

铜转运蛋白 hCtr1 结合 Cu(I) 并转运至铜伴侣蛋白 Atox1

卫 浩, 许德晨, 崔 杨, 魏开举, 袁斯明, 刘扬中

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要: 铜转运蛋白 hCtr1 细胞膜内的 C 端区域对于细胞的铜转运过程具有重要作用, 然而这一结构域对铜离子的捕获和胞内蛋白的铜分布机理尚不清楚. 为了研究 hCtr1 蛋白的 C 端结构域与铜的结合方式, 通过紫外-可见吸收光谱、核磁共振谱和质谱等方法, 对 C 端 8 肽(C8)与铜离子的结合进行了分析. 结果表明, 一价铜离子对 C8 有很高的亲和力($\log K = 16.6$). C8 能够结合多个铜离子, 其 HCH 基序中的组氨酸和半胱氨酸残基是铜结合位点, 而另一个天冬氨酸残基也可能参与铜结合. 进一步研究发现, 铜离子能够从 C8 转移到 Atox1. 实验数据揭示了铜与 hCtr1 结合的详情, 也有助于理解铜在细胞中的分布.

关键词: 金属蛋白; 铜转运蛋白; 铜转移; 铜伴侣蛋白 Atox1; 核磁共振

中图分类号: O614.121 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2019.06.005

引用格式: 卫浩, 许德晨, 崔杨, 等. 铜转运蛋白 hCtr1 结合 Cu(I) 并转运至铜伴侣蛋白 Atox1[J]. 中国科学技术大学学报, 2019, 49(6): 458-464.

WEI Hao, XU Dechen, CUI Yang, et al. Cu(I) binds to the C-terminal domain of copper transport protein hCtr1 and transfers to copper chaperone Atox1[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2019, 49(6): 458-464.

Cu(I) binds to the C-terminal domain of copper transport protein hCtr1 and transfers to copper chaperone Atox1

WEI Hao, XU Dechen, CUI Yang, WEI Kaiju, YUAN Siming, LIU Yangzhong

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The intracellular C-terminal domain of human copper transporter hCtr1 is crucial for copper transport and delivery in cells. However, the mechanism of copper acquisition and distribution is not fully understood. The copper binding to hCtr1 was studied using a C-terminal peptide (C8) through the methods of UV-vis, NMR and MS spectroscopies. The results show that cuprous ions exhibit high binding affinity to C8 ($\log K = 16.6$). C8 can bind with multiple copper ions, and the His and Cys residues in the HCH motif are the key binding sites, while an aspartate residue could also be involved in the copper coordination. Further investigation reveals that copper ions can transfer from C8 to the copper chaperone Atox1. These data provide detailed information on the copper binding to hCtr1 and help understand the copper distributions in cells.

Key words: metallo-protein; copper transport protein; copper transfer; copper chaperone Atox1; NMR

收稿日期: 2018-11-09; 修回日期: 2019-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(21573213, 51503194), 苏州科技发展计划(SYG201624), 江苏省自然科学基金(BK20151238)资助.

作者简介: 卫浩, 男, 1991年生, 硕士生. 研究方向: 生物无机化学. E-mail: hansonwey@163.com

通讯作者: 袁斯明, 博士. E-mail: yuansm@mail.ustc.edu.cn

0 引言

铜是一种重要的微量元素,几乎在所有生物体中铜都不可或缺.铜作为许多酶的中心元素,在众多生理过程中发挥重要的作用,包括自由基排毒、细胞呼吸、神经肽加工、血管生成、铁转运等^[1-2].铜离子的配位特点及其氧化还原活性对相关铜蛋白行使正常功能与参与生理活动具有重要的作用.然而,人体中过量的铜会产生铜毒性(copperedus),过多的铜离子不可逆地破坏细胞组分,例如造成DNA和脂类损伤.因此,正常生物体内的铜浓度受到铜代谢系统的精准调控^[3].铜转运蛋白(Ctr1)能够促进细胞摄取铜,在哺乳动物的铜代谢过程中起着重要作用.

人源铜转运蛋白(hCtr1)是由190个氨基酸残基组成的膜蛋白,其中包括由60个氨基酸残基组成的细胞外N端结构域,1个由15个氨基酸残基组成的细胞内C端结构域,以及3个跨膜结构域^[4-5].hCtr1所形成的同源三聚体具有离子通道结构^[5],从而Cu(I)离子可以由N端结构域通过通道进入膜内并传递到C端结构域,在此过程中铜离子的配位取代过程起到重要作用,尤其是铜离子与含硫残基(Met和Cys)与含氮残基(His)的配位^[5-6].Ctr1 N端富含蛋氨酸和组氨酸的基序能够直接结合铜离子,并调控细胞摄取铜的过程.虽然hCtr1膜内的C端区域仅有15个氨基酸残基,研究证实这一序列对蛋白的整体功能十分重要.此外,C端区域含有一个潜在的金属结合基序HCH,金属结合基序中的C189S突变体会抑制细胞摄取铜的过程^[10],而截断其C端区域也会产生类似的效果^[10].然而,铜和Ctr1 C端具体是如何结合的仍未被研究清楚.有趣的是,hCtr1也会影响细胞内铂类化合物的积累.hCtr1的含硫残基半胱氨酸和蛋氨酸能通过反式螯合作用结合并转运铂类化合物,并且其C端与铂类化合物的反应活性也很高^[11].

铜被hCtr1摄取进入细胞,进入细胞内的铜在铜伴侣蛋白(包括Atox1、CCS和Cox17)的作用下分布到各细胞质途径.Atox1能够将铜转移到ATPase(包括ATP7A和ATP7B)上,ATPase进而将铜运输到位于反式高尔基体上的铜结合蛋白上,或者将多余的铜泵出细胞外;CCS可将铜转移给超氧化物歧化酶1(SOD1),并使之活化;而Cox17参与了铜进入线粒体的过程.因此细胞内的铜受到这些蛋白质的严格调控.虽然铜从Atox1向ATPase

转移已有很多研究,但其中的机制并不是十分清楚.Atox1可能是通过与hCtr1膜内C端的铜结合基序的相互作用获取铜离子.虽然已有实验证实酵母细胞的铜转运蛋白的C端区域和铜伴侣蛋白Atox1存在铜交换过程^[13],但是人体细胞中的hCtr1较短的C端与yCtr1的C端(126个氨基酸残基)并不相同.因此,研究hCtr1中铜的结合方式对于理解铜在细胞内的分布具有重要意义.

由于hCtr1的C末端8个氨基酸序列VDITEHCH含有重要的金属结合基序HCH,而且该序列的缺失会抑制细胞摄取铜^[10],因此本文以hCtr1的C端8肽(C8)为模型,研究Cu(I)与hCtr1的C端区域的相互作用,其中包括hCtr1的铜结合方式和解离常数.我们通过ESI-MS(电喷雾质谱)方法研究了Cu(I)的结合位点;利用二维核磁共振(¹H,¹⁵N HSQC)核和离子交换色谱研究Cu(I)从C8向铜伴侣蛋白Atox1的转移过程.这些结果为研究铜与hCtr1结合及铜向Atox1转移奠定了理论基础.

1 实验部分

1.1 材料与方法

根据文献^[11]合成并纯化C8(VDITEHCH),并且通过HPLC(高效液相色谱)和ESI-MS对产物进行验证.按照文献^[14]中的方法制备高氯酸乙腈合铜([Cu(CH₃CN)₄](ClO₄)).所有其他试剂均购自生工(中国上海).紫外-可见吸收光谱在Agilent 8453仪器上使用1cm光程的微量石英比色皿进行检测.

1.2 Atox1的蛋白表达与纯化

将表达Atox1的pST-SG1-Atox1质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)Gold细胞中.细胞在含有¹⁵NH₄Cl的M9基本培养基中培养直至OD₆₀₀达到0.8,加入0.8 mmol·L⁻¹异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG),25℃诱导10 h.然后4000 r·min⁻¹离心20 min进行收菌,收集的细胞在重悬后通过超声破碎进行裂解;裂解液通过低温离心去除细胞碎片,其上清通过HisTrapFF柱(5mL,GE Healthcare)进行纯化;收集的蛋白与烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶在16℃过夜孵育以去除Atox1 N端的6×His标签.最后通过HiLoadSuperdex 75 pg 16/60(GE Healthcare)进一步纯化Atox1.通过Tricine-SDS-PAGE和ESI-MS检测Atox1的纯度.

1.3 Cu(I)离子与还原剂结合

通过与二辛可宁酸(BCA)的竞争实验来测量 DL-二硫苏糖醇(DTT)、三-(2-羧乙基)膦(TCEP)和抗坏血酸等还原剂与 Cu(I)的结合能力. 在还原剂存在下,用 BCA 滴定 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu(I)溶液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 缓冲液, pH 7.4). 此外也在 20%乙腈条件按同样的方法进行了测试.

1.4 C8 和 Cu(I)的稳定性分析

在 25°C 孵育不同时间后,用 5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)测定 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ C8 溶液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液, pH 7.4) 中巯基的浓度. 通过 412nm 处的 UV-Vis 吸收来计算巯基浓度. 将 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{ClO}_4$ 溶解在乙腈中并用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 向 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu(I)样品溶液加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BCA, 在 25°C 下孵育不同的时间间隔后,测量 562nm 处的 UV-vis 吸收.

1.5 Cu(I)离子滴定 C8

首先用氮气充满手套箱准备好厌氧条件,再在手套箱中用氮气对实验所用缓冲液脱氧. 在厌氧条件下将 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C8 溶解在脱氧的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl 缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.4) 中. 在厌氧条件下,用 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{ClO}_4$ 的脱氧乙腈溶液滴定 C8,再用石蜡将样品密封到含有盖子的 1cm 石英比色皿中,在 Agilent 8453 紫外-可见分光光度计上记录 C8 和 Cu(I)样品(室温)在 200~800nm 范围内的紫外-可见吸收光谱.

1.6 Cu(I)与 C8 结合常数的测定

将 C8 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液, pH 7.4) 与等物质的量 Cu(I)孵育 10min,形成 C8 和 Cu(I)的复合物 C8-Cu(I). 将不同浓度的 BCA 与 C8-Cu(I)混合,使 C8-Cu(I)终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 记录 400~800 nm 范围内的紫外-可见吸收光谱,再用 562nm 的吸收光谱数据计算 Cu(I)与 C8 的结合常数.

1.7 电喷雾质谱(ESI-MS)

在 20%(体积分数)的乙腈存在下,将 C8 溶液 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与 2 倍的 Cu(I)水溶液混合,并用氨水和高氯酸将 pH 调节至 7.4. 在具有纳米电喷

雾离子源及 LTQ 离子阱的质谱仪 (Thermo Fisher, San Jose, CA, USA)上采集电喷雾离子质谱(ESI-MS)数据. 毛细管温度 200°C ,喷雾电压 1.8 kV,毛细管电压 32 V. 在正模式下操作离子阱分析仪监测 m/z 在 200~2000 范围内的离子信号.

1.8 Cu-C8 复合物与 Atox1 的相互作用

将 C8 溶于 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、pH 7.4 的脱氧缓冲液中,并在无氧条件下与等物质的量 Cu(I)混合,形成 Cu(I)-C8 复合物. 在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、10% D_2O 缓冲液 (pH 7.4) 中,用 ^{15}N 标记的 apo-Atox1 与等物质的量 C8-Cu(I)或 Cu(I)混合至终浓度 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 来制备核磁样品. 在 298K 下配备有冷冻探针的 600 MHz Bruker 核磁谱仪上获取二维 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ 异核 HSQC 核磁谱图. 使用 Topspin 软件(版本 1.3)处理数据.

apo-Atox1 与等物质的量 C8-Cu(I)或 Cu(I)在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液 (pH 7.4) 中混合,并用阴离子交换色谱法进行分析. 实验中使用 Source 15Q 柱(GE healthcare)并在 FPLC(快速蛋白液相色谱)上进行. 流动相如下: A, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、pH 8.0; B, A 相 + $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl. 使用 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速的梯度 (0~2.5 min, B: 0%; 2.5~12.5 min, B: 0~5%)分析样品.

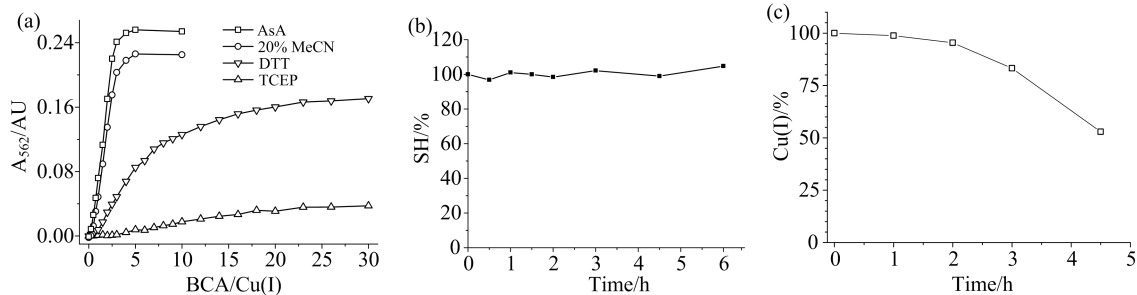
2 结果与讨论

2.1 还原剂抗坏血酸对 Cu(I)-C8 复合物稳定性的影响

由于 Cu(I)与 C8 的半胱氨酸残基上的巯基容易在空气中氧化,通常 Cu(I)的研究体系中都含有还原剂,而抗坏血酸(AsA)是这一体系中最常用的还原剂之一. 因此,我们首先通过 Ellman 法和 BCA 法检测了 Cu(I)-C8 复合物在抗坏血酸条件下的稳定性(图 1). BCA 竞争实验显示,抗坏血酸的存在并不影响 Cu(I)离子与 BCA 的结合,表明抗坏血酸不会与 Cu(I)离子形成稳定的配合物而干扰实验(图 1(a));与之对应的常见还原剂 DTT 和 TCEP 则显著降低了 BCA 对 Cu(I)的结合,表明这两种还原剂可以与 Cu(I)离子配位而干扰实验. 因此,我们采用抗坏血酸作为本研究的还原剂. 此外, Ellman 分析表明, C8 样品在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液

(pH7.4)中暴露于空气中 6 h 后,几乎所有 C8 上的巯基仍保持在还原状态(图 1(b)). 另一方面,BCA 分析表明,Cu(I) 在 4.5 h 的孵育过程中逐渐被氧化;而在 2 h 内,超过 95% 的铜仍未被氧化(图 1(c)). 由

于 Cu(I) 的配位反应发生得十分迅速(< 1 s),而且所有实验都能在较短的时间内完成(< 0.5 h),所以抗坏血酸可以用来保证 Cu(I) 与 C8 的还原状态,即实验条件适用于研究 Cu(I) 与 C8 的结合.



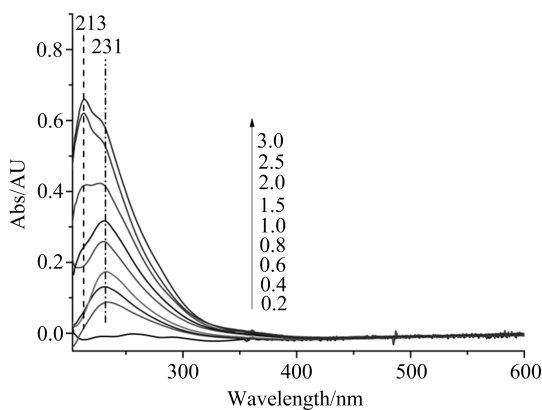
(a) 还原剂对 BCA 与铜结合的影响;(b) Ellman 法检测抗坏血酸缓冲液中 C8 巯基的含量变化;(c) BCA 法检测抗坏血酸缓冲液中 Cu(I) 的含量变化. $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸缓冲液 (pH7.4) 中,并在 25°C 下暴露于空气里.

图 1 还原剂保持 Cu(I) 与 C8 巯基的还原状态

Fig. 1 Reducing agent maintained the reduced state of Cu(I) and C8

2.2 Cu(I) 滴定 C8

使用紫外-可见吸收光谱来研究 Cu(I) 与 C8 的结合. C8 的 HCH 基序中的组氨酸和半胱氨酸残基是 Cu(I) 的潜在结合位点. 用 Cu(I) 滴定 C8 导致样品溶液的紫外-可见吸收光谱 231 nm 处的吸收信号增强(图 2),这可能是由于 Cu(I) 与半胱氨酸结合时 Cu-S 电荷转移产生的. 结果表明半胱氨酸残基是 Cu(I) 的结合位点之一. 随着 C8 与 Cu(I) 的比例达到 1 : 3,吸收峰逐渐增强,这说明在这种实验条件下 C8 结合不止 1 个 Cu(I).



实验在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧的抗坏血酸缓冲液 (pH7.4) 中进行.

图 2 不同比例的 Cu(I) 与 C8 反应的紫外-可见吸收光谱

Fig. 2 UV spectra of C8 in the reaction with different amount of Cu(I)

由于 BCA 对 Cu(I) 有很强的亲和力($K_{\text{Cu-BCA}} = 2.0 \times 10^{17}$),本文中用 BCA 竞争法来研究 Cu(I)

与 C8 的结合常数. Cu(I) 与 BCA 配位后形成 $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^{3-}$,其在 562 nm 处具有特征吸收. 因此,用 BCA 滴定 Cu(I)-C8 复合物(结合单个铜离子)导致 562 nm 处的特征吸收增强. 结果显示随着 BCA 的逐渐加入,紫外吸收逐渐增强(图 3). 拟合滴定曲线可以获得该反应的表现平衡常数($K_{\text{app}} = K_{\text{Cu-BCA}}/K_{\text{Cu-C8}} = 4.91$). 根据 Cu(I)-BCA 的结合常数计算得到 Cu(I)-C8 的结合常数($K_{\text{Cu-C8}} = 4.0 \times 10^{16}$). 这个数据反映的是第一个 Cu(I) 与 C8 的亲合能力,两者间的亲和能力较强,因此 hCtr1 膜内的金属结合区域能够与从膜外的 N 端($\log K = 14.92$)竞争性夺取 Cu(I)^[16].

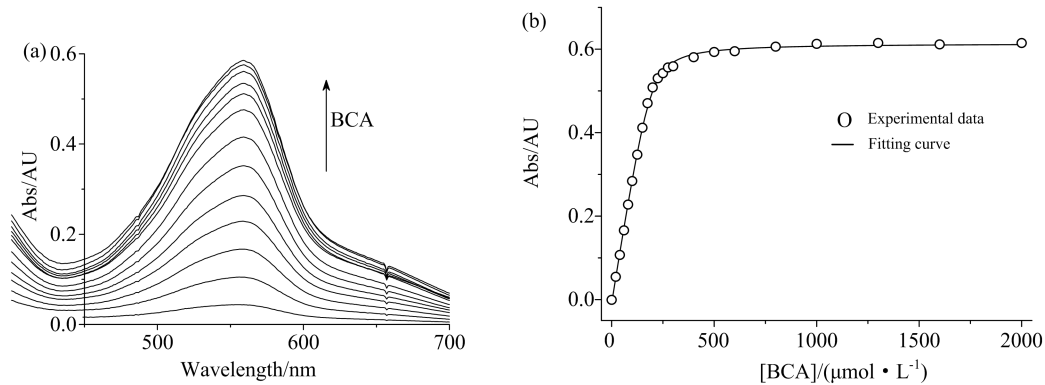
2.3 Cu(I)-C8 复合物的组成分析

我们使用 ESI-MS 方法分析 Cu(I)-C8 的结合产物. 根据分子量的增加能直接获得 C8 与 Cu(I) 的结合比. 质谱结果显示 Cu(I) 与 C8 反应后生成了不同的产物,其中单核配位产物 $[\text{C8} + \text{Cu}]$ 与双核配位产物 $[\text{C8} + 2\text{Cu}]$ 是主要产物;我们还发现 C8 结合 3 个 Cu(I) 的产物,但其信号较弱,这表明 C8 分子最多能结合 3 个 Cu(I). 此外,我们还发现了 Cu(I) 与 C8 形成的桥联的二聚体产物,这表明 2 个 C8 分子可能通过 Cu(I) 桥连起来.

为了确定 Cu(I) 在 C8 上的结合位点,我们利用 ESI-MS 的串联质谱对 C8 与 Cu(I) 的反应产物进行了分析. 以 $[\text{C8} + 2\text{Cu}]$ 作为前体离子,对其进行碰撞诱导解离. 二级质谱图如图 4(b) 所示,并对碎片离子峰进行归属. 我们按照 Biemann 命名法命名碎片

离子,即 N 端碎片用 b 表示,C 端碎片用 y 表示,星号表示结合 Cu(I)的片段^[17].其中 1 个星号指碎片结合了 1 个铜,2 个星号指碎片结合了 2 个铜.结果显示碎片 V1-H6 和 H6-H8 各结合 2 个铜原子,可

推测 H6 残基是结合位点并能结合 2 个铜原子.另外,结合紫外-可见吸收光谱的结果,C7 也参与铜结合.



(a) Cu(I)-C8 与不同量的 BCA 反应的紫外-可见吸收光谱图;(b) 拟合 562 nm 处紫外吸收信号. $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu(I)-C8 样品在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧的抗坏血酸缓冲液 (pH7.4) 中. $0 \sim 2000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BCA 滴定到 Cu(I)-C8 样品中.

图 3 C8 与 BCA 对 Cu(I)的竞争

Fig. 3 Competition of Cu(I) binding between C8 and BCA

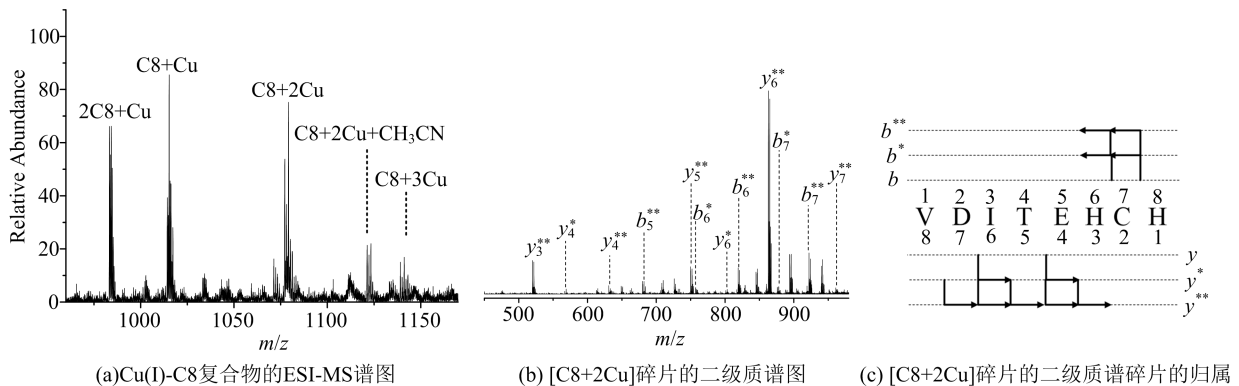


图 4 ESI-MS 分析 C8 与 Cu(I)反应的产物

Fig. 4 ESI-MS analysis on the products of C8 and Cu(I)

2.4 Cu(I)离子由 C8 转运到 Atox1

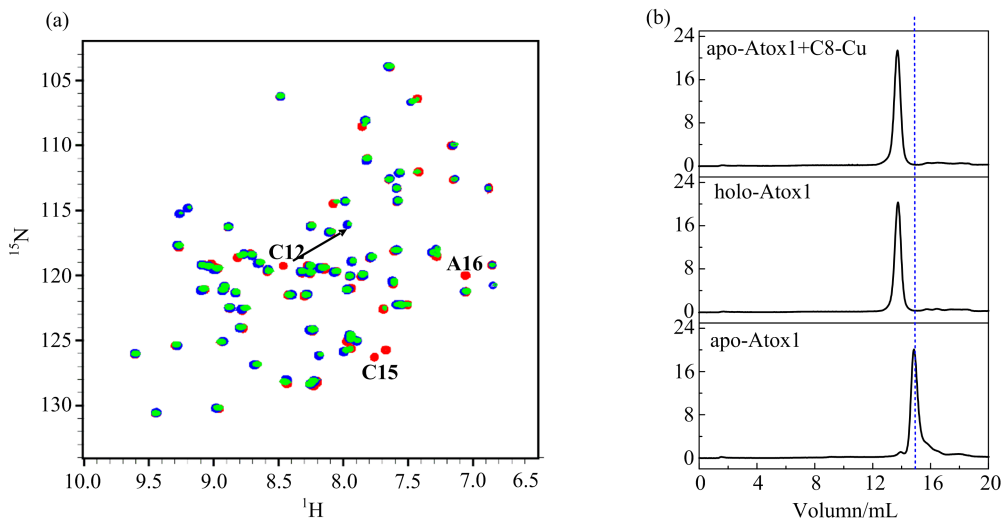
膜蛋白 hCtr1 促进细胞摄取铜,而 Cu(I)通过铜伴侣蛋白(例如 Atox1)的作用来转运至细胞质中的目标蛋白.因此,Atox1 与 hCtr1 膜内区域的相互作用对于蛋白间的铜转移至关重要.为了验证这个结论,我们通过 ^1H , ^{15}N -HSQC 二维核磁方法研究了 apo-Atox1 与 Cu(I)-C8 复合物的相互作用.结果显示,apo-Atox1 与 Cu(I)-C8 复合物反应后,其铜配位残基 C12、C15 及其附近的 M10、A16 和 A18 等残基的化学位移发生明显移动(图 5(a))^[18],并且其反应后的谱图与文献报道的 Cu(I)-Atox1 的谱图一致^[19].这说明 Cu(I)-C8 能够与 apo-Atox1 反应并且将铜离子转移到 Atox1,这与 NMR 的结果一致.

此外,我们通过阴离子交换色谱法进一步验证 Cu(I)从 C8 向 Atox1 的转移.结果显示,apo-Atox1 与 Cu(I)-Atox1 的保留体积明显不同(图 5(b)),当向 apo-Atox1 样品中加入 Cu(I)-C8 复合物后,其在阴离子交换色谱上的保留体积与 Cu-Atox1 的保留体积一致.这进一步证明了 Cu(I)能从 C8 向 Atox1 转移.

细胞内铜的平衡受到细胞内铜转运蛋白的严格调控,以避免过量铜产生毒性,因而相关研究受到较多的重视.有文献研究了 hCtr1 的 C 端 13 肽与 Cu(I)之间的相互作用^[19],通过 CD 方法发现 hCtr1 的 C 端 13 肽与 Cu(I)的结合比为 1,由于 hCtr1 的 C 端结构域是一个无规结构,且 Cu(I)结合后其 CD

信号变化很小,不易获得其准确的作用信息. 本文通过紫外和 ESI-MS 发现 hCtr1 的 C 端结构域可以结合 3 个 Cu(I). 相关文献^[19]报道了 Cu(I) 能够从 HCH 基序突变的 hCtr1 C 端结构域向金属伴侣蛋白 Atox1 转移. 由于 HCH 基序突变显著降低 hCtr1 C 端结构域对 Cu(I) 的结合能力, 研究结果并

不能反映野生型蛋白质的反应情况. 本文通过 ESI-MS 发现,除了 HCH 基序是 Cu(I) 的结合位点外,其他氨基酸残基如天冬氨酸也可能涉及铜的结合. 此外,我们通过二维异核核磁和离子交换色谱直接检测到了 Cu(I) 能够从野生型的 hCtr1 C 端结构域向 Atox1 转移.



(a) apo-Atox1(红色)、holo-Atox1(蓝色)、apo-Atox1 与 Cu(I)-C8 反应产物(绿色)的 2 维¹H,¹⁵N-HSQC NMR 谱图. (b) apo-Atox1(下)、holo-Atox1(中)、apo-Atox1 与 Cu(I)-C8 反应产物(上)的阴离子交换色谱图.

图 5 铜由 C8 转运到 Atox1

Fig. 5 Copper transfer from C8 to Atox1

3 结论

综上所述,本文研究了一价铜离子与 hCtr1 蛋白膜内的 C 端(C8)的结合. 结果发现,C8 对 Cu(I) 具有很强的亲和性,其结合常数为 4.0×10^{16} , 并且 1 个 C8 可结合多达 3 个 Cu(I) 离子. 虽然 HCH 基序是 Cu(I) 的优先的结合位点,但是其他氨基酸残基如天冬氨酸也可能涉及铜的结合. 二维异核核磁和离子交换色谱数据显示结合铜的 C8 能与铜伴侣蛋白 Atox1 作用, 并且将铜离子从 C8 转移至 Atox1. 这些过程与铜离子的细胞摄取和铜伴侣蛋白的作用机制一致. 研究结果有助于理解 hCtr1 结合铜的分子机理和细胞内的铜代谢途径.

参考文献(References)

- [1] ZHANG L Y, XIAO N, PAN Y, et al. Binding and inhibition of copper ions to RecA inteins from *Mycobacteriu tuberculosis*[J]. Chemistry - A European Journal, 2010, 16(14): 4297-4306.
- [2] PUIG S, THIELE D J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution[J]. Current Opinion in

Chemical Biology, 2002, 6(2): 171-180.

- [3] PROHASKA J R. Role of copper transporters in copper homeostasis[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 88(3): 826S-829S.
- [4] ZHOU B, GITSCHIER J. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(14): 7481-7486.
- [5] DE FEO C J, ALLER S G, SILUVAI G S, et al. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(11): 4237-4242.
- [6] SCHUSHAN M, BARKAN Y, HALILOGLU T, et al. α -trace model of the transmembrane domain of human copper transporter 1, motion and functional implications[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(24): 10908-10913.
- [7] PUIG S. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake[J]. Journal of

- Biological Chemistry, 2002, 277(29): 26021-26030.
- [8] LIANG Z D, STOCKTON D, SAVARAJ N, et al. Mechanistic comparison of human high-affinity copper transporter 1-mediated transport between copper ion and cisplatin[J]. Molecular Pharmacology, 2009, 76 (4): 843-853.
- [9] LARSON C A, ADAMS P L, JANDIAL D D, et al. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin [J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80 (4): 448-454.
- [10] DU X B, WANG X H, LI H Y, et al. Comparison between copper and cisplatin transport mediated by human copper transporter 1 (hCTR1) [J]. Metallomics, 2012, 4(7): 679-685.
- [11] WANG E Q, XI Z Y, LIU Y Z, et al. Interaction between platinum complexes and the C-terminal motif of human copper transporter 1 [J]. Inorganic Chemistry, 2013, 52(10): 6153-6159.
- [12] ROBINSON N J, WINGE D R. Copper metallochaperones [J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 537-562.
- [13] XIAO Z, WEDD A G. A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1 [J]. Chemical Communications, 2002(6): 588-589.
- [14] KUBAS G J, MONZYK B, CRUMBLISS A L. Tetrakis(Acetonitrile)Copper(I) Hexafluorophosphate [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc. , 1979: 90-92.
- [15] XIAO Z, DONNELLY P S, ZIMMERMANN M, et al. Transfer of copper between bis(thiosemicarbazone) ligands and intracellular copper-binding proteins. insights into mechanisms of copper uptake and hypoxia selectivity[J]. Inorganic Chemistry, 2008, 47(10): 4338-4347.
- [16] DU X B, LI H Y, WANG X H, et al. Kinetics and thermodynamics of metal binding to the N-terminus of a human copper transporter, hCTR1 [J]. Chemical Communications, 2013, 49(80): 9134-9136.
- [17] BIEMANN K. Mass-spectrometry of peptides and proteins[J]. Annual Review of Biochemistry, 1992, 61: 977-1010.
- [18] ANASTASSOPOULOU I, BANCI L, BERTINI I, et al. Solution structure of the Apo and copper(I)-loaded human metallochaperone HAH1⁺[J]. Biochemistry, 2004, 43(41): 13046-13053.
- [19] KAHRA D, KOVERMANN M, WITTUNG-STAFSHEDE P. The C-terminus of human copper importer Ctr1 acts as a binding site and transfers copper to Atox1[J]. Biophysical Journal, 2016, 110 (1): 95-102.