулярное пространство, очевидно, достигается в результате взаимодействия металла с внешними участками связывания и с учетом примененного в реакции значительного (до 30-кратного) молярного избытка катионов по отношению к γ -глобулину, мы использовали для анализа характеристик взаимодействия названные нами условными координаты Скэтчарда, спрямляющие изотермы адсорбции степенью насыщения белка металлом в зависимости от общего содержания катионов в растворе.

Результат полностью соответствует прямым оптическим измерениям (рис.1). Он показывает, что константа связывания меди ($6,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) на порядок превышает таковую цинка ($6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) и свидетельствует в пользу отмеченной нами ранее большей активности меди на внешних сайтах молекулы белка [1, 8].

Применение молекулярной ультрафильтрации с последующим определением и введением в расчеты реальных количеств, связавшихся с белком меди и цинка обнаруживает, что во взаимодействие γ -глобулина с металлом вовлекаются сайты, обладающие различными характеристиками связывания (рис.2 и 3). При этом в динамике насыщения (а именно она представлена на оси абсцисс) катионы меди сначала заполняют сайты, сильнее связывающие металл ($K_{ca.} = 8,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), а затем, в режиме донасыщения – более слабые сайты ($K_{ca.} = 2,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), (рис.2).

Как видно на рис.3, цинк наоборот сначала заполняет более слабые поверхностные связи молекулы белка ($K_{ca.} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) с последующим переходом на более сильные участки связывания ($K_{ca.} = 1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Вероятно, в нативной конформации белковой глобулы последние оказываются недоступными катионам, и для их экспрессии требуется реаранжировка исходно доступных металлу боковых (более слабых) аминокислотных остатков, открывающая области локализации сайтов с большим металлосвязывающим потенциалом.

Последующие наблюдения обнаруживают, что молекула γ -глобулина располагает не только вне-

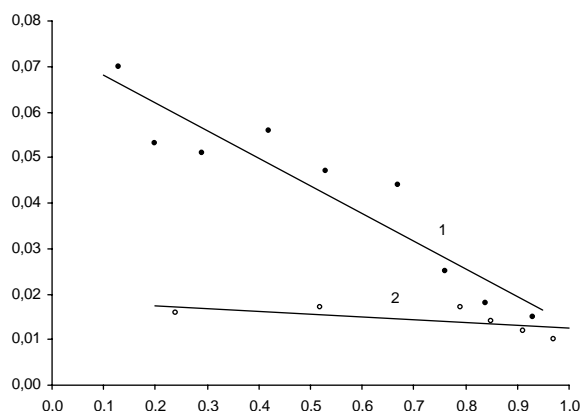


Рис. 1. Оптические эффекты насыщения человеческого сывороточного γ -глобулина катионами меди (линия 1 и темные кружки) и цинка (линия 2 и светлые кружки), представленные на основании данных [8] в условных координатах Скэтчарда. Здесь и на рис.2-5: оценка при длине волны 280 нм. Здесь и на рис.2 и 3: степень насыщения рассчитывали по Мецлеру. По оси абсцисс: здесь и на рис.2 и 3 – отношение опытного и предельного изменения показателей оптической плотности ($\Delta O.D. / \Delta O.D. \text{ max.}$). По оси ординат: то же, отнесенное к общему содержанию исследуемых катионов в растворе ($\Delta O.D. / \Delta O.D. \text{ max.} / [Me^{2+}] \text{ общ.}$), мкМ^{-1} .

шними (исходно доступными и недоступными катионам), но и внутренними сайтами связывания металла. Определенные указания на это обстоятельство следовали из результатов наших предшествующих исследований [2, 8].

Зависимость измененной оптической плотности раствора связавшего металл γ -глобулина от количества связанного металла показывает, что первые катионы меди встраиваются во внутренние компартменты молекулы белка и компактизируют глобулу (рис.4). Далее

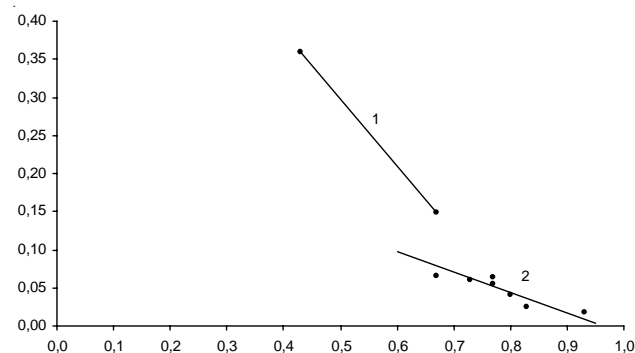


Рис.2. Оптические эффекты насыщения человеческого сывороточного γ -глобулина катионами меди, представленные на основании данных [8] в координатах Скэтчарда. По оси ординат: отношение опытного и предельного изменения показателей оптической плотности, отнесенное к содержанию в растворе свободной (не связавшейся с белком) меди ($\Delta O.D. / \Delta O.D. \text{ max.} / [Cu^{2+}] \text{ своб.}$), мкМ^{-1} . Здесь и на рис.3: 1 и 2 – отдельные диапазоны концентрационных зависимостей.

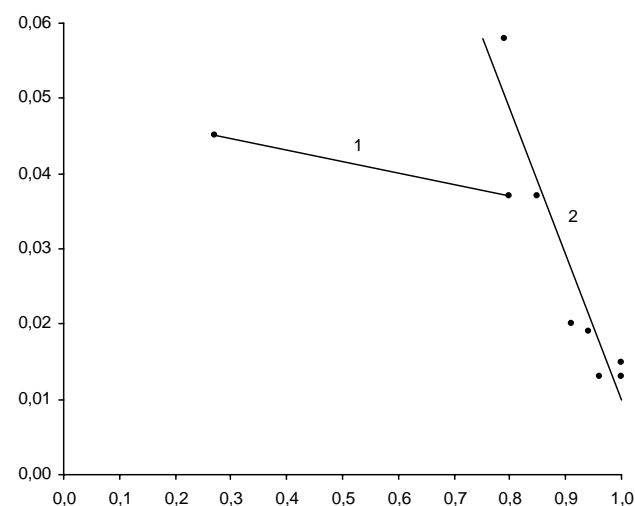


Рис.3. Оптические эффекты насыщения человеческого сывороточного γ -глобулина катионами цинка, представленные на основании данных [8] в координатах Скэтчарда. По оси ординат: отношение опытного и предельного изменения показателей оптической плотности, отнесенное к содержанию в растворе свободного (не связавшегося с белком) цинка ($\Delta O.D. / \Delta O.D. \text{ max.} / [Zn^{2+}] \text{ своб.}$), мкМ^{-1} .

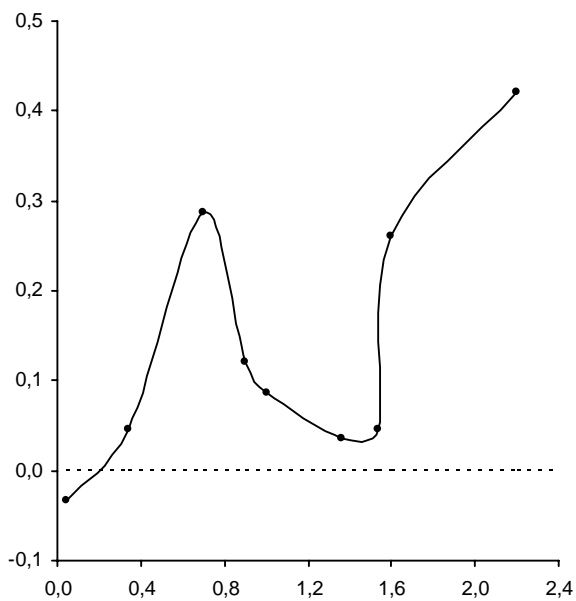


Рис.4. Изменение показателей поглощения в растворе человеческого сывороточного γ -глобулина, связавшего катионы меди. По оси абсцисс: концентрация связанной меди ($[\text{Cu}^{2+}]$ связ.), мкг/мл. Здесь и на рис.5 по оси ординат: изменение показателей оптической плотности, ед.

в реакцию вовлекаются внешние участки связывания, молекула разворачивается во внемолекулярное пространство до состояния, когда экспрессируются исходно недоступные катионам сайты связывания (рис.4). Взаимодействие с последними способствует встраиванию большего количества катионов во внутренние области глобулы, молекула снова компактизуется до насыщения своих внутриглобулярных структур (рис.4). В последующем металл продолжает действовать по внешним, оставшимся незаполненными связям γ -глобулина, вторично разворачивая уже содержащую медь внутри глобулы молекулу белка (рис.4). Насыщающие отдельные области связывания концентрации меди приведены в работе [1].

Те же закономерности обнаруживаются в условиях связывания γ -глобулином катионов цинка. В отличие от меди, цинк, обладая тропностью к внутренним компартаментам молекулы [2, 8], в большем диапазоне концентраций и, следовательно, большим количеством катионов первично встраивается внутрь белковой глобулы (рис.5). Повторная компактизация молекулы более выражена, чем на меди: она проявляется абсолютной гипохромией в спектре поглощения γ -глобулина. Таким образом, в совокупности, во внутренние компарменты молекулы белка цинка попадает существенно больше, нежели меди (рис.5). Насыщающие отдельные области связывания концентрации цинка приведены в работе [2].

Графики Скэтчарда свидетельствуют о наличии в составе молекулы γ -глобулина нескольких групп неэквивалентных и зависимых друг от друга участ-

ков связывания металла. Как показано на рис.6 для меди и на рис.7 для цинка, таких участков видится 4 (точка – тоже определенная область связывания). Поскольку проекции полученных отрезков на ось абсцисс не перекрываются, мы полагаем и продолжаем придерживаться этой позиции, что заполнение медью, как и цинком, соответствующих сайтов и переключение связывания с одной группы центров на другую происходит последовательно, по мере увеличения количества связавшихся с белком катионов. При этом прочность связывания металла в динамике последовательного заполнения экспрессирующихся в доступные катионам конформации участков нарастает. Соответствующие константы связывания составляют: 1 – 1,6; 2 – 1,8 и 3 – $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (рис.6). Распределение меди по отдельным концентрационным зависимостям (отрезкам) следующее: 1 – 20; 2 – 45 и 3 – 35% связавшегося металла.

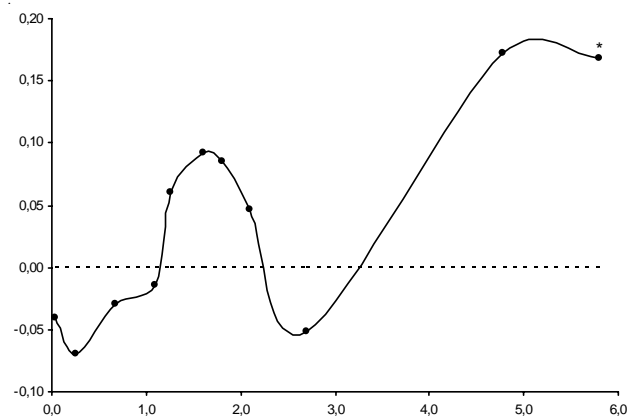


Рис.5. Изменение показателей поглощения в растворе человеческого сывороточного γ -глобулина, связавшего катионы цинка. По оси абсцисс: концентрация связанного цинка ($[\text{Zn}^{2+}]$ связ.), мкг/мл. *Точка приведена условно (ее истинная абсцисса 7,55 мкг/мл).

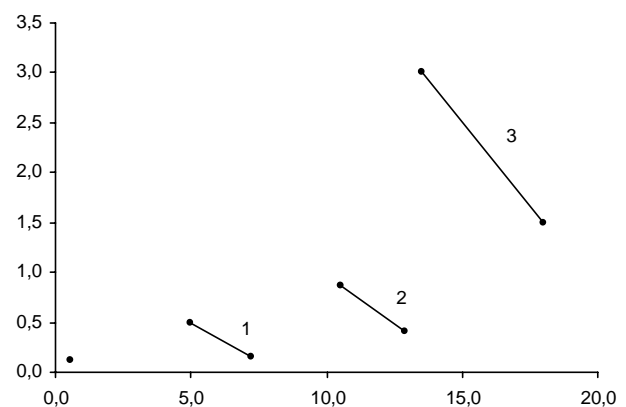


Рис.6. График Скэтчарда, полученный при связывании катионов меди с человеческим сывороточным γ -глобулином. По оси абсцисс: концентрация связанной меди ($[\text{Cu}^{2+}]$ связ.), мкМ. По оси ординат: отношение концентраций связанной и свободной меди ($[\text{Cu}^{2+}]$ связ. / $[\text{Cu}^{2+}]$ своб.). Точка и отрезки 1, 2, 3 – отдельные диапазоны концентрационных зависимостей.

В опытах с цинком, по понятным причинам, область связывания низких концентраций металла представлена уже отрезком (рис.7). Проекция отрезков на ось абсцисс, аналогично меди, не перекрываются. Прочность связывания катионов по мере увеличения количества присоединенного металла тоже нарастает. Соответствующие константы составляют: 1 – 0,8; 2 – 2,1; 3 – 3,4 и 4 – $5,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (рис.7). Распределение катионов по отрезкам: 1 – 2; 2 – 18; 3 – 45 и 4 – 35% связавшегося металла.

Достаточно высокое соответствие результатов прямых оптических измерений (рис.4 и 5) расчетам графиков Скэтчарда (рис.6 и 7) по последовательности заполнения катионами определенных областей связывания металла, а оно составляет в опытах с медью 70%, а в экспериментах с цинком – 80%, позволяет, соединив нижние границы отрезков на графиках Скэтчарда, получить динамику заполнения металлом тех критических сайтов, связывание с которыми вызывает переключение взаимодействия на новую группу участков связывания. На рис.8 отчетливо видна разница между медью и цинком. Для меди экспрессия новых участков связывания нарастает почти экспоненциально (рис.8) и, по видимому, определяется ее высокой химической активностью и неспецифичностью. Для цинка число таких критических сайтов резко ограничено (рис.8), что может свидетельствовать о более высокой специфичности цинка в сравнении с медью в реализации взаимодействия с γ -глобулином.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что γ -глобулины связывают цинк и медь. Основу взаимодействия составляют металлосвязывающие аминокислотные последовательности, которых в первичной структуре только одной тяжелой цепи IgG1 человека содержится около 30 [3]. Не удивительно поэтому, что в опытах с нагрузкой белка значительным молярным избытком катионов, когда, по условиям эксперимента, гибкость и пластичность молекулы существенно возрастают [7], а это может сопровождаться частичным раскручиванием полипептидных цепей, приоткрывающим скрытые в нативной конформации сайты связывания, мы получаем достаточно высокие количества связавшегося с γ -глобулином металла – до 20-30 катионов меди и 40-60 цинка на молекулу белка [1, 2]. В связывании катионов будут также участвовать богатые цистеином, гистидином и пролином сайты междоменного пространства и экспрессированные на поверхности глобулы полианионные цепочки олигосахаридов, ковалентно присоединенные к каркасу молекулы в области $\text{C}_{\text{H}2}$ доменов [5].

При этом, если для меди, в силу ее высокого редокс-потенциала, такая ситуация может рассматри-

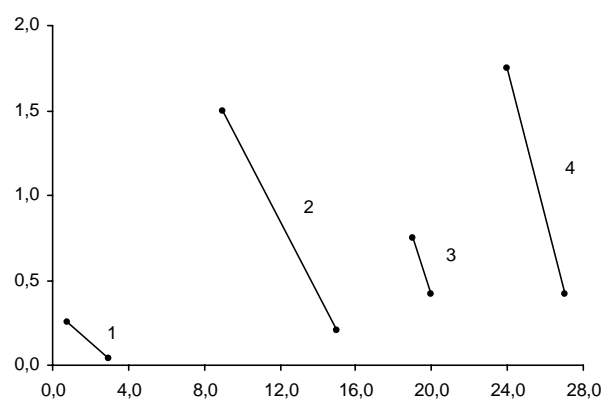


Рис.7. График Скэтчарда, полученный при связывании катионов цинка с человеческим сывороточным γ -глобулином. По оси абсцисс: концентрация связанного цинка ($[\text{Zn}^{2+}]_{\text{связ.}}$), мкМ. По оси ординат: отношение концентраций связанного и свободного цинка ($[\text{Zn}^{2+}]_{\text{связ.}} / [\text{Zn}^{2+}]_{\text{своб.}}$). Отрезки 1, 2, 3, 4 – отдельные диапазоны концентрационных зависимостей.

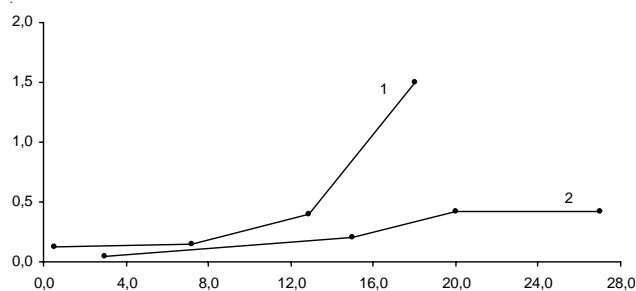


Рис.8. Динамика заполнения катионами меди (1) и цинка (2) металлосвязывающих сайтов γ -глобулина, взаимодействие с которыми вызывает переключение реакции на новую группу участков связывания металла. Получена из графиков Скэтчарда (пояснение в тексте). По оси абсцисс: концентрация связанного металла ($[\text{Me}^{2+}]_{\text{связ.}}$), мкМ. По оси ординат: отношение концентраций связанного и свободного металла ($[\text{Me}^{2+}]_{\text{связ.}} / [\text{Me}^{2+}]_{\text{своб.}}$).

ваться лишь в качестве чисто экспериментальной модели, то значительные (в 30-60 раз) повышения локальной концентрации цинка, происходящие за счет дегрануляции тромбоцитов в очагах тканевого повреждения или воспаления, могут реально возникать в клинической практике [13, 14].

Первичными хелаторами единичных катионов в структуре молекулы γ -глобулина представляются разветвленные антенны олигосахаридов шарнирной области [5]. По всей видимости, их общий отрицательный заряд привлекает катионы, которые, взаимодействуя с сахарами, нейтрализуют их по заряду. Последние, обретая в результате меньшую степень нуклеофильности, должны проявлять тенденцию к сворачиванию в более гидрофобные области междоменного пространства. Металл оказывается погруженным во внутренние компартменты молекулы белка и образует там металлокомплексы, что при-

водит к индукции потока конформационных сигналов, распространяющегося по всей молекуле [10]. Совокупность вызываемых этими событиями микрконформационных движений и преобразований может способствовать одновременному формированию в составе молекулы белка частично компактизованных и декомпактизованных участков и, следовательно, экспрессии скрытых в нативной конформации сайтов связывания металла. Понятно, что при этом молекула белка испытывает серию локальных возмущений в отдельных участках каркаса и своей поверхности, динамично меняющих условия связывания катионов [9, 12].

Сказанное, конечно, не описывает всей масштабы происходящих в молекуле γ -глобулина при взаимодействии с металлом конформационных преобразований. В то же время, оно демонстрирует многокомпонентность и комплексность исследуемых процессов, когда исход реакции может определяться не столько последовательностью заполнения катионами конкретных участков связывания, сколько тем, в каком конформационном состоянии находится отдельная молекула γ -глобулина и какие ее металлосвязывающие сайты экспрессированы и доступны металлу в определенном, даже временном интервале.

Находящиеся в растворе катионы могут одновременно распределяться не по одной, а, например, по двум группам участков связывания, имеющим разную пространственную локализацию. Сложность подходов к анализу использованной экспериментальной системы, определяющаяся особенностями структурной организации молекулы γ -глобулина, очевидна. И какие бы расчеты параметров связывания – основанные на степени насыщения белка металлом или соотношении количества связанных и свободных катионов – мы ни применяли, результат будет ограничен самим количественным характером расчета и стандартностью оценки. Он будет тем достовернее, чем меньше число сайтов вовлечено в реакцию, и притом с условием, что эти сайты являются эквивалентными и независимыми друг от друга.

Представленные в работе материалы, вне сомнения, свидетельствуют о том, что связывание металлов с γ -глобулином выходит далеко за рамки общепринятых подходов к анализу связывания белков с лигандами. Во всяком случае, в основополагающих трудах по химии и физике белковых молекул вопросы взаимодействия белка с лигандами за счет сайтов разной пространственной локализации и доступности не освещаются.

Действительно, если понятно, что поверхностные сайты связывания металла оказываются относительно слабыми и, следовательно, способными к достаточно легкому сбросу катионов в условиях взаимодействия с другими макромолекулами (в противном случае белки γ -глобулиновой фракции правомочно рассматривались бы в качестве хелаторов и перенос-

чиков катионов в плазме, чего до сих пор не отмечали), то совершенно необъяснимо с принятых позиций распределение большей части присоединяемого металла по участкам с промежуточной константой связывания (отрезки 2 и 3 на рис.6 и 7 соответственно). Объяснению этого факта с позиций преимущественного нахождения именно таких сайтов в составе молекулы γ -глобулина противоречат данные, представленные на рис.8 и показывающие, что, во всяком случае, для меди, способных прочнее связывать металл структур значительно больше, нежели тех, по которым распределяется примерно половина катионов.

Естественно, что использованные нами экспериментальные подходы тоже ограничены и не позволяют достоверно описать и структурно локализовать всю совокупность происходящих с молекулой белка в ходе связывания металла событий. Тем не менее, применение оптических методов исследования (рис.4 и 5) и сопоставление этих данных с результатами расчетов графиков Скэтчарда (рис.6 и 7) позволяют существенно приблизиться к пониманию того, что на самом деле происходит с белковой глобулой и катионами металлов в процессе их взаимодействия. Прослеживая последовательность событий сопоставлением оптических и количественных характеристик взаимодействия, мы получаем возможность, с известным уровнем допущений, установить общие закономерности экспрессии сайтов связывания меди и цинка в динамике присоединения металлов и даже судить об их пространственной локализации.

При таком анализе область точки на рис.6 (а это реальный белок) и первый отрезок на рис.7 можно считать относящимися к внутренним, первый отрезок на рис.6 и второй на рис.7 – к внешним, третий отрезок на рис.6 и четвертый на рис.7 – снова к внутренним участкам связывания. Не расшифрованными и не вписывающимися в динамику взаимодействия, представленную оптическими характеристиками, остаются промежуточные (второй на рис.6 и третий на рис.7) отрезки, т.е. как раз те диапазоны, по которым распределяется большая часть связывающихся с γ -глобулином меди и цинка.

Можно было бы на этом остановиться, сказав, что доказательный анализ зависимостей, определяемых этими промежуточными диапазонами, требует дальнейших специальных исследований. Это так и есть. Но уже сегодня мы располагаем достаточным объемом материала (и этот материал представлен в настоящей работе) для трактовки указанных зависимостей с позиций, правомочность которых определяется объединением данных количественного и «качественного» анализа, полученных объективными независимыми методами исследований.

Ключ к ответу на вопрос о природе обсуждаемых отрезков – в их промежуточном положении на гра-

фиках Скэтчарда (рис.6 и 7). Они располагаются между диапазонами, формирующимися за счет внешних и внутренних связей молекулы белка. Если следовать логике поэтапного заполнения металлом последовательно экспрессирующихся участков связывания, присоединяющиеся по этим диапазонам катионы должны выписывать нисходящую дугу «колоколов» на рис.4 и 5. Но это – не что иное, как конформационное состояние молекулы, экспрессирующей, за счет своего предшествующего развертывания, исходно недоступные металлу сайты связывания. Идет их заполнение катионами, молекула вторично компактизуется, и в это же время, очевидно, остается вакантной значительная часть внешних участков связывания, которая насыщается одновременно с внутренней областью молекулы.

Тогда нет промежуточной группы сайтов связывания. Есть суммарный вектор перемещения металла из раствора на исходно недоступные катионам участки. Идет присоединение меди и цинка всеми экспрессированными в данном конформационном состоянии молекулы металлосвязывающими структурами. Попытка количественно охарактеризовать реакцию взаимодействия соответствующей константой, естественно, дает константу, заниженную по сравнению с прочными внутренними связями (за счет участия более слабых внешних), но более высокую по сравнению со слабыми внешними (благодаря вовлечению во взаимодействие более сильных внутренних). Иными словами, в отсутствие у каждого единой структурной основы промежуточные второй и третий отрезки на рис.4 и 5 соответственно образуются определенным конформационным состоянием взаимодействующей с металлом молекулы белка и отражают возможность связывания катионов с обоими типами экспрессируемых γ -глобулином сайтов (внешними и внутренними, или исходно доступными и недоступными металлу) одновременно.

Подводя краткий итог обсуждению, можно видеть, что, присоединяя катионы металлов, молекула γ -глобулина переходит в новое, динамично меняющееся конформационное состояние, определяемое тем количеством меди или цинка, которое встроилось в структуру белковой глобулы. Если при этом оказываются задействованными Fab фрагменты молекулы, возможны существенные сдвиги в протекании реакций антиген – антитело; если поменялось состояние Fc региона, можно ожидать изменения всего спектра клеточных реакций, замкнутых на активацию Fc рецепторов.

В совокупности с полученными нами ранее данными [1, 2, 8] результаты обоснованно свидетельствуют о правомочности рассмотрения белков γ -глобулиновой фракции в качестве активных участников процессов обмена катионов металлов в биологических жидкостях и тканях организма и транспор-

тировки меди и цинка, причем не только в локальном микроокружении. Обмен металла возможен за счет достаточно легкого сброса катионов внешними сайтами связывания [1, 8], а транспортировка (или депонирование) – вследствие встраивания единичных катионов во внутренние области молекулы белка [2, 8], когда металл оказывается скрыт в сайтах межмолекулярного пространства и его хелатирование становится невозможным без нарушения целостности самой молекулы – например, в случае частичного протеолиза поверхностных структур шарнирной области.

В свете сказанного γ -глобулины видятся потенциально вовлеченными в механизмы развития ряда патологических состояний, возникновение, динамику и лечение которых никогда не связывали с известными теперь, благодаря проведенным исследованиям, особенностями γ -глобулиновой фракции плазмы крови.

В практической медицине описана преคลินิกическая стадия миеломной болезни, при которой выраженная гиперкуперемия ассоциирована с сильным специфическим связыванием меди аномальным IgG [15]. Можно думать о механизмах, ослаблявших бы эту связь за счет индуцируемых в молекуле белка конформационных перестроек, или об обмене металлом с более мощными хелаторами.

При ревматоидном артрите связанная с альбумином (а теперь не исключено, что и с γ -глобулином) медь запускает серию патологических реакций в результате изменения метаболизма синовиальных клеток [19]. Первичной точкой приложения патогенетической терапии заболевания считают выведение из организма связанной с белками меди [19]. Это снова вопросы обмена металлом и его транспортировки, но теперь – с участием белков γ -глобулиновой фракции.

При раке печени мишенью противоопухолевой терапии представляется взаимодействие фактора роста гепатоцитов с клеточными рецепторами [23]. Катионы меди и цинка специфически ингибируют это взаимодействие, препятствуя активации гепатоцитов и метастазированию измененных клеточных форм [23]. Можно представить себе доставку катионов меди или цинка в очаги развития гепатоцеллюлярной карциномы белками γ -глобулиновой фракции.

Полученные данные позволяют по-новому рассматривать патогенез количественно-функциональной недостаточности клеточного звена иммунитета в условиях естественного дефицита цинка [4] – с позиций прочного связывания металла белками γ -глобулиновой фракции, препятствующего поступлению цинка в метаболические процессы и участию катионов в поддержании иммунного гомеостаза.

Остается отметить, что, если два-три года назад, на первых этапах исследования проблема взаимо-

действия и связывания металлов с белками γ -глобулиновой фракции могла быть отнесена к чисто фундаментальным, на данном этапе, по совокупности представленных результатов, она обретает вполне определенную клинико-иммунологическую направленность.

Список литературы

1. Бабаева Е.Е., Воробьева У.А., Жаркова М.С., Чекнёв С.Б. Человеческий сывороточный γ -глобулин связывает катионы меди // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 2006. – Т.141. – №1. – С.59-62.
2. Бабаева Е.Е., Воробьева У.А., Денисова Е.А., Медведева Д.А., Чекнёв С.Б. Связывание катионов цинка с человеческим сывороточным γ -глобулином // Там же. – №5. – С.540-543.
3. Джеске Д.Дж., Кеpra Дж.Д. Иммуноглобулины: строение и функции // Иммунология. В трех томах: (пер. с англ.) / Под редакцией У.Пола. – М.: Мир, 1987. – С.204-254.
4. Ковальчук Л.В., Сусликов В.Л., Карзакова Л.М., Соколова Е.В. Иммуная реактивность организма в условиях естественного дефицита цинка // Иммунология. – 2004. – Т.25. – №6. – С.336-339.
5. Сыкулев Ю.К., Еронина Т.В. Углеводные компоненты иммуноглобулинов: структура и биологическое значение // Успехи соврем. биологии. – 1990. – Т.110. – №2(5). – С.204-218.
6. Хайтов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, антивирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 2. Сигналпроводящие активирующие и ингибирующие рецепторы естественных клеток-киллеров // Там же. – 2005. – Т.125. – №5. – С.435-445.
7. Христофоров В.С., Персанов В.М., Сухомудренко А.Г., Абрамов В.М., Завьялов В.П. Роль «шарнирной» области иммуноглобулинов G в тепловой агрегации и активации комплексообразования // Биофизика. – 1987. – Т.32. – №1. – С.32-36.
8. Чекнёв С.Б. Сопоставление эффектов меди и цинка в условиях их взаимодействия с человеческим сывороточным γ -глобулином // Иммунология. – 2006. – Т.27. – №4. – С.212-216.
9. Шайтан К.В. Конформационная динамика и новые подходы к физическим механизмам элементарных актов переноса массы, трансформации энергии и передачи информации в биомолекулярных структурах // Молек. биология. – 1994. – Т.28. – №3. – С.670-678.
10. Ширяев Н.В. Эволюционное прошлое IgG млекопитающих в свете современных знаний о структуре и функционировании данной белковой молекулы // Иммунология. – 2006. – Т.27. – №1. – С.58-60.
11. Atanasova A., Zamble D.B. *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel // J. Bacteriology. – 2005. – Vol.187. – №14. – P.4689-4697.
12. Berg J.M. Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules // J. Biol. Chemistry. – 1990. – Vol.265. – №12. – P.6513-6516.
13. Borza D.-B., Morgan W.T. Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals // Ibid. – 1998. – Vol.273. – №10. – P.5493-5499.
14. Jones A.L., Hulett M.D., Parish C.R. Histidine-rich glycoprotein binds to cell-surface heparane sulfate via its N-terminal domain following Zn^{2+} chelation // Ibid. – 2004. – Vol.279. – №29. – P.30114-30122.
15. Lewis R.A., Hultquist D.E., Baker B.L., Fales H.F., Gershowitz H., Penner J.A. Hypercupremia associated with a monoclonal immunoglobulin // J. Lab. Clin. Med. – 1976. – Vol.88. – №3. – P.375-388.
16. Lukasewycz O.A., Prohaska J.R., Meyer S.G., Schmidtke J.R., Hatfield S.M., Marder P. Alterations in lymphocyte subpopulations in copper-deficient mice // Infect. Immunity. – 1985. – Vol.48. – №3. – P.644-647.
17. Mullenix M.C., Mortensen R.F. Calcium ion binding regions in C-reactive protein: location and regulation of conformational changes // Molec. Immunol. – 1994. – Vol.31. – №8. – P.615-622.
18. Percival S.S. Copper and immunity // Amer. J. Clin. Nutrition. – 1998. – Vol.67. – №5, suppl. – P.1064-1068.
19. Rafter G.W. Rheumatoid arthritis: a disturbance in copper homeostasis // Med. Hypotheses. – 1987. – Vol.22. – №3. – P.245-249.
20. Rink L., Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production // J. Nutrition. – 2000. – Vol.130. – suppl.5. – P.1407-1411.
21. Shankar A.H., Prasad A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection // Amer. J. Clin. Nutrition. – 1998. – Vol.68. – suppl. – P.447-463.
22. Sulica A., Chambers W.H., Manciuola M., Metes D., Corey S., Rabinowich H., Whiteside T.L., Herberman R.B. Divergent signal transduction pathways and effects on natural killer cell functions induced by interaction of Fc receptors with physiologic ligands or antireceptor antibodies // Natural Immunity. – 1995. – Vol.14. – P.123-133.
23. Wright T.G., Tsai J., Jia Z., Elliott B.E. Inhibition by copper (II) binding of hepatocyte growth factor (HGF) interaction with its receptor Met and blockade of HGF/Met function // J. Biol. Chemistry. – 2004. – Vol.279. – №31. – P.32499-32506.

поступила в редакцию 27.06.2006
принята к печати 03.07.2006