

УДК 577.15:577.322.4

В. Н. НИКАНДРОВ, Г. В. ВОРОБЬЕВА, О. Н. МУРАШКО,
Н. С. ПЫЖОВА, Н. В. КВЯТКОВСКАЯ, О. А. БАРТАЛЕВИЧ, Т. В. ДАНИЛОВИЧ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СРЕПТОКИНАЗЫ И ПЛАЗМИНОГЕНА
ЧЕЛОВЕКА С ОКСИДОРЕДУКТАЗАМИ И ПИРУВАТКИНАЗОЙ:
ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ КОМПЛЕКСОВ
В ВОДНО-СОЛЕВОМ РАСТВОРЕ**

(Представлено академиком О. А. Стрельчонком)

Механизм активации плазминогена, молекулярные механизмы ее регуляции все еще остаются недостаточно изученными, несмотря на важную роль звена "плазминоген-плазмин" при воспалении, иммунном ответе, малигнизации и метастазировании опухолей, тромбозисе, гистогенезе и ряде других процессов [1]. Одним из сильнейших активаторов плазминогена является белок β -гемолитических стрептококков – стрептокиназа, лишенная собственной гидролазной активности [2]. Характерная ее особенность – образование устойчивых комплексов с плазминогеном человека, что склонны считать ключевым в реализации плазминоген-активаторной функции стрептокиназы [2]. Долгое время этот зимоген считали единственным белком – лигандом стрептокиназы. Затем было обнаружено образование ее устойчивых комплексов и с М-субъединицами лактатдегидрогеназы [3]. Однако последствия этого события для активации плазминогена, а также устойчивость и свойства таких комплексов остаются неясными. Мы предположили возможность образования устойчивых комплексов стрептокиназы не только с субъединицами М-типа лактатдегидрогеназы, но и с нативным энзимом, а также с другими тканевыми энзимами углеводно-энергетического метаболизма.

Цель настоящей работы – изучить возможность формирования комплексов стрептокиназы с лактатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.27), малатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.37), каталазой (КФ 1.11.1.6) и пируваткиназой (КФ 2.7.1.40). Кроме того, необходимо было выяснить, образуют ли комплексы эти энзимы с плазминогеном.

В работе использовали очищенные образцы лактатдегидрогеназы и пируваткиназы мышц кролика, малатдегидрогеназы сердца быка, каталазы печени быка (Reanal, Венгрия). Очищенные образцы плазминогена человека получали методом аффинной хроматографии на лизинсефарозе из обогащенной β -глобулинами фракции плазмы крови, очищенные образцы стрептокиназы – методом хроматографии на голубой агарозе из коммерческого отечественного препарата "Целиаза". Способы очистки белков, оценки их активности, гомогенности и характеристика очищенных образцов подробно описаны в нашей предыдущей статье [4]. В работе использовали также сефарозу 4В-СНВг (Pharmacia, Швеция), L-лизин и реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле (Reanal, Венгрия), голубую сефарозу (Kemotech, Эстония). Остальные реактивы были производства стран СНГ, их использовали после дополнительной очистки.

Образование белковых комплексов регистрировали методом дифференциальной спектроскопии на спектрофотометре Specord M-40 в стандартной

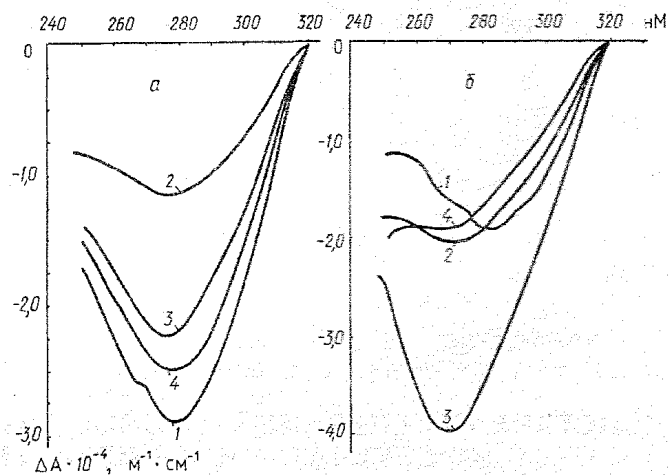


Рис. 1. Дифференциальные спектры эквимольных смесей стрептокиназы (а) или плазминогена (б) с лактатдегидрогеназой мышц (1), малатдегидрогеназой сердца (2), каталазой печени (3) и пируваткиназой мышц (4). Конечная концентрация белков 10^{-6} М, растворитель 0,05 М фосфатный буфер рН 7,4, температура 25°C

четырехцветной системе, как подробно описано ранее [4]. Измерения проводили при 25°C с использованием 0,05 М фосфатного буфера рН 7,4; 0,2 М ацетатного буфера рН 3,0 и 0,05 М борат-NaOH, буфера рН 10,0 при конечной концентрации белков 10^{-6} или $2,5 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрацию белков в растворе учитывали по величине абсорбции при 280 нм, принимая значения $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ равными 8,8, 17,0, 12,0, 2,5, 15,8 (276 нм) и 5,4 для стрептокиназы, плазминогена, лактат-, малатдегидрогеназ, каталазы и пируваткиназы соответственно [4–8]. Плазминоген-активаторную функцию стрептокиназы определяли методом лизиса фибриновых пластин [9] по активации уже сорбированного на фибрине зимогена стрептокиназой и ее комплексами с энзимами и по активации растворимого плазминогена. Во втором варианте фибриновые пластины обрабатывали ультрафиолетовым излучением для инактивации примеси прочно связанного с фибрином плазминогена [9]. Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно.

Смешивание стрептокиназы со всеми использованными энзимами в эквимольном соотношении при рН 7,4 приводило к появлению дифференциальных спектров, предполагающему образование комплексов “стрептокиназа-энзим” (рис. 1). По-видимому, они устойчивы – форма и амплитуда спектров принципиально не менялись в течение 30 мин. Комплексы характеризовались коротковолновым положением экстремума спектра и, как правило, “плеча”, если оно имелось (табл. 1). Это существенно отличает взаимодействие стрептокиназы с тканевыми энзимами от ее взаимодействия с плазминогеном. Образование комплексов “стрептокиназа-плазминоген” сопровождалось появлением дифференциальных спектров с экстремумами при 288–289 и 293 нм [4], соответствующими, по-видимому, вкладу остатков тирозина и триптофана.

Выявленный характер спектров может быть обусловлен перемещением хромофорных групп белков в более полярное окружение либо так называемыми пертурбационными изменениями этих групп [10]. Полагают, что такие обусловлены не грубыми конформационными переходами (трансконформационными), а неспецифическим влиянием взаимодействия хромофорных групп с окружением. На наш взгляд, такое взаимодействие определяется существенным изменением свойств растворителя или самой хромофорной группы. Учитывая низкую концентрацию белков в растворе, первый вариант представляется маловероятным. Изменения же свойств самой хромофорной группы опять-таки предполагают наличие конформационных изменений локального плана. Термином “конформационные изменения” описывают широ-

Т а б л и ц а 1. Влияние свойств растворителя на параметры дифференциальных спектров при взаимодействии стрептокиназы с оксидоредуктазами и пируваткиназой в эквимольном соотношении

Исследуемый образец	рН 7,4		рН 3,0		рН 10,0		6 М мочевины	
	$\lambda_{\text{пикс}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4},$ $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пикс}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4},$ $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пикс}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4},$ $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пикс}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4},$ $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Стрептокиназа-лактатдегидрогеназа	277-278 266 плечо	-2,9	271	-1,8	279-280	-1,9	279	-4,0
Стрептокиназа-малатдегидрогеназа	275 263 плечо 286 плечо	-1,1	271	-1,8	279-280	-1,3	275	-1,2
Стрептокиназа-каталаза	277	-2,3	270	-1,9	277	-1,2	277	-1,8
Стрептокиназа-пируваткиназа	275-276	-2,5	270	-1,8	280 270 плечо	-2,2	278	-1,4

кий спектр событий, происходящих в макромолекуле белка, в том числе и изменения положения боковой цепи лишь одной или нескольких аминокислот [11]. Выяснение характера и причин изменений состояния хромофорных групп по данным дифференциальной спектроскопии – сложная задача [12], решение которой требует проведения углубленных исследований, привлечения дополнительной информации, полученной с помощью других методов (в том числе и спектральных), и составляет самостоятельный вопрос для дальнейшей работы.

Присутствие в растворе 6 М мочевины или резкий сдвиг рН растворителя, судя по полученным данным, не препятствовали формированию эквимольных комплексов стрептокиназы с энзимами. Это еще одно принципиальное отличие от взаимодействия стрептокиназы с плазминогеном: в указанных условиях их комплексы не образовывались [4]. При формировании же комплексов “стрептокиназа-энзим” отмечены лишь изменения характера дифференциальных спектров. В кислой среде наблюдался значительный гипсохромный сдвиг экстремума с уравниванием амплитуды спектров всех комплексов. Сопоставление этих изменений с параметрами дифференциальных спектров индивидуальных белков при рН 3,0 (табл. 2) позволяет считать, что в большинстве случаев особенности спектров комплексов “стрептокиназа-энзим” свидетельствуют о наличии локальных конформационных перестроек белков. В щелочной среде, как правило, изменения характеризовались менее значительным батохромным сдвигом экстремума с уменьшением абсолютной величины амплитуды спектра (за исключением комплекса с лактатдегидрогеназой). Внесение мочевины не вызывало принципиальных изменений экстремума дифференциальных спектров всех комплексов. Известно, что стрептокиназа конформационно подвижна, но имеет структурно-ригидную триптофансодержащую область [13]. При действии 6 М мочевины резких перестроек этой области может не быть. Согласно данным триптофановой флуоресценции и кругового дихроизма, грубые изменения структуры этого белка начинаются при рН > 10 [13]. Удивительно, однако, что все используемые энзимы – субъединичные белки – также, по-видимому, не претерпевают резких структурных переходов.

Взаимодействие тканевых энзимов с плазминогеном при рН 7,4 также сопровождалось, судя по данным спектроскопии, формированием комплексов (рис. 1). Особенность их спектров заключалась, как правило, в большей ширине полосы и еще более коротковолновом положении экстремума. Лишь

Т а б л и ц а 2. Параметры дифференциальных спектров белков при изменении рН растворителя при добавке мочевины

Белок	рН 3,0		рН 10,0		6 М мочевина	
	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Стрептокиназа	262–267	+0,8	269–272	+1,1	–	0
Плазминоген	285	–0,6	298	–0,3	280–285	–0,6
Лактатдегидрогеназа	–	0	270–273 плечо 273–290	+1,0	288 293	+0,3 +0,6
Малатдегидрогеназа	260–265	–1,3	–	0	274–276	+0,7
Каталаза	270–280	–0,7	–	0	281	+0,9
	290	–0,5	–	–	288	+0,9
	298	–0,4	–	–	293	+0,7
Пируваткиназа	267–269	–0,5	270–273	+1,1	282	+0,7
					289	+0,8

комплекс “плазминоген–лактатдегидрогеназа” имел экстремум 279–280 нм и два “плеча” при 293 и 278 нм. При рН 3,0 наблюдался еще больший гипсохромный сдвиг экстремума комплексов зимогена с дегидрогеназами, в сравнении с комплексами “стрептокиназа–энзим”, тогда как у комплексов с каталазой и пируваткиназой сдвиг меньший (табл. 3). При рН 10,0 характер такого сдвига зависел от энзима, входящего в состав комплексов. Следовательно, рН растворителя в использованном диапазоне фундаментально не отражался на образовании комплексов плазминогена с энзимами. При добавлении же мочевины в смеси зимогена с дегидрогеназами дифференциальных спектров не регистрировалось, что свидетельствует об отсутствии комплексов. В случае каталазы дифференциальный спектр проявлялся, хотя и менее выраженный, чем в отсутствие мочевины (табл. 3). Характер спектра смеси зимогена с пируваткиназой в присутствии мочевины, вероятно, свидетельствует о принципиально ином окружении части хромофорных групп.

Ни в одном случае не зафиксированы дифференциальные спектры в полосе 310–330 нм и в области полосы S_{ore} (в опытах с каталазой). Это позволяет считать, что изменения состояния хромофорных групп в комплексах не связаны с образованием грубых агрегатов белка, и что при взаимодействии не затрагиваются группы гема в каталазе.

Предынкубация стрептокиназы со всеми энзимами, за исключением пируваткиназы, не влияла на активацию связанного с фибрином плазминогена (рис. 2). Добавки пируваткиназы усиливали активацию. Однако, поскольку концентрация стрептокиназы в экспериментах соответствовала $5 \cdot 10^{-6}$ М, наиболее сильный эффект отмечен при молярном избытке энзима. Образование эквимольных комплексов со стрептокиназой не влияло и на активацию растворимого плазминогена. Следовательно, интеграция стрептокиназы в комплексы с энзимами существенно не изменяет ее функциональные свойства.

Итак, стрептокиназа и плазминоген способны формировать с рядом оксидоредуктаз и пируваткиназой комплексы, по устойчивости значительно превосходящие таковые “стрептокиназа–плазминоген”. Складывается впечатление,

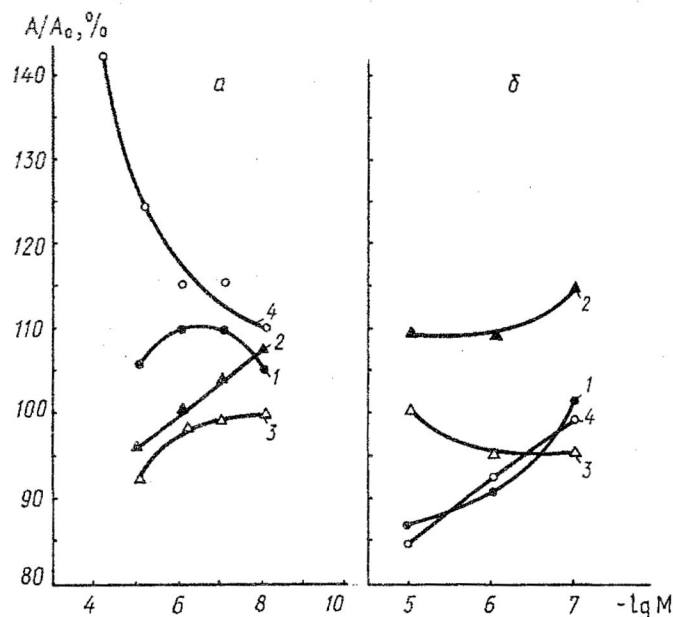


Рис. 2. Активация сорбированного на фибрине (а) и растворимого (б) плазминогена человека стрептокиназой (по лизису фибриновых пластин) при добавках лактатдегидрогеназы (1), малатдегидрогеназы (2), каталазы (3) и пируваткиназы (4). Конечная концентрация стрептокиназы $5 \cdot 10^{-6}$ М, растворитель 0,05 М фосфатный буфер рН 7,4, время предынкубации стрептокиназы с энзимами 30 мин, температура 25°C

Т а б л и ц а 3. Влияние свойств растворителя на параметры дифференциальных спектров при взаимодействии плазминогена с оксидоредуктазами и пируваткиназой в эквимольном соотношении

Исследуемый образец	рН 7,4		рН 3,0		рН 10,0		6 М мочевины	
	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{пик}}$ нм	$\Delta A \cdot 10^{-4}$, $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Плазминоген-лактатдегидрогеназа	279-280 278 плечо 293 плечо	-1,9	265	-1,1	272	-1,9	-	0
Плазминоген-малатдегидрогеназа	270-275	-2,0	268-269	-1,8	273-274	-2,0	-	0
Плазминоген-каталаза	267-270	-4,0	268	-0,6	274	-0,7	270	-2,7
Плазминоген-пируваткиназа	269-272	-1,9	267	-3,4	274-275 285 плечо	-2,1	281	+2,2

чатление, что их образование – непременно следствие взаимодействия стрептокиназы и зимогена с тканевыми энзимами. Оно не отражается на активации плазминогена. Причину образования комплексов стрептокиназы с М-субъединицами лактатдегидрогеназы усматривают в гомологии участков плазминогена и этих субъединиц, отвечающих за взаимодействие со стрептокиназой [3]. В таком случае все использованные нами энзимы – белки различных семейств – могут иметь такие участки. С другой стороны, учитывая реализацию в системе “плазминоген–стрептокиназа” процессов с участием активных форм кислорода и, по-видимому, перемещение электронов [14], образование комплексов с энзимами может обеспечивать регуляцию этих процессов по пока еще неизученным механизмам. Отсюда логически вытекает группа вопросов о роли таких комплексов в биосистемах и особенностях их структуры; о функциональных свойствах входящих в их состав энзимов; о природе взаимодействий, формирующих и стабилизирующих комплексы, и о сайтах, участвующих в этих взаимодействиях. Указанные вопросы открывают обширное поле дальнейших исследований и, возможно, выливаются в самостоятельную проблему.

Исследования финансировались Фондом фундаментальных исследований Республики Беларусь.

Summary

The formation of equimolar complexes of streptokinase or plasminogen with lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, catalase and pyruvate kinase in pH 7,4, 3,0 and 10,0 aqueous solutions was demonstrated by means of difference spectroscopy. 6 M urea did not hinder the formation of enzyme complexes with streptokinase, as well as plasminogen complexes with catalase and pyruvate kinase. It is assumed, that in “plasminogen-plasmin” system the formation of such complexes can regulate the processes, occurring with active oxygen species or with electron translocation participation.

Литература

1. Kristensen P., Larsson L. J., Nielsen L. S. et al. // FEBS Lett. 1984. Vol. 168. P. 33–37.
2. Reddy K. N. N. // Enzyme. 1988. Vol. 40, N 1. P. 79–89.
3. Podlasek St. J., Mc Pherson R. A. // Clin. chem. 1989. Vol. 35, N 1. P. 69–73.
4. Nikandrov V. N., Vorobyova G. V., Yankovskaya G. S., Demidchik N. V. // Int. J. Biol. Macromol. 1992. Vol. 14, N 8. P. 229–234.
5. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1973. Vol. 55, N 1. P. 166.
6. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 64, N 1. P. 185.
7. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 68, N 2. P. 465–484.
8. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1978. Vol. 87. P. 223–242.
9. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. // Thromb. Res. 1996. Vol. 82, N 4. P. 303–312.
10. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев, 1981.
11. Пфайль В., Привалов П. // Биохимическая термодинамика. М., 1982. С. 95–191.
12. Bello J. // Int. J. Pep. Prot. Res. 1977. Vol. 10, N 1. P. 71–79.
13. Никандров В. Н. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20, № 2. С. 169–181.
14. Nikandrov V. N. // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24, N 2. P. 47–53.

Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Поступило 12.08.96