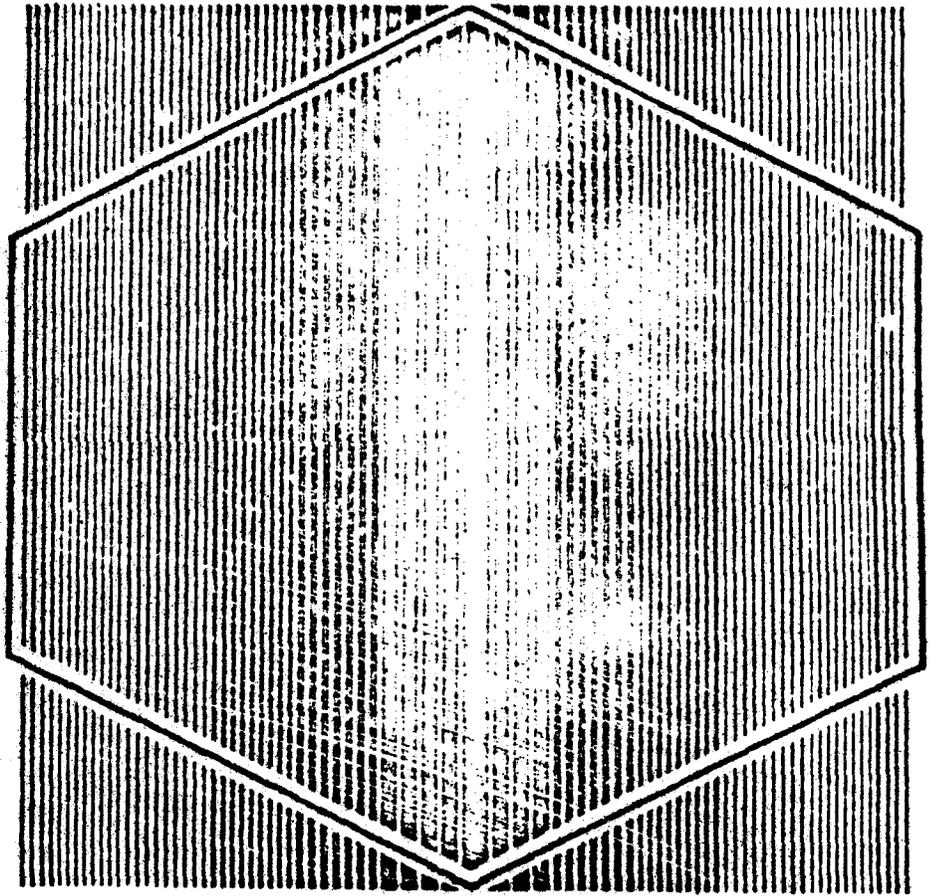


ISSN 0042-8800

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА

МЕДИЦИНА

1
1989

УДК 612.115.12.06: [579.862.1:577.222:577.152

В. Н. Никандров, О. А. Казючиц

МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП СТРЕПТОКИНАЗЫ ПРИ ПОДИРОВАНИИ

НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск

Механизм взаимодействия плазмидогена со стрептокиназой (СК) — одним из наиболее сильных его активаторов, белком, синтезируемым β -гемолитическими стрептококками, изучен недостаточно. В частности, это касает-

ся функциональных групп СК, при участии которых образуется комплекс плазминоген — СК.

Ранее мы [17] впервые получили предварительные данные о том, что йодирование остатков тирозина в СК приводит к утрате ею способности образовывать с плазминогеном человека эквимольный комплекс. В настоящей работе проведено дальнейшее изучение влияния модификации функциональных групп СК на особенности ее конформации и характер взаимодействия с плазминогеном.

Методика

СК выделяли из культуральной жидкости, полученной при выращивании β -гемолитического стрептококка штамм H46A на питательной среде сложного состава, путем сорбции на двуокиси кремния и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, как описано ранее [6, 7]. В ряде случаев СК выделяли также из отечественного коммерческого препарата целпазы путем пересаживания 10% хлоридом натрия при pH 2,0 и последующей ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50 в 0,1M трис-HCl-буфере pH 6,8 с элюцией активных фракций 0,15 M HCl. Полученные образцы СК были гомогенны при электрофорезе в 12,5% ПААГ с 0,1% додецилсульфата натрия в режиме 40 В и 20 мА в течение 16 ч при 4°C [21]. Удельная активность образцов СК, определенная методом лизиса фибриновых струтков или фибриновых пластинок [8], соответствовала 100 000 ME на 1 мг белка.

Плазминоген выделяли из обогащенной β -глобулинами фракции плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе [12]. Полученные образцы при электрофорезе в указанных выше условиях характеризовались наличием основной белковой полосы с молекулярной массой 90 кД (90%), соответствующей плазминогену, и минорной фракции (20%) с молекулярной массой 80 кД, соответствующей плазмину. Активность плазминогена в полученных образцах, определенная казеинолитическим методом [19], составила 14 казеинолитических ед. мг белка.

Йодирование СК проводили в 0,06 M фосфатном буфере pH 7,4 при 4°C. Свежеприготовленный раствор 9 mM I_2 в 0,5 M KI добавляли к раствору белка в конечной концентрации I_2 $2 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ M, а KI — 10^{-5} M так, чтобы молярные соотношения I_2 :СК были равны 2:1, 5:1, 6:1, 10:1, 20:1 и 30:1. Реакцию проводили до момента исчезновения окраски смеси по абсорбции при 350 нм, которое в зависимости от концентрации I_2 достигалось за 3—60 мин и считалось временем окончания реакции [18]. При максимальной концентрации I_2 $3 \cdot 10^{-4}$ M, однако, обесцвечивания не происходило в течение 180 мин. Отделение модифицированной СК от низкомолекулярных компонентов смеси проводили методом гель-фильтрации на колонке (1x10 см) с сефадексом G-25 в 0,06 M фосфатном буфере pH 7,4.

Модификацию L-тирозина или L-гистидина проводили в указанной системе при конечных концентрациях L-тирозина $6 \cdot 10^{-5}$ M, L-гистидина $3 \cdot 10^{-4}$ M, I_2 (1,5—3,0) $\cdot 10^{-4}$ M, учитывая величину абсорбции при 340 нм.

Спектры абсорбции записывали на спектрофотометре "Specord" M-40 в стандартных кюветках. Дифференциальную спектроскопию проводили по 4-кюветной системе, при этом pH контрольного образца доводили до 2,5, а опытного — до 11,5, поскольку при этом pH ионизируются все йодированные производные тирозина [14].

Спектры флюоресценции снимали на спектрофлюориметре "Fica-55" с длиной волны возбуждения 296 нм (возбуждаются остатки триптофана и йодированные остатки тирозина) и 280 нм (возбуждаются все указанные остатки и остатки тирозина).

Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре I-20 в интервале длин волн 205—240 нм при концентрации белка 0,2—0,5 мг/мл, в кюветках с толщиной слоя 0,1 см при чувствительности прибора $0,005^\circ/\text{см}$ и скорости сканирования 0,04 нм/с. Значения молярной эллиптичности рассчитывали, принимая среднюю массу аминокислотного остатка равной 133,6, исходя из данных аминокислотного состава СК [16]. Прибор калибровали по D-пентагалтону и цинкобаламину.

Содержание элементов вторичной структуры рассчитывали по реперным спектрам [10] с использованием ЭВМ БЭСМ-6.

Образование эквимольных комплексов СК и плазминогена человека выявляли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200 [20] размером 0,5x80 см в 0,01 M трис-HCl-буфере pH 8,0, содержащем 0,1 M L-лизина при концентрации белков $2 \cdot 10^{-6}$ M, скорости элюции 3 мл/ч и объеме фракций 0,5 мл.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [11], а также по величине абсорбции при 280 нм, принимая значения $A_{280}^{1\%}$ для СК и плазминогена соответственно 9,0 и 17,1 [9, 15].

Все эксперименты выполнены не менее 3 раз, результаты обработаны статистически. В работе использовали сефадексы G-25, G-200, ДЭАЭ-А-50, ВrCN-сефарозу ("Pharmacia"), додецилсульфат натрия ("Koch-Light"), кумасси голубой G-250 ("Serva"), L-тирозин, L-лизин-гидрохлорид, L-гистидин-гидрохлорид, ДЭАЭ-целлюлозу, перекристаллизованные реагенты для ПААГ ("Reanal"). Остальные реагенты были отечественного производства марок «ос. ч.» или «х. ч.», их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Результаты и обсуждение

Известно [13], что йодирование белков приводит к модификации различных аминокислотных остатков. Однако поскольку молекула СК не содержит других серосодержащих аминокислот, кроме 4 остатков метионина [16], при йодировании СК возможна модификация только остатков тирозина и гистидина.

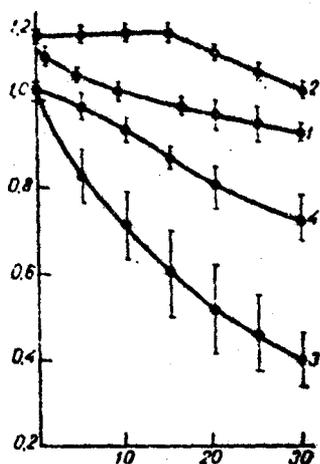


Рис. 1. Кинетика обесцвечивания йода.

1 — спонтанное обесцвечивание; 2 — L-гистидин в конечной концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М; 3 — L-тирозин в конечной концентрации $6 \cdot 10^{-3}$ М; 4 — стрептокиназа в конечной концентрации $3 \cdot 10^{-6}$ М. Конечная концентрация йода $1,5 \cdot 10^{-4}$ М. По оси абсцисс — время (в мин).

Для выяснения особенностей модификации этих аминокислот в специальных опытах исследовали кинетику йодирования L-тирозина и L-гистидина. Оказалось, что при избранных условиях I подвергается спонтанному обесцвечиванию (рис. 1), кинетика которого подчиняется уравнению скорости реакции первого порядка с константой скорости $5,25 \cdot 10^{-3} \cdot \text{мин}^{-1}$ (табл. 1). Введение в реакционную смесь L-гистидина не изменяло скорость обесцвечивания I. В то же время L-тирозин значительно повышал скорость обесцвечивания, увеличивая константу скорости на порядок. Это позволяет думать, что в избранных условиях (4°C , $0,06$ М фосфатный буфер pH 7,4) возможно йодирование лишь остатков тирозина. Йодирование СК также сопровождалось ускорением спонтанного

Таблица 1

Константы скорости обесцвечивания йода при йодировании L-гистидина, L-тирозина и СК

Условия эксперимента	$I_0 (\cdot 10^{-4})$, М	Константа скорости
Контроль	1,5	$5,25 \cdot 10^{-3} \cdot \text{мин}^{-1}$
L-гистидин, $3 \cdot 10^{-4}$ М	1,5	$5,25 \cdot 10^{-3} \cdot \text{мин}^{-1}$
L-тирозин, $6 \cdot 10^{-3}$ М	1,5	$3,25 \cdot 10^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$
СК, $3 \cdot 10^{-6}$ М	3,0	$2,70 \cdot 10^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$
	1,5	$1,35 \cdot 10^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$

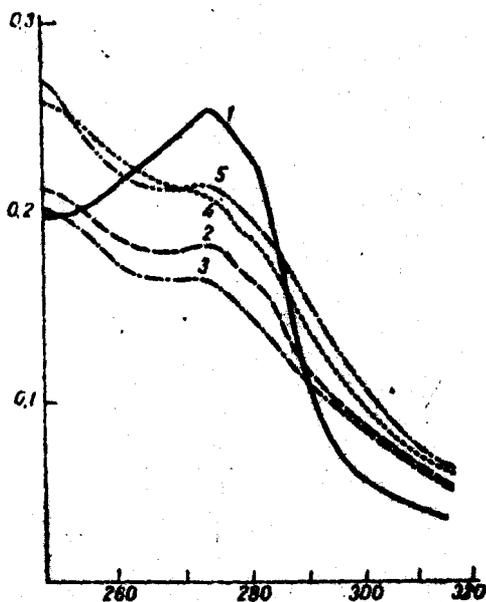


Рис. 2. Изменения спектра абсорбции СК при йодировании.

1 — нативный белок; 2 — СК, модифицированная при молярном соотношении I_2 :СК, равном 6:1, 3 — 10:1; 4 — 20:1, 5 — 30:1.

обесцвечивания I с константой скорости, близкой к таковой для свободного тирозина. Это хорошо согласуется с ранее описанным нами [4] фактом расположения всех остатков тирозина в молекуле СК на поверхности глобулы белка.

Йодирование СК приводило в целом к уменьшению полосы абсорбции при 280 нм (рис. 2). Вместе с тем поглощение при 245 нм не уменьшалось, а соотношение D_{280}/D_{245} , позволяющее в известной мере судить о состоянии остатков гистидина [3], уменьшалось вследствие снижения абсорбции при 280 нм (табл. 2). Все это, по-видимо-

Таблица 2

Изменения отдельных полос спектра абсорбции СК при йодировании ($n = 5$)

Исследуемые образцы СК	D_{280}	D_{245}	D_{280}/D_{245}
Нативная	$0,23 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,03$	1,18
Йодированная при молярном соотношении I_2 :СК:			
6:1	$0,17 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	0,80
10:1	$0,15 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	0,72
20:1	$0,19 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,03$	0,71
30:1	$0,20 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	0,71

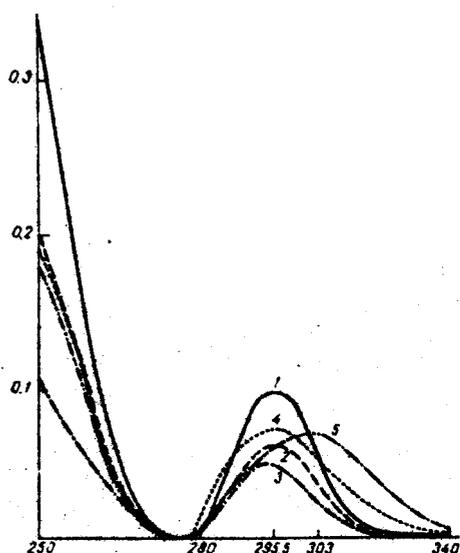


Рис. 3. Дифференциальные спектры абсорбции (рН 11,5 против рН 2,5) нативной и модифицированной СК.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

му, также свидетельствует о том, что при йодировании СК модифицируются практически лишь остатки тирозина. Вместе с тем при росте молярного соотношения I_2 :СК наблюдается неоднонаправленное изменение спектров абсорбции. Можно полагать, что это, по-видимому, обусловлено различиями коэффициентов молярной экстинкции нативного тирозина и его йодированных производных [1], а также локальными конформационными изменениями белка.

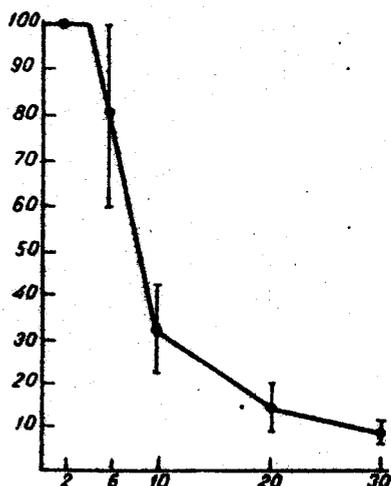


Рис. 4. Инактивация СК при различном соотношении I_2 :СК.

По оси абсцисс — соотношение I_2 :СК (в М); по оси ординат — остаточная активность (в % от исходной).

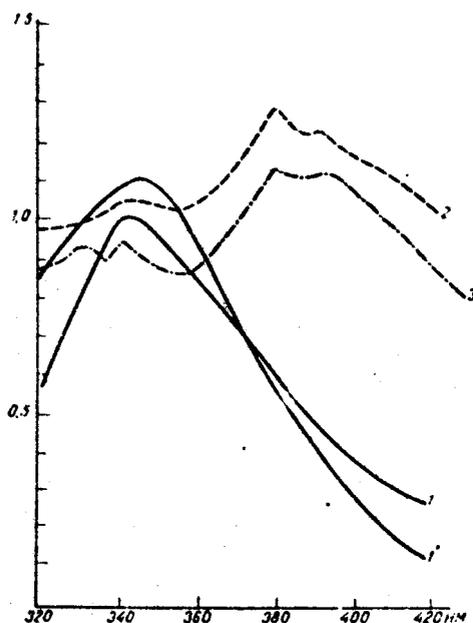


Рис. 5. Спектры флуоресценции нативной (I; I') и йодированной СК.

Молярное соотношение I_2 :СК: 2—10:1; 3—20:1. Возбуждение флуоресценции при 296 нм (I, 2, 3) или 280 нм (I'). Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4, концентрация СК $5,0 \cdot 10^{-4}$ М.

Судя по данным дифференциальной УФ-спектроскопии, СК с полностью ионизированными остатками тирозина (21 остаток) имело максимум абсорбции при 295,5 нм (рис. 3). Положение максимума не менялось после йодирования при соотношении I_2 :СК, равном 6:1, но смещалось до 293 нм при соотношении 10:1. Йодирование СК при молярных соотношениях 20:1 и 30:1 вызывало увеличение абсорбции при 303 и 311 нм, а в последнем случае и смещение максимума спектра до 303 нм. Исходя из спектральных характеристик йодированных производных тирозина [1], можно полагать, что модификация при соотношении I_2 :СК, равном 20:1 или 30:1, ведет к частичному образованию моноидтирозилов, а также дийодтирозилов. Однако поскольку даже у этих производных сохранена полоса абсорбции при 295,5 нм, можно думать, что часть остатков тирозина в СК остается немодифицированной.

При молярном соотношении I_2 :СК, равном 5:1, йодирование не вызывало существенного изменения активности СК. Дальнейшее увеличение концентрации I вело к нелинейному падению активности фермента (рис. 4). Однако

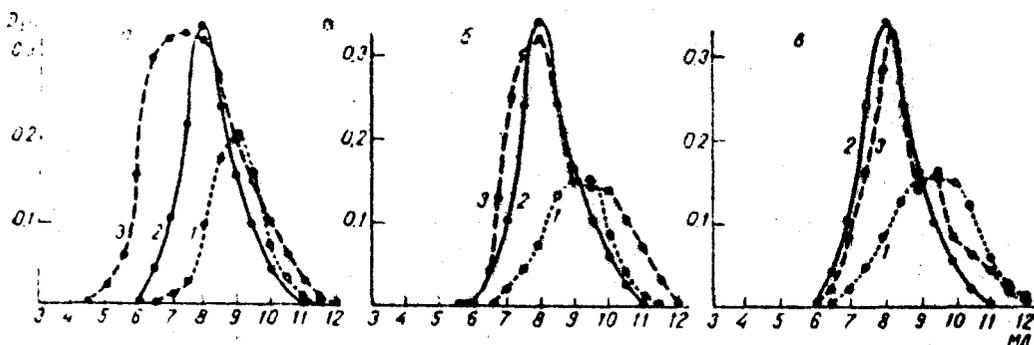


Рис. 6. Гель-фильтрация СК (1), плазминогена человека (2) и их эквимолярной смеси (3).

СК нативная и модифицированная при молярном соотношении I_2 : СК 6:1 (б) или 30:1 (в).

даже при молярном соотношении I_2 : СК—30:1 йодирование на протяжении 3 ч не приводило к полной инактивации СК: до 10% ее активности сохранялось. Это согласуется с тем, что часть остатков тирозина остается в немодифицированном состоянии. Причиной такого явления может быть не только гетерогенность остатков тирозина в молекуле белка, но и гетерогенность СК. Известно, что СК суще-

ствует в виде нескольких форм, имеющих особенности конформации [2, 5].

Исследования флюоресценции СК показали, что основной вклад во флюоресценцию нативного белка вносят остатки триптофана, а флюоресценция тирозина невелика (рис. 5). Йодирование СК приводило при возбуждении светом с 296 нм к появлению длинноволновых компонент с максимумами при 378 и 391—395 нм, характерных для йодзамещенных производных [1]. Положение максимума флюоресценции триптофана в целом не менялось, что, по-видимому, свидетельствовало об отсутствии модификации триптофанилов. Отмечена высокая интенсивность флюоресценции полос, соответствующих йодированным тирозилам, хотя их квантовый выход низок [1]. Такое несоответствие не может быть объяснено погрешностями при определении количества белка и требует специальных исследований, выходящих за рамки статьи. Изучение флюоресценции йодированной СК при возбуждении 280 нм были осложнены интенсивной флюоресценцией в коротковолновой области с максимумом 305 нм и, возможно, обусловленной явлениями рассеяния.

Смешивание нативной СК и плазминогена человека в эквимолярных концентрациях приводило к смещению профиля элюции белка, что свидетельствует о формировании надмолекулярного комплекса (рис. 6). Йодирование СК уже при соотношении I_2 : СК—6:1 приводило к тому, что смесь модифицированной СК и плазминогена элюировалась в виде двух не полностью разрешенных пиков, соответствовав-

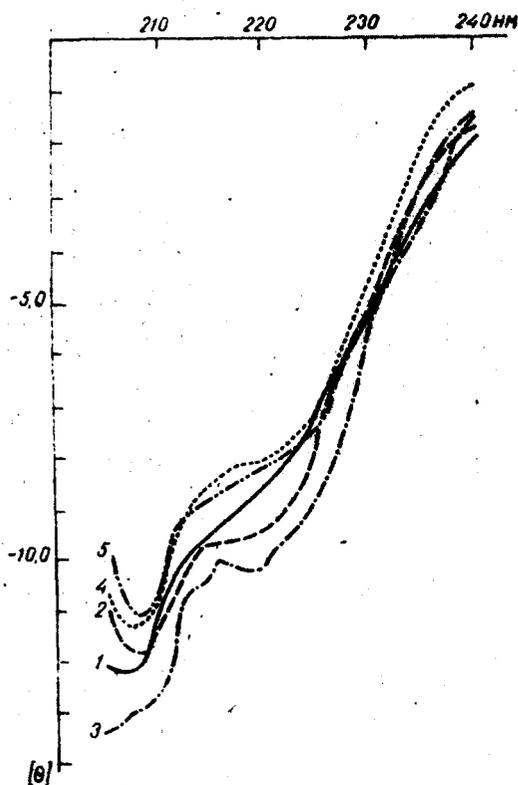


Рис. 7. Спектры кругового дихроизма нативной и йодированной СК.

Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,5. Обозначения те же, что на рис. 2 и 3.

Таблица 3

Относительная доля (в %) элементов вторичной структуры СК при ее йодировании ($n = 3$; $M \pm m$)

Исследуемые образцы СК	α -Спираль	β -Структуры		β -Изгибы	Неупорядоченная конформация
		антипараллельные	параллельные		
Нативная	26,2 \pm 2,7	14,6 \pm 1,1	3,4 \pm 1,8	20,1 \pm 0,6	35,7 \pm 2,3
Модифицированная при молярном соотношении I_2 :СК:					
6:1	39,0 \pm 7,3	4,1 \pm 1,9	3,0 \pm 1,5	18,7 \pm 1,9	35,2 \pm 9,3
10:1	35,7 \pm 9,6	7,6 \pm 1,1	2,6 \pm 1,8	18,7 \pm 2,2	35,4 \pm 10,5
20:1	27,6 \pm 6,9	9,0 \pm 1,6	1,8 \pm 1,3	17,4 \pm 1,2	44,2 \pm 8,4
30:1	29,8 \pm 6,8	9,1 \pm 0,8	1,9 \pm 1,3	19,5 \pm 2,6	39,7 \pm 6,4

ших индивидуальным компонентам. По-видимому, при йодировании способность СК к образованию эквимольных комплексов с плазминогеном утрачивается. Между тем, как указывалось выше, активность СК при соотношении I_2 :СК—6:1 снижалась незначительно. Создается впечатление, что для реализации активаторной функции СК образование устойчивых комплексов ее с плазминогеном не является обязательным условием.

Судя по характеру спектров кругового дихроизма (рис. 7), йодирование не вызывает значительных изменений во вторичной структуре СК. Однако при расчетах по реперным спектрам показано, что йодирование вначале усиливало спирализацию белка за счет уменьшения доли β -структур, а затем при молярном соотношении I_2 :СК—(20—30):1 вызывало небольшое уменьшение относительной доли β -структур и увеличение доли неупорядоченной конформации (табл. 3).

Полученные материалы позволяют считать, что йодирование СК приводит к преимущественной модификации остатков тирозина, причем в зависимости от концентрации йода может достигаться превращение последних в монойод- и дийодтирозин. Остатки тирозина в молекуле СК, судя по кинетике модификации, по-видимому, гетерогенны, часть из них остается немодифицированной. Возможно, остатки тирозина не играют определяющей роли в организации вторичной структуры СК, однако их состояние способно изменить соотношение между отдельными элементами вторичной структуры. Глубокая модификация остатков тирозина приводит к утрате способности СК к образованию комплексов с плаз-

миногеном человека. Это дает основания полагать, что модификация остатков тирозина вызывает конформационные изменения фермента, затрагивающие центры взаимодействия с макромолекулой плазминогена¹.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка: (Природа и применение). — М., 1977.
2. Казюциц О. А., Никандров В. Н. // Современные проблемы биотехнологии микроорганизмов. — Рига, 1987. — С. 121.
3. Кобылянская К. Р., Кочетов Г. А. // Успехи биол. химии. — 1971. — Т. 12. — С. 97—118.
4. Никандров В. Н., Воробьева Г. В. // Изв. АН БССР: Сер. биол. наук. — 1984. — № 5. — С. 74—77.
5. Никандров В. Н. // Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей системы крови. — Минск, 1985. — С. 43—58.
6. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С. и др. // Изв. АН БССР: Сер. биол. наук. — 1986. — № 6. — С. 47—52.
7. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Вотяков В. И. // Докл. АН СССР. — 1986. — Т. 287. № 3. — С. 751—755.
8. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 1. — С. 84—87.
9. Роббинз К. К., Маркус Г. // Фибринолиз: Современные фундаментальные и клинические концепции: Пер. с англ. — М., 1982. — С. 69—84.
10. Bolotina I. A., Chekhov V. O., Lugauskas V. // Int. J. Quantum. Chem. — 1979. — Vol. 16. — P. 819—824.
11. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
12. Deutch D. J., Mertz E. T. // Science. — 1970. — Vol. 170. — P. 1095—1096.
13. Feeney R. E., Yamasaki R. B., Geoghegan K. F. // Advanc. Chem. Ser. — 1982. — № 198. — P. 3—55.
14. Janford C., Robert J. // J. Amer. Chem. Soc. — 1952. — Vol. 74. — P. 2509—2515.

¹ Авторы выражают благодарность Г. С. Янковской за помощь при снятии спектров кругового дихроизма.

15. Kreschenbaum D. M. // *Analyt. Biochem.* — 1975 — Vol. 68 — P. 465—484.
16. Morgan F., Henschen A. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1969 — Vol. 181 — P. 93—104.
17. Nikandrov V. N., Kazyuchits O. A. // *International Congress of Biochemistry, 13th Abstracts* — Amsterdam, 1985. — Vol. 2. — P. 302.
18. Otwell H. B., Yang-Ho Tan A., Friedman M. E. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1978. — Vol. 527. — P. 309—318.
19. Robbins K. C., Summaria L. // *Meth. Enzymol.* — 1970. — Vol. 19. — P. 184—186.
20. *Sephadex: Gel Filtration in Theory and Practice* — Sweden, Pharmacia Fine Chemicals. — 1975.
21. Weber K., Osborn M. // *J. biol. Chem.* — 1969 — Vol. 244 — P. 4406—4411.

Почтына 15 03 88

MODIFICATION OF THE STREPTOKINASE FUNCTIONAL GROUPS DURING IODINATION

V. N. Nikandrov, O. A. Kazyuchits

Institute of Epidemiology and Microbiology,
Minsk

Modification of tyrosine residues was detected in streptokinase molecule during iodination. A nonlinear type of the modification reaction allowed to suppose that tyrosine residues were heterogenous. As shown by gel chromatography the modified streptokinase did not develop stable complexes with human plasminogen even at low ratios of iodine/streptokinase, however the activating effects of the streptokinase were maintained. During iodination the secondary structure of streptokinase appears to be altered, the level of which depended on the molar ratio iodine/streptokinase.