

ВОЗМОЖНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА,
ЛОКАЛИЗОВАННОГО В МИТОХОНДРИЯХ

Нарушения обмена меди, как экологического, так и наследственного характера, приводят к развитию тяжёлых заболеваний. К ним помимо болезней, связанных с врождёнными ошибками обмена меди, относятся ацерулоплазминемия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечно-сосудистые заболевания, остеопороз, рак, прионные болезни. При всех этих заболеваниях наблюдают дисфункцию митохондрий, природа которой остаётся неизвестной. В самое последнее время было обнаружено, что избыток или недостаток ионов меди в клетке вызывает апоптоз, опосредованный митохондриальными белками семейства BCL2.

Показано, что медь-индуцированный апоптоз связан с внутриклеточным перераспределением меди, т. е. с её транспортом, который, очевидно, осуществляют пока не идентифицированные белки. Выявление этих белков и установление их биологической роли должно способствовать пониманию механизма медь-индуцированного апоптоза, который, с одной стороны, вызывает гибель нейронов и приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний, а с другой — осуществляет санитарную функцию в отношении клеток с нарушенной системой сигнальной трансдукции, у которых, вероятно, повышена чувствительность к изменению статуса меди.

При изучении внутриклеточного распределения иммунореактивных полипептидов церулоплазмينا (ЦП), гликопротеина α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови позвоночных, на долю которого приходится до 95 % внеклеточной меди, в разных органах взрослых крыс нами была идентифицирована самостоятельная молекулярная форма ЦП, локализованная в митохондриях. Выявленная изоформа ЦП (мтЦП) имеет молекулярную массу примерно 110 кДа и ассоциирована с матриксом и внутренними мембранами. мРНК, кодирующая мтЦП, образуется в результате транскрипции с внутреннего альтернативного промотора, расположенного в интроне 2. Она программирует синтез ЦП-полипептида с расчётной молекулярной массой 109 кДа, N-конец которого отличается от ЦП. Поэтому новосинтезированный мтЦП остаётся в цитозоле и транспортируется в митохондрии благодаря присутствию трёх внутримолекулярных мотивов со свойствами сигнала доставки белков в митохондрии (СДБМ), образующих кластер на поверхности глобулы.

В хромосомном гене ЦП человека нам не удалось выявить альтернативный промотор. Для расширенного поиска потенциальных областей, кодирующих мтЦП, был разработан алгоритм анализа последовательностей ДНК, представленных в открытой базе данных "GenBank". Вначале искали последовательности, соответствующие СДБМ, в генах ЦП, затем — участки, кодирующие СДБМ, во всех последовательностях, гомологичных ЦП.

Компьютерный поиск ЦП-подобных последовательностей по программе "BLAST", расположенной на публичном сервере NCBI, выявил в геноме человека последовательность псевдогена ЦП (ψCp) (HGNC: 2322, GenBank: NG_001106). ψCp расположен на коротком плече 8-й хромосомы в области q21.13—q23.1 и предположительно является продуктом обратной транскрипции участка процессированной ЦП-мРНК (HGNC: 2295, GenBank: NM_000096) от 1752-го до 3613-го нуклеотида включительно (в скобках приведены номера последовательностей по номенклатуре "HUGO Gene Nomenclature Committee" и базы данных "GenBank").

Транслирование этой последовательности с помощью программы "ORF Finder" во всех шести рамках считывания выявило только во второй рамке транслирующуюся последовательность длиной 984 нуклеотида (с 308-го по 1291-й нуклеотид), которой

соответствует аминокислотная последовательность длиной 328 аминокислотных остатков. Она попадает в одну рамку считывания с последовательностью ЦП, начиная с 703-го кодона по нумерации аминокислотных остатков в пре-ЦП. На N-конце вычисленного белка программа “MitoProt II” предсказывает СДБМ длиной 65 аминокислотных остатков с вероятностью 0,9505.

На основании проведённого анализа последовательности ψCr составлена следующая теоретическая модель $\psi ЦП$. У человека на участке генома, занимаемом ψCr , возникла последовательность, содержащая все элементы, характерные для эукариотического гена класса II. Внутри популяции теоретически транскрибируемый участок ψCr характеризуется высоким уровнем консервативности. Его белковым продуктом может быть митохондриальный белок, идентичный С-концевому участку ЦП на 92 %. Предполагаемый $\psi ЦП$ состоит из 303-х аминокислотных остатков, 40 из которых составляют N-концевой СДБМ. Молекула $\psi ЦП$ содержит один сайт гликозилирования, а в её центре присутствует специфический для оксидаз медьсвязывающий мотив His-X-His. На поверхности белковой глобулы возникает пространственный сайт, образованный двумя остатками гистидина, предположительно координирующий один атом меди. Расчётная молекулярная масса зрелого $\psi ЦП$ составляет примерно 30 кДа.

Методом обратной транскрипции, сопряжённой с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), показано, что в культивируемых клетках человека линий HepG2 и HuTu80 присутствует продукт транскрипции ψCr . В клетках линии HuTu80 продукты транскрипции гена ЦП, кодирующие секреторную или связанную с плазматической мембраной молекулярные формы ЦП, не выявлены.

Методом хемилюминесцентного иммуноблотинга получены прямые доказательства присутствия ЦП-подобного полипептида в митохондриях человека *in vitro*. Иммунореактивные полипептиды ЦП с молекулярной массой примерно 30 кДа, которые могут быть продуктом экспрессии ψCr , обнаружены в составе митохондриальных белков и белков внутренних мембран клеток линии HuTu80. Высокомолекулярные полипептиды ЦП в клетках HuTu80 не найдены.

Данные, полученные в опытах по тестированию биологической способности потенциального СДБМ, указали, что СДБМ $\psi ЦП$ способен доставлять слитый с ним зелёный флуоресцирующий белок в митохондрии клеток линии НЕК293.

Испытание биологической функции мтЦП проведено на животных моделях с изменяющимся метаболизмом меди. В качестве таких животных использованы лабораторные крысы, в печени которых ранее был идентифицирован мтЦП. В этом исследовании с помощью ОТ-ПЦР технологии определено присутствие мтЦП-мРНК.

Оказалось, что мтЦП экспрессируется преимущественно в мозге, печени, семенниках и почках взрослых крыс, а также в клетках инволюлирующей молочной железы. Образование мтЦП-мРНК характерно для взрослого метаболизма меди. При эмбриональном типе метаболизма меди мтЦП-мРНК не формируется. В эмбриональных внезародышевых органах (плацента и желточный мешок) мтЦП-мРНК также не выявлена. В клетках молочной железы — органе, который подвергается повторяющимся циклам роста, дифференцировки и инволюции, что сопровождается изменением метаболизма меди, мтЦП-мРНК обнаруживается только после 48 часов отнятия крысят от груди. Именно этому периоду соответствует максимальное нарастание апоптоза, о котором судили по увеличению фрагментов ДНК, соответствующих мононуклеосомной фракции. У крыс с низким содержанием оксидантного церулоплазмينا в крови (Ag-крысы, получавшие с пищей хлорид серебра) мтЦП не формируется. У крыс с экспериментальной моделью деменции альцгеймеровского типа, характеризующейся снижением метаболизма меди, формирование мтЦП нарушается в мозгу, но не в печени.