

ISSN 0002—3558

ВЕСЦІ АКАДЭМІІ НАВУК БССР

СЕРЫЯ
БІЯЛАГІЧНЫХ
НАВУК

6

МІНСК НАВУКА І ТЭХНІКА

1986

УДК 577.152.4

*В. М. НИКАНДРАУ, Г. У. ВАРАБ'ЄВА, Г. С. ЯНКОУСКАЯ,
Н. С. ПЫЖОВА, Н. В. МІКУЦ*

ДАСЛЕДАВАННЕ СТАБІЛЬНАСЦІ СТРЭПТАКІНАЗЫ У РАСТВОРЫ ПРЫ ДЗЕЯННІ ДЭНАТУРЫРУЮЧЫХ ФАКТАРАУ

Даследаванне структурна-функцыянальнай спецыфікі, у тым ліку канфармацыйнай рухомасці стрэптакіназы — сінтэзуемага β -гемалітычнымі стрэптакокамі бялковага актыватара плазмінагену, надзвычай важна для расшыфроўкі фізіка-хімічных механізмаў рэгуляцыі фібрынолізу. Канфармацыйным асаблівасцям стрэптакіназы (СК) у літаратуры прысвечаны адзінкавыя паведамленні [1, 2]. Раней намі [3] было паказана, што пры нейтральным рН у водна-салявым растворе дру-

гасная структура гамагенных узораў СК прадстаўлена 41% неўпарадкаванага клубка, 24% α -спіралей, 19% β -выгібаў і 16% β -структур (пераважна антыпаралельных). Былі ўстаноўлены таксама змяненні другой гаснай структуры СК у залежнасці ад складу раствору [4]. У гэтай рабоце даследаван уплыў дэнатуруючых фактараў (зруху pH, мачавіны, награвання) на канфармацыйныя ператварэнні малекулы СК.

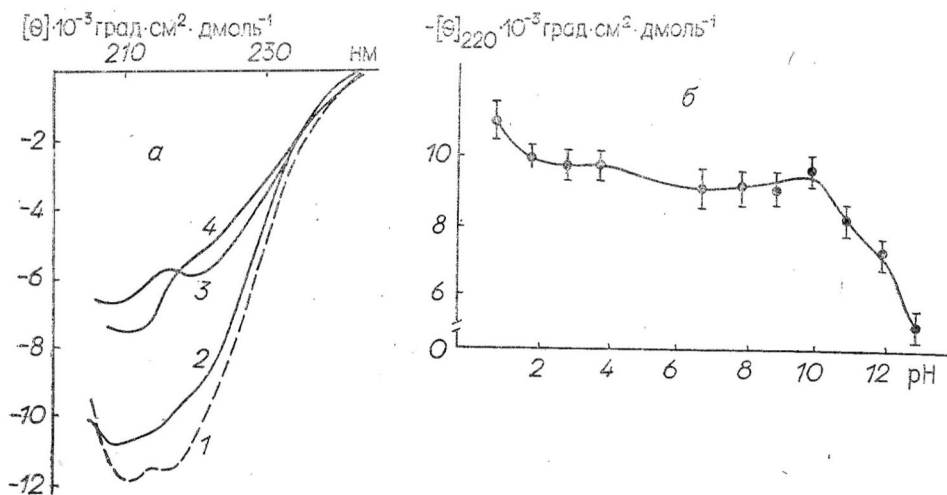
Матэрыялы і метады. У рабоце выкарыстана СК штама H46A, якая вылучана з культуральнай вадкасці шляхам сорбцыі на двухвокісу

Табліца 1. Залежнасць актыватарнай функцыі стрэптакіназы ад pH раствору (па лізісу фібрынавых пласцін)

pH	Удзельная актыватарнасць СК, тыс. МАдз/мг бялку	pH	Удзельная актыватарнасць СК, тыс. МАдз/мг бялку
1,0	47±4	8,0	98±7
2,0	99±7	9,0	99±5
3,0	100±10	10,0	93±9
4,0	102±7	11,0	94±7
5,0	93±7	12,0	89±7
6,0	98±6	13,0	62±6
07,0	100±7		

кремнію з элюцыяй 0,1 М растворам карбанату натрыю [5], наступнай храматаграфіі на ДЭАЭ-цэлюлозе ў хларыднай форме ў 0,05 М трыс-НСІ буферы pH 7,4 [6] з элюцыяй 0,3 М растворам хларыду натрыю, асаджэннем этанолам пры pH 5,0 і хларыдам натрыю ў канчатковай канцэнтрацыі 10% пры pH 2,0. У асобных доследах выкарыстоўвалі камерцыйны прэпарат СК-цэліазу, які дадаткова ачышчалі храматаграфіяй на ДЭАЭ-цэлюлозе, асаджэннем этанолам і соллю, як апісана вышэй. Атрыманыя ўзоры былі гамагенныя пры электрафарэзе ў поліакрыламідным гелі ў прысутнасці дадэцылсульфату натрыю і мелі ўдзельную актыватарнасць 100—120 тыс. МАдз/мг бялку. Канцэнтрацыю бялку вызначалі па велічыні $A_{280}^{1\%} = 8,8$ для СК [7], а таксама па метаду Лоуры [8], актыватарнасць СК — як апісана вышэй [9], а таксама па лізісу фібрынавых пласцін [10]. Для атрымання пласцін у чашках Петры на строга гарызантальнай паверхні змешвалі 9 мл 0,3%-нага раствору чалавечага фібрынагену, які змяшчаў плазмінаген, і 0,2 мл (100 адз/мл) раствору чалавечага трамбіну.

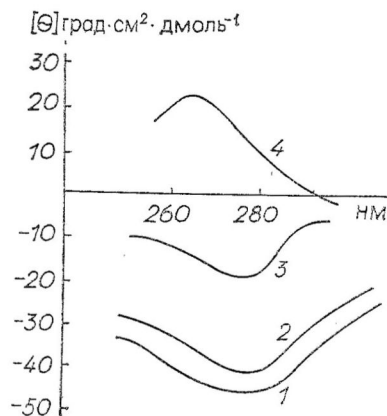
Спектры кругавога дыхраізму (КД) здымалі на спектрапаляры-



Рыс. 1. Змяненні спектраў КД стрэптакіназы ў «пептыднай» вобласці (а) і малярнай эліптычнасці (б) у залежнасці ад pH раствору (1 — pH 7,5; 2 — 1,5; 3 — 12,0; 4 — 12,5)

метры Jasco мадэль J-20 у інтэрвале даўжынь хваль 205—240 нм (канцэнтрацыя бялку 0,5 мг/мл, таўшчыня слоя 0,1 см, адчувальнасць 0,005°/см, скорасць сканіравання 0,5 см/мін, г. зн. 0,04 нм/с) і ў інтэрвале 250—350 нм (канцэнтрацыя бялку 1,2 мг/мл, таўшчыня слоя 1,0 см, адчувальнасць 0,002°/см, скорасць сканіравання 1,0 см/мін, г. зн. 0,08 нм/с). Велічыню малярнай эліптычнасці $[\theta]$ разлічвалі, беручы сярэдняю масу амінакіслотнага астатку роўным 133,6, зыходзячы з даных аб амінакіслотным складзе СК [11]. Прыбор калібравалі па D-пен-талактону [12]. Спектры трыптафанавай флуарэсцэнцыі СК здымалі таксама, як і раней [9]. Эксперыменты па нагрэву выкананы ў тэрмастатыраваных кюветах, ваганні тэмпературы не перавышалі 0,2°С. Неабходныя значэнні рН дасягалі, выкарыстоўваючы 0,06 М фасфатную або ацэтатную

Рис. 2. Уплыў рН раствору на характар спектраў КД стрэптакіназы ў «араматычнай» вобласці (1—рН 0,7; 2—2,3; 3—6,5 і 9,4; 4—11,7)



буферныя сістэмы або дабаўлялі канцэнтрыраваныя растворы HCl або NaOH.

Чалавечы фібрынаген (серы, якія змяшчалі плазімаген) і чалавечы трамбін былі айчынай вытворчасці, таксама, як і астатнія рэактывы маркі Х.ч., якія дадаткова шматразова перакрышталізавалі. Усе эксперыменты выкананы не менш чым 4-разова.

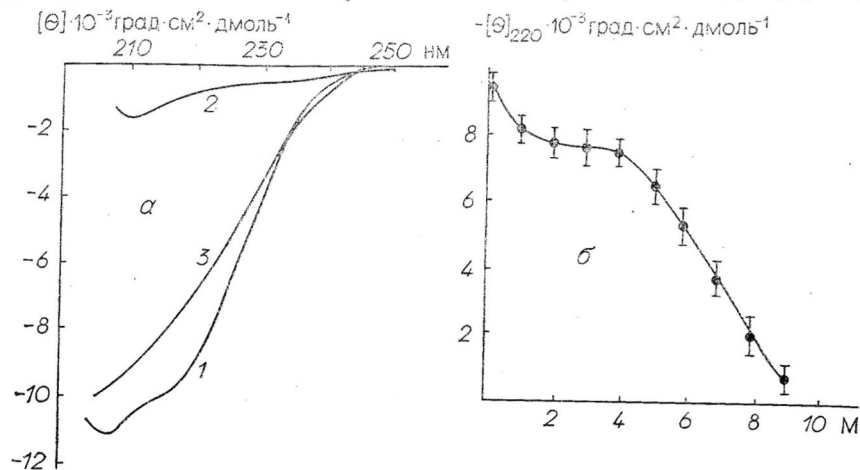
Вынікі і абмеркаванне. Спектр КД ачышчанага гамагеннага СК пры рН 7,0 адрозніваецца інтэнсіўнымі адмоўнымі палосамі з экстрэмумамі пры 206—210 і 218—220 нм, характэрнымі для α -спіралі, а таксама больш слабай адмоўнай паласой у бліжняй УФ-вобласці з экстрэмумам каля 275 нм (рыс. 1 і 2). Зрух рН ад 2 да 11 практычна не змяняе характар спектраў КД у «пептыднай» вобласці. У больш кіслым асяроддзі спіралізацыя малекулы ўзрастае, а пры рН больш чым 12 другая структура СК разбураецца (рыс. 1). У «араматычнай» вобласці спектры КД прыкметна змяняюцца ўжо ў дыяпазоне рН 2,3—6,5, што сведчыць аб перабудовах трацічнай структуры СК (рыс. 2). Пры рН больш чым 11 малярная эліптычнасць пераходзіць у вобласць дадатных значэнняў, назіраецца зрух максімуму спектра. Супастаўляючы гэтыя даныя з раней атрыманымі намі матэрыяламі аб уплыве рН на характар спектраў трыптафанавай флуарэсцэнцыі СК [9], можна мер-

Табліца 2. Уплыў мацывіны на параметры спектра флуарэсцэнцыі стрэптакіназы ($\lambda_{узбудж} = 296$ нм, канцэнтрацыя бялку 0,3 мг/мл, растваральнік — 0,06 М фасфатны буфер рН 7,4)

Канцэнтрацыя мацывіны, М	$\lambda_{тах}$, нм	$\Delta\lambda$, нм	$I_{адн}$
0	343	63	1,00
1	343	72	0,85
2	345	72	0,85
3	345, 350 плячо	72	0,80
4	347, 350 плячо	72	0,67
5	350	> 80	0,60
6	350	> 80	0,60
7	350	> 80	0,60
8	350	> 80	0,60

каваць, што пры рН 12 і больш малекула СК падвяргаецца тыпічным для бялковых структур дэнатурацыйным змяненням. У кіслым асяродзі другасная і трацічная структуры малекулы больш выражаны.

Раней намі [13] было выказана меркаванне аб магчымасці існавання функцыянальна актыўнай малекулы СК у двух канфармацыйных станах: у выглядзе кампактнай і стабільнай глобулы і глобулы разрыхленай, якая павялічана ў аб'ёме, менш стабільнай. У агульным выглядзе для бялковых глобул гэты ж пункт погляду (прамежкавы



Рыс. 3. Спектры КД стрэптакіназы ў «пептыднай» вобласці (а) і змяненне малярнай эліптычнасці (б) у залежнасці ад канцэнтрацыі мачавіны (1 — да дабаўлення мачавіны; 2 — пасля дабаўлення 8 М мачавіны; 3 — тое ж пасля дыялізу супраць фасфатнага буфера на працягу 12 гадз)

стан) выказан таксама ў [14]. Прамежкавы стан характарызуецца захаваннем другаснай структуры і разбурэннем трацічнай. Відаць, СК можа знаходзіцца ў такім стане пры рН 11—12. Аднак у адрозненне ад іншых бялкоў, як намі раней меркавалася [13], яна і ў лабілізаваным стане захоўвае свае актыватарныя ўласцівасці (табл. 1). Больш таго, нават рэзкія перабудовы другаснай структуры пры зруху рН не прыводзяць да поўнага знішчэння яе актыўнасці.

Уздзеянне мачавіны на малекулу СК, мяркуючы па даных спектраў КД у «пептыднай» вобласці, выклікае дзве перабудовы другаснай структуры. Ужо ў канцэнтрацыі 1 М мачавіна паніжае спіралізацыю малекулы (рыс. 3). Далейшая дэспіралізацыя назіраецца толькі пры канцэнтрацыі дэнатуранту больш чым 4 М. Гэтыя змены абарачальныя: дыяліз раствораў СК у мачавіне супраць 0,06 М фасфатнага буфера ўжо праз 12 гадз прыводзіць да значнага аднаўлення спектраў КД. Вывучэнне спектраў трыптафанавай флуарэсцэнцыі паказала, што ўжо ў канцэнтрацыі 1 М мачавіна прыкметна змяняе структуру СК (табл. 2), выклікаючы пры павелічэнні канцэнтрацыі дэнатуранту тыповыя для дэнатурацыі бялкоў зрухі параметраў флуарэсцэнцыі. Разбаўленне раствораў СК у мачавіне 0,06 М фасфатным буферам прак-

Табліца 3. Уплыў мачавіны на актыўнасць стрэптакіназы (па лізісу фібрынавых пласцін)

Канцэнтрацыя мачавіны, М	Актыўнасць стрэптакіназы		Канцэнтрацыя мачавіны, М	Актыўнасць стрэптакіназы	
	тыс. МАдз/мг бялку	% ад зыходнай		тыс. МАдз/мг бялку	% ад зыходнай
0	120±10	100	5	120±6	100
1	102±6	85	6	125±3	104
2	97±4	81	8	126±7	105
3	102±6	85			

тычна імгненна аднаўляе спектры флуарэсцэнцыі, характэрныя для натыўнага бялку. Мачавіна не змяняе актыватарную функцыю СК больш чым на 20% (табл. 3).

Нагрэў раствораў СК ад 10 да 80 °С практычна не ўплывае на характар спектраў КД у «пептыднай» вобласці. Пры нагрэванні да 40 °С велічыня малярнай эліптычнасці манатонна падае (табл. 4), а затым аж да 70 °С не змяняецца. Далейшы нагрэў СК да 90° прыводзіць да змены спектраў КД, якія падобныя да такіх пры ўздзеянні мачавіны.

Табліца 4. Залежнасць велічыні малярнай эліптычнасці спектраў КД стрэптакіназы і інтэнсіўнасці яе трыптафанавай флуарэсцэнцыі ад тэмпературы раствора

Тэмпература, °С	$[\theta]_{220} \cdot 10^{-3}$, град·см ² × × дмоль ⁻¹	$I_{адн}$	Тэмпература, °С	$[\theta]_{220} \cdot 10^{-3}$, град·см ² × × дмоль ⁻¹	$I_{адн}$
15	10,2	1,0	50	8,2	0,7
20	9,5	1,1	60	7,9	0,5
30	8,7	0,9	70	7,9	0,4
40	8,2	0,8	80	7,2	0,3

У спектрах флуарэсцэнцыі пры нагрэве ад 20 да 80° назіраецца манатоннае падзенне інтэнсіўнасці флуарэсцэнцыі і павелічэнне паўшырыні. Ахаладжэнне раствораў СК да 20° не прыводзіць да аднаўлення зыходнай паўшырыні спектраў. Інкубацыя раствораў СК пры 80 і 90° праз 2 гадз выклікае страту актыватарнай функцыі на 40 і 70% адпаведна.

Зыходзячы з атрыманых матэрыялаў, можна меркаваць, што нават значныя перабудовы структуры СК, якія рэгіструюцца выкарыстанымі намі метадамі, не прыводзяць да страты ёй спецыфічнай актыўнасці. Гэтым можна ўскосна пацвердзіць наша дапушчэнне аб тым, што малекула СК мае вобласці (дамены), пры гэтым вобласць, якая вызначае яе актыватарную функцыю, устойлівая да рада пашкоджальных уздзеянняў [15, 16]. Акрамя таго, калі СК з'яўляецца бялком, для якога магчымы прамежкавы стан, пераход у апошні, відаць, не прыводзіць да страты актыўнасці.

Summary

Some changes in the spatial streptokinase structure were revealed with the circular dichroism method and tryptophan fluorescence technique at the shifted pH of the solution (1—13) under the influence of urea and heating from 10 to 90 °C. At pH 11—12, the streptokinase globule was supposed to be in intermediate state. In the presence of urea (1—8 M) at pH above 12, tertiary and secondary streptokinase structures appear destroyed but the streptokinase activity is not eliminated. The action of urea, but not of high temperature, is reversible.

Літаратура

1. Loch T., Bilinski T., Zakrzewski K. Acta Biochim. Polon. 1968, Vol. 15, N 1. P. 129—136.
2. Brockway W. J., Castellino F. J. // Biochemistry, 1974. Vol. 13, N 10. P. 2063—2070.
3. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Демидчик Н. В. // VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов: Тез. докл. Рига, 1983. С. 194—195.
4. Nikandrov V. N., Vorobuova G. V., Garbuz N. I., Golubovich V. P. // Final Programme and book of abstracts: 8th Intern. Biophysic. Congress, 29 July—4 August 1984. Bristol, 1984. P. 66.
5. Ткач В. М., Карезо Н. В., Постоянова Н. И. и др. // Энзимология тромболитиса и стрептокиназа: Материалы республ. симпоз. Минск, 1982. С. 86—89.
6. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 364 с.
7. Kirschenbaum D. M. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 68. P. 465—484.
8. Lowry O. H., Rosebrough N., Farr A. L., Randall R. J. // Biol. Chem. 1951, Vol. 193, N 1. P. 265—275.

9. Нікандраў В. М., Вараб'ёва Г. У. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1984. № 5. С. 74—78.
10. Андрееенко Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М., 1981. 132 с.
11. Morgan F., Henschen A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 181, N 7. P. 93—104.
12. Tuzimura K., Konno T., Meguro H. et al. // Anal. Biochem. 1977. Vol. 81, N 1. P. 167—174.
13. Никандров В. Н. // Энзимология тромболитизиса и стрептокиназа. Минск, 1982. С. 23—34.
14. Птицын О. Б., Долгих Д. А., Гильманшин Р. И. и др. // Молекуляр. биол. 1983. Т. 17, № 3. С. 569—577.
15. Nikandroу V. N., Votyakov V. J., Vorobyova G. V. // 3rd Sympos. Soc. Countries on Biotechnology. Abstracts. Bratislava, 1983. A2-36.
16. Никандров В. Н., Казючич О. А. // Микроорганизмы-продуценты биологически активных веществ: Тез. докл. конф. Рига, 1984. С. 87.

*Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии МЗ БССР,
Институт биоорганической химии
АН БССР*

*Поступила в редакцию
03.12.85*