

# ВЕСЦІ

АКАДЭМІІ НАВУК БССР

---

СЕРЫЯ  
БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК  
№ 5

Асобны адбітак



---

Мінск 1984

УДК 577.3+535.34 : 535.372

В. М. НИКАНДРАЎ, Г. У. ВАРАБ'ЕВА

### АБ СТАНЕ АСТАТКАЎ ТЫРАЗИНУ І ТРЫПТАФАНУ У МАЛЕКУЛЕ СТРЭПТАКІНАЗЫ

Структурна-каталітычныя ўласцівасці стрэптакіназы (КФ 3.4. 99. 22) вывучаны недастаткова. Асаблівае значэнне мае выяўленне ўчасткаў малекулы, адказных за ўзаемадзеянне з плазмінагенам. Ёсць даныя [1] аб значным зніжэнні актыўнасці стрэптакіназы (СК) пасля хімічнай мадыфікацыі трыптафанілаў. Вядома таксама роля астаткаў тыразіну ў каталітычных функцыях некаторых ферментаў [2]. Улічваючы выкладзенае, а таксама маючы на ўвазе недастатковасць і супярэчлівасць наяўных даных аб колькасці і стане астаткаў тыразіну і трыптафану ў СК [3—6], у дадзенай рабоце спектральнымі метадамі даследавана лакалізацыя гэтых храмафораў у бялку.

#### Матэрыялы і метады

Даследаванні праведзены на водна-саявых растворах, якія змяшчаюць 0,2 М NaCl, электрафарэтычна гамагенных узораў СК стрэптакока штама H46A, атрыманых па [7]. Удзельная актыўнасць складала

100 000 МАдз/мг бялку. Канцэнтрацыя бялку вызначана па [8], актыўнасць СК — па [9] з карэкцыяй па міжнароднаму стандарту стрэптакіназа — стрэптадарназа (Лондан, ВОЗ) і прэпарата стрэптаза (Behringwerke AG, ФРГ).

Спектры паглынання вымяралі на спектрафатометры Векман-5270. Рознасныя спектры атрыманы па [10] у 4-кветнай сістэме на спектрафатометры Spexord UV-vis. Спектрафотаметрычнае цітраванне выкана на на спектрафатометры СФ-26. Спектры флуарэсцыцы знімалі на спектрафлуарыметры Fica-55 з монахраматычным узбуджэннем пры даўжыні хвалі 296 нм. Тушэнне флуарэсцыцы даследавалі пры рН 3,0; 7,5 і 9,6. Да 2 мл раствору бялку ( $0,4 \cdot 10^{-5}$  М) у 0,05 М фасфатным буферы або баратным буферы ў прысутнасці 0,2 М NaCl непасрэдна перад вымярэннем дадавалі аліквоты (5—10 мкл) 3 М NaNO<sub>3</sub> CsCl або акрыламіды да канцэнтрацыі не больш чым 0,4 М акрыламіды, 0,3 М NaNO<sub>3</sub> або 2 М CsCl.

Даныя па тушэнню аналізавалі згодна з ураўненнем Штэрна — Фольмера з увядзеннем паправак на рэабсорбцыю для NaNO<sub>3</sub> [11]. Разлік магчымай колькасці астаткаў тыразіну і трыптафану ў СК ажыццяўлялі па [12—14].

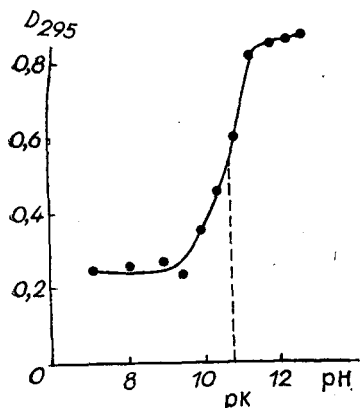
У рабоце выкарыстоўвалі рэактывы маркі х. ч., якія падвяргаліся дадатковай ачыстцы перакрышталізацыяй. Трыптафан быў вытворчасці фірмы Sigma (ЗША).

### Результаты і абмеркаванне

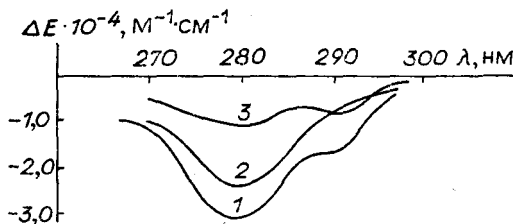
**Спектры паглынання.** Наяўнасць у спектры максімуму пры 277 нм і пляча пры 282—286 нм сведчыць аб пераважным укладзе ў паглынне астаткаў трыптафану. У кіслым асяроддзі (рН 3,0) характар спектра не змяняецца. У шчолачным — у выніку іанізацыі ОН-групы тыразілаў — максімум зрушваецца да 291 нм, наглядаецца плячо пры 284—286 нм (уклад паглынання трыптафанавых астаткаў). Спектрафотаметрычнае цітраванне паказала, што іанізацыя астаткаў тыразіну ў СК адбываецца ў адну стадыю (рыс. 1), пачынаючы з рН 9, і мае рК 10,7. Працэс іанізацыі абарачальны да рН 12.

Спектры паглынання СК у растваральніках з рознай палярнасцю змяняюцца нязначна (табл. 1), прычым спектр бялку зрушаны ў караткахвалевую вобласць у параўнанні са спектрам свабоднага трыптафану ў тым жа растваральніку. Гэтыя даныя дазваляюць меркаваць, што трыптафанілы СК абмежавана даступныя растваральніку.

Даследаванне СК метадам дыферэнцыяльнай спектраскапіі пры пер-



Рыс. 1. Спектрафотаметрычнае цітраванне тыразінавых астаткаў стрэптакіназы; канцэнтрацыя бялку  $1,3 \cdot 10^{-5}$  М



Рыс. 2. Дыферэнцыяльныя сольвентна-пертурбацыйныя спектры стрэптакіназы ў 20%-ных растворах этыленгліколю (1), глюкозы (2), гліцэрыны (3), канцэнтрацыя бялку  $3,2 \cdot 10^{-6}$  М

турбацыі растваральнікамі дазволіла выявіць стан астаткаў тыразіну ў натыйнай СК (рыс. 2). У 20%-ных растворах этыленгліколю і гліцэрыны ў дыферэнцыяльных спектрах наглядаецца адмоўны максімум пры 279—280 нм, што можа быць звязана са змяненнем стану тыразілаў. Пры 290 нм ёсць другі, менш інтэнсіўны адмоўны максімум, які адсутнічае пры пертурбацыі раствораў глюкозы і абумоўлены, відаць, змяненнем стану трыптафанілаў.

Разлічаныя на метаду Гудвіна і Мортана [12] малярныя суадносіны

Табліца 1

Уплыў палярнасці растваральніка на спектр паглынання стрэптакіназы

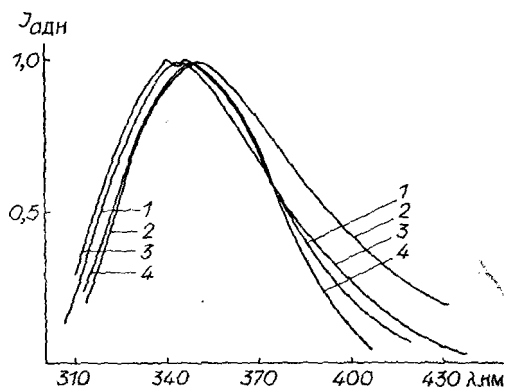
Растваральнік (20%-ныя растворы)	Стаяновішча $\lambda_{\max}$ (нм) для		$\lambda_{\max}^{СК} - \lambda_{\max}^{тр}$ , нм
	стрэптакіназы	трыптафану	
Этанол	277,5	279,5	-2
Гліцэрына	277,2	279,5	-2,3
Дыметылсульфаксід	276,0	279,8	-3,8
Дыаксан	277,0	279,5	-2,5
Глюкоза	276,2	278,8	-2,6
Фасфатны буфер, рН 7,0	276,9	279,2	-2,3

тыразіну і трыптафану былі роўнымі 5 : 1. Агульная колькасць астаткаў тыразіну, знойдзеная па даных спектрафотаметрычнага цітравання, адпавядала 21, што ўзгадняецца з данымі літаратуры. Знойдзеная колькасць трыптафану (4 моль) некалькі перавышае даныя літаратуры: 1—2 моль [3, 4].

**Спектры флуарэсценцыі.** У параўнанні са спектрам свабоднага трыптафану спектр натыйнай СК пры нейтральных значэннях рН зрушаны ў караткахвалеваю вобласць і мае даволі вялікую паўшырыню:  $\lambda_{\max} = 344$  нм,  $\Delta\lambda = 64$  нм (рыс. 3). 8 М мачавіна выклікае зрушэнне паласы флуарэсценцыі ў даўгахвалеваю вобласць з адначасовым яе пашырэннем ( $\lambda_{\max} = 353$  нм,  $\Delta\lambda = 68$  нм).

Найбольшы квантавы выхад флуарэсценцыі пры стабільнасці астатніх параметраў наглядаецца ў інтэрвале рН 5,5—8,5. Пры пераходзе ў кіслую і шчолачную вобласці квантавы выхад зніжаецца (рыс. 4) у выніку кіслота-шчолачнага тушэння флуарэсценцыі трыптафану. У вобласці ізаэлектрычнай кропкі СК (рН 4—5) наглядаецца пашырэнне і караткахвалевае зрушэнне спектраў флуарэсценцыі. Даўгахвалевае зрушэнне і памяншэнне паўшырыні пры рН больш чым 11,0 звязаны, відавочна, са шчолачнай дэнатурацыяй стрэптакіназы.

Пры змяненні палярнасці асяроддзя (20%-ныя растворы дыаксану, гліцэрыны) параметры флуарэсценцыі некалькі змяняюцца (рыс. 3). У 20%-ным дыаксане наглядаецца некаторае павелічэнне інтэнсіўнасці флуарэсценцыі, з'яўленне структуры ў спектры ( $\lambda_{\max} = 340$  нм,



Рыс. 3. Спектры флуарэсценцыі раствораў стрэптакіназы пры  $\lambda_{\text{узбудж}} = 296$  нм у фасфатным буферы, рН 7,0 (1), 8 М мачавіне (2), 20%-ным дыаксане (3), 20%-най гліцэрыне (4)

$\lambda_{\max 2} = 346 \text{ нм}$ ) і невялікае пашырэнне ( $\Delta\lambda = 66 \text{ нм}$ ). У 20%-най гліцэрыне адбываецца тушэнне флуарэсэнцы на 40%, даўгахвалевае зрушэнне ( $\lambda_{\max} = 348 \text{ нм}$ ) і памяншэнне паўшырыні да 59 нм. Відаць, арганічныя растваральнікі пранікаюць у месцы лакалізацыі трыптафанілаў без рэзкай перабудовы структуры макрамалекулы.

Для высвятлення пытання аб стане і даступнасці астаткаў трыптафану ў СК выкарыстан метада выбіральнага тушэння з дапамогай іонных ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) і нейтральнага (акрыламід) тушыльнікаў. Дабаўленне да раствору натыйнай СК катыёна Cs практычна не ўплывае на флуарэсцэнтныя якасці бялку (табл. 2). Пры рН 7,5 і 9,6 у прысутнасці 0,1 М CsCl інтэнсіўнасць флуарэсэнцы зніжаецца толькі на 5–8%.

Больш эфектыўнае тушэнне наглядаецца ў прысутнасці аніённага тушыльніка  $\text{NO}_3^-$  і нейтральнай малекулы акрыламіду. Пры канцэнтрацыі тушыльнікаў у раствору

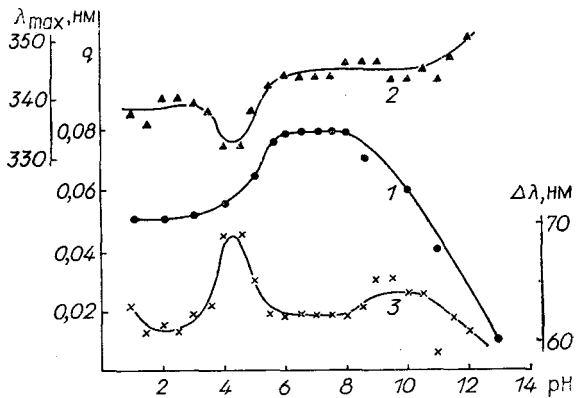


Рис. 4. Уплыў рН на параметры спектраў трыптафанавай люмінесценцы стрэптакіназы  $q$  (квантавы выхад) — 1,  $\lambda_{\max}$  — 2,  $\Delta\lambda$  — 3

0,1 М найменшая ступень тушэння складае 30% і наглядаецца для абодвух тушыльнікаў пры рН 3,0, а для  $\text{NO}_3^-$  і пры рН 9,6, найбольшая (85%) — для акрыламіду пры рН 9,6. Характар тушэння аніёнам дазваляе меркаваць, што трыптафанілы размешчаны паблізу дадатна заражанага ўчастка бялковай глобулы. Невысокая эфектыўнасць тушэння абодвума тушыльнікамі ў кіслай вобласці можа сведчыць аб кампактнасці бялковай глобулы пры рН 3,0. Пры рН 9,6 структура бялку, відаць, разрыхляецца і трыптафанілы становяцца больш даступнымі для акрыламіду, аднак агульны адмоўны зарад малекулы ў гэтых умовах, магчыма, зніжае эфектыўнасць нітрату натрыю.

Табліца 2

Тушэнне трыптафанавай флуарэсэнцы стрэптакіназы

Тушыльнік	K <sub>SV</sub> , М <sup>-1</sup> пры рН			Ступень тушэння* (%) пры рН		
	3,0	7,5	9,6	3,0	7,5	9,6
Cs <sup>+</sup>	0	0,5	0,3	0	5,0	8,0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,0	16,8	4,6	33,0	63,0	31,0
Акрыламід	4,0	7,4	38,0	28,0	42,0	85,0

\* Канцэнтрацыя тушыльніка ў раствору бялку — 0,1 М.

Атрыманыя даныя даюць падставу лічыць, што астаткі тыразіну знаходзяцца, верагодна, на паверхні малекулы СК паблізу ад моцна заражаных груп, а астаткі трыптафану — у дадатна заражаных участках макрамалекулы, хутчэй за ўсё, «карманах» паверхні СК.

Аўтары выказваюць падзяку С. В. Коневу і Л. Ф. Гладчанку за плённую дыскусію, В. М. Ткач — за ўзоры стрэптакіназы.

### Summary

The spectral luminescent properties of streptokinase have been studied. All the tyrosine residues are found to be ionized within one stage with ionization constant of 10.7. The state and availability of tryptophane residues have been investigated by the fluore-

science method in a wide range of pH (1—12) with addition of different extinguishers ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , acrylamide) and solvents of different polarities (dioxane, glycerol). Tryptophane residues are shown to be localized at positively charged sites of the globule, perhaps, in the «pockets» of the streptokinase molecule surface.

### Літаратура

1. Buck F. F., Boggiano E.—J. Biol. Chem., 1971, vol. 246, N 7, p. 2091—2096.
2. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа.—М.: Высшая школа, 1977.—280 с.
3. Taylor F. B., Botts J.—Biochemistry, 1968, vol. 7, N 1, p. 232—242.
4. Einarsson M., Skoog B., Forsberg B., Einarsson R.—Biochim. Biophys. Acta, 1979, vol. 568, N 1, p. 19—29.
5. Bilinski T., Loch T., Zakrzewski K.—Acta Biochim. Polon., 1968, vol. 15, N 1, p. 123—128.
6. Loch T., Bilinski T., Zakrzewski K.—Acta Biochim. Polon., 1968, vol. 15, N 1, p. 129—136.
7. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Демидчик Н. В., Казючич О. А.—У зб.: Энзимология тромболизиса и стрептокиназа. Мн., 1982, с. 47—53.
8. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr A. L., Randall R. J.—J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
9. Каневская М. И., Коников А. П.—У зб.: Детские капельные инфекции. Л.: Медгиз, 1953, с. 47—58.
10. Herskovits T. T., Laskowski M. I.—J. Biol. Chem., 1962, vol. 237, N 8, p. 2481—2492.
11. Бурштейн Э. А. Собственная флуоресценция белка. Природа и применение, т. 7 / Итоги науки и техники. Биофизика.—М.: Изд-во ВНИИТИ, 1977, с. 138.
12. Goodwin T. W., Morton R. A.—Biochem. J., 1946, vol. 10, N 4, p. 628—632.
13. Benze W. L., Schmid K.—Anal. Chem., 1957, vol. 29, N 8, p. 1193—1196.
14. Edelchoch H.—Biochemistry, 1967, vol. 6, N 7, p. 1948—1954.

Белорусский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии  
и микробиологии МЗ БССР

Поступила в редакцию  
06.01.84