

НЕТРИВИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОТЕОЛИЗА

Никандров В.Н., Пыжова Н.С.

Институт физиологии НАН Беларуси, НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь

Реакции протеолиза играют важную роль в реализации функции клеток, тканей, организма в целом (гистогенез, овуляция, имплантация яйцеклетки, пищеварение, свертывание крови и т.д.) и генезисе ряда патологических процессов (воспаление, малигнизация и метастазирование опухолей, инвазия в организм патогенной биосубстанции, дегенерация ряда клеток и тканей, иммунопатологические нарушения и ряд других). Однако, механизмы регуляции протеолитических реакций на молекулярном и клеточном уровнях все еще далеки от полной ясности.

Нами обнаружена зависимость активации плазминогена (Pg) – предшественника сериновой протеиназы плазмина (ЕС 3.4.21.7) стрептокиназой (SK, белком β-гемолитических стрептококков группы С), от образования в системе супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) Pgom и конверсии его SKой, что, по видимому, сопряжено с дестабилизацией и последующим расщеплением пептидной связи в зимогене [1]. Учитывая это, а также частичную активацию Pg источниками активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , системами генерирования  $O_2^-$ -радикала, ионами  $Fe^{2+}$ ), наличие атома Fe в молекулах Pg и стрептокиназы, мы выдвинули положение о кислородзависимом пути активации Pg, реализующемся без участия специфических Pg-активаторов протеиназного характера вследствие  $O_2^-$ -генерирующей способности зимогена и последующей конверсии радикала [1,2]. Принципиальная возможность реализации такого механизма была продемонстрирована в экспериментах с фракциями (ядерной, тяжелых мембран, митохондриальной) гомогенатов мозга и печени мышей при добавках субстратов окисления – НАДН [3] или цитрата.

Оказалось, что активность протеиназ, различающихся по структуре, специфичности, типу катализа, подавляется веществами-перехватчиками  $O_2^-$ -радикала, что зимогены трипсиноген, химотрипсиноген, пепсиноген могут быть частично активированы при обработке указанными выше источниками активных форм кислорода, что трипсиноген, трипсин, пепсин, папаин способны медленно генерировать эти формы в растворе и что трипсин и пепсин обладают определенной  $O_2^-$ -конвергирующей способностью. Обобщение всех этих результатов позволило сформулировать гипотезу кислородзависимых реакций протеолиза, суть которой заключается в том, что аутоактивация зимогенов протеиназ и каталитическая функция этих энзимов реализуются при участии собственных для данных белков, эндогенных активных форм кислорода [4,5].

Последующая разработка этой авторской концепции привела к нескольким «ответвлениям». Так, обнаружена способность Pg и SK образовывать устойчивые эквимольные комплексы с тка-

невыми энзимами (лактат- и малатдегидрогеназами, каталазой, пируваткиназой), описаны параметры взаимодействия белков, устойчивости комплексов, характер изменений вторичной и третичной структур и функциональных свойств белков в составе комплексов [5].

С 1999 года в Институте физиологии НАН Беларуси на основе описанных выше свойств Pg и SK ведутся комплексные исследования их влияния на структуру, функциональные и метаболические особенности клеток нервной ткани с использованием органных и первичнодиссоциированных культур симпатических и чувствительных ганглиев, коры головного мозга, перевиваемых культур глиомы С6 и феохромоцитомы РС12 [6]. Установлен сложный характер изменений, зависящих от концентрации исследуемого белка, экспозиции и типа клеток и предполагающих регуляторную триггерного типа роль данных компонентов протеолиза в жизнедеятельности клеток.

У белков регуляторного типа (стрептолизина О, дифтерийного токсина, фактора роста нервов - NGF, ингибиторов протеиназ, интерлейкина-1β) найдены способность воздействовать на реакции протеолиза (в ряде случаев показаны наличие собственной протеиназной и/или p-Pg-активаторной способности), генерирования и трансформации активных форм кислорода, эндонуклеазная активность. Это позволило высказать идею о «возбуждении» метаболитического рецептора белком лигандом из-за конформационной перестройки не только за счет физического контакта комплементарных центров рецептора и лиганда, но и прямой химической «атаки» рецептора лигандом [7].

В 1987 году было обнаружено специфическое подавление Pg-активаторной функции SK АТФом и 3,5-АМФ: процесс угнетался на 50% при концентрации нуклеотидов, приближающейся к 0,1M [8]. Другие нуклеотиды (АДФ, АМФ, 2,3-АМФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ) эффекта не дали. При изучении протеиназы гриба *Arthrobothrys longa* – «лонголитин» оказалось, что его фибринолитическая активность на 75% угнеталась в присутствии АТФ (0,01M) [9]. Это также достаточно высокая концентрация АТФ. Однако исследования Pg-активаторной способности β- и γ-субъединиц NGF показали, что эффективная концентрация нуклеотидов может находиться в пределах 0,0001M. Так, АТФ подавлял Pg-активаторную способность при концентрации 0,001M на 30% в случае γ-субъединицы и на 60% у β-NGF. Увеличение концентрации нуклеотида до 0,01M вело к угнетению активности на 50% и 100% соответственно. АДФ практически не влиял на функцию γ-субъединицы, но при концентрации 0,01M подавлял таковую β-NGF на 25%. АМФР (0,0001-0,01M) увеличивал активность обеих субъединиц NGF на 20-25%. Отличительной особенно-

стью от выше упомянутых белков является также подавление активаторной функции  $\beta$  (но не  $\gamma$ )-субъединицы добавками ГТФ: при концентрациях 0,0001М, 0,001М и 0,01М на 20%, 55% и 100%, а ГДФ действовал даже несколько сильнее [10]. Фибринолитическая активность разрушенных клеток *Corynebacterium diphtheriae* шт. PW-8, выращенных на бульоне Лингуда с сывороткой крови, подавлялась на 45%, 20%, 35% и 30% под действием соответственно АТФ, АДФ, АМФ и ГТФ в концентрации 0,01М [10].

На модели активации зимогенов протеиназ, протеолитической активности человеческих лимфоцитов линий Jurkat-tat, Molt-4, Molt-4/8 и рабдомиосаркомы RD, крысиных феохромоцитомы РС12, глиомы С6, диссоциированных эмбриональных  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, а также на культурах *Pseud. aeruginosa*, *Corynebact. diphtheriae* установлено триггерного характера действие неорганического ортофосфата на протеолитические реакции. Ингибиторный анализ позволяет думать, что стимуляция в этих клетках протеолиза фосфатом в ряде случаев не связана с ресинтезом АТФ [5, 11].

Обнаруженные феномены открывают перспективы проработки и обоснования путей решения частных вопросов дифференциальной диагностики заболеваний (и разработки таксономических тестов), фармакологии, биотехнологии, а также уяснения генеза ряда патологических процессов.

**Литература.** 1. Nikandrov V.N. // Int. J. Biochem., 1992, 24, № 1, 47-53. 2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Известия НАН Беларуси, сер. мед-биол. наук, 2001, № 1, 54-60. 3. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // Доклады НАН Беларуси, 1998, т. 42, № 4, 94-99. 4. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. // Thromb. Res., 1996, 88, № 4, 303-312. 5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Современные проблемы инфекционной патологии человека. Матер II научно-практ. конфер., Мн., 2001, 319-339. 6. Никандров В.Н., Володкович О.И., Гронская Р.И., Жук О.Н., Шлак Г.А., Лукашевич И.Б., Полукошко Е.Ф., Петрусенко Г.П., Тумилович М.К. // В кн.: "Достижения медицинской науки Беларуси", вып. VII. Рецензир. научно-практ. ежегодник, Минск, 2002, 49-50. 7. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Известия НАН Беларуси, сер. мед-биол. наук, 2003, № 3, 75-89. 8. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1987, т. 103, № 7, 49-57. 9. Цыманович С.Г., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. // Вопр. мед. химии. 1992, т. 38, № 3, 44-45. 10. Протекторное действие пуриновых нуклеотидов на плазминоген человека. В кн. "Функциональная роль монооксида азота и пуринов. Сборник статей конфер." Минск, Бизнесофсет, 2001, с. 142-146. 11. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // В кн.: "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. конфер.: Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Сб. статей. Часть I". Минск, 2004, 236-238. 12. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. // В кн. "Инфекция и иммунитет. Матер., приуроченные к V междунар. форуму по глобальной вакцинологии "Вакцины и иммунизация", Нес-си, Минск, 2001, с. 193-202.