

ДОКЛАДЫ

АКАДЕМИИ НАУК БССР

АВТОРСКИЙ ОТТИСК



33-Й ГОД ИЗДАНИЯ
Том XXXIII, № 7

1989

УДК 577.15

В. Н. НИКАНДРОВ, Г. В. ВОРОБЬЕВА, Н. В. ДЕМИДЧИК, Г. С. ЯНКОВСКАЯ

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МОЛЕКУЛ ПЛАЗМИНОГЕНА ЧЕЛОВЕКА,
БЫКА И КРОЛИКА В РАСТВОРЕ***(Представлено академиком АН БССР Ю. М. Островским)*

Одним из наиболее сильных активаторов плазминогена (Пг) является стрептокиназа (СК) — синтезируемый β -гемолитическими стрептококками белковый активатор Пг. Важной особенностью СК является проявление видовой специфичности: в ее присутствии легко активируются Пг человека, кота, собаки, в меньшей степени — кролика и крайне слабо — Пг быка [1]. Полагают, что одной из главных причин подобной специфичности являются различия структуры зимогенов. Однако до сих пор неясно, сколь значительны эти различия. В связи с этим мы исследовали особенности конформации Пг человека, быка и кролика в водно-солевых растворах.

Образцы Пг человека получали из обогащенной β -глобулинами фракции крови, а образцы Пг кролика и быка — из плазмы крови методом аффинной хроматографии соответственно на лизин-сефарозе или лизин-полимер-силохроме, как описано в [2, 3]. Удельная активность образцов, определенная казеинолитическим методом [4], после активации зимогенов СК или урокиназой составила около 20 казеинолитических ед/мг белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по величине абсорбции водных растворов при 280 нм, используя значения $A_{1\text{см}}^{1\%}$ для Пг человека, кролика и быка 17,0; 18,1 и 15,9 соответственно [5, 6]. Гомогенность полученных образцов очищенных белков подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [2].

Спектрофотометрическое титрование Пг выполнено в бидистиллированной воде на спектрофотометре СФ-26 в стандартных кюветах. Спектры триптофановой флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Fica-55 при возбуждении 296 нм, тушение флуоресценции хлоридом цезия, нитратом натрия или акриламидом исследовали, как описано в [7]. Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре Jasco J-20 в интервале длин волн 205—240 нм (при концентрации белка 0,4 мг/мл, длине оптического пути 0,1 см) и 250—300 нм (при концентрации 1 мг/мл, длине оптического пути 1,0 см), при чувствительности прибора 0,005 °/см, постоянной времени 4 и постоянной скорости 2. Прибор калибровали по D-10-камфорсульфоновой кислоте и D-пантолактону [8]. Величину молярной эллиптичности $[\theta]$ рассчитывали, принимая среднюю массу аминокислотного остатка равной 119, исходя из данных об аминокислотном составе Пг [9, 10].

В работе использовали препарат СК — стрептазу (Behringwerke AG, ФРГ), D-пантолактон, D-10-камфорсульфоновую кислоту, додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), ВгCN-сефарозу (Pharmacia, Швеция), L-ли-

зин, акриламид, реагенты для полиакриламидного геля (Reanal, ВНР). Человеческий и бычий фибриногены (содержащие Пг серии), тромбин, урокиназа («Урокинин»), казеин были отечественного производства, так же, как и остальные реактивы марки х. ч., которые дополнительно многократно перекристаллизовывали.

При спектрофотометрическом титровании ионизация остатков тирозина в молекуле Пг человека идет в 2 стадии (рис. 1): в первую стадию ионизируются 6 остатков ($pK=10,2$), а остальные — при дальнейшем

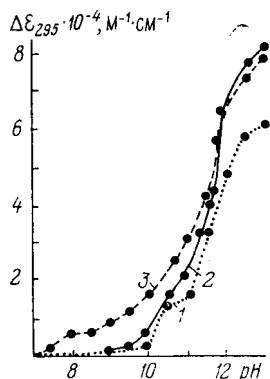


Рис. 1. Спектрофотометрическое титрование тирозиновых остатков плазминогенов человека (1), кролика (2) и быка (3). Концентрация плазминогена человека 6 мкМ, плазминогена кролика и быка — 3 мкМ

увеличении рН ($pK=11,7$), по-видимому, после конформационного перехода. Этот процесс обратим. В молекулах Пг кролика и быка остатки тирозина ионизируются в одну стадию с $pK=11,2$, причем в Пг быка ионизация начинается уже при рН 8,0. Общее число остатков тирозина в молекулах Пг человека, кролика и быка, рассчитанное на основании значения для ионизации одного остатка ($\Delta E_{295} = 2400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [11], соответствует 24, 33 и 35. Это согласуется с данными аминокислотного анализа [9, 10]. Следовательно, исследуемые зимогены различаются по локализации остатков тирозина. Известно, что нитрование их в молекуле Пг человека ведет к утрате способности формировать устойчивые эквивалентные комплексы с СК [12]. Между тем вышеизложенные факты показывают, что легко ионизирующиеся (вероятно, поверхностно расположенные) остатки тирозина имеются у всех зимогенов, хотя Пг быка и кролика устойчивых комплексов с СК не образуют [1]. Можно полагать, что способность Пг человека к формированию комплексов с СК обусловлена спецификой микроокружения остатков тирозина либо тонкой структурой поверхности молекулы Пг: например, у Пг быка и кролика легко ионизирующиеся остатки тирозина могут располагаться в нишах поверхности, причем доступность их ионам или малым молекулам сохраняется, а контакт с макромолекулами ограничен.

Таблица 1. Параметры спектров триптофановой флуоресценции плазминогенов в 0,06М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,2М хлорида натрия

Плазминоген	q	λ_{max} , нм	$\Delta\lambda$, нм
Человека	0,06	336	58
Кролика	0,11	336	59
Быка	0,18	340	60

Таблица 2. Тушение триптофановой флуоресценции плазминогенов в 0,06М фосфатном буфере рН 7,4, содержащем 0,2М хлорида натрия

Плазминоген	K_{SV} , M^{-1} при тушении			Степень тушения, %		
	Cs^+	NO_3^-	акрил-амидом	Cs^+	NO_3^-	акрил-амидом
Человека	1,6	7,5	2,5	8	38	22
Кролика	—	10,4	6,0	8	46	23
Быка	—	6,5	3,2	3	40	22

Примечание. Концентрация тушителя 0,1 М.

Известно, что в Пг человека, кролика и быка содержание триптофановых остатков почти одинаково и соответствует 20, 19 и 22 [9, 10]. Квантовый выход триптофановой флуоресценции Пг быка в 3 раза выше, чем у человека (табл. 1). Судя по остальным параметрам спектра флуоресценции, в Пг быка больше остатков триптофана находится в контакте с растворителем. Исходя из модели трех типов остатков триптофана в белках [13], можно думать, что у Пг человека и быка за счет погруженных вглубь остатков триптофана обеспечивается 65 и 45%

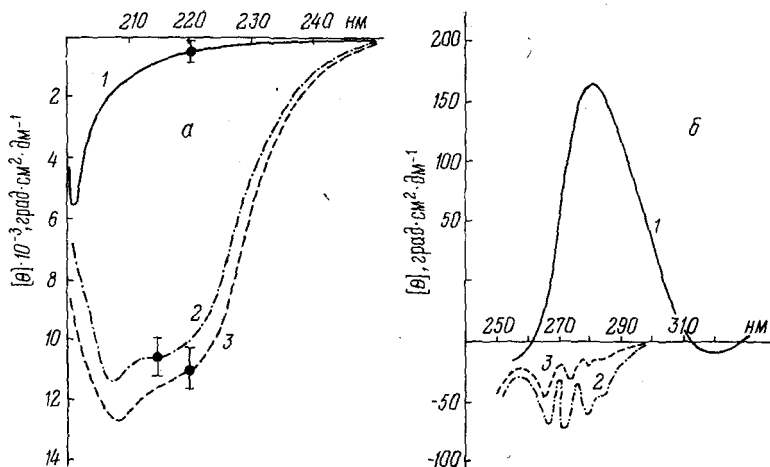


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма плазминогенов человека (1), кролика (2) и быка (3) в дальней (а) и ближней (б) ультрафиолетовых областях. Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер рН 7,4, содержащий 0,2 М NaCl

флуоресценции соответственно. Эффективность тушения флуоресценции обоих Пг тушителями практически одинакова (табл. 2). По-видимому, доступные тушителю остатки триптофана во всех Пг локализованы в несущих положительный заряд участках молекулы. Но есть основания полагать, что в Пг человека остатки триптофана локализованы вблизи тушащих флуоресценцию групп белка. Следовательно, различия организации структуры трех зимогенов проявляются и в характере локализации остатков триптофана.

Судя по спектрам КД в дальней ультрафиолетовой области, исследуемые зимогены заметно различаются по вторичной структуре (рис. 2). По-видимому, для Пг человека характерно преобладание нерегулярной конформации, тогда как для Пг кролика и быка велика доля упорядоченных элементов, прежде всего α -спирали. Третичная структура, выражающаяся особенностями симметрии окружения хромофорных групп, у трех белков также различается (рис. 2). Так, у Пг человека спектр КД в ближней ультрафиолетовой области отличается интенсивной положительной бесструктурной полосой с максимумом при 281—282 нм, отражающей, вероятно, вклад оптических переходов остатков тирозина и триптофана. Спектры КД Пг кролика и быка характеризуются несколькими слабыми отрицательными полосами с экстремумами при 267—269, 272—274 и 278—282 нм, также отражающими вклад упомянутых хромофоров. Принципиальных различий в асимметрии окружения хромофорных групп у Пг кролика и быка не найдено.

На основании полученных данных можно высказать следующее суждение. Несмотря на идентичную функциональную направленность, молекулы трех Пг имеют глубокие различия организации, затрагивающие вторичную, третичную структуры и состояние хромофорных групп. В целом конформационные различия указанных трех белков предопределены известными различиями аминокислотной последовательности. Одна-

ко метод кругового дихроизма характеризует в основном только общую структуру макромолекулы белка. Поэтому отмеченное обстоятельство, на наш взгляд, заслуживает пристального внимания с точки зрения молекулярной эволюции зимогенов и в целом белков. Ранее методом триптофановой флуоресценции мы установили различия измененной молекулы у трех перечисленных зимогенов при нагревании или действии хлорида гуанидина, дающие основания считать, что молекула Пг человека структурно более подвижна и способна к обратимым перестройкам [14]. Можно ожидать (если в образовании комплексов с СК роль остатков тирозина действительно определяющая), что у молекулы Пг человека имеется больше возможностей структурной «подстройки», следствием чего и является формирование устойчивых комплексов с СК.

Однако полученные данные о существенных различиях организации молекул трех Пг сами по себе не проясняют причин различной чувствительности их к СК, тем более, что Пг кролика в отличие от Пг быка ею активируется достаточно хорошо. Известно, что активаторная функция СК реализуется при участии генерируемых молекулой Пг супероксидных радикалов и что эта O_2 -генерирующая способность обусловлена присутствием металлов переменной валентности [2, 15]. По-видимому, различия в способности СК активировать изучаемые зимогены кроются в неодинаковой функциональной способности этих металлов в молекулах зимогенов. В частности, преобладание «жестких» элементов вторичной структуры в молекуле Пг быка может вызвать избыточную координацию металла и снижение его каталитической активности.

Summary

The differences in ionization of tyrosine residues, tryptophan fluorescence, secondary and tertiary structures of the human, rabbit and bovine plasminogens were estimated. It is supposed that the ability of human plasminogen to form stable equimolar complexes with streptokinase can be ascribed to a smaller rigidity of its molecules in comparison with other plasminogens.

Литература

1. Никандров В. Н. // Энзимология тромболиза и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 23—34.
2. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1988. № 5. С. 58—63.
3. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Вотяков В. И. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287, № 3. С. 751—755.
4. Robbins K. C., Summaria L. // Methods Enzymol. New York; London, 1970. Vol. 19. P. 184—186.
5. Wohl R. C., Arzadon L., Summaria L., Robbins K. C. // J. Biol. Chem. 1977. Vol. 252, N 4. P. 1141—1147.
6. Summaria L., Arzadon L., Bernabe P., Robbins K. C. // J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248, N 18. P. 6522—6527.
7. Никандров В. Н., Воробьева Г. В. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1984. № 5. С. 74—78.
8. Tuzimura K., Kopno T., Meguro H. et al. // Anal. Biochem. 1977. Vol. 81. P. 167—174.
9. Wohl R. C., Sinio L., Summaria L., Robbins K. // Biochim. biophys. acta. 1983. Vol. 745. P. 20—31.
10. Collen D. // Thromb. Haemost. 1980. Vol. 43, N 2. P. 77—89.
11. Елякова Л. А., Улькина Ж. И., Глебко Л. И. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3, № 4. С. 555—560.
12. Nedkov P., Ninh K. Z. // Изв. хим. Бълг. АН. 1978. Т. 11, № 1. С. 173—179.
13. Бурштейн Э. А. Собственная флуоресценция белка. Природа и применение: Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 7. ВИНТИ. М., 1977.
14. Никандров В. Н., Демидчик Н. В. // Молекулярные механизмы регуляции метаболических процессов: Сб. кратких науч. сообщ. биохимиков Белорусской, Литовской, Латвийской и Эстонской ССР. Минск, 1987. С. 183.
15. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // 18 FEBS Meeting. Abstracts. Ljubljana, 1987. P. 84.