Минский ордена Трудового Красного Знамени
государственный медицинский институт

БАРКОВСКИЙ Евгений Викторович

УДК 612.115.12

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ α-ТРОМБИНА И МЕХАНИЗМЫ ЕГО ЛИМФОЦИТ-ОПОСРЕДОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ

03.00.04 Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Минск - 1987

О Г Л А В Л Е Н И Е

стр.

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИЯХ ТРОМБИНА I8

§I. Общая характеристика протромбина и молекулярные механизмы образования тромбина ,,..... I8

§2. Тромбин как представитель семейства сериновых протеиназ 29

§3. Клеточно-опосредованные реакции α-тромбина 38

ГЛАВА II. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ 47

ГЛАВА III. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПРЕДСКАЗАНИЯ СТРУКТУРНОГО КЛАССА, ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ α-ТРОМБИНА И ЕГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ α-ТРОМБИНА 67

§I. Состояние проблемы и постановка задачи 67

§2. Разработка методов предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности 74

§3. Предсказание структурного класса и вторичной структуры тромбина и его предшественников. Структурные основы специфичности тромбина III

§4. Заключение I4I

ГЛАВА IУ. СОСТОЯНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТРОМБИН-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ .. I47

§I. Введение и постановка задачи I47

§2. Влияние α-тромбина на синтез и экскрецию ДНК лимфоцитами I49

§3. О биологической роли экстраклеточной ДНК I64
§4. Влияние α-тромбина на синтез РНК и белка в лимфоцитах селезенки мыши I73
§5. Роль ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов в активации биосинтетических процессов в лимфоцитах селезенки мыши α-тромбином I86
§6. Заключение I96
ГЛАВА У. РОЛЬ ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ МЕМБРАН И ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ α-ТРОМБИНА В АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ 205
§I. Состояние проблемы и постановка задачи 205
§2. Морфологические и электрокинетические изменения тромбин-стимулированных лимфоцитов 209
§3. Холестерин и фосфолипидный состав лимфоцитов 2I4
§4. Физическое состояние липидов мембран лимфоцитов .. 220
§5. Влияние α-тромбина на перекисное окисление в лимфоцитах 229
§6. Изменение активности мембраносвязанных ферментов при активации лимфоцитов α-тромбином 230
§7. О возможности внутриклеточного действия α-тромбина при стимуляции лимфоцитов 233
§8. Заключение 238
ГЛАВА УI. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 245
ВЫВОДЫ 270
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 275

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АНС – 1-анилино-нафталин-8-сульфонат

ГДА – 9-гексадециламиноакридин гидрохлорид

ДДА – 9-додециламиноакридин гидрохлорид

ДФГТ – 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен

ИОП – интегральная оптическая плотность

КР – комбинационное рассеяние

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

ПДК – 10-пирендекановая кислота

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РОК – розеткообразующая клетка

СМ – сфингомиелин

СОП – средняя оптическая плотность

ФГА – фитогемагглютинин

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ФНА – *N* -фенил-1-нафтиламин

ФХ – фосфатидилхолин

цАМФ (цГМФ) – циклический аденозин (гуанозин)-монофосфат

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ЭК-ДНК – экстраклеточная ДНК

L -ЭК-ДНК – экстраклеточная ДНК тромбин-стимулированных лимфоцитов

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭФП – электрофоретическая подвижность

В В Е Д Е Н И Е

А к т у а л ь н о с т ь п р о б л е м ы. Проблемы, связанные с изучением молекулярных механизмов активации и функциональной активности иммунокомпетентных клеток, занимают центральное место в биохимии, иммунологии и молекулярной биологии. Знание механизмов митотической стимуляции лимфоцитов является основой для понимания нормального иммунного ответа и иммунопатологии. В более обширном плане активация лимфоцитов - одна из немногих удобных моделей для изучения регуляции процессов роста и пролиферации животных клеток.

До последнего времени самой распространенной моделью для изучения механизмов активации клеток служили культивируемые лимфоциты, обработанные такими митогенами, как растительные лектины, бактериальные антигены, липополисахариды, окислители и некоторые ионы. В настоящее время большое значение придается постоянно присутствующим в организме человека и животных веществам биологического происхождения, которые способны активировать как сам процесс иммуногенеза, так и развитие иммунологических реакций при различных состояниях организма. Эта проблема имеет большое теоретическое и практическое значение для научно-обоснованной разработки методов и средств, способствующих усилению или ослаблению гуморальных и клеточных реакций иммунитета.

Осознание протеолиза как особой формы биологического контроля вызвало большой интерес к изучению протеолитических ферментов (21, 74, 75). Понимание регуляторной функции протеолитических ферментов имеет принципиальное значение как для расшифровки механизмов сложнейших биологических процессов, таких как деление

и трансформация клеток, морфогенез, метаморфоз, адаптационная перестройка обмена и т.д., так и для выяснения молекулярных основ патологии. Уже сейчас ясно, что нарушение функций протеолитических ферментов лежит в основе многих патологических состояний (75).

Предметом нашего исследования является тромбин (КФ 3.4.2I.5) - представитель семейства трипсина класса сериновых протеиназ. Являясь ключевым ферментом системы свертывания крови, тромбин с высокой специфичностью катализирует гидролиз фибриногена до фибрин-мономеров, которые полимеризуются в фибрин - основу кровяного сгустка. На выяснение причин тромботических осложнений при сердечно-сосудистых и других заболеваниях, а также основных закономерностей физиологической регуляции гемостаза направлены усилия современной физиологии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии (3,II,26,40,4I,57,62,III,I24,I55,I99). Помимо фибриногена тромбин осуществляет ограниченный протеолиз некоторых белков крови: активирует факторы У, УШ и ХШ, расщепляет протромбин до претромбина I, активирует белок С в форму, инактивирующую факторы Уа и УШ а и способствующую освобождению тканевого активатора плазминогена (I99). Природа высокой специфичности тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам, несмотря на значительные успехи в этой области (I02-I05, II0,III), не выяснена к началу настоящей работы и представляется весьма актуальной задачей. Это обусловлено, в первую очередь, отсутствием кристаллографических данных о пространственной организации тромбина и его высокомолекулярных субстратов.

Поскольку между генетически предопределенной первичной структурой белка и его пространственным строением существует

однозначное соответствие,то в принципе можно установить его структуру по аминокислотной последовательности без рентгеноструктурного анализа. Первым этапом в этом направлении может служить тщательное исследование взаимосвязи между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белков (70, 71, 95, 179, 180). Поэтому разработка корректного алгоритма предсказания вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности является актуальной как с точки зрения установления взаимосвязи между двумя низшими уровнями структурной организации белков, так и последующего предсказания вторичной структуры тромбина и его белковых субстратов, что, несомненно, будет способствовать более глубокому пониманию структурных основ высокой специфичности α-тромбина.

К настоящему времени накоплен обширный материал, свидетельствующий о том, что биологическая роль тромбина не ограничивается его участием в обеспечении локального гемостаза. Этот фермент дает ряд гормоноподобных эффектов и выступает в роли важного физиологического регулятора многих внутриклеточных процессов: репликации ДНК, синтеза РНК и белков, пролиферации и миграции клеток, обмена веществ и т.д. (58, 83).

Впервые идея о существовании специфических рецепторов к тромбину на поверхности клеток (эндотелиоцитов) была выдвинута Б.А.Кудряшовым (261). Эта идея впоследствии легла в основу современной концепции о физиологической противосвертывающей системе (59). В дальнейшем было показано, что, наряду с клетками эндотелия сосудов, специфические рецепторы к тромбину имеются также на поверхности фибробластов (141, 300).

К началу 80-х годов мы уже располагали некоторой информа-

цией о совокупности биохимических реакций, инициируемых взаимодействием тромбина с рецепторами фибробластов (I4I, I70, 220, 300, 336) и тромбоцитов (362).

В то же время оставалась невыясненной возможность наличия специфических рецепторов к тромбину на поверхности иммунокомпетентных клеток. Интерес к этому вопросу обусловлен тем, что в течение последних лет в литературе стали накапливаться факты, свидетельствующие о тесном сопряжении иммунных и гемостатических процессов (64, I30, I33). Так, искусственные иммунодефекты, созданные у животных и птиц удалением тимуса или сумки Фабрициуса, сопровождаются повышением коагуляционных и снижением фибринолитических свойств крови, что приводит к тромбофилическим состояниям и служит причиной их низкой резистентности в различных стрессовых ситуациях (I3I). В литературе также широко обсуждается вопрос о сопряжении сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и иммуногенеза (I35, 65, I33). Изучение связующих звеньев между гемостазом и иммунитетом является, таким образом, актуальной научной проблемой, так как расшифровка их механизмов позволит целенаправленно корригировать как реакции иммунологической защиты, так и реакции гемостаза при различных состояниях организма. Однако механизмы сопряжения гемостатических и иммунологических реакций расшифрованы лишь отчасти.

С позиций гипотезы о существовании в организме животных и человека иммунного механизма регуляции ферментативного гомеостаза в системе свертывания крови (I29), предусматривающей специфическое взаимодействие активных факторов свертывания с иммунокомпетентными клетками, можно предположить, что взаимодействие тромбина с лимфоцитами является одним из важнейших звеньев

сопряжения между гемостазом и иммуногенезом.

Однако, к началу наших исследований в литературе практически отсутствовали какие-либо сведения о взаимодействии тромбина с иммунокомпетентными клетками. Специалисты в области гемостазиологии и иммунологии не уделяли внимания этому вопросу вплоть до 1982-1983 годов. Хотя к настоящему времени данные о влиянии тромбина на функциональную активность уже известны (63, 78-80), в литературе, однако, эта взаимосвязь совсем не получила объяснения на языке биохимии и биофизики. Поэтому как в теоретическом, так и практическом отношениях целесообразно изучение молекулярных механизмов взаимодействия тромбина с иммунокомпетентными клетками. Наиболее удобной моделью для таких исследований ин витро представляется взаимодействие тромбина с лимфоцитами. Выбор в качестве объекта исследования лимфоцитов обусловлен тем, что эти клетки, выполняя функцию иммунологического надзора, имеют также уникальную гемостатическую характеристику (219, 269, 322, 346).

Ц е л ь ю н а с т о я щ е й р а б о т ы являлось следующее: предложить вероятную модель вторичной структуры молекулы тромбина и на ее основе проанализировать структурные аспекты высокой специфичности тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам и рецепторам клеток; выяснить роль липидной матрицы мембран в активации лимфоцитов тромбином; оценить состояние макромолекулярных биосинтетических процессов в тромбин-стимулированных лимфоцитах. На основании полученных данных разработать схему активации лимфоцитов тромбином.

О с н о в н ы е з а д а ч и р а б о т ы: исходя из вышеизложенного, конкретные задачи исследования могут быть сформули-

рованы следующим образом:

I. Разработать алгоритмы предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков по аминокислотной последовательности и на их основе предсказать вторичную структуру тромбина.

2. Выявить структурные особенности молекулы тромбина (на уровне элементов вторичной структуры), ответственные за проявление высокой функциональной специфичности по отношению к высокомолекулярным субстратам.

3. С учетом возможного рецепторного взаимодействия тромбина с лимфоцитами изучить:

а) текучесть липидной фазы мембран лимфоцитов;

б) фосфолипидный состав, жирнокислотный состав фосфолипидов и холестерин лимфоцитов;

в) активность мембраносвязанных ферментов;

г) перекисное окисление липидов.

4. Оценить влияние тромбина на ДНК-, РНК- и белок-синтетическую активность лимфоцитов.

5. Выявить возможную роль ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов во взаимодействии тромбина с лимфоцитами.

6. В плане анализа механизма действия тромбина исследовать возможность его интернализации лимфоцитами.

Научная новизна. На основании учета парных корреляций между соседними остатками белков с известным пространственным строением разработаны новые алгоритмы предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности, которые дают гораздо луч-

шее соответствие результатов предсказания с данными рентгеноструктурного анализа по сравнению со всеми другими теоретическими методами предсказания. Используя разработанные алгоритмы, предложена вероятная модель вторичной структуры молекулы тромбина. Выявлена гомология в расположении элементов вторичной структуры В-цепей α-тромбина и α-химотрипсина, что позволило выдвинуть предположение о сходной в общих чертах пространственной организации этих белков. В то же время, конформационное состояние остатков, образующих систему переноса заряда в молекуле тромбина (His 43, Asp 99 и Ser 205), по данным теоретического предсказания значительно отличается от состояния аналогичных остатков в молекулах гомологичных сериновых протеиназ, что является, вероятно, одним из факторов снижения реакционной способности тромбина по отношению к низкомолекулярным субстратам. Эффективному катализу макромолекулярных субстратов тромбина (фибриноген, антитромбин Ш, протромбин и фактор ХШ) способствует наличие слева от тромбин-чувствительной связи гидрофобного кластера, который, по-видимому, осуществляет дополнительное гидрофобное экранирование Asp I99 тромбина.

Согласно полученным данным дополнительный центр связывания высокомолекулярных субстратов, обусловливающий высокую специфичность тромбина к некоторым белкам свертывающей системы крови и рецепторам клеток формируется структурами, расположенными на участке 47-73 В-цепи.

Анализ аминокислотной последовательности В-цепи α-тромбина свидетельствует о том, что в ее составе имеется трипептид Arg - Gly - Asp и тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr , которые являются частью связывающего сайта в молекулах ря-

да белков (фибронектин, фибриноген, коллаген и т.д.) и гормонов (тиреотропин, хорионический гонадотропин и т.д.). Показана принципиальная возможность пространственного сближения этих двух участков полипептидной цепи и выдвинуто предположение об их участии в формировании детерминант для рецепторного связывания α-тромбина со специфическими рецепторами клеток.

Продемонстрировано, что α-тромбин, действуя как протеолитический фермент, активирует синтез ДНК и белка в лимфоцитах селезенки мыши. Основным изменением метаболизма РНК на ранних этапах тромбин-индуцированной активации лимфоцитов является накопление в цитоплазме новосинтезированной РНК, обусловленное, по-видимому, ускорением процессинга и ядерно-цитоплазматического транспорта, а не усилением транскрипционной активности.

Актиномициновый и кордицепиновый блоки полностью отменяют активирующее влияние α-тромбина на синтез белка и накопление новосинтезированной РНК в лимфоцитах. Эти данные служат аргументом в пользу представлений о том, что регуляторные механизмы тромбин-индуцируемой активации лимфоцитов находятся как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях.

Выдвинуто положение о биологической целесообразности пролиферации лимфоцитов под влиянием α-тромбина как реакции, создающей неспецифическую защиту в локальной области раны еще до мобилизации специфического и гуморального механизмов.

Получены доказательства иммуностимулирующего действия экскретируемой тромбин-стимулированными лимфоцитами ДНК, что позволило выдвинуть предположение о регуляции функциональной активности иммунокомпетентных клеток ростстимулирующими дезоксинуклеопротеидами, выделяющимися во внеклеточную среду в процессе жизне-

деятельности клеток.

Под влиянием α-тромбина наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации свободного цитоплазматического кальция, цитозольного кальмодулина и цГМФ. Верапамил и трифторперазин полностью отменяют стимулирующее действие α-тромбина на синтез ДНК, РНК и белка в лимфоцитах. Полученные данные позволили выдвинуть положение о том, что в тромбин-индуцируемую активацию лимфоцитов вовлечены кальций-кальмодулиновая система и цГМФ-зависимые механизмы.

Методами зондовой флуоресценции и ЭПР-спектроскопии установлено, что под влиянием α-тромбина происходит структурная перестройка мембран лимфоцитов, проявляющаяся увеличением текучести их липидной компоненты. Изменение физического состояния липидной фазы мембран в тромбин-стимулированных лимфоцитах не сопровождается изменением полярности бислоя.

На основании анализа жирнокислотного состава общих фосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина клеточных мембран интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов показана ведущая роль в индукции митогенеза увеличения содержания полиненасыщенных жирных кислот, по-видимому, обусловленного активацией оборота ацильных цепей фосфолипидов, катализируемого ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазой.

Показано, что свое воздействие на лимфоциты α-тромбин оказывает не только трансмембранно, но и поступая внутрь лимфоцитов путем интернализации и дальнейшей транслокации в ядра клеток, где его возможной мишенью, вероятно, являются гистоны.

Научно-теоретическая и практическая значимость. Результаты настоящей работы

имеют существенное научно-теоретическое значение, так как раскрывают новые аспекты строения и структурных основ высокой специфичности α-тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам, а также механизмов его клеточно-опосредованных эффектов.

На основании обширного экспериментального материала предлагается схема активации лимфоцитов α-тромбином. Согласно ей, одной из возможных функций α-тромбина является непосредственное участие в регуляции метаболической активности лимфоцитов. α-Тромбин контролирует основные характеристики лимфоцитов, включая синтез ДНК, РНК, белка, функционирование мембран, концентрацию ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов, определяющих функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

Результаты работы не только раскрывают закономерности взаимодействия α-тромбина с лимфоцитами, но и могут служить базой для разработки дальнейших исследований прикладного характера, связанных с выяснением механизмов регуляции функционального состояния иммунокомпетентных клеток в условиях повышенного содержания протеиназ в окружающей среде при различных состояниях организма.

По методическим разработкам, используемым в работе, получены 2 авторских свидетельства на изобретения, которые внедрены в Центральном ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови МЗ СССР и Минском ордена Трудового Красного Знамени государственном медицинском институте.

Результаты работы, касающиеся влияния α-тромбина на экскрецию ДНК и содержание в лимфоцитах ионов Ca^{2+} и циклических

нуклеотидов, внедрены в исследования по изучению внеклеточной ДНК и циклических нуклеотидов плазмы крови и инкубационной среды ядерных клеток крови и костного мозга в связи с гематологическими заболеваниями и криоконсервированием лейкоцитов человека, проводимые в Центральном ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови МЗ СССР.

Результаты настоящей работы, опубликованные в периодической печати, используются в курсах лекций по биоорганической и биологической химии, а также по гематологии и трансфузиологии в ряде учебных заведений биологического и медицинского профиля (I Московский медицинский институт им. И.М.Сеченова, Минский государственный медицинский институт, Гродненский медицинский институт, Белорусский государственный институт усовершенствования врачей).

А п р о б а ц и я р а б о т ы. Отдельные части работы были доложены и обсуждены: на У Биохимической конференции Прибалтийских республик и Белорусской ССР (Таллин,I976); Ш Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков,I977); научной сессии "Теоретические и практические вопросы гематологии и переливания крови" (Минск, I982); секции "Биохимия крови" Московского отделения Всесоюзного биохимического общества АН СССР (Москва,I986); Ш Республиканском съезде врачей-лаборантов (Минск,I986); Всесоюзной конференции "Актуальные проблемы гемостаза в клинической практике" (Москва,I987); УП съезде Белорусского физиологического общества им. И.П.Павлова (Витебск, I987).

П у б л и к а ц и и п о т е м е д и с с е р т а ц и и.

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ. Имеются 2 авторских свидетельства на изобретения.

С т р у к т у р а и о б ъ е м р а б о т ы. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, библиографического указателя, содержащего I37 отечественных и 233 иностранных названий. В I главе приведен аналитический обзор по исследуемой проблеме, во П - дано обоснование применяемых методических подходов, в Ш - приводятся данные теоретического предсказания вторичной структуры α-тромбина, рассматриваются структурные основы (на уровне элементов первичной и вторичной структур) его высокой специфичности по отношению к высокомолекулярным субстратам и рецепторам клеток, в IУ - описываются результаты, характеризующие состояние макромолекулярных биосинтетических процессов в тромбин-стимулированных лимфоцитах, в У - исследуется структурное и функциональное состояние мембран тромбин-стимулированных лимфоцитов. УI глава посвящена обсуждению результатов исследования и обобщению представлений о структурных основах высокой специфичности α-тромбина и механизмах его взаимодействия с лимфоцитами.

Данные диссертации сведены в 50 таблиц и иллюстрированы 34 рисунками. Диссертация напечатана на 3I8 стр., содержание изложено на 205 стр.

На защиту выносятся следующие положения:

I. Вероятная модель вторичной структуры α-тромбина.

2. Структурные основы (на уровне первичной и вторичной структур) высокой специфичности α-тромбина по отношению к макромолекулярным субстратам и рецепторам клеток.

3. Природа структурной и функциональной реорганизации мемб-

ран при активации лимфоцитов α-тромбином.

4. Вовлечение систем Ca^{2+} - кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов в активацию лимфоцитов α-тромбином.
5. Иммуностимулирующее и тромбоцитагрегирующее действие экскретируемой лимфоцитами ДНК.
6. Схема активации лимфоцитов α-тромбином.

О Б З О Р Л И Т Е Р А Т У Р Ы

Г Л А В А I

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИЯХ ТРОМБИНА

§I. Общая характеристика протромбина и молекулярные механизмы образования тромбина.

Протромбин человека представляет собой гликопротеид с молекулярной массой 7I600 Да (274). Первичная структура протромбина человека была установлена в конце 70-х годов (I68,358) и представлена на рис. I. Анализ аминокислотной последовательности протромбина позволил предположить наличие структурных доменов в молекуле. Так, N -концевая часть молекулы протромбина содержит гомологичные области аминокислотных последовательностей (остатки 66-I44 и I7I-249), образующие петли с гомологичным расположением трех дисульфидных связей (236). Наличие внутренней гомологии навело на предположение о частичном удвоении гена во время эволюции протромбина (358).

Определение вторичной структуры протромбина методом кругового дихроизма указывает на наличие 8-I4% α-спиральной, I5-36% β-структурной и 50-77% нерегулярной конформации (I0,I57).

Сведения о структурном классе, расположении элементов вторичной структуры в цепи и трехмерной структуре молекулы протромбина отсутствуют до сих пор.

Во время свертывания крови образование тромбина происходит путем каталитического превращения протромбина фактором Ха. Фактор Уа является кофактором, ускоряющим действие фактора Ха на протромбин (3I9). В этой реакции субстрат (протромбин) и фер-

1	Ala	Asn	Thr	Phe	Leu	GLA	GLA	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu	GLA	Arg
16	GLA	Cys	Val	GLA	GLA	Thr	Cys	Ser	Tyr	GLA	GLA	Ala	Phe	GLA	Ala
31	Leu	GLA	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Lys	Tyr	Thr
46	Ala	Cys	Glu	Thr	Ala	Arg	Thr	Pro	Arg	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Cys
61	Leu	Glu	Gly	Asn	Cys	Ala	Glu	Gly	Leu	Gly	Thr	Asn	Tyr	Arg	Gly
	CHO														
76	Asn	Val	Ser	Ile	Thr	Arg	Ser	Gly	Ile	Glu	Cys	Gln	Leu	Trp	Arg
										CHO					
91	Ser	Arg	Tyr	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Ile	Asn	Ser	Thr	Thr	His	Pro
106	Gly	Ala	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ser	Ser
121	Ile	Thr	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Ala	Arg	Arg
136	Gln	Glu	Cys	Ser	Thr	Pro	Val	Cys	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Thr	Val
151	Met	Val	Thr	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Pro
166	Pro	Leu	Glu	Gln	Cys	Val	Pro	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	Tyr	Gln	Gly
181	Arg	Leu	Ala	Val	Thr	Thr	His	Gly	Leu	Pro	Cys	Leu	Ala	Trp	Ala
196	Ser	Ala	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	His	Gln	Asp	Phe	Asn	Ser
211	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp
226	Glu	Glu	Gly	Val	Trp	Cys	Tyr	Val	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe
241	Gly	Tyr	Cys	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Val	Glu	Glu	Glu
256	Thr	Gly	Asp	Gly	Leu	Asp	Glu	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Ile
271	Glu	Gly	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro
286	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asn	Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu
301	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu
316	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	Asn	Ala	Glu
331	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu					
341	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile
356	Ser	Asn	Arg	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro
					CHO										
371	Pro	Trp	Asn	Lys	Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile
385	Gly	Lys	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser
401	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu
416	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val
431	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asn	Arg	Glu
446	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr
461	Gly	Tyr	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	Thr	Val	Thr	Ala	Asp	Val	Gly	Lys
476	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Ala	Leu	Val	Gln
491	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	Ile	Thr	Asp	Asn
506	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Asp
521	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro
536	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu
551	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
566	Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu

Рис. I. Первичная структура молекулы протромбина человека (I68, 358).

мент (фактор Ха) подвергаются кальций-зависимой ассоциации с фосфолипидной поверхностью мембран (I98). Благодаря такому специфическому механизму концентрирования субстрата вблизи фермента, обеспечивается достаточная скорость реакции между ними (9).

Современная схема протеолитической фрагментации протромбина при тромбиногенезе была сформулирована благодаря обширным исследованиям, выполненным в ряде лабораторий (I09,II2,II3,II5, 273,275,282,328,34I). Активация протромбина в организме начинается фактором Ха. Этот фактор расщепляет в молекуле протромбина две пептидные связи. Связь Arg 273- Thr 274 расщепляется первой и это приводит к образованию претромбина 2 и освобождению "про" конца протромбина - фрагмента I·2. В дальнейшем фактор Ха расщепляет связь Arg 322- Ile 323, что приводит к образованию из претромбина 2 α-тромбина, состоящего из А-цепи (остатки 274-322) и В-цепи (остатки 323-58I). Тромбин также расщепляет в молекуле протромбина человека две связи. Фрагмент I·2 содержит чувствительную к действию тромбина связь Arg I55- Ser I56. Поэтому он недолговечен и распадается под действием тромбина на фрагмент I (остатки I-I55) и фрагмент 2 (остатки I56-273). При расщеплении же этой связи в молекуле протромбина образуется фрагмент I и претромбин I (остатки I56-58I). Протромбинпревращающий комплекс не способен эффективно активировать претромбин I, так как в нем отсутствуют кальций-связывающие сайты, обеспечивающие связь с фосфолипидной поверхностью. Таким образом тромбин вызывает "инактивацию протромбина", превращая его в претромбин I. Этот механизм саморегуляции количества тромбина, образующегося при свертывании, назван отрицательной тромбиновой петлей регуляции свертывания (II8,273). В молекуле челове-

ческого претромбина 2 происходит расщепление второй чувствительной к действию тромбина связи Arg 286- Thr 287, что в конечном итоге приводит к генерации устойчивой формы тромбина, содержащей укороченную А-цепь с N-конца на I3 аминокислотных остатков (359).

Схематически образование продуктов активации протромбина человека под влиянием фактора Ха и тромбина представлено на рис. 2.

Рассмотрим в отдельности различные продукты активации протромбина человека.

а) Фрагмент I протромбина. Фрагмент I протромбина человека образуется из нетромбиновой области молекулы и соответствует остаткам I-I55. Одной из самых важных особенностей первичной структуры фрагмента I является наличие в нем остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты, образующейся в результате пострибосомальных синтетических модификаций при участии витамина К (34I). Эти остатки необходимы для связывания ионов Ca^{2+} не только протромбином, но и другими витамин К-зависимыми белками (34I).

Результаты кругового дихроизма (I57) и калориметрии (306) протромбина и продуктов его активации свидетельствуют о том, что фрагмент I, фрагмент 2 и претромбин 2 существуют как относительно некооперативные структурные домены внутри молекулы протромбина.

Определение вторичной структуры фрагмента I протромбина человека методом КД свидетельствует о наличии в его молекуле 6% α-спиральных, 3I% β-структурных и 63% нерегулярных участков (I57).

Фрагмент I протромбина быка подвергнут кристаллографичес-

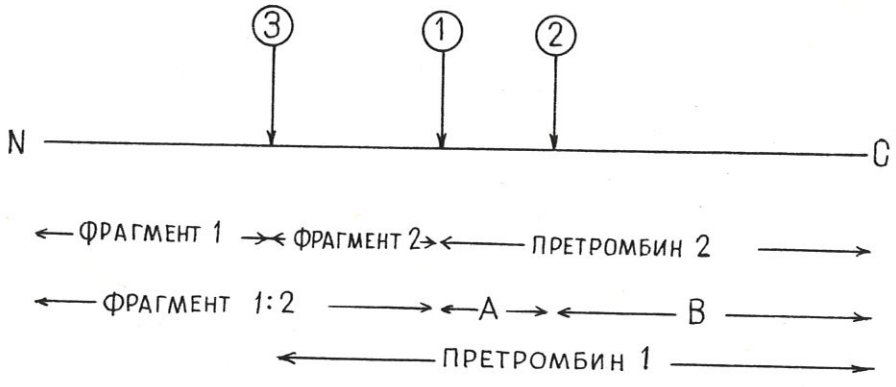


Рис. 2. Схематическая структура протромбина.
I и 2 - пептидные связи, расщепляемые активированным фактором Ха ;
3 - пептидная связь, расщепляемая α-тромбином ;
A и B - цепи α-тромбина, связанные дисульфидной связью.

кому исследованию (294). Рентгеноструктурный анализ показал, что молекула фрагмента I состоит из двух доменов, разделенных щелью. Карты электронной плотности свидетельствуют о том, что молекула фрагмента I содержит очень мало участков с вторичной структурой (294).

Функция фрагмента I, как кальций-зависимого фосфолипидсвязывающего сегмента молекулы протромбина (I40), не является единственной в процессе свертывания крови. Так, фрагмент I способен тормозить активацию протромбина через протромбинпревращающий комплекс, вероятно, конкурируя за центры связывания на комплексе, к которым прикрепляется N-концевая часть протромбина во время активации (I47). Фрагмент I способен также индуцировать биосинтез протромбина (223).

б) Фрагмент 2 протромбина. Между аминокислотными последовательностями фрагментов I и 2 протромбина имеется значительная внутренняя гомология: 24% аминокислотных остатков являются идентичными и последовательность 8 аминокислот (остатки III-II8 в фрагменте I и остатки 2I6-223 в фрагменте 2) идентична в обоих фрагментах как у человека, так и у быка. Три дисульфидных связи, находящиеся в фрагменте 2, также являются идентичными с последними тремя дисульфидными связями в фрагменте I. Следует отметить, что аминоконцевой участок фрагмента I, содержащий I0 остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты не имеет эквивалента в протромбиновом фрагменте 2. Вместе с тем, фрагмент 2 обладает I3 дополнительными остатками, отсутствующими в фрагменте I (274).

Определение вторичной структуры фрагмента 2 протромбина человека методом КД указывает на наличие в его молекуле 20% β-структурных и 80% нерегулярных участков (I57). Проведено предва-

рительное рентгеноструктурное исследование фрагмента 2 протромбина человека и быка (240).

Область фрагмента 2 протромбина, связывая фактор Va, играет важную роль в процессе тромбиногенеза (140). Фрагмент 2 связывается также с тромбином и претромбином 2 с очень высоким сродством (290). Высокие значения константы диссоциации дают возможность предположить, что фрагмент 2 может находиться в организме в связанном состоянии с тромбином или претромбином 2.

Фрагмент 2 может участвовать в реакциях тромбина с плазменными ингибиторами, а также во взаимодействии между тромбином и клетками крови (290). Известно также, что фрагмет 2 замедляет скорость ингибирования тромбина антитромбином III (357). Авторы полагают, что фрагмент 2 препятствует связыванию тромбина с антитромбином III и, следовательно, может оказывать регулирующее действие на тромбообразование.

в) Претромбин 2 и тромбин. Третий домен молекулы протромбина соответствует претромбину 2, который является непосредственным предшественником тромбина. Как указывалось выше, при активации протромбина под влиянием фактора Xa расщепляется пептидная связь в молекуле претромбина 2, что приводит к экспрессии активного центра фермента и образованию двухцепочечной структуры тромбина, соединенной дисульфидной связью (254).

Тромбин человека может существовать в трех формах: α-тромбина, имеющего значительную свертывающую активность, и β- и γ-тромбина, свертывающая активность которых является незначительной (222). В данном обзоре основное внимание сконцентрировано на α-тромбине, так как он является начальной формой, генерируемой в процессе активации протромбина, и имеющей, повидимому,

основное физиологическое значение.

В таблице I представлены наиболее важные физико-химические свойства α-тромбина (200).

Таблица I

Основные физико-химические свойства тромбина человека (200)

Свойство		Результат
I. Молекулярная масса		
а) электрофорез в ПААГ- DS - Na		
А-цепь		4600±200
В-цепь		32000±1000
Сумма А- и В-цепей		36600±1000
б) седиментационное равновесие		36600±800
2. Коэффициенты поглощения при 280 нм ($мл \cdot мг^{-1} \cdot см^{-1}$)		
а) 0,21 М NaCl, pH 7,2		1,73±0,10
б) 1,0 М CH_3COOH		1,74±0,04
в) 0,10 М NaOH		1,83±0,08
3. Основные изоионные формы	pI	7,0, 7,3, 7,6
4. Границы денатурации		
а) титрование HCl		pH < 5,5
б) титрование / NaOH		pH > 10,3
в) прогревание 5 мин		51 °C

В молекуле фибриногена тромбин разрывает три пары пептидных связей, включающих карбонильную группу аргинина. Вначале расщепляется связь Arg 16- Gly 17 Aα-цепи фибриногена. При

этом происходит отщепление фибринопептида А и образуется фибрин-мономер. Этот момент служит началом свертывания, после чего разрывается связь Arg I4- Val I5 в Bβ-цепи и происходит отщепление фибринопептида В. Затем для формирования полноценного геля фибрина необходим еще протеолиз связи Arg I9- Val 20 Aα-цепи с высвобождением трипептида. Этот процесс идет наиболее медленно (359).

Существует мнение, что участок 8-23 Aα-цепи фибриногена, повидимому, определяет специфичность каталитического этапа свертывания, а локус узнавания фермента находится вне этого участка (352). Скорость гидролиза аминоконцевого фрагмента Aα-цепи фибриногена, включающего остатки I-5I, соизмерима со скоростью протеолиза всей молекулы фибриногена (226), но сильно уменьшается при отщеплении участка 34-5I (I56). Эти данные позволили выдвинуть предположение, что локус узнавания тромбина, комплементарный соответствующей структуре фермента и обеспечивающий эффективность его функции, находится именно в этом участке Aα-цепи фибриногена, т.е. на значительном удалении от чувствительной связи (I2,I04,I56). Здесь отмечают возможную роль двух сегментов 34-44 и 45-49. Участок 45-49 интересен тем, что в ходе эволюции остается консервативным. Он встречается в Aα-цепи практически всех известных фибриногенов. Фрагмент 34-44 необходим, повидимому, для поддержания упорядоченной структуры, требуемой для эффективного узнавания субстрата (I56).

Если Aα-цепь фибриногена на участке I-5I содержит основные структурные элементы, необходимые для специфического протеолиза, то с расщеплением связи Arg I4- Val I5 в Bβ-цепи дело обстоит гораздо сложнее. Дело в том, что изолированная Bβ-

цепь и ее фрагменты по скорости гидролиза этой связи значительно уступают фибриногену и Aα-цепи (I55). Не исключено, что центр узнавания тромбина на Bβ-цепи формируется после отщепления фибринопептида А и начала полимеризации фибрин-мономеров (I04,I56).

Согласно представлениям В.А.Белицера и Т.В.Варецкой (I2), локус фибриногена, обеспечивающий эффективность функции тромбина, расположен довольно далеко от чувствительной связи. Вероятно, молекула тромбина содержит особую структуру, комплементарную к определенной части Aα-цепи фибриногена. Это гарантирует безошибочность узнавания субстрата и точность контакта каталитического центра с участком чувсвительной связи Aα-цепи (22I).

Сравнительный анализ ТАМЭ и фибринопептида А по ингибированию амидолиза низкомолекулярных субстратов показал, что фибринопептид А не конкурирует с ТАМЭ за участок связывания (22I). На основании этих данных высказано предположение о наличии в молекуле тромбина дополнительного центра связывания высокомолекулярных субстратов, ответственного за его высокую специфичность. В последние годы вопрос о дополнительном центре связывания и узнавания высокомолекулярных субстратов является предметом интенсивных исследований в ряде лабораторий (47,I02-I05, II0,III,I99). Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в главе III настоящей работы.

Еще в конце 50-х годов было установлено, что тромбин можно лишить свертывающей активности, сохранив эстеразную (327). В последующем исследование автолиза и протеолиза α-тромбина трипсином, плазмином и фактором Ха показало, что продуктами протеолиза являются две деградированные формы (200). На первом

этапе автолиза и протеолиза происходит расщепление связи Arg 73-Asn 74 В-цепи α-тромбина, называемой локусом его биологической деградации, (В-цепь делится на фрагменты B_I и B_2), что приводит к образованию трехцепочечной формы тромбина. Эта форма получила название β-тромбина. Поскольку резкое снижение свертывающей активности, сопровождающее превращение α-тромбина в β-тромбин, происходит в результате деформации структуры белка в области фрагмента B_I, то, возможно, что дополнительный центр связывания фибриногена локализуется левее точки биологической деградации (I04). Следует иметь в виду, что дополнительный центр связывания и узнавания высокомолекулярных субстратов - это не просто конкретный участок полипептидной цепи, а уникальная нативная структура части молекулы фермента (I04,I05).

При дополнительном расщеплении связи Lys 65- His 66 в B_I-фрагменте выщепляется С-концевой октапептид, а аминоконцевой участок B_I и B_2 остаются связанными нековалентно (I96). Дальнейшее расщепление связи Lys I54- Gly I55 (фрагмент B_2 разделяется на фрагменты B_3 и B_4) приводит к образованию γ-тромбина (200).

Таким образом, в производных α-тромбина фрагментируется В-цепь и каталитические остатки заряд-переносящей системы отделяются друг от друга. Так, в β-тромбине His 43 находится в B_I-фрагменте, Asp 99 и Ser 205 в B_2-фрагменте; в γ-тромбине His 43 в B_I-фрагменте, Asp 99 - в B_3-фрагменте и Ser 205 - в B_4-фрагменте. Большая часть свертывающей активности у β- и γ-тромбина потеряна, но склонность к гидролизу низкомолекулярных субстратов сохраняется (II6,200). Последнее является свидетельством нормального функционирования каталитического центра у

β- и γ-тромбина. Следует обратить внимание на то, что свертывающая и протеазная активность тромбина не являются синонимами. Так, β- и γ-тромбин, значительно теряя свертывающую активность, сохраняют не только эстеролитическую и амидолитическую активность α-тромбина, но и некоторые протеолитические активности: они могут активировать факторы У и XIII, способны отщеплять фрагмент I от протромбина, реагировать с антитромбином III, но не активируют факторы УII и УIII (200). Биологическая функция деградированных форм α-тромбина неизвестна. Маловероятно, что эти формы тромбина могут принимать активное участие в процессах свертывания крови, но и полностью исключить такую возможность нельзя (I00,I2I).

§ 2. Тромбин как представитель семейства сериновых протеиназ.

Тромбин относится к группе пептид-гидролаз, подгруппе протеиназ, классу сериновых ферментов. В настоящее время достоверно выявлена ключевая роль в механизме действия тромбина His 43, Asp 99 и Ser 205, образующих триаду активного центра (2I5, 2I7).

Сопоставление первичных структур тромбина, химотрипсина, трипсина, эластазы и фактора Ха показало высокую степень гомологии их аминокислотных последовательностей (I04,245,34I). На рис. 3 представлены аминокислотные последовательности тромбина человека и α-химотрипсина быка. Рассмотрим основные различия.

А-цепь тромбина представляет собой оригинальную структуру, не свойственную пищеварительным протеиназам. У трипсина и эластазы подобного аналога нет совсем, а у химотрипсина она значительно укорочена по сравнению с тромбином. Аминоконцевой окта-

А-цепь

```
1                                                                  1
                                                                   Cys Gly Val Pro Ala Ile
2  Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asn Cys Gly Leu Arg Pro Leu
                          10                                                    20
1  Gln Pro Val Leu Ser Gly Leu
                     10
2  Phe Glu Lys Lys Soe Leu Glu Asn Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg
                30                                  40
```

Б-цепь

```
                  20                                                  30                                  40
1  Ile Val Asn Gly Glu Glu Ala Val Pro Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Asp Lys    Thr Gly Phe His Phe
2  Ile Val Glu Gly Ser Asn Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu
                                                                                  20
                        50                                                  60
1  Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Glu Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Gly Val Thr Thr Ser Asp Val  —  —  —
                                                  40
2  Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asn Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asn Lys Asn Phe
                                                  70                                  80
1  —  —  —  —  —  —  Val Val Ala Gly Glu Phe Asp Glu Gly Ser Ser Ser Glu Lys Ile Gln Lys Leu Lys    Ile
                  60                                                                        80
2  Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu
                  90                                                  100                                 110
1  Ala Lys Val Phe Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ser Leu Thr Ile  —  Asn Asn Asp Ile Thr Leu Leu Lys Leu Ser Thr Ala
2  Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro
                        120                                                 130
1  Ala Ser Phe Ser Glu Thr Val Ser Ala Val Cys Leu Pro Ser Ala Ser Asp  —  —  —  Asp Phe Ala Ala Gly Thr Thr
                                  120
2  Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asn Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Tyr Lys
```



Рис. 3. Сопоставление аминокислотных последовательностей α-химотрипсина быка (I) и α-тромбина человека (2) (I04).

пептид А-цепи тромбина человека (21-членный пептид в тромбине быка) и 13-ти членный пептид С-концевой области отсутствуют в химотрипсине. В противоположность трипсину и эластазе все сериновые протеиназы, участвующие в свертывании крови, имеют эквивалент А-цепи тромбина. Поэтому А-цепь была предложена в качестве потенциального кандидата для объяснения их специфичности (273). Модель тромбина, построенная на основе рентгеноструктурных данных его гомологов, предсказывает близость А-цепи к активному центру (273). Интересно, что отсутствие 13 аминоконцевых остатков в А-цепи тромбина человека по сравнению с тромбином быка не сказывается на его ферментативной активности (200). Установлено также, что полное отделение А-цепи от молекулы тромбина не приводит к полной потере свертывающей активности (227).

Существует представление, что боковая цепь С-концевого остатка аргинина А-цепи, повидимому, располагается в первичном кармане связывания тромбина и может быть конкурентно вытеснена только специфическим субстратом, который связывается с дополнительным контактным участком фермента. Короткие субстраты не могут конкурировать с С-концевым участком А-цепи за связывание в кармане и поэтому гидролизуются хуже (104).

Насколько справедливы приведенные гипотезы выяснится тогда, когда будет экспериментально установлена трехмерная структура тромбина. Пока сделаны лишь первые попытки кристаллизации и рентгеноструктурного анализа тромбина (283).

В-Цепь тромбина человека содержит 140 замен, 30 вставок и одну делецию аминокислотного остатка по сравнению с химотрипсином быка (104). Наибольший интерес представляет расположенная

вблизи His 43 активного центра вставка из 9 аминокислотных остатков, к одному из которых (Asn 57) прикрепляется углеводный компонент, не являющийся необходимым для "узнавания" фибриногена (I96). Важно указать, что ни одна сериновая протеиназа, включая фактор Ха, не имеет эквивалента этой вставке. Углеводная цепь, нонапептидная вставка и примыкающая к ней замена (остатки 70-76), вместе взятые, составляют весьма значительный структурный элемент тромбина, которого нет у трипсина и химотрипсина. Эту аминокислотную последовательность иногда называют "углеводной" петлей (I04). Существенно, что именно в этой области находится октапептид (остатки 66-73), который выщепляется при аутолизе α-тромбина в β-форму (268).

Из двух оставшихся крупных вставок в В-цепи тромбина (остатки I48-I53 и I95-I98) отметим вставку I95-I98, которая в гипотетической модели тромбина локализуется на его поверхности (273).Расположение этого тетрапептида рядом с Asp I99 привело к представлению о возможности влияния вставки на функцию остатка аспарагиновой кислоты, локализованного на дне кармана связывания и определяющего "трипсиноподобную" специфичность тромбина. Этот пептид, ослабляя взаимодействие положительно заряженной боковой цепи субстрата с отрицательным зарядом аспарагиновой кислоты, повидимому, отвечает за особенности этапов связывания и ацилирования при гидролизе тромбином (49).

В-цепь тромбина содержит также и небольшие вставки: одну трехостаточную (остатки I26-I28), 2 двухостаточные (остатки 2I4-2I5 и 258-259) и 6 одноостаточных (остатки 22,52,80,96,I90, 233).

Важную роль играет и делеция единственного остатка в тром-

бине, соответствующего Ser 2I8 химотрипсина. Дело в том, что остатки 2I4-2I6 в химотрипсине образуют антипараллельный β-слой с аминоконцевым участком пептидной цепи субстрата. В химотрипсине на С-концевой стороне (Gly 2I6) пептидная цепь резко изгибается в сторону от субстрата. В тромбине же остаток, соответствующий Ser 2I8 химотрипсина, подвергается делеции и вследствие этого P_4 взаимодействует с Gly 230 тромбина (245).

Значительная гомология аминокислотной последовательности наблюдается у тромбина и других сериновых протеиназ в тех участках молекул, где находятся аминокислотные остатки активного центра (245). Весьма близки последовательности петель, образуемых тремя дисульфидными связями внутри В-цепи: гистидиновой (остатки 28-44), метиониновой (I73-I87) и сериновой (20I-23I). Значительная гомология тромбина и сериновых пищеварительных протеиназ позволила выдвинуть предположение об их происхождении путем дупликации и последующей дивергентной эволюции общего гена предшественника (272).

Рассмотрим более подробно аминокислотную последовательность тромбина в области остатков, образующих систему переноса заряда активного центра и участок первичного связывания.

Остаток серина (Ser 205) каталитического центра тромбина, также как у трипсина и химотрипсина, расположен в сериновой петле.

При активации химотрипсиногена происходит конформационная перестройка, в результате которой между новообразованной аминогруппой Ile I6 и боковым радикалом Asp I94 образуется солевой мостик. Эта связь важна для поддержания Ser I95 химотрипсина в правильной конфигурации (245). Весьма вероятно, что такая же

связь образуется между Ile I и Asp 204 при активации претромбина 2 до тромбина. Но у тромбина, по мнению некоторых авторов (I04), в аминоконцевой области В-цепи возможно образование более жесткой вторичной структуры, α-спирали вместо β-листа или β-изгиба за счет наличия активного спиралеобразователя Glu 3 (вместо Asn у химотрипсина и Gly у трипсина).

Гистидин активного центра тромбина (His 43), соответствующий His 57 химотрипсина, расположен в гистидиновой петле 28-44. Слева от него замена аспарагина химотрипсина на аргинин увеличивает суммарный положительный заряд этого участка В-цепи тромбина, а справа замена, приводящая к появлению двух дополнительных остатков пролина в положениях 48 и 49, может вызвать формирование β-изгиба, изменяющего ориентацию гистидина активного центра (I04).

По данным рентгеноструктурного анализа у химотрипсина His 57 и Asp I02 активного центра сближены за счет образования β-листа антипараллельными участками 50-55 и I03-II0 (264). В химотрипсине Asp I02 защищена от растворителя последовательностью 55-58, а также остатками Tyr 94, Ile 99, Ser 2I4 и Trp 2I5 (I5I). Эти остатки являются существенными для поддержания правильной ориентации Asp I02. Эти же остатки сохраняются и в тромбине за исключением изолейцина (аспарагин в тромбине). Вместе с тем, у тромбина появляется сильный спиралеобразователь Ala I0I, что дает возможность формирования α-спирали, начиная с Asp 99. Такая ситуация могла бы отразиться на ориентации не только Asp 99, но и His 43 (I04).

Будучи сходными по структуре и механизму действия, серинновые протеиназы поразительным образом различаются по специфич-

ности. Как показал рентгеноструктурный анализ, эта разница обусловлена очень небольшими структурными различиями участков связывания субстрата (264). В химотрипсине ароматические и большие неполярные боковые цепи субстрата размещаются в гидрофобном кармане. В трипсине имеется такой же карман, отличающийся, однако, заменой одного остатка - вместо серина стоит аспарагиновая кислота в положении I78. В тромбине Asp I99 соответствует Asp I78 в трипсине и обусловливает первичную специфичность тромбина и трипсина путем образования прочной электростатической связи с положительно заряженными боковыми радикалами лизина или аргинина субстрата. Единственным различием в связывающем кармане тромбина является наличие Glu 202 по сравнению с Gln I8I в трипсине и Met I92 в химотрипсине. Вставка I95-I98 в тромбине может ослабить взаимодействие положительно заряженного бокового радикала цепи субстрата с Asp I99. В трипсине и химотрипсине у входа в карман связывания имеется последовательность Ser - Trp - Gly , соответствующая остаткам 226-228 тромбина, которая по данным рентгеноструктурного анализа фиксирует субстрат в зоне активного центра (I59).

Таким образом, первичная специфичность тромбина, т.е. специфичность по отношению к боковой цепи остатка, карбоксильная группа которого образует расщепляемую связь, подобна таковой трипсина и определяется гидрофобными и электростатическими взаимодействиями боковой цепи субстрата с активным центром фермента.

Факторы, определяющие вторичную специфичность тромбина, т.е. взаимодействие фермента с субстратом вне субцентра S_I, изучены недостаточно и нужно предпринять значительные усилия для выяснения механизмов узнавания во вторичном центре связывания (I02).

Избирательность действия тромбина может быть обусловлена не только вторичной специфичностью, определяемой природой остатков, соседних с расщепляемой связью, но и третичной, зависящей от природы и конформации дополнительных участков (центров) связывания, "узнавания" субстрата (I03-I05,II0). Эта высокая специфичность проявляется в реакциях с белковыми субстратами. В последние годы предложено все белковые субстраты тромбина разделить на две группы по принципу необходимости дополнительного центра при его действии (I05). К первому типу относятся субстраты (например, фибриноген), с которыми тромбин контактирует по центру узнавания, имеющие дополнительный участок связывания, независимо от того, сопровождается контакт протеолизом или нет. Субстраты, лишенные участка, комплементарного центру узнавания высокомолекулярных субстратов относятся ко второму типу. Для протеолиза этих субстратов дополнительный центр не нужен, достаточно связывания по контактной зоне активного центра. Именно к этому типу относятся трипсиноген, плазминоген, факторы У и XIII и некоторые другие соединения (I05).

Несмотря на обширные исследования особенностей первичной структуры тромбина по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами, природа его узкой специфичности далеко еще не ясна. И это во многом обусловлено отсутствием кристаллографических данных о вторичной и третичной структуре не только тромбина, но и протромбина, фибриногена и других белковых субстратов. Вряд-ли эти данные будут получены в ближайшие годы. Поэтому выяснению структурных основ специфичности тромбина на более высоком уровне его пространственной организации предшествовала работа по разработке и совершенствованию теоретических методов предсказания

структурного класса и вторичной структуры α-тромбина, его форм, предшественников и белковых субстратов.

§ 3. Клеточно-опосредованные реакции α-тромбина.

В последние годы сформировалось новое понимание регуляторной роли протеолитических ферментов в организме (2I,74). Регуляторная функция протеиназ многообразна и внастоящее время еще не полностью осмыслена. Известны, повидимому, далеко не все биологические процессы, которые осуществляются при участии протеиназ.

Исследованиями, проведенными Д.М.Зубаировым (40), показано, что в сосудистом русле непрерывно осуществляется процесс образования и растворения фибрина. Эта реакция неминуемо сопровождается появлением в кровотоке тромбина, который, наряду с фибринообразованием, способен активировать факторы У (I9I), УIII (270) и XIII (I2I), расщеплять протромбин до претромбина I (273), превращать белок С в форму, инактивирующую факторы Уа и УIIIа и стимулирующую освобождение тканевого активатора плазминогена, вызывать ограниченный протеолиз ингибиторов - антитромбина III, α_2-макроглобулина, α_1-антитрипсина, белков системы комплемента (I08).

Функция тромбина как биорегулятора свертывающей системы крови проявляется не только во взаимодействии с белковыми факторами этой системы, но и, в значительной мере, во взаимодействии с клеточными рецепторами (58). Действие тромбина на клетки крови и стенки сосуда реализуется либо ускорением свертывания крови либо его замедлением. Механизмы этих процессов различаются. К механизмам положительной обратной связи, ускоряющим тромбинообразование и свертывание, можно отнести ускорение свертывания, обеспе-

чиваемое взаимодействием тромбина с тромбоцитами, что приводит к их агрегации и реакции высвобождения тромбоцитарных факторов свертывания. Активированные тромбоциты, осколки их мембран и гранул создают каталитическую поверхность, на которой осуществляется взаимодействие факторов свертывания и генерация новых порций тромбина (39).

Имеются сведения, что поверхность иммунокомпетентных клеток также может выступать в качестве биологической поверхности, необходимой для стимуляции тромбиногенеза (346).

Из механизмов отрицательной обратной связи, тормозящих тромбиногенез и свертывание крови, важнейшим является взаимодействие тромбина с хеморецепторами сосудистой стенки и запуск физиологической реакции противосвертывающей системы организма (57). Структурные основы запуска реакции противосвертывающей системы тромбином детально изучены С.М.Струковой (III).

Полученные к настоящему времени сведения о взаимодействии тромбина с рецепторами клеток, субстратами и ингибиторами позволили составить шкалу относительного сродства связывания с ними α-тромбина (58, I99). По шкале (табл. 2) можно оценить сродство тромбина к различным лигандам. Следует отметить, что сродство тромбина к рецепторам клеток значительно выше, чем к специфическому субстрату фибриногену. Это обусловливает связывание очень низких концентраций тромбина клеткой-мишенью и, следовательно, ее высокую чувствительность к тромбину (58).

Важным аспектом биологии и биохимии тромбина является его стимулирующее влияние на синтез ДНК и деление клеток. Перейдем к рассмотрению этого вопроса.

В I970 году впервые было показано, что протеазная обработ-

Таблица 2

Шкала относительного сродства связывания α-тромбина с рецепторами клеток, субстратами, ингибиторами и другими лигандами (58,I99).

pK_S	Лиганды
II	Гирудин ($K_{ингиб.}$ 63 пМ)
I0	Фибробласты ($K_{дисс.}$ 300–600 пМ)
9	Эндотелиоциты ($K_{дисс.}$ < 2 нМ)
8	Тромбоциты ($K_{дисс.}$ 2,2–I20 нМ)
7	Гепарин ($K_{дисс.}$ ~ I0 нМ)
	Антитромбин III ($K_{дисс.}$ ~ I0–I00 нМ)
6	Фибриноген ($K_м$ ~ I мкМ)
5	Протромбин ($K_м$ I,8 мкМ)
	Фактор XIII ($K_м$ I2,2 мкМ)
4	Фрагмент I·2 протромбина ($K_м$ ~ 500 мкМ)
3	Бензамидин ($K_{ингиб.}$ 750 мкМ)
2	

Величины сродства связывания выражены как pK_S – отрицательный логарифм от величин $K_{ингиб.}$, $K_{дисс.}$ или $K_м$.

ка (трипсин) покоящихся фибробластов эмбриона цыпленка (ФЭЦ) вызывает значительное включение меченого тимидина и последующее деление (I66). Впоследствии было показано, что и тромбин вызывает индукцию клеточного деления ФЭЦ (I74). Протромбин не обладает митогенной активностью по отношению к ФЭЦ. Однако после добавления к протромбину фактора Ха и фактора Уа ФЭЦ начинают делиться со скоростью, которая сравнима со скоростью деления в присутствии эквивалентного количества тромбина (I73). Не исключено, что протромбин, как впрочем и плазминоген, является потенциальным резервом митогенной активности плазмы крови (3I3). Была сделана попытка оценить вклад протромбина, как потенциального митогена, в общую митогенную емкость плазмы крови. Оказалось, что вклад протромбина достаточно высок и составляет приблизительно 30% (I73).

Имеются сведения, что тромбин сначала связывается с клетками, а затем подвергается интернализации (276, 3I0). Примечательно, что интернализованный тромбин практически не подвергается деградации и сохраняет ферментативную активность (276, 3I0). Поэтому, можно полагать, что интернализованный тромбин сохраняет потенциальную способность к гидролизу внутриклеточных субстратов, возможно, проявляя при этом часть своего стимулирующего на клетку действия. Существует предположение, что тромбин может действовать на уровне клеточного ядра (в частности, на аргинин- и лизин-богатые гистоны), индуцируя новый цикл клеточного деления (276). Однако, вышеприведенные факты еще не являются доказательством того, что интернализация тромбина необходима для стимуляции синтеза ДНК и деления клеток.

Тромбин, иммобилизованный на сефарозе и полистирольных гра-

нулах, также стимулирует синтез ДНК в ФЭЦ (I69, 3I0). Это свидетельствует о том, что для стимулирующего эффекта тромбина на клеточную пролиферацию достаточно его взаимодействия с поверхностью клеток. Вместе с тем, максимальная стимуляция синтеза ДНК, полученная с помощью иммобилизованного тромбина, составляет только 50% от стимуляции, вызванной растворимым тромбином (3I0).

Эксперименты по связыванию ^{I25}I-тромбина с ФЭЦ позволили обнаружить на их поверхности высоко специфичные рецепторы по отношению к тромбину (I70, 2I6, 220, 300). Изучение механизма, с помощью которого ФЭЦ связывают тромбин, показало, что при этом участвует несколько клеточных компонент. Один из них обладает некоторыми новыми свойствами, которые отличают его от большинства клеточных рецепторов. Этот компонент (протеаза-нексин) высвобождается из клетки и образует ковалентное соединение с тромбином ; эти комплексы затем снова связываются с клеткой посредством протеазо-нексиновой части комплекса (I4I).

Важным вопросом, касающимся механизма, посредством которого тромбин инициирует деление клетки, является вопрос о том, требуется ли для стимуляции протеолитическая активность тромбина. Оказалось, что энзиматически неактивный диизопропилфосфат-α-тромбин (ДИФ-α-тромбин) связывается с фибробластами эмбрионов мыши и легкого китайского хомячка также эффективно, как и протеолитически активный тромбин, однако, не вызывает деления этих клеток. Это явилось поводом сделать вывод о том, что для инициации деления клеток требуется протеолитическая активность тромбина (2I6). В отличие от ДИФ-α-тромбина, γ-тромбин не связывается с высокоаффинными рецепторами фибробластов легкого китайского хомячка и эмбрионов мыши (I70, 220, 336). Оба аналога в отдельности не сти-

мулируют синтез ДНК в клетках, однако при одновременном их добавлении наблюдается стимуляция синтеза ДНК, аналогичная наблюдаемой под воздействием нативного α-тромбина (170, 336). На основании этих данных, авторы приходят к выводу, что инициация пролиферативных реакций фибробластов α-тромбином требует как связывания с рецепторами, так и ферментативной активности.

Первые эксперименты по идентификации белков клеточной поверхности, подвергающихся протеалитическому расщеплению тромбином, привели к обнаружению компонента поверхности ФЭЦ с молекулярной массой 43000 дальтон, который чувствителен к тромбину (216).

Хотя биологическая роль тромбин-индуцированного деления фибробластов еще не изучена, есть причины предположить, что этот процесс может вовлекаться в репарацию тканей после повреждения (173). Существенно отметить, что тромбин, усиливая рост и клеточное деление фибробластов, значительно изменяет их коагуляционную характеристику. Так, при стимуляции фибробластов тромбином обнаружены выраженные изменения фибринолитической активности клеток: увеличивается содержание активатора и проактиватора плазминогена и ингибиторов фибринолиза. В среду инкубации усиливается поступление тромбопластических агентов и активатора плазминогена (78, 80). Эта реакция фибробластов на действие тромбина, по-видимому, также играет не последнюю роль в заживлении ран. Вероятно, митогенный эффект тромбина оказывает влияние на формирование соединительной ткани, а выделяющиеся тканевые прокоагулянты вызывают образование фибрина в поврежденном участке. Избыток фибрина растворяется фибринолитическими агентами клеточного происхождения.

В свете современных представлений о тесной взаимосвязи между иммуногенезом и системой гемостаза (63, 64, I29-I3I) значительный интерес представляют данные о взаимодействии α-тромбина с иммунокомпетентными клетками.

В I976 году впервые было показано, что тромбин является митогеном для лимфоцитов селезенки мыши (I75). После тромбиновой обработки ^{I3I}I-пероксидазомеченых спленоцитов мыши единственными белковыми компонентами, подвергающимися значительному снижению, являлись белки с молекулярной массой около 45000 дальтон. Эти данные привели авторов к заключению, что для наблюдаемой после тромбиновой обработки индукции митогенного ответа может быть достаточной сама по себе протеолитическая модификация поверхностных белков в указанном диапазоне молекулярных масс. Следует однако заметить, что хотя модификация поверхностных белков лимфоцитов и является результатом протеолиза тромбином, это еще не доказывает, что она является тем сигналом, который инициирует митогенный ответ ин витро. Впоследствии в лаборатории Б.И.Кузника (63) было показано, что аутологичный тромбин способен вызывать также и бласттрансформацию лимфоцитов периферической крови.

Тромбин значительно усиливает фагоцитарную способность макрофагов и более чем в три раза уменьшает скорость их миграции из очага воспаления, т.е. повышает функциональную активность макрофагов, направленную на ликвидацию патологического процесса (63, 78-80). Стимулируя защитную функцию макрофагов, тромбин усиливает прокоагулянтную активность клеток и содержание в них активатора плазминогена. Одновременно повышается выделение тромбопластических агентов и соединений антитромбинного характера. Продукция фибринолитических соединений сопровождается выделением ак-

тиватора, проактиватора плазминогена и плазминоподобного фермента, способного самостоятельно расщеплять фибрин (79). Сходные результаты получены и с культурой лимфоцитов. Под влиянием тромбина в лимфоцитах увеличивается активность тромбопластина, уменьшается концентрация проактиватора плазминогена и нарастает содержание активатора плазминогена. Изменение коагулологических свойств сопровождается секрецией в инкубационную среду тромбопластина, активатора и проактиватора плазминогена. Отмеченные реакции осуществляются за счет ферментативной активности тромбина, ибо инактивированный фермент подобных эффектов не вызывает (79). Интересно, что тромбин, в отличие от протромбина, индуцирует хемотаксический ответ моноцитов (I45). Предполагается, что хемотаксическая активность тромбина существенна для миграции моноцитов (I45). Предполагается, что хемотаксическая активность тромбина существенна для миграции моноцитов в область заживления ран.

Таким образом, можно придти к выводу, что тромбин является не только ферментом системы гемостаза, но и активатором специфической функции иммунокомпетентных клеток. Индуцирующее действие тромбина на лимфоциты и макрофаги биологически оправдано, так как при любом повреждении возникает необходимость как в остановке кровотечения, так и борьбе с внедряющейся инфекцией (63).

Поскольку тромбин относится к числу биологически активных соединений, он должен опосредовать свое влияние на клетки через рецепторный аппарат. Такие рецепторы обнаружены на эндотелиоцитах (277), фибробластах (I72), тромбоцитах (362) и ряде других клеток. Наличие рецепторов к тромбину на лимфоцитах периферической крови человека было показано Н.Н.Цыбиковым (I29). Взаимодей-

ствие тромбина с мембранными рецепторами является пусковым механизмом, приводящим в конечном итоге к изменению метаболизма, морфологии и функциональной активности иммунокомпетентных клеток (63).

Интересно отметить, что тромбин индуцирует также повышенное включение ^{3}Н-тимидина в ДНК клеток мышиной саркомы, клеток карциномы шейки матки человека и клеток при остром лимфобластном лейкозе человека в культуре (I64). Для стимуляции этих клеток требуются гораздо более высокие концентрации (в I0 раз) по сравнению с нормальными клетками. Авторы полагают, что это может быть обусловлено уменьшением числа рецепторов на опухолевых клетках или снижением функции рецепторного аппарата.

На основании вышеизложенного видно, что феноменологический аспект клеточно-опосредованных эффектов тромбина является достаточно разработанной областью. Вместе с тем, вопрос о молекулярных механизмах активации, в частности, иммунокомпетентных клеток α-тромбином к началу настоящей работы не был совершенно разработан.

ГЛАВА П. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

§ I. Лабораторные животные, приготовление клеточной суспензии[x], суспензии ядер и их характеристика.

а) Исследования проводились на 6-8-недельных беспородных белых мышах и мышах линии $C_{57}Bl$ с перевивным лейкозом, содержащихся на обычном рационе вивария. Некоторые серии опытов были выполнены на беспородных белых крысах.

б) Исходной клеточной популяций являлась популяция клеток селезенки экспериментальных животных. Фракцию мононуклеарных клеток из клеточной суспензии селезенки выделяли методом плотностного центрифугирования, используя фиколл-верографиновую смесь с плотностью I.087 г/см^3 при I500 об/мин в течение 30 минут (I63). Жизнеспособность лимфоцитов, оцениваемая по тесту исключения живыми клетками трипанового синего, составляла более 95%. Выход лимфоцитов составлял $50 \cdot 10^6$ клеток на I г селезенки.

Выбор в качестве объекта исследования лимфоцитов обусловлен тем, что эти клетки, выполняя функцию иммунологического надзора, имеют также уникальную гемостатическую характеристику: взаимодействуют с плазменными факторами $У_а$ и $Х_а$ с образованием функционального каталитического комплекса, активирующего протромбин в тромбин (346), являются местом синтеза антигемофильного глобулина, продуцируют тромбопластин (265), антигепариновый фактор, проактиватор и активатор плазминогена (2I9), а также усиливают генерацию тромбопластина в моноцитах и макро-

---

[x] Авторское свидетельство СССР, № II733I6

фагах (269), повышают функциональную активность тромбоцитов (322).

в) Чистоту полученной клеточной суспензии оценивали с помощью электронной микроскопии по общепринятой методике. Срезы просматривали на электронном микроскопе марки J EM-I00 CX (Япония) или ЭМВ-I00 Л (СССР).

Для проведения сканирующей электронной микроскопии сухие образцы клеточной суспензии получали в соответствии с рекомендациями (307). Сухие образцы покрывали золотом и подвергали исследованию на сканирующей приставке ASID - 4D к электронному микроскопу J EM-I00 CX.

На рис. 4 представлены данные электронно-микроскопического

Рис. 4. Электронная микрофотография мононуклеаров селезенки мыши. (Увеличение х 5800).

исследования суспензии выделенных лимфоцитов. Видно, что в популяции клеток селезенки, выделенных методом плотностного центрифугирования, преобладают малые лимфоциты, встречаются единич-

ные плазматические клетки.

г) Для получения количественной информации о состоянии хроматина с помощью телевизионной системы анализа изображений микрообъектов (Omnicon FAS - II , Австрия) оценивали кариометрические показатели лимфоцитов: площадь ядер, интегральную оптическую плотность - ИОП и среднюю оптическую плотность - СОП (29). Предварительно мазки клеток подвергали окраске по Фельгену (87). В каждом препарате измеряли ИОП, СОП и площадь 200-250 ядер клеток.

д) Выделение ядер лимфоцитов проводили по методу (241).

§ 2. Радиоизотопные и радиоиммунологические методы

а) Измерение включения радиоактивного тимидина в ДНК лимфоцитов. В опытах использовали ^{3}H -тимидин и ^{14}C -тимидин (В/О Изотоп, СССР). Синтез ДНК оценивали по количеству радиоактивного тимидина, включенного в ДНК лимфоцитов (286).

Свежеизолированные лимфоциты разводили средой или РРМЈ - 1640 до концентрации $5 \cdot 10^{6}$ клеток на 1 мл культуры. При трехсуточном культивировании лимфоцитов культуры были дополнены 2 мМ l -глутамина, $3 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанола, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. К 1 мл клеточной суспензии добавили 1-20 мкг α-тромбина, разведенного на среде культивирования. В качестве контроля служила суспензия клеток, к которой вместо тромбина добавляли соответствующий объем среды культивирования. Клетки культивировали в течение 3-х суток в атмосфере, содержащей 5% CO_2. За 4 часа до конца культивирования к клеткам добавляли 2 мкКи ^{3}H -тимидина или ^{14}C -тимидина. После окончания культивирования клетки промывали на холоду средой культивирования и обрабатывали 5%-ной трихлоруксусной

кислотой. Нерастворимую фракцию переносили на мембранные фильтры и определяли радиоактивность фильтров в диоксановом сцинцилляторе на жидкостно-сцинцилляционном счетчике СБС-2 (СССР) или "Beckman " (США). Количественные данные о включении радиоактивного тимидина в ДНК лимфоцитов представляют собой среднее арифметическое измерений в 5-6 параллельных культурах и выражены в импульсах в минуту на культуру.

б) Постановка опытов для оценки влияния оптимальной митогенной концентрации α-тромбина (5 мкг/мл) на спонтанный синтез ДНК в лимфоцитах селезенки мыши была точно такой же, как описано выше, за исключением того, что в культуральную среду не добавляли антибиотики и продолжительность культивирования клеток составляла всего 4 часа. Радиоактивный тимидин (2 мкКи/мл) вводили в культуры на весь период культивирования лимфоцитов.

в) Измерение репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах селезенки мыши оценивали по включению радиоактивного тимидина (2 мкКи/мл) в ДНК в присутствии 2 мМ гидроксимочевины, избирательно подавляющей репликацию ДНК (I). После периода мечения определяли включение метки в ДНК, как указывалось выше.

г) ДНК из ядер лимфоцитов и экстраклеточную ДНК из культуральных супернатантов выделяли по ранее описанному методу (I95).

д) Выделение палиндромной ДНК из новосинтезированной ДНК ядер лимфоцитов проводили по методу (3I8).

е) Для анализа экстраклеточной ^{3}Н-ДНК культуральные супернатанты концентрировали на ультрафильтре ХМ-50 (" Amicon ", Голландия) и концентрат подвергали гель-фильтрации на колонке (Iх20 см), заполненной тойоперлом HW -60 (" Toyo Soda ", Япония) и уравновешенной раствором, содержащим I0 мМ триса, I0 мМ

ЭДТА, 0,6% додецилсульфата натрия, для отделения ^{3}Н-ДНК от избытка свободного предшественника. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 20 мл/час, собирая фракции по 2 мл. Пик меченой ДНК, элюируемый в свободном объеме колонки, подвергался такому же циклу щелочной денатурации - нейтрализации- фенольной экстракции, как и ДНК ядер лимфоцитов (3I8). По 0,25-0,50 мл растворов ^{3}Н-ДНК ядер и культуральных супернатантов до и после цикла щелочной денатурации - нейтрализации - фенольной экстракции переносили во флаконы с 8 мл сцинциллятора Брея. Радиоактивность образцов определяли на жидкостном сцинцилляционном счетчике " Beckman " (США).

ж) Для контроля чистоты освобождающегося из лимфоцитов ДНК-содержащего материала изучали выход из клеток меченного ^{3}Н -уридином материала. В культуры лимфоцитов вводили по I0 мкКи ^{3}Н -уридина (В/о "Изотопы", СССР) на весь период культивирования лимфоцитов. Культуральные супернатанты концентрировали на ультрафильтре РМ-I0 (" Amicon ", Голландия) и концентрат подвергали гель-фильтрации на колонке (I,5 х 65 см), заполненной тойоперлом HW -60 и уравновешенной раствором, содержащим 0,05 М трис-HCI, pH 7,4, 0,I5 М NaCI, I% додецилсульфата натрия. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью I4 мл/час, собирая фракции по 3 мл. Радиоактивность элюата определяли как описано выше.

Аналогичным образом проводили фракционирование экстраклеточной ^{3}Н-ДНК и лизатов лимфоцитов, меченых радиоактивным предшественниками ДНК и РНК. Свободный объем колонок определяли по выходу голубого декстрана (мол. масса $2 \cdot I0^{6}$ дальтон). Для калибровки колонок в качестве маркеров использовали: уридин, сум-

марный препарат дрожжевой тРНК и рРНК из E. coli.

з) Измерение включения радиоактивного уридина в РНК лимфоцитов. В качестве специфического предшественника РНК использовали ^{3}H -уридин (В/О "Изотоп", СССР). Учитывая, что при этом значительная часть радиоактивности может включаться в ДНК, особенно в форме цитозина (I), все опыты с измерением включения радиоактивного уридина в РНК лимфоцитов селезенки мыши проводили в присутствии 2 мМ гидроксимочевины. В культуры лимфоцитов ($5 \cdot 10^{6}$ клеток/мл) вводили 5-10 мкКи ^{3}H -уридина на весь период культивирования клеток.

и) РНК-синтетическую активность лимфоцитов селезенки мыши оценивали по включению ^{3}H -уридина в кислотоосаждаемый (ТХУ) материал клеток, меченых в течение 15 минут, так как за этот промежуток времени можно пренебречь вкладом распада новосинтезированных РНК в количество включенного радиоактивного предшественника в быстрометящиеся РНК (99).

к) Для изучения стабильности новосинтезированной РНК использовали методический прием, основанный на кратковременной инкубации клеток с ^{3}H -уридином (15 мин) и дальнейшем культивировании в течение двух часов в присутствии актиномицина Д в концентрациях, полностью подавляющих синтез РНК (пульс-чейз эксперимент). Пульс-чейз эксперименты проводили на свежеизолированных интактных лимфоцитах селезенки мыши и лимфоцитах, предварительно обработанных оптимальной митогенной концентрацией α-тромбина в течение одного часа. Чейз-эксперименты проводили с использованием актиномицина Д в концентрации 10 мкг/мл.

л) Определение доли пре-рРНК среди суммарных быстрометящихся ^{3}H -уридином РНК в лимфоцитах селезенки мыши использова-

ли метод селективного ингибирования синтеза рибосомных РНК низкими концентрациями (0,I5 мкг/мл) актиномицина Д (93, 6I).

м) Накопление общего пула новосинтезированной РНК в лимфоцитах селезенки мыши оценивали по включению ^{3}H -уридина в кислотонерастворимую фракцию клеток, меченых в течение 4-х часов, т.е. в течение времени, достаточного для включения метки во все типы быстрометящихся РНК, их процессинга и выхода зрелых молекул в цитоплазму.

Детали этих исследований будут приведены в соответствующей главе.

н) Измерение синтеза белка в лимфоцитах. В экспериментах использовали ^{I4}C-гидролизат белков хлореллы (UVVVR , ЧССР) или ^{3}H -лейцин (В/О "Изотоп", СССР).

К культурам интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши ($5 \cdot I0^{6}$ клеток/мл) на среде I99 добавляли 5-I0 мкКи радиоактивных аминокислот на весь период культивирования, после чего производили посадку кислотонерастворимого материала на мембранные фильтры и измеряли радиоактивность по той же схеме, что и при исследовании синтеза ДНК и РНК.

о) Поглощение ^{I4}C -дезоксиглюкозы лимфоцитами. В экспериментах использовали ^{I4}C -дезоксиглюкозу фирмы " Amersham " (Англия).

В культуры лимфоцитов на среде I99 добавляли I0 мкКи ^{I4}C - дезоксиглюкозы. Через различные промежутки времени по мере инкубации клеток при 37° С измеряли поглощение ими радиоактивной метки. Поглощение прерывали быстрой фильтрацией аликвот по I мл ($5 \cdot I0^{6}$ клеток/мл) через фильтры " Millipore " (диаметр 0,45 мкм) с тремя промывками по 5 мл следующей среды: $_{N}$ aCI -

150 мМ, трис-HCl буфер - 10 мМ, pH 7,4.

п) Включение ^{14}C -холина в фосфолипиды лимфоцитов. В экспериментах использовали ^{14}C -холин хлорид фирмы " Amersham ", (Англия). Синтез холинсодержащих фосфолипидов лимфоцитов оценивали по включению радиоактивной метки в липидные компоненты по методу (292) с незначительными изменениями, заключающимися в том, что экстракцию общих фосфолипидов из клеток проводили по методу (212).

р) Определение внутриклеточного уровня цАМФ и цГМФ в лимфоцитах. При определении внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов лимфоциты преинкубировали в среде 199 в течение 1 часа при 37°С, после чего в культуры вносили оптимальную митогенную концентрацию тромбина. Реакцию останавливали в момент внесения препарата, через 5, 15, 30 и 60 минут помещением культуры в ледяную баню. Уровень цАМФ и цГМФ в этаноловых экстрактах определяли радиоконкурентным методом с использованием наборов фирмы " Amersham " (Англия) и выражали в пмоль на 10^7 лимфоцитов.

с) Определение внутриклеточного уровня простагландинов в лимфоцитах. Эксперименты проводили по той же схеме, что и при определении циклических нуклеотидов. Экстракцию простагландинов из лимфоцитов осуществляли этилацетатом (288). Уровень простагландинов группы Е определяли с использованием наборов фирмы " Clinical Assays " (США), а простагландина $F_{2\alpha}$ - " Izotop" (ВНР) и выражали в пкг на 10^7 клеток.

т) Определение кальмодулина в лимфоцитах. Лимфоциты культивировали в среде 199 в течение 1 часа в условиях, описанных выше. После 5-минутного центрифугирования при 1500 об/мин клеточные осадки подвергались гомогенизации в среде следующего состава:

0,I25 М боратный буфер, I мМ ЭГТА, 75 мМ N aCI, pH 8,4 (на $I0^7$ клеток добавляли 5 мл среды гомогенизации). Гомогенат разделяли на две равные части, одну из которых подвергали быстрой фильтрации через фильтры " Synpor " (диаметр пор 0,23 мкм) и тут же прогревали обе пробы на водяной бане при 90°С в течение 5 минут. Затем их быстро охлаждали и подвергали центрифугированию при I2000 об/мин в течение I5 минут при 4°С. Супернатанты использовались для определения уровня общего и цитозольного кальмодулина с помощью наборов фирмы " New England Nuclear " (Англия).

§ 3. Химико-аналитические методы.

а) Электрофорез ядерных белков лимфоцитов проводили по методу (263) в пластинах с линейным градиентом (8-20%) полиакриламидного геля. Образцы ядер ($I0^8$ ядер/мл) растворяли в равном объеме 0,I М трис-HCI буфера, pH 6,8, содержащего 2%-ный додецилсульфат натрия и 2%-ный 2-меркаптоэтанол и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2-х минут. В каждую лунку геля вносили по 50 мкл лизата ядер. На пластину геля размером I30xI80xI,5 мм подавали напряжение 250 В. Гели окрашивали в течение 30 минут в 0,I%-ном растворе кумасси ярко-голубого R -250. Денситометрию осуществляли с помощью специально сконструированного денситометра при длине волны 550 нм с интегратором И-02.

Для определения радиоактивности отдельных фракций ядерных белков тромбин-стимулированных лимфоцитов гель разрезали на кусочки, содержащие фракции и растворяли их в смеси пергидроль - концентрированный водный раствор аммиака (I0:I, об/об) в течение 4-х часов при 56°С. Добавляли во флаконы диоксановый сцинциллятор и подсчитывали радиоактивность на счетчике.

б) Извлечение липидов из лимфоцитов и очистку липидного

экстракта проводили по методу (2I2).

в) Определение липидного фосфора проводили по методу (289).

г) Тонкослойную хроматографию липидов проводили на пластинах с силикагелем 5/40 (" Chemapol ", ЧССР), используя в качестве подвижной фазы смесь хлороформ-метанол-вода (65:25:4) в соответствии с известными методами (44).

Фосфолипиды элюировали смесью хлороформ-метанол-гидроксид аммония (56:42:2).

д) Определение жирнокислотного состава фосфолипидов лимфоцитов осуществляли на газо-жидкостном хроматографе "Chrom -2" (ЧССР) с пламенно-ионизационным детектором на стеклянной колонке, заполненной хроматоном N - AW/DMCS , пропитанным I5%-ным Reoplex 400 (ЧССР). Температура колонки I96°С. Газ-носитель - гелий.

Метилирование жирных кислот проводили по методу (69). Кислоты идентифицировались с помощью соответствующих стандартов, а их содержание оценивали по площади пиков (I6).

е) Количественное определение общего холестерина лимфоцитов проводили по методу Либермана-Бурхарда.

ж) Содержание гидроперекисей липидов измеряли по поглощению конъюгированных диеновых структур при 233 нм после перевода экстрагированных липидов в гептан (27).

з) Содержание белка измеряли по методу (267) и спектрофотометрически, принимая, что $A_{280}^{1\%}$ для α-тромбина составляет I9,5 (290).

§4. Методы определения ферментативной активности.

а) Активность 5'-нуклеотидазы лимфоцитов определяли в среде следующего состава: 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, I0 мМ $MgCl_2$, 0,85% NaCl, 5 мМ 5-АМФ при 37°С. Реакцию начинали добавлением 200 мкл

суспензии лимфоцитов в 0,85%-ном растворе NaCl ($15 \cdot 10^6$ клеток/мл) к I мл среды инкубации и останавливали через 30 минут прибавлением I,2 мл I0%-ной ТХУ. Количество отщепившегося неорганического фосфата (P_i) определяли следующим образом. К 2,5 мл дистиллированной воды последовательно добавляли 0,5 мл исследуемой пробы, 0,I мл 33%-ного Na_2SO_3, I мл 2,5%-ного $(NH_4)_2MoO_4$ и 0,5 мл 2%-ной аскорбиновой кислоты. Пробу подвергали нагреванию в кипящей водяной бане в течение 20 минут, после чего ее объем доводили до 5 мл дистиллированной водой и фотометрировали против контроля на реактивы при 822 нм. Активность фермента рассчитывали в мкг P_i на 10^7 клеток за I час.

б) Определение активности γ-глутамилтранспептидазы в гомогенате лимфоцитов проводили с помощью наборов фирмы " Lachema " (ЧССР). Активность фермента выражали в мкМ·мин$^{-I}$·мг белка$^{-I}$.

в) Активность лактатдегидрогеназы в культуральных супернатантах определяли спектрофотометрически (326).

г) Кинетику гидролиза экстраклеточной ДНК ДНКазой I регистрировали на спектрофотометре " Specord UV -VIS " (ГДР) по увеличению поглощения при 260 нм (гиперхромный эффект) и на спектрофлуориметре " Fica - 55" (Франция) по гашению интенсивности флуоресценции комплекса ДНК-этидий бромид. Возбуждение флуоресценции этидия бромида проводили при 520 нм, а регистрацию - при 6I0 нм (I8).

д) Фибриноген-свертывающую активность α-тромбина и лизата ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов определяли визуально по времени образования сгустка фибрина и по интенсивности флуоресценции фибринопептидов А и Б, отщепляемых от дансилированного

фибриногена (ДНС-фибриноген)[x].

§ 5. Спектральные методы исследования

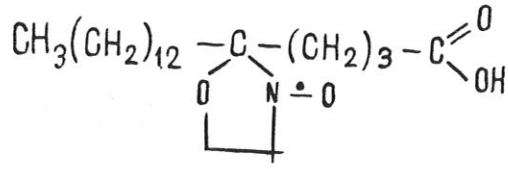
Эта серия экспериментов проведена на базе отдела автоматических спектральных исследований Института физики АН БССР.

а) Спектры комбинационного рассеяния (КР) α-тромбина были получены на Раман-спектрометре " Ramalog SPEX I40I" (США). Твердые образцы α-тромбина помещали в капилляры из пирекса с внутренним диаметром I мм. Для возбуждения использовалась линия 5I4,5 нм Ar^+-лазера. Спектры записывались при мощности лазера 200-300 мВт, напряжения на ФЭУ II50 В, ширине щели 400 мкм, скорости сканирования 50 $см^{-I}$/мин и постоянной времени I,5 сек. Спектры КР воспроизводились 3-4 раза.

б) Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре "Varian" (США) при 25° С в следующем режиме: мощность СВЧ-излучения - I0 мВт, амплитуда высокочастотной модуляции - 2-4 Гс, скорость развертки магнитного поля I0 Гс/мин при постоянной времени I сек. В качестве зонда использовали 2-(3-карбоксипропил)-2-тридецил-4,4-диметил-3-оксазолидинилоксил, структурная формула и спектр ЭПР которого приведены на рис. 5. Спиновый зонд вводили в суспензию свежеизолированных лимфоцитов в виде этанольного раствора. Концентрация зонда в образце составляла $5 \cdot I0^{-5}$ М, этанола I об.%. Включение зонда в мембраны лимфоцитов проводили в течение I часа при 37° С, после чего их дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рекомендованным для работы с клетками фирмой " Serva ": на I л бидистиллированной воды 8 г NaCI, 0,2 г KCI, I,0 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,I5 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,2 г KH_2PO_4. Концентрацию нагруженных зондом в ФСБ доводили до $I0^{I0}$ клеток/мл. ЭПР-спектры

---

[x] Авторское свидетельство СССР, № II6I878.



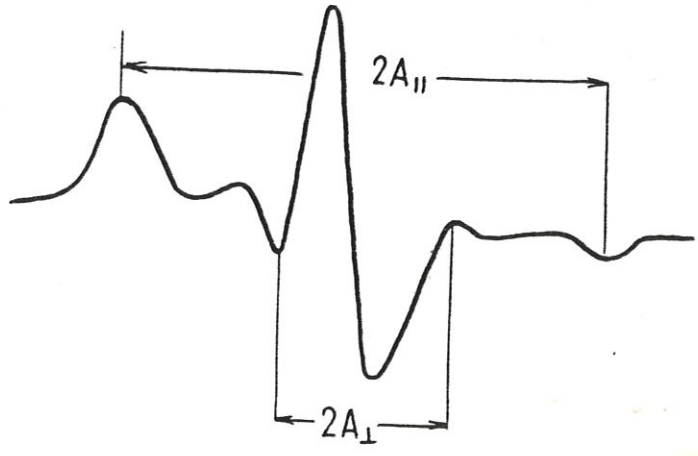


Рис. 5. Структурная формула и спектр ЭПР спинового зонда 2-(3-карбоксипропил)-2-тридецил-4,4-диметил-3-оксазолидинилоксила, встроенного в мембраны лимфоцитов селезенки мыши.

записывали в кварцевом капилляре с внутренним диаметром 0,9 мм. Для характеристики поведения зонда в мембране использовали параметр упорядоченности S , характеризующий подвижность жирнокислотных цепей мембранных липидов (28) и изотропную константу сверхтонкого взаимодействия (а), значения которой возрастают с увеличением полярности окружения нитроксильного фрагмента (60).

в) Истинные спектры флуоресценции α-тромбина регистрировали на спектрофлуориметре " Fica -55" (Франция) в растворе I0 мМ трис-HCI, pH 7,4. Возбуждение флуоресценции производили при 296 нм.

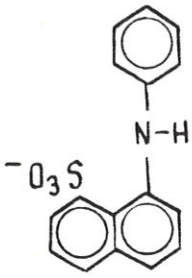
Относительный квантовый выход флуоресценции триптофанилов измеряли по методу Parker (297). Значение квантового выхода для водного раствора триптофана принимали равным 0,20 (344).

Степень поляризации флуоресценции триптофанилов (P) измеряли при 20° C на спектрофлуорометре SZM 8000, соединенного с компьютером Hewlett Packard (США).

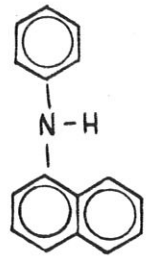
Кривые затухания флуоресценции α-тромбина измеряли на спектрофлуорометре PRA - Sys -3000 (Канада) при $\lambda_{возб.}$=296 нм, $\lambda_{рег.}$=335 нм.

г) Для изучения состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов использовали следующие флуоресцентные зонды: АНС, ГДА, ДДА, ФНА, пирен, ПДК, ДФГТ. Структурные формулы этих зондов представлены на рис. 6.

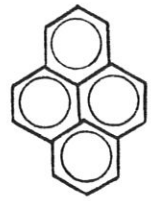
Для флуоресцентного мечения суспензию лимфоцитов трижды отмывали от среды I99 фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали в этом же буфере до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. Пирен, ПДК, ГДА и ДДА добавляли в концентрации I0 мкМ (конечная концентрация), АНС - 20 мкМ, ДФГТ - I мкМ, ФНА - 50 мкМ. После инкубации в тече-



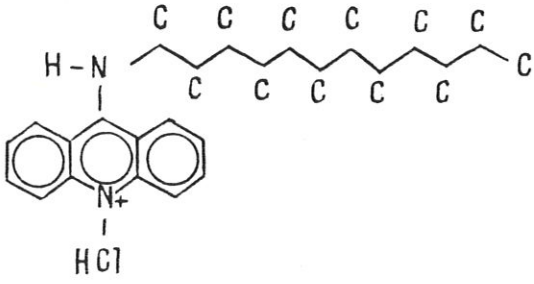
I-Анилинонафталин-8-сульфонат (АНС)



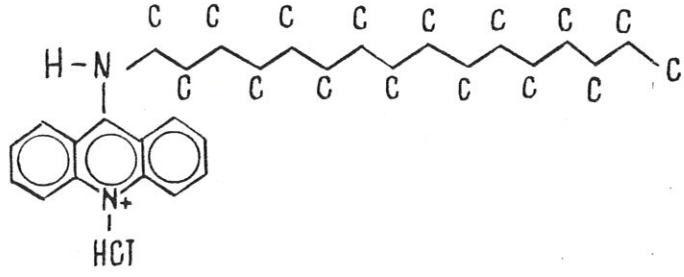
N-Фенил-I-нафтиламин (ФНА)



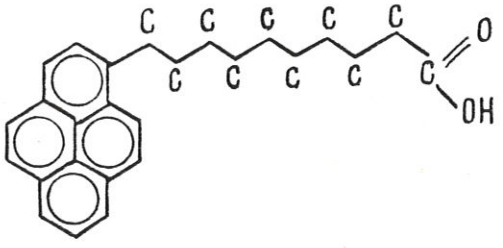
Пирен



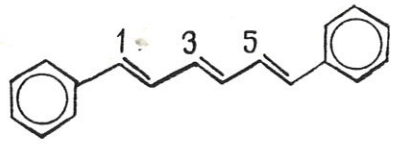
9-Додециламиноакридин гидрохлорид (ДДА)



9-Гексадециламиноакридин гидрохлорид (ГДА)



I0-Пирендекановая кислота (ПДК)



I,6-Дифенил-I,3,5-гексатриен (ДФГТ)

Рис. 6. Структурные формулы флуоресцентных зондов.

ние 45 минут при 37° С клетки отмывали от невстроившегося зонда и концентрацию клеток доводили до $2 \cdot 10^6$ в I мл ФСБ.

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре " Fica -55" (Франция) или SZM 8000 (США) в кварцевых кюветах (I0 x I0 мм) при ширине щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии соответственно 5 и 2 нм. Флуоресценцию пирена, ПДК, ФНА и ДФГТ возбуждали при длине волны 340 нм, АНС - при 365 нм, ГДА и ДДА - при 362 нм.

Поляризация флуоресценции зондов, встроенных в мембраны лимфоцитов, измерена при ширине щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии I0 нм.

д) Уровень флуоресцирующих оснований Шиффа в лимфоцитах регистрировали по спектрам флуоресценции растворов липидов в хлороформе с максимумом возбуждения при 360 нм и максимумом испускания в области 420-440 нм (8I) на спектрофлуориметре " Fica -55".

е) Измерение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в лимфоцитах проводили с использованием высокоселективного флуоресцентного хелатора квин 2 АМ (235). Флуоресценцию комплексов Ca^{2+}-квин регистрировали на спектрофлуорометре SZM 8000 (США). Длина волны возбуждения и флуоресценции - 339 и 492 нм, размер щели 4 и I0 нм, соответственно. Измерения проводили при комнатной температуре.

Процентное содержание комплексов Ca^{2+}-квин в цитоплазме лимфоцитов рассчитывали по уравнению, предложенному в работе (235).

Для расчета концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме лимфоцитов (Cain) использовали уравнение, предложенное в работе (350).

§ 6. Методы оценки влияния экстраклеточной ДНК на реакции иммунокомпетентных клеток и тромбоцитов.

В этой серии экспериментов использовали иммунокомпетентные клетки (лимфоциты, гранулоциты) и тромбоциты, полученные из венозной крови доноров Белорусского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови.

Исходный раствор экстраклеточной ДНК, полученной из культуральных супернатантов лимфоцитов, был приготовлен на I0 мМ трис-HCI буфере, pH 7,4 и имел концентрацию I00 мкг/мл.

а) Реакция спонтанного розеткообразования лимфоцитов периферической крови человека с эритроцитами барана. Чистые суспензии мононуклеарных клеток получали путем центрифугирования крови доноров в одноступенчатом градиенте фиколла-верографина с плотностью I,077 г/см^3 (I63). Лимфоциты дважды отмывали средой I99 до концентрации 2·I0^6 клеток/мл. Клеточные суспензии были обработаны экстраклеточной ДНК. С этой целью к 0,5 мл суспензии лимфоцитов добавляли 50 мкл (5 мкг) исходного раствора экстраклеточной ДНК (в контрольные пробы добавляли 50 мкл I0 мМ раствора трис-HCI, pH 7,4) и инкубировали в течение I часа при 37^o С, а затем ставили реакцию Е-розеткообразования (247). Мазки фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Используя масляную иммерсию подсчитывали процентное содержание розеткообразующих клеток (РОК) на 200 клеток. За одну розеткообразующую клетку принимали лимфоцит, присоединивший три и более лимфоцитов.

б) Фагоцитарная активность гранулоцитов. Выделение гранулоцитов из венозной крови доноров проводили по методу (I63). К 0,I мл взвеси гранулоцитов добавляли 60 мкл (6 мкг) исходного раствора экстраклеточной ДНК (в контрольные пробы добавляли 60 мкл I0 мМ трис-HCI буфера, pH 7,4), инкубировали в течение 30 минут при 37^o С, после чего клетки дважды отмывали раствором Хенкса до

концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. Затем к 0,I мл взвеси гранулоцитов добавляли 0,I мл миллиардной взвеси золотистого стафилококка и инкубировали в течение 30 минут при 37° С. Клетки осаждали центрифугированием и готовили мазки. Мазки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. В каждом мазке под масляной иммерсией подсчитывали по 200 гранулоцитов. Для оценки фагоцитарной активности гранулоцитов рассчитывали следующие показатели: I) фагоцитарный показатель - процент фагоцитарных клеток; 2) фагоцитарный индекс - среднее число фагоцитированных частиц на один гранулоцит; 3) фагоцитарное число - среднее число фагоцитированных частиц на один фагоцитирующий гранулоцит.

в) Агрегационная способность тромбоцитов. К I мл богатой тромбоцитами плазмы крови доноров (I50 000 - 200 000 клеток/мкл) добавляли I00 мкл (I0 мкг) исходного раствора экстраклеточной ДНК и фотометрически регистрировали агрегационную способность тромбоцитов (I62).

§ 7. Метод электрофореза клеток.

Измерение электрофоретической подвижности (ЭФП) лимфоцитов селезенки мыши проводили на цитоферометре фирмы "Opton " (ГДР) в I/I5 М фосфатном буфере, pH 7,3, содержащем I0 мМ глюкозу, при комнатной температуре.

§ 8. Математическая обработка данных.

Ожидаемое распределение аминокислотных пар i ,$i+I$ в различных элементах вторичной структуры белков вычисляли в предположении независимого расположения аминокислотных остатков в пределах каждой индивидуальной последовательности (I53).

В качестве теста для оценки случайного спаривания аминокислот использовали величину нормированного отклонения Zij . Спаривание аминокислотных остатков рассматривалось как неслучайное при $|Zij| > 3,0$ (256).

Квадратные матрицы 20x20 распределения соседних пар аминокислот анализировались с помощью критерия кси-квадрат (43).

Для сравнительной оценки эффективности алгоритмов предсказания вторичной структуры глобулярных белков использовали коэффициент корреляции (С), предложенный в работе (279).

Достоверность различий между средними значениями измеряемых величин оценивали по критерию Стьюдента (96). Различия рассматривались как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$. Вычисления производились на ЭЦВМ "Электроника МК-54" или "Электроника МК-61" по программе, составленной О.В.Колесса.

§ 9. Использованные реактивы и препараты.

α-Тромбин человека любезно предоставлен профессором J.Fenton (США), за что автор выражает ему свою искреннюю благодарность и признательность. Удельная свертывающая активность препарата составляла 2700 NIH ед/мг.

Инактивацию α-тромбина проводили с использованием ФМСФ (283).

Иодирование α-тромбина осуществляли общепринятым методом (134).

В работе использовали следующие реактивы: гидроксимочевина, пирен, N -фенил-1-нафтиламин, N -гидроксиэтилпиперазин-2-этансульфоновая кислота (HEPES), кордицепин, митомицин С -" Sigma " (США), проназа, актиномицин Д, ДНКаза I, квин 2-АМ "Calbiochem "

(США), l-глутамин - "Dibco" (США), фитогемагглютинин Р - "Difco" (США), меркаптоэтанол-"Eastman Kodak" (США), хлорпромазин, 2-(3-карбоксипропил)-2-тридецил-4,4-диметил-3-оксазолидинилоксил - "Ciba" (США), 9-додециламиноакридин гидрохлорид, 9-гексадециламиноакридин гидрохлорид, 10-пирендекановая кислота, 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен -"Molecular Probes" (США), А 23187 - "Lilly" (США), нонидет Р-40, рРНК из E. coli - "BDH" (АНГЛИЯ), ^{14}C -дезоксиглюкоза, ^{14}C - холин хлорид - "Amersham" (АНГЛИЯ), тритон Х-100, кумасси ярко-голубой R -250 - "Ferak" (Берлин), фенилметилсульфонилфторид - "Boehringer" (ФРГ), додецилсульфат натрия, этидий бромид, РНКаза А, 1-анилино-нафталин-8-сульфонат, этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир)-N-N-тетрауксусная кислота (ЭГТА) - "Serva" (ФРГ), суммарный препарат дрожжевой тРНК - "Boehringer Mannheim" (ФРГ), фиколл - "Pharmacia" (Швеция), верографин, гепарин - "Spofa" (ЧССР), ^{14}C -гидролизат белков хлореллы - "UVVVR" (ЧССР), нитросиний тетразолий - "Chemapol" (ЧССР), верапамил - "Orion" (Финляндия), трис, глутаровый альдегид, сахароза, АДФ, ЭДТА, 5-аденозинмонофосфорная кислота, кальмодулин, акриламид, метиленбисакриламид, тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония, глицин - "Reanal" (ВНР), фибриноген - "Каунасское предприятие бакпрепаратов", ^{3}H - тимидин, ^{14}C -тимидин, ^{3}H - лейцин, $Na^{131}I$ -"Изотоп" (СССР). Остальные препараты и реактивы (квалификации хч) отечественного производства.

ГЛАВА Ш. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПРЕДСКАЗАНИЯ СТРУКТУРНОГО КЛАССА, ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ α-ТРОМБИНА И ЕГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ α-ТРОМБИНА.

§ I. Состояние проблемы и постановка задачи

В последние годы биохимия и биофизика достигла решающих успехов в понимании способов функционирования белков в связи с различными уровнями их структурной организации. Решение многих биологических проблем неминуемо сталкивается с необходимостью изучения структуры белков. Уровень знаний в этой области в значительной степени определяет развитие многих направлений не только в биологии, но и в медицине, фармакологии и ряде других смежных наук. Это делает проблему пространственной организации белковых молекул самой актуальной, ключевой проблемой биологии.

В настоящее время практически единственным экспериментальным методом исследования пространственного строения белка является рентгеноструктурный анализ. Однако большая сложность кристаллографических исследований и высокая дороговизна используемой аппаратуры делают этот метод малодоступным. Поскольку в первичной структуре заложена полная информация о структуре белка, то в принципе можно установить его пространственное строение по аминокислотной последовательности без рентгеноструктурного анализа. Первым этапом в этом направлении может служить более тщательное исследование взаимосвязи между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белков (94, 95, I20, 70, 7I, I79-I82, 206, 207). Поэтому разработка корректного алгоритма теоретического предсказания вторичной структуры глобулярных

белков по их аминокислотной последовательности является актуальной как с точки зрения установления взаимосвязи между двумя низшими уровнями структурной организации белков, так и последующего предсказания структурных уровней более высокого порядка.

Теоретические методы, которые используются для предсказания пространственной структуры белков, можно разделить на 2 категории. К первой относятся методы, основанные на детальных расчетах геометрии в рамках модели атом-атомных потенциальных функций. В идеале эти методы претендуют на то, чтобы предсказывать энергии (а, стало быть, и вероятности) различных конформаций молекулы белка, исходя только из его химического строения. В этом направлении, особенно в последние годы, достигнут значительный прогресс (88, 89).

Ко второй категории теоретических методов относятся те, которые основаны на статистических и стереохимических закономерностях, выведенных из анализа пространственных характеристик структурно изученных белков. При разработке методов предсказания трехмерной структуры белков на основе статистических и стереохимических закономерностей исходят из предположения о том, что самоорганизация белковой молекулы является спонтанным процессом и осуществляется через ряд промежуточных структур, имеющих наибольшую стабильность, причем каждая предыдущая структура определяет характер последующей (95). Предсказание пространственной структуры белка на основе статистических и стереохимических закономерностей включает три основных этапа: I) предсказание регулярных вторичных структур; 2) приблизительная упаковка α-спиралей и β-структурных участков и 3) использование упрощенных энергетических расчетов для уточнения предполагаемых нативных

структур (I84). В исследованиях этого направления при обсуждении пространственной организации белка подразумевается лишь конфигурация пептидного остова. Однако достижение конечной цели при такого рода моделировании представляет собой очень трудную задачу и в настоящее время удовлетворительно разработаны лишь методы более или менее точного предсказания вторичной структуры для полипептидной цепи с заданной аминокислотной последовательностью, т.е. первого этапа предсказания пространственной организации белка. Рассмотрим, какие же результаты были достигнуты в отношении предсказания вторичной структуры белка по его аминокислотной последовательности.

Данные о взаимосвязи между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой впервые были получены при исследовании синтетических полипептидов (I58). Эти данные положили начало многочисленным поискам простых корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белков. Наиболее ранними в этом направлении, имеющими в настоящее время лишь исторический интерес, были работы (I20, I86, 225, 302, 309), которые показали, что между аминокислотным составом или последовательностью участка белка и его вторичной структурой существуют статистически достоверные корреляции. Однако предсказательная способность этих методов была крайне низкой в силу малочисленности известных трехмерных белковых структур. По мере расширения базисных данных точность предсказательных методов существенно улучшилась.

Вероятностные методы предсказания вторичной структуры основаны на статистическом анализе аминокислотных остатков в различных элементах вторичной структуры белков с известным пространст-

венным строением. Первые эмпирические корреляции предсказания α-спиральных и β-структурных участков глобулярных белков, использующие тезис о доминантной роли ближних взаимодействий (в пределах одного остатка) в образовании вторичных структур (258), и, давшие разумное согласие с экспериментом, были разработаны О.Б.Птицыным и А.В.Финкельштейном (94). Следует, однако, указать, что положение о доминантной роли ближних взаимодействий в формировании элементов вторичной структуры белков является спорным, поскольку из ряда работ следует, что взаимодействия между соседними по цепи остатками (средние взаимодействия) являются одним из важнейших факторов, обусловливающих их конформационное состояние (72). Наиболее глубоко и подробно этот вопрос рассмотрен Е.М.Поповым (89).

Учитывая важную роль межостаточных взаимодействий в формировании элементов вторичной структуры, многие методы предсказания используют частоты встречаемости и склонности пар аминокислот от $i \pm 1$ до $i \pm 8$ (291, 301, 317, 366) и триплетов (291, 366) встраиваться во вторичную структуру.

Физико-химические методы предсказания вторичной структуры основываются не только на известных корреляциях между аминокислотной последовательностью и структурой базисных белков, но используют также другие экспериментальные и теоретические данные. Совокупность этих методов можно разделить на две группы: 1) методы, основанные на стереохимическом анализе и 2) методы, основанные на статистической механике.

Стереохимический подход впервые был использован для анализа α-спиральной конформации на основе данных по распределению гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности α-спиралей мио-

глобина и гемоглобина (325). В дальнейшем этот подход был развит В.И.Лимом (70,7I), который предложил стереохимическую теорию вторичной структуры глобулярных белков.

Методы статистической механики для предсказания вторичной структуры белков впервые были использованы в работе (258). Авторы рассчитали для всех аминокислотных остатков статистические веса нахождения данного остатка в конформации правой α-спирали, левой α-спирали и β-складчатого листа с учетом ван-дер-ваальсовых взаимодействий между различными частями цепи и вклада свободной энергии растворителя. Для каждого аминокислотного остатка конформация с наибольшей величиной статистического веса принималась за его склонность к встраиванию во вторичную структуру белков.

А.И.Денесюк и соавт. (32) предложили теорию спиральной структуры развернутых полипептидных цепей белка, которая базируется только на значениях термодинамических параметров, полученных в опытах с синтетическими полипептидами и характеризующих инициирование и процесс роста инициированных спиральных участков.

Многие авторы для предсказания элементов вторичной структуры белков использовали алгоритмы, основанные на модели Зимма-Брэгга (I79, I80, 205, 207). Из всей совокупности этих методов наиболее популярным является метод предсказания вторичной структуры белков Чоу-Фасмана (I79, I80).

Чтобы оценить эффективность любого алгоритма предсказания вторичной структуры необходимо провести сравнение предсказанных конформационных состояний для всех аминокислотных остатков в белке с их конформационными состояниями, определенными на осно-

ве рентгеноструктурного анализа. Для этого предложены разнообразные критерии, отражающие различные аспекты предсказаний (94, I79, I80, 258). Одним из наиболее широко распространенных критериев является статистический показатель - коэффициент корреляции С (279). Сравнительная оценка эффективности различных предсказательных методов с использованием коэффициента корреляции показала (280), что типичной является ситуация, когда какой-либо алгоритм удовлетворительно предсказывает вторичную структуру одного белка и неудовлетворительно - структуру другого. Поэтому трудно обсуждать вопрос о предпочтительности того или иного алгоритма предсказания. Такой вывод ставит на повестку дня вопрос о разработке объективного алгоритма предсказания вторичной структуры, имеющего успех как в отношении белков с известной пространственной организацией, так и структурно не изученных белков. В исследованиях этого направления необходимо учитывать следующие соображения. Во-первых, принимая во внимание весьма субъективный характер идентификации различных элементов вторичной структуры по данным кристаллографических исследований, следует использовать базисные белки, выделение вторичных структур у которых проводилось единым методом. Во-вторых, учитывая проблематичность гипотезы о доминантной роли в образовании вторичных структур ближних взаимодействий, с одной стороны, и недостаток экспериментальных данных для использования триплетной информации, с другой стороны, следует отдавать предпочтение разработке предсказательных алгоритмов, учитывающих парные корреляции между соседними аминокислотными остатками, так как взаимодействие между ними является одним из важнейших факторов конформационного состояния их основных и боковых цепей. В третьих, дальнейшее повы-

шение эффективности предсказательных алгоритмов возможно при наличии предварительной информации о структурном классе (I67), что требует разработки априорных методов его предсказания.

Проблемы оценки точности предсказания и сравнения различных алгоритмов предсказания также являются областями, нуждающимися в дальнейшей разработке. Останавливаясь на первом из упомянутых здесь аспектов, нужно отметить, что наиболее корректными показателями оценки эффективности предсказательных алгоритмов должны быть объединенные показатели, учитывающие α-спирали, β-структуру и β-повороты одновременно, поскольку их предсказания не являются независимыми. Наиболее простым из таких показателей является процентное содержание всех остатков в белке, предсказанных правильно (I36).

Кроме того, сопоставление относительной точности различных предсказательных алгоритмов не может считаться корректным, если для этого используются различные тестовые белки. Это требует выделения строго определенной группы тестовых белков для сравнительной оценки эффективности различных предсказательных алгоритмов. Нами показано, что для объективной оценки эффективности предсказательного алгоритма и сравнения его с другими алгоритмами необходимо использовать в качестве тестовых белков единый набор простых белков различных структурных классов (5).

Учитывая вышеизложенное, была проведена разработка методов предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков, учитывающих парные корреляции между соседними аминокислотными остатками их первичных структур. С помощью разработанных предсказательных алгоритмов предпринята попытка подойти к проблеме высокой специфичности α-тромбина с позиций сопоставле-

ния теоретически предсказанной вторичной структуры тромбина человека с данными кристаллографических исследований гомологичных сериновых протеиназ. Рассмотрение структурных особенностей (на уровне предсказанной вторичной структуры) β - и γ -тромбинов по сравнению с α -тромбином также может пролить свет на важность отдельных участков молекулы α -тромбина в осуществлении свертывающей функции фермента. Кроме того, крайне принципиальным является вопрос о структурном состоянии тромбин-чувствительных связей и соседних с ними областей в молекулах различных белковых субстратов.

§ 2. Разработка методов предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности

а) Взаимоотношения соседних аминокислотных остатков в структурированных участках глобулярных белков

Изменение аминокислотного состава белков в ходе эволюции отличается от того, что можно было бы ожидать на основе случайного характера замен аминокислот (I88). Вероятно, в процессе длительной биохимической эволюции устраняются биологически малопригодные сочетания аминокислот и сохраняются последовательности благоприятные для формирования определенных структур и осуществления функциональных свойств в естественно встречающихся белках (2II). Отсюда следует, что аминокислотная последовательность каждого белка является уникальной и неслучайной. Развитие этой проблемы связано с работами ряда авторов (43, I22, 259, 206). Однако, до сих пор неясно, какой характер носит расположение групп аминокислот в реальных белковых последовательностях

и в какой мере частота этих групп отличается от случайной (9I, 92).

Нами предпринята попытка установить, существуют ли определенные предпочтения между ближайшими аминокислотными остатками (i , i + I) в α-спиралях, β-структурных и нерегулярных участках глобулярных белков или же распределение этих пар аминокислот является случайным, т.е. определяется особенностями аминокислотного состава различных элементов вторичной структуры.

В выборку были включены аминокислотные последовательности 46 глобулярных белков, отобранные в работе (I44), которые содержали 8II5 аминокислотных остатков. Из них, в α-спиралях содержалось 2672 (32,9%) аминокислотных остатка, в β-структуре - 2383 (29,4%) и в нерегулярных участках - 3060 (37,7%).

Данные, приведенные в табл. 3, указывают на значительные отклонения в распределении частот некоторых аминокислот между различными элементами вторичной структуры белков от тех, которые следовало бы ожидать при случайном распределении. Эти отклонения являются наиболее явными в случае многофункциональных (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) и отличающихся по структуре (глицин - отсутствие бокового радикала; пролин - наличие вторичной аминогруппы; валин, изолейцин - разветвление бокового радикала у β-углеродного атома) аминокислот. Так, валин и изолейцин встречаются почти в 2 раза чаще, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты - в 2 раза реже в β-структуре по сравнению с α-спиралями и нерегулярными участками; наоборот, пролин и глицин гораздо чаще встречаются в нерегулярных участках, чем в α-спиралях и β-структуре.

Эти результаты находятся в согласии с многочисленными пред-

Таблица 3

Частота встречаемости аминокислотных остатков в различных элементах вторичной структуры глобулярных белков

Аминокислотный остаток	Элементы вторичной структуры		
	α - спираль	β -структура	нерегулярная структура
	($\times 10^{-2}$)	($\times 10^{-2}$)	($\times 10^{-2}$)
Pro	2,81 (0,319)	2,98 (0,348)	6,18 (0,436)
Gly	5,54 (0,442)	8,18 (0,561)	12,78(0,604)
Ser	5,99 (0,459)	8,18 (0,561)	10,16(0,546)
Tyr	2,47 (0,301)	4,74 (0,435)	3,56 (0,335)
Thr	4,90 (0,418)	7,72 (0,547)	6,93 (0,459)
Ile	4,42 (0,398)	7,13 (0,527)	3,10 (0,313)
Val	7,63 (0,514)	12,25 (0,672)	5,39 (0,408)
Phe	4,00 (0,379)	3,90 (0,397)	2,78 (0,297)
Ala	11,71 (0,622)	6,80 (0,516)	7,80 (0,485)
Leu	9,54 (0,568)	7,89 (0,552)	4,84 (0,388)
Lys	9,06 (0,555)	5,71 (0,475)	7,26 (0,469)
Gln	3,33 (0,347)	3,27 (0,364)	3,07 (0,312)
Glu	7,22 (0,501)	2,90 (0,344)	4,12 (0,359)
His	3,44 (0,353)	2,35 (0,310)	2,48 (0,281)
Met	1,95 (0,268)	1,47 (0,246)	0,92 (0,172)
Arg	2,77 (0,318)	2,98 (0,348)	2,71 (0,294)
Asp	6,02 (0,460)	3,57 (0,380)	7,06 (0,463)
Asn	3,63 (0,362)	3,27 (0,364)	5,75 (0,421)
Cys	1,95 (0,268)	2,69 (0,331)	2,03 (0,255)
Cys	1,81 (0,244)	2,01 (0,287)	1,34 (0,208)
Trp			

В скобках приведены значения среднего квадратического отклонения частот.

шествующими работами ряда авторов, посвященными статистике распределения аминокислот между различными участками белковых молекул.

Наличие отличительных особенностей аминокислотного состава α-спиралей, β-структуры и нерегулярных участков лежит в основе большинства методов предсказания вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности. Однако эффективность предсказания этих методов, как указывалось выше, еще недостаточно высока. Для более глубокого понимания взаимосвязи между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой необходим анализ распределения групп аминокислот в разных участках белков. Вследствие малого объема данных кристаллографических исследований белков такой анализ в настоящее время возможен только для аминокислотных пар.

В табл. 4-6 приведены данные, характеризующие реальное распределение аминокислотных пар i , i + I в α-спиралях, β-структуре и нерегулярных участках 46 глобулярных белков. Из 400 всевозможных дипептидов во всех элементах вторичной структуры с той или иной частотой встречаются 337 (84,2%) дипептидов. Из оставшихся 63 дипептидов, 9 дипептидов присутствуют и I6 отсутствуют в α-спиралях; 6 присутствуют и I8 отсутствуют в β-структуре; 4 присутствуют и I0 отсутствуют в нерегулярных участках белков. Анализ частот распределения этих дипептидов приводит к выводу о возможном существовании запрещенных аминокислотных пар i ,i + I в определенных элементах вторичной структуры. Например, дипептиды Ser - Glu , Asp - Asp , Ser - His вообще не встречаются в β-структуре, но широко представлены в α-спиралях (I4, I0, 7 раз) и нерегулярных участках (I3, I6 и 6 раз, соответст-

Таблица 4

Наблюдаемые частоты аминокислотных пар в α-спиральных участках 46 глобулярных белков

	Pro	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Gln	Glu	His	Met	Arg	Asp	Asn	Cys	Trp
Pro	I	4	4	I	4	3	7	I	9	4	8	I	I2	3	0	0	4	4	2	3
Gly	2	5	4	4	II	8	I5	6	I6	8	I8	3	22	4	0	7	7	5	2	I
Ser	3	9	8	5	8	5	I0	7	26	II	I0	7	I4	7	2	5	8	5	6	4
Tyr	2	5	5	3	3	2	3	4	4	9	5	2	3	0	2	I	5	I	2	2
Thr	7	4	7	3	5	6	6	6	I4	I6	I0	7	I2	6	2	0	9	8	I	2
Ile	I	5	7	2	3	II	4	6	I6	8	9	2	9	2	4	3	8	8	2	0
Val	2	8	9	5	9	7	I3	4	36	24	I8	II	4	7	2	4	I3	8	7	2
Phe	I	4	5	4	7	4	5	5	8	II	II	2	8	I	2	5	4	2	2	0
Ala	7	I2	I8	8	8	I2	29	I0	42	39	22	I3	I6	I6	7	5	I8	I0	2	7
Leu	I	I6	27	3	9	II	25	4	26	22	20	I0	I7	9	5	II	I7	3	0	2
Lys	5	2I	I8	9	I4	I0	24	I0	27	I6	26	3	9	II	8	5	II	4	4	2
Gln	0	3	3	2	3	2	6	I	II	8	9	4	7	4	0	5	5	3	2	3
Glu	I	7	4	9	II	6	I3	II	I8	22	20	I0	I7	7	6	I2	7	7	2	3
His	I	8	5	I	2	3	7	6	II	6	8	0	6	2	I	I	I	I	5	0
Met	I	4	2	0	2	3	5	3	4	3	8	I	6	I	3	2	2	2	0	0
Arg	0	3	4	I	I	4	2	4	4	II	4	6	4	5	4	2	3	3	3	I
Asp	9	8	6	4	5	II	I3	II	2I	I7	I4	0	I7	I	2	2	I0	4	4	2
Asn	6	5	2	2	6	3	II	7	8	9	5	6	6	5	0	2	2	2	5	5
Cys	0	2	2	0	4	2	2	0	5	7	II	0	2	0	I	I	4	2	I	I
Trp	0	2	4	0	2	5	4	I	7	4	6	I	0	I	I	I	4	0	0	0

Таблица 5

Наблюдаемые частоты аминокислотных пар в β-структурных участках 46 глобулярных белков

	Pro	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Gln	Glu	His	Met	Arg	Asp	Asn	Cys	Trp
Pro	6	6	8	0	3	3	II	2	2	I0	2	0	I	I	2	0	I	4	I	I
Gly	8	I7	22	I0	I9	I8	2I	5	II	I2	5	2	7	2	3	6	I0	5	6	5
Ser	4	22	I8	I5	I2	I0	2I	8	I2	24	8	2	0	0	2	4	5	2	6	8
Tyr	5	II	I0	9	II	6	7	3	8	6	4	5	4	2	0	2	7	8	4	I
Thr	3	I4	II	7	I4	8	29	I2	I0	I6	I0	5	5	6	4	5	8	4	9	4
Ile	4	I8	I3	8	I2	I4	2I	5	9	9	8	7	3	6	I	5	II	II	4	I
Val	I	23	29	9	25	I8	37	I3	27	I5	9	4	I3	II	2	II	I2	9	II	2
Phe	3	5	8	5	7	4	7	3	I	7	5	2	6	7	2	4	4	3	4	3
Ala	I0	I2	I5	5	I2	9	2I	4	I6	9	II	2	3	4	I	5	8	2	5	5
Leu	5	I0	I6	7	I5	2I	I9	7	7	I4	II	I6	5	6	4	4	3	4	3	3
Lys	3	5	7	I0	6	I2	24	3	II	I8	6	2	5	2	3	5	2	8	2	2
Gln	5	6	I0	5	2	3	7	4	7	4	5	7	0	I	I	3	5	I	I	I
Glu	3	7	4	I	4	4	I2	2	6	7	3	3	3	2	I	0	0	I	I	3
His	2	2	3	I	4	4	6	7	3	2	3	0	5	I	I	0	0	0	I	2
Met	0	2	2	I	4	4	8	3	2	2	2	I	I	0	0	0	2	0	0	I
Arg	3	4	8	4	5	6	I3	4	4	8	3	2	I	0	0	2	2	I	I	0
Asp	4	8	I	7	8	9	7	5	II	7	4	I	I	2	0	I	0	2	I	0
Asn	2	2	6	I	9	3	8	3	6	7	2	5	3	I	I	I	3	7	3	5
Cys	0	6	3	2	4	2	5	0	7	I0	5	8	I	2	I	I	I	I	0	0
Trp	0	8	I	4	4	3	8	0	2	I	4	2	2	0	0	I	I	3	I	0

Таблица 6

Наблюдаемые частоты аминокислотных пар в нерегулярных участках 46 глобулярных белков

	Pro	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Gln	Glu	His	Met	Arg	Asp	Asn	Cys	Trp
Pro	4	22	21	12	8	5	9	5	10	11	11	2	17	2	3	6	20	8	3	2
Gly	20	33	42	13	26	16	27	10	30	19	31	19	13	4	2	13	34	16	8	3
Ser	8	45	39	12	32	7	16	7	24	13	20	14	13	6	4	5	16	18	7	5
Tyr	10	18	14	1	8	2	7	0	5	1	5	6	4	4	0	5	5	2	1	3
Thr	14	28	26	6	12	7	12	8	15	8	15	7	5	4	1	4	10	6	2	4
Ile	13	10	9	3	4	3	5	4	7	2	12	3	1	0	0	2	4	5	2	2
Val	15	18	9	4	13	2	6	4	8	12	12	5	8	4	1	4	20	10	5	5
Phe	8	14	8	5	8	2	3	1	7	3	8	1	5	1	0	2	4	4	1	0
Ala	12	35	24	7	14	6	11	2	31	8	19	9	9	6	2	6	18	16	2	2
Leu	16	17	19	5	18	3	3	6	6	5	13	3	3	5	0	4	8	9	2	2
Lys	9	21	12	19	14	11	8	2	20	9	12	1	2	6	8	3	22	12	2	0
Gln	9	16	5	3	7	3	1	3	12	4	4	1	3	4	0	2	6	8	2	1
Gly	8	16	10	2	8	4	5	5	8	4	10	3	9	2	2	3	13	10	3	1
His	12	11	3	4	4	1	4	3	1	6	8	0	5	1	0	2	2	4	5	0
Met	1	2	1	0	3	2	0	0	0	0	4	2	3	1	0	0	4	3	0	0
Arg	5	13	9	3	7	0	6	0	4	7	5	4	2	1	0	2	1	4	1	1
Asp	8	25	28	2	10	11	12	7	18	11	10	4	10	1	2	7	16	19	3	5
Asn	10	21	17	6	11	8	7	6	7	6	11	4	8	1	2	5	10	13	1	2
Cys	4	16	9	2	1	2	1	0	5	2	3	3	0	1	1	6	1	5	0	0
Trp	3	10	4	0	4	0	1	0	2	0	2	0	3	0	0	2	2	4	2	2

венно . Аналогично, дипептиды Thr - Arg , Leu - Cys , Asp - Gln отсутствуют в α-спиралях, но с достаточной частотой встречаются в других участках вторичной структуры. С другой стороны, анализируя данные, представленные в табл. 4-6, можно предположить наличие специфических для определенной конформации дипептидов, а именно: Pro - Arg и Cys - Pro для нерегулярных участков, Trp - Tyr для β-структуры и т.д. Несомненно набор запрещенных и специфических дипептидов для различных участков вторичной структуры по мере увеличения выборки аминокислотных последовательностей будет уточняться.

Частота встречаемости некоторых дипептидов значительно зависит от последовательности аминокислот. Например, дипептид Glu - Pro в α-спиралях встречается только I раз, а Pro - Glu - I2 раз; Glu - Gly - 7, а Gly - Glu - 22; Arg - Glu - 4, а Glu - Arg - I2; Lys - Glu - 9, а Glu - Lys - 20 и т.д. Эти данные свидетельствуют о том, что конформационное состояние данного остатка определяется не только его собственной природой, но и характером соседних в последовательности остатков.

Величина критерия кси - квадрат по данным распределения аминокислотных пар i , i + I в α-спиралях, β-структуре и нерегулярных участках составляет 349, 498 и 5I6, соответственно. В данном случае для β-структуры $u_{0I} = 4{,}7I$, а для нерегулярных участков $u_{0I} = 5{,}27$. Поскольку, это больше одностороннего I%-ного граничного значения ($u_{0I} = 2{,}33$), то с высокой степенью надежности можно исключить нулевую гипотезу о случайном спаривании аминокислотных остатков в β-структуре и нерегулярных участках белков. Распределение же аминокислотных пар i , i + I в α-спиралях не отличается от случайного.

Сравнение реального распределения дипептидов в белках с их ожидаемым распределением с помощью значений нормированных отклонений показало, что в α-спиралях неслучайному спариванию отвечает лишь один дипептид Gly - Glu (Zij =3,43); в β-структуре - 4 дипептида : Phe - His (3,07), His - Phe (3,07), Leu - Gln (3,78) и Cys - Gln (3,85); в нерегулярных участках - 5 дипептидов : Pro - Gln (3,25), His - Pro (3,28), Cys - Arg (3,26), Lys - Met (3,70) и Lys - Tyr (3,75).

Наличие запрещенных и специфических дипептидов, а также дипептидов, соответствующих неслучайному спариванию, указывает на то, что существуют определенные предпочтения между ближайшими аминокислотными остатками и, следовательно, информация из частот встречаемости пар остатков i , $i+1$, отражающая взаимодействие между близкими по цепи остатками, может быть использована для повышения качества предсказания вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности.

б) Предсказание структурного класса глобулярных белков.

До сих пор не существует способа представления аминокислотной последовательности белка с неизвестной пространственной структурой, содержащего информацию о его структурном классе. Вместе с тем наличие предварительной информации о структурном классе белков позволяет повысить эффективность предсказательных методов их вторичной структуры по аминокислотной последовательности (167). Отсюда понятен интерес к предсказанию структурного класса глобулярных белков.

Распределение дипептидных фрагментов в элементах вторичной структуры глобулярных белков.

Вероятности встречаемости всевозможных дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях (табл.7) получены путем статистического анализа данных по пространственной структуре 46 глобулярных белков, отобранных в работе (I44).

Всего проанализировано 7736 дипептидов: 2471 - в α-спиралях, 2306 - в β-структуре и 2959 - в неупорядоченной конформации. Из 400 теоретически возможных дипептидов в элементах вторичной структуры изученных белков не встретились 2 дипептида: Met - Cys и His - Gln .

В табл. 7 N -концевые остатки дипептидов представлены столбцами, а С-концевые - строками. Анализ дипептидных фрагментов глобулярных белков с известной пространственной структурой свидетельствует о том, что вероятности встречаемости абсолютного большинства дипептидов значительно различаются для α-спиральных, β-структурных и неупорядоченных участков полипептидной цепи. В связи с этим была предпринята попытка выделения тех дипептидных фрагментов, которые встречаются преимущественно в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях.

Преимущественным состоянием данного дипептида считали то конформационное состояние, в котором вероятность его встречаемости была равна или более 0,50.

Построение карт преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях

Для построения карт преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях использовали квадратные матрицы 20 x 20, на которых N-концевые остатки дипептидов представлены столбцами, а С-концевые - стро-

Таблица 7

Вероятности встречаемости дипептидов в α-спиральной (первая строка), β-структурной (вторая строка) и неупорядоченной (нижняя строка) конформациях

	Ala	Leu	Ile	Phe	Met	Pro	Val	His	Lys	Arg
	0,50	0,70	0,45	0,60	0,70	0,25	0,50	0,65	0,45	0,33
Ala	0,20	0,20	0,35	0,25	0,I0	0,40	0,35	0,I5	0,25	0,33
	0,30	0,I0	0,20	0,I5	0,20	0,35	0,I5	0,20	0,30	0,33
	0,70	0,55	0,30	0,25	0,55	0,05	0,50	0,45	0,45	0,60
Leu	0,20	0,35	0,60	0,45	0,45	0,30	0,40	0,35	0,30	0,25
	0,I0	0,I0	0,I0	0,30	0	0,65	0,I0	0,20	0,25	0,I5
	0,50	0,40	0,40	0,40	0,80	0,05	0,I5	0,25	0,30	0,30
Ile	0,30	0,50	0,55	0,35	0,20	0,25	0,70	0,75	0,30	0,50
	0,20	0,I0	0,05	0,25	0	0,70	0,I5	0	0,40	0,20
	0,55	0,50	0,40	0,55	0,50	0,I0	0,35	0,I0	0,50	0,45
Phe	0,05	0,35	0,40	0,35	0,50	0,30	0,50	0,80	0,20	0,40
	0,40	0,I5	0,20	0,I0	0	0,60	0,I5	0,I0	0,30	0,I5
	0,65	0,55	0,35	0,50	I,00	0,55	0,35	0,55	0,60	I,00
Met	0,35	0,45	0,45	0,50	0	0	0,65	0	0,I5	0
	0	0	0,20	0	0	0,45	0	0,45	0,25	0
	0,45	0,I5	0,30	0,I5	0	0,I0	0,25	0,50	0,40	0
Pro	0,I0	0,45	0,30	0,30	0,50	0,60	0,45	0,I5	0,I0	0
	0,45	0,40	0,40	0,55	0,50	0,30	0,30	0,35	0,50	I,0
	0,50	0,50	0,25	0,20	0,40	0,I5	0,20	0,30	0,45	0,20
Val	0,40	0,30	0,70	0,65	0,45	0,05	0,70	0,55	0,25	0,60
	0,I0	0,20	0,05	0,I5	0,I5	0,80	0,I0	0,I5	0,30	0,20
	0,75	0,45	0,40	0,40	0,50	0,05	0,40	0,55	0,45	0,35
His	0,20	0,I5	0,55	0,45	0,50	0,I5	0,40	0,25	0,20	0
	0,05	0,40	0,05	0,I5	0	0,80	0,20	0,20	0,35	0,65
	0,50	0,35	0,30	0,65	0,45	0,30	0,40	0,60	0,60	0,40
Lys	0,20	0,45	0,40	0,20	0,20	0,20	0,45	0,I0	0,I5	0,40
	0,30	0,20	0,30	0,I5	0,35	0,50	0,I5	0,30	0,25	0,20
	0,35	0,45	0,40	0,50	I,00	0	0,I0	0,85	0,35	0,35
Arg	0,35	0,35	0,55	0,50	0	0,45	0,65	0	0,30	0,35
	0,30	0,20	0,05	0	0	0,55	0,25	0,I5	0,35	0,30

(продолжение табл. 7)

	Ser	Thr	Tyr	Trp	Asp	Asn	Glu	Gln	Cys	Gly
	0,35	0,25	0,40	0,50	0,45	0,40	0,60	0,55	0,20	0,20
Ala	0,30	0,40	0,25	0,35	0,20	0,I0	0,I0	0,I0	0,60	0,25
	0,35	0,35	0,35	0,I5	0,35	0,50	0,30	0,35	0,20	0,55
	0,45	0,20	0,20	0,30	0,50	0,I5	0,55	0,35	0,20	0,40
Leu	0,30	0,40	0,50	0,45	0,I0	0,20	0,I5	0,60	0,55	0,25
	0,25	0,40	0,30	0,25	0,40	0,65	0,30	0,05	0,25	0,35
	0,25	0,I5	0,I5	0	0,35	0,35	0,70	0,I5	0,25	0,I5
Gle	0,50	0,65	0,65	0,35	0,50	0,50	0,25	0,60	0,45	0,60
	0,25	0,20	0,20	0,65	0,I5	0,I5	0,05	0,25	0,30	0,25
	0,25	0,33	0,30	0	0,35	0,25	0,45	0,40	0,30	0,20
Phe	0,40	0,33	0,40	I,0	0,35	0,40	0,35	0,45	0,60	0,25
	0,35	0,33	0,30	0	0,30	0,35	0,20	0,I5	0,I0	0,55
	0,40	0,20	0	0	0,25	0,45	0,65	0,25		0,50
Met	0,45	0,50	I,0	I,0	0,30	0	0,I0	0,25		0,30
	0,I5	0,30	0	0	0,45	0,55	0,25	0,50		0,20
	0,I5	0,30	0,I0	0,50	0,20	0,25	0,45	0,35	0,35	0,I5
Pro	0,30	0,25	0	0,I5	0,05	0,30	0,05	0	0,20	0,20
	0,55	0,45	0,90	0,35	0,75	0,45	0,50	0,65	0,45	0,65
	0,20	0,20	0,35	0,2	0,30	0,25	0,I5	0,60	0,30	0,I5
Val	0,65	0,55	0,45	0,25	0,30	0,40	0,55	0,20	0,50	0,50
	0,I5	0,25	0,20	0,50	0,40	0,35	0,30	0,20	0,20	0,35
	0,40	0,20	0,20	0	0,35	0,20	0,40		0,50	0,40
His	0,40	0,45	0,20	I,0	0	0	0,35		0,I0	0,I0
	0,20	0,35	0,60	0	0,65	0,80	0,25		0,40	0,50
	0,50	0,45	0,25	0,50	0,35	0,I5	0,55	0,45	0,50	0,50
Lys	0,20	0,20	0,30	0,50	0,05	0,40	0,35	0,45	0,30	0,I0
	0,30	0,35	0,45	0	0,60	0,45	0,I0	0,I0	0,20	0,40
	0,20	0,05	0,I5	0,55	0,50	0,40	0,60	0,50	0,65	0,I5
Arg	0,45	0,45	0,55	0	0,40	0,I5	0,I5	0,20	0,20	0,25
	0,35	0,50	0,30	0,45	0,I0	0,45	0,25	0,30	0,I5	0,60

(продолжение табл. 7)

	Ala	Leu	Gle	Phe	Met	Pro	Val	His	Lys	Arg
	0,45	0,25	0,25	0,30	0,25	0,20	0,20	0,60	0,30	0,40
Ser	0,20	0,50	0,50	0,40	0,25	0,30	0,50	0	0,25	0,30
	0,35	0,25	0,25	0,30	0,50	0,50	0,30	0,40	0,45	0,30
	0,35	0,40	0,30	0,25	0,30	0,30	0,I0	0,35	0,30	0
Thr	0,30	0,45	0,40	0,50	0,60	0,I5	0,65	0,40	0,30	0,60
	0,35	0,I5	0,30	0,25	0,I0	0,55	0,25	0,25	0,40	0,40
	0,25	0,55	0,20	0,55	I,0	0,I5	0,20	0	0,40	0,I5
Tyr	0,50	0,40	0,65	0,45	0	0,35	0,45	0,50	0,30	0,30
	0,25	0,05	0,I5	0	0	0,50	0,35	0,50	0,30	0,55
	0,65	0,80	0,60	I,0	I,0	0	0,30	I,0	0,50	0,25
Trp	0,20	0,20	0,40	0	0	0	0,65	0	0,35	0,25
	0,I5	0	0	0	0	I,0	0,05	0	0,I5	0,50
	0,45	0,50	0,40	0,50	0,50	0,45	0,40	0,25	0,50	0,20
Asp	0,25	0,20	0,30	0,25	0	0,20	0,25	0,55	0,I5	0,I0
	0,30	0,30	0,30	0,25	0,50	0,35	0,35	0,20	0,35	0,70
	0,40	0,40	0,25	0,45	0,30	0,35	0,45	0,75	0,30	0,30
Asn	0,30	0,35	0,25	0,20	0,30	0,I5	0,35	0,I5	0,I0	0,I5
	0,30	0,25	0,50	0,35	0,40	0,50	0,20	0,I0	0,60	0,55
	0,60	0,65	0,45	0,50	0,70	0,I0	0,45	0,65	0,65	0,80
Glu	0,20	0,25	0,30	0,20	0,I0	0,30	0,45	0,20	0,I0	0,05
	0,20	0,I0	0,25	0,30	0,20	0,60	0,I0	0,I5	0,25	0,I5
	0,40	0,50	0,25	0,I5	0,50	0	0,40	0,40	0,50	0,50
Gln	0,25	0,30	0,40	0,55	0,50	0,45	0,55	0,20	0,30	0,30
	0,35	0,20	0,35	0,30	0	0,55	0,05	0,40	0,20	0,20
	0,30	0,35	0,35	0	0,35	0	0,25	0	0,60	0,I5
Cys	0,45	0,55	0,35	0	0,35	0	0,65	0,75	0,30	0,I5
	0,25	0,I0	0,30	I,0	0,30	I,0	0,I0	0,25	0,I0	0,70
	0,30	0,20	0,20	0,30	0	0,05	0,20	0,40	0,35	0,35
Gly	0,20	0,35	0,45	0,25	0,65	0,30	0,40	0,20	0,I0	0,25
	0,50	0,45	0,35	0,45	0,35	0,65	0,40	0,40	0,55	0,45

(продолжение табл. 7)

	Ser	Thr	Tyr	Trp	Asp	Asn	Glu	Gln	Cys	Gly
	0,I5	0,I5	0,I5	0,25	0,30	0,20	0,55	0,35	0,35	0,I5
Ser	0,30	0,25	0,50	0,50	0,25	0,I0	0	0,I0	0,30	0,35
	0,55	0,60	0,35	0,25	0,45	0,70	0,45	0,55	0,35	0,50
	0,I5	0,I5	0,20	0,20	0,35	0,45	0,55	0,40	0,I0	0,I0
Thr	0,30	0,50	0,500	0,45	0,35	0,25	0,25	0,30	0,70	0,35
	0,55	0,35	0,30	0,35	0,30	0,30	0,20	0,30	0,20	0,55
	0,20	0,I5	0,20	0,35	0,30	0,I0	0,30	0,20	0,30	0,I5
Tyr	0,40	0,55	0,70	0,20	0,45	0,75	0,40	0,40	0,60	0,35
	0,40	0,30	0,I0	0,45	0,25	0,I5	0,30	0,40	0,I0	0,50
	0,45	0,20	0,20	0	0,60	0	0	0,30	0	0,I0
Trp	0,I5	0,45	0,80	0	0,I5	0,50	0,50	0,70	0,35	0,45
	0,40	0,35	0	I,00	0,25	0,50	0,50	0	0,65	0,45
	0,20	0,20	0,30	0,30	0,40	0,20	0,65	0	0,55	0,20
Asp	0,05	0,40	0,55	0	0	0,I0	0,05	0,20	0,I5	0,25
	0,75	0,40	0,I5	0,70	0,60	0,70	0,30	0,80	0,30	0,55
	0,I0	0,25	0,25	0,40	0,I5	0,I0	0,40	0,40	0,55	0,25
Asn	0,30	0,40	0,I0	0,40	0,25	0,35	0,20	0,40	0,35	0,I0
	0,60	0,35	0,65	0,20	0,60	0,55	0,40	0,20	0,I0	0,65
	0,25	0,50	0,75	0,45	0,40	0,40	0,60	0,65	0,35	0,25
Glu	0,25	0,20	0,I0	0,45	0	0,05	0,I0	0,20	0,20	0,25
	0,50	0,30	0,I5	0,I0	0,60	0,55	0,30	0,I5	0,45	0,50
	0,I5	0,25	0,20	0,50	0,33	0,30	0,75	0,35	0,40	0,I0
Gln	0,60	0,25	0,55	0,35	0,33	0,I0	0	0,60	0,20	0,30
	0,25	0,50	0,25	0,I5	0,33	0,60	0,25	0,05	0,40	0,60
	0,I5	0,45	0	I,00	0,70	0,30	0,55	0	0,50	0,I0
Cys	0,25	0,45	0,50	0	0,I5	0,I5	0,25	0,75	0	0,30
	0,60	0,I0	0,50	0	0,I5	0,55	0,20	0,25	0,50	0,60
	0,05	0,20	0,I5	0,I0	0,I5	0,20	0,55	0,I5	0,I0	0,I0
Gly	0,40	0,40	0,50	0,65	0,25	0,20	0,20	0,I0	0,45	0,35
	0,55	0,40	0,35	0,25	0,60	0,60	0,25	0,75	0,45	0,55

ками (рис. 7). Клетки, соответствующие дипептидам преимущественного состояния, заштрихованы.

Видно, что характер распределения дипептидов преимущественного состояния на квадратных матрицах 20 х 20 в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях весьма различен. Так, например, для α-спиральной конформации (рис. 7) дипептиды преимущественного состояния сосредоточены на матрице в основном в центральной зоне и зоне правого нижнего угла. Наоборот, для β-структурной конформации (рис. 8) эти зоны матрицы слабо заселены дипептидами преимущественного состояния. В то же время, для β-структурной конформации имеются характерные зоны на матрице, заселенные дипептидами преимущественного состояния (например, зона левого верхнего угла и т.д.). Своеобразен также характер заселенности матрицы дипептидами преимущественного состояния в неупорядоченной конформации (рис. 9).

Логично ожидать, что характер распределения дипептидов на матрице 20 х 20 для полностью α-спиральных (β-структурных) белков должен быть, в общем случае, результирующим от наложения карт преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной (β-структурной) и неупорядоченной конформациях; для белков смешанного типа ($\alpha+\beta$ и α/β) - результирующим от наложения карт преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформации; для белков с невыраженной вторичной структурой характер распределения дипептидов на матрице 20 х 20 должен соответствовать карте преимущественного состояния дипептидов в неупорядоченной конформации.

Следует отметить, что общая заселенность дипептидами зон на матрице 20 х 20, соответствующих преимущественному состоянию

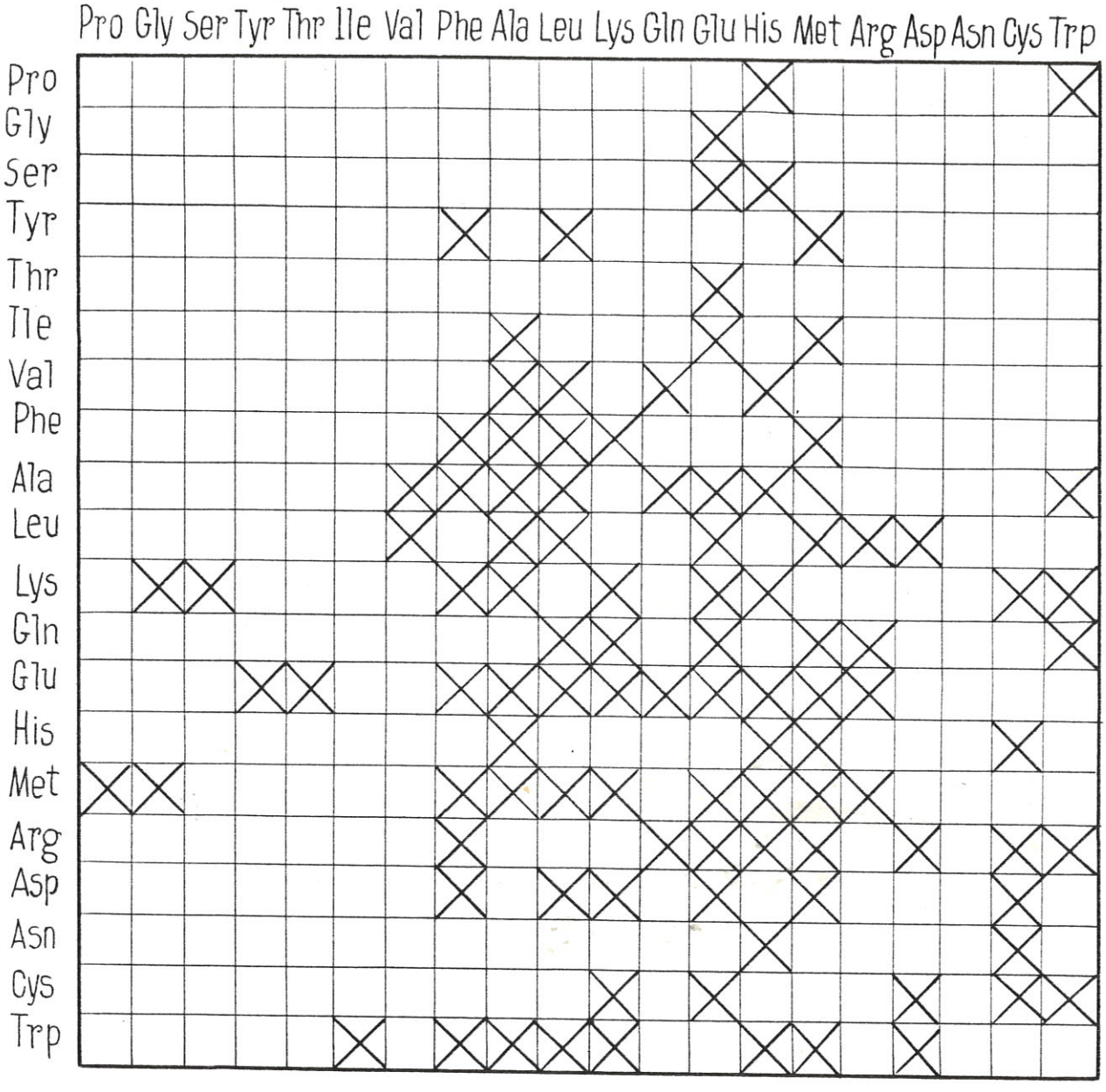


Рис. 7. Карта преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной конформации.

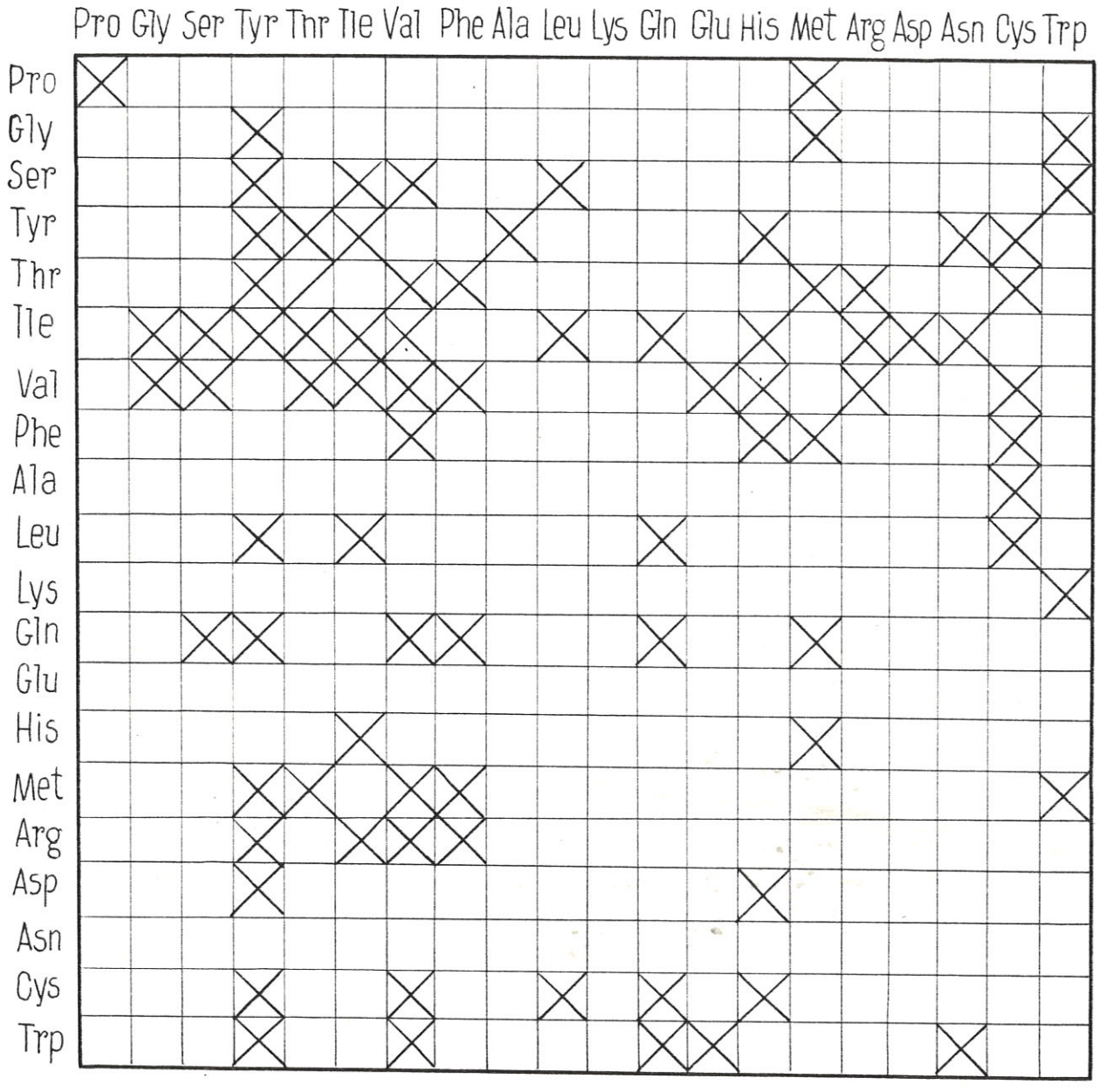


Рис. 8. Карта преимущественного состояния дипептидов в β-структурной конформации.

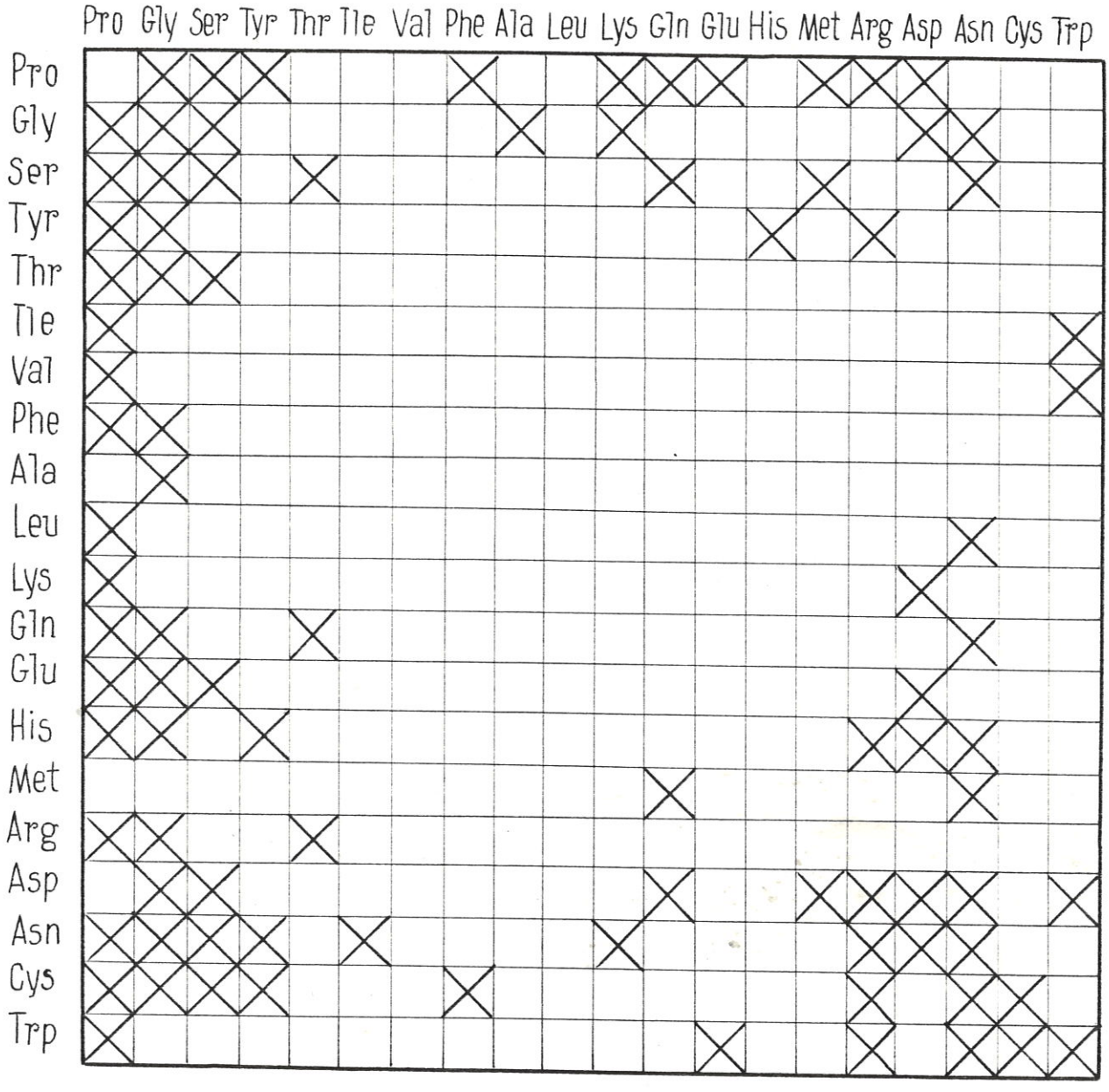


Рис. 9. Карта преимущественного состояния дипептидов в неупорядоченной конформации.

дипептидов в неупорядоченной конформации, должна зависеть от структурного класса белка. Это обусловлено тем, что содержание β-поворотов в α-спиральных белках составляет 17%, а в β-структурных - 41% (182). Таким образом, зоны преимущественного состояния дипептидов в неупорядоченной конформации на матрицах 20 х 20 должны быть слабо заселены дипептидами для α-спиральных и значительно - для β-структурных белков.

На основании изложенных соображений становится возможным использование карт преимущественного конформационного состояния дипептидов для предсказания структурного класса белков по их аминокислотной последовательности.

Двумерное представление аминокислотной последовательности глобулярных белков

Двумерное представление аминокислотной последовательности в виде квадратной матрицы 20 х 20 распределения соседних пар аминокислот получено для 32 белков с известной пространственной структурой, отобранных в работе (6).

Для получения двумерного представления аминокислотной последовательности белка проводится заполнение квадратной матрицы 20 х 20 перекрывающими дипептидами, начиная с N-конца цепи. В табл. 8 в качестве примера приведено двумерное представление аминокислотной последовательности полностью β-структурного белка - щелочной сериновой протеазы В.

Сопоставление заполненных квадратных матриц 20 х 20 распределения соседних пар аминокислот для белков различных структурных классов между собой, а также с картами преимущественного состояния дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупоря-

Таблица 8

Двумерное представление аминокислотной последовательности щелочной сериновой протеиназы В

	Pro	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Gln	Glu	His	Met	Arg	Asp	Asn	Cys	Trp
Pro		I					I			I	I							I		
Gly	I	7	5		6	I		2	2	I		I			2	I	3	I		
Ser		9	3		3		3	I	2	I										
Tyr		4	2	I	I			I												
Thr		3	3	I	5	I	5	I	2				I	I		2	I	I		I
Ile	I	I	I	I	I		I									I				
Val		2		3	3		2			I						2		I	I	
Phe	I							I		I		I						I	I	
Ala		I	I		3	2	I		I	2			I			I		I		
Leu		2	I	I	2													I		
Lys																	I			
Gln	I																I			
Glu	I								I											
His			I																	
Met						I			I											
Arg		I	I	I	2				I							I			I	
Asp		2	I	I		I	I		I											
Asn			I	I	I		I		2								I	I	I	
Cys			2		I				I											
Trp																		I		I

доченной конформации позволило выделить четыре зоны на матрице (рис. I0), анализ характера заселенности которых дипептидами привел к разработке алгоритма предсказания структурного класса белка.

Алгоритм предсказания структурного класса глобулярных белков по их аминокислотной последовательности

Стадия I. Аминокислотная последовательность белка разбивается на ряд перекрывающихся дипептидов, начиная с N-конца цепи.

Стадия 2. Квадратная матрица 20 х 20 заполняется перекрывающимися дипептидными фрагментами аминокислотной последовательности белка, начиная с N -конца, так, чтобы N -концевые остатки дипептидов были представлены столбцами, а С-концевые - строками.

Стадия 3. Рассчитывается процентное содержание дипептидов в каждой из четырех зон матрицы 20 х 20 от общего числа дипептидов в белке.

Стадия 4. Полностью α-спиральным считается белок, если на квадратной матрице 20 х 20 заселенность дипептидами первой зоны находится в пределах от 5 до I2%; второй зоны - менее 3,5%; третьей зоны - более 8,5% ; четвертой зоны - более 2,5%.

Стадия 5. Полностью β-структурным считается белок, если на квадратной матрице 20 х 20 заселенность дипептидами первой зоны составляет не менее 20,5%; второй зоны - равна или более 3,0%; третьей зоны - менее 8,5%; четвертой зоны - менее 4,0%.

Стадия 6. Если характер заполнения зон на матрице 20 х 20 не позволяет отнести белок ни к α-спиральным, ни к β-структурным, то он считается белком со смешанной вторичной структурой. У $\alpha+\beta$ белков, в отличие от α/β белков, заселенность четвер-

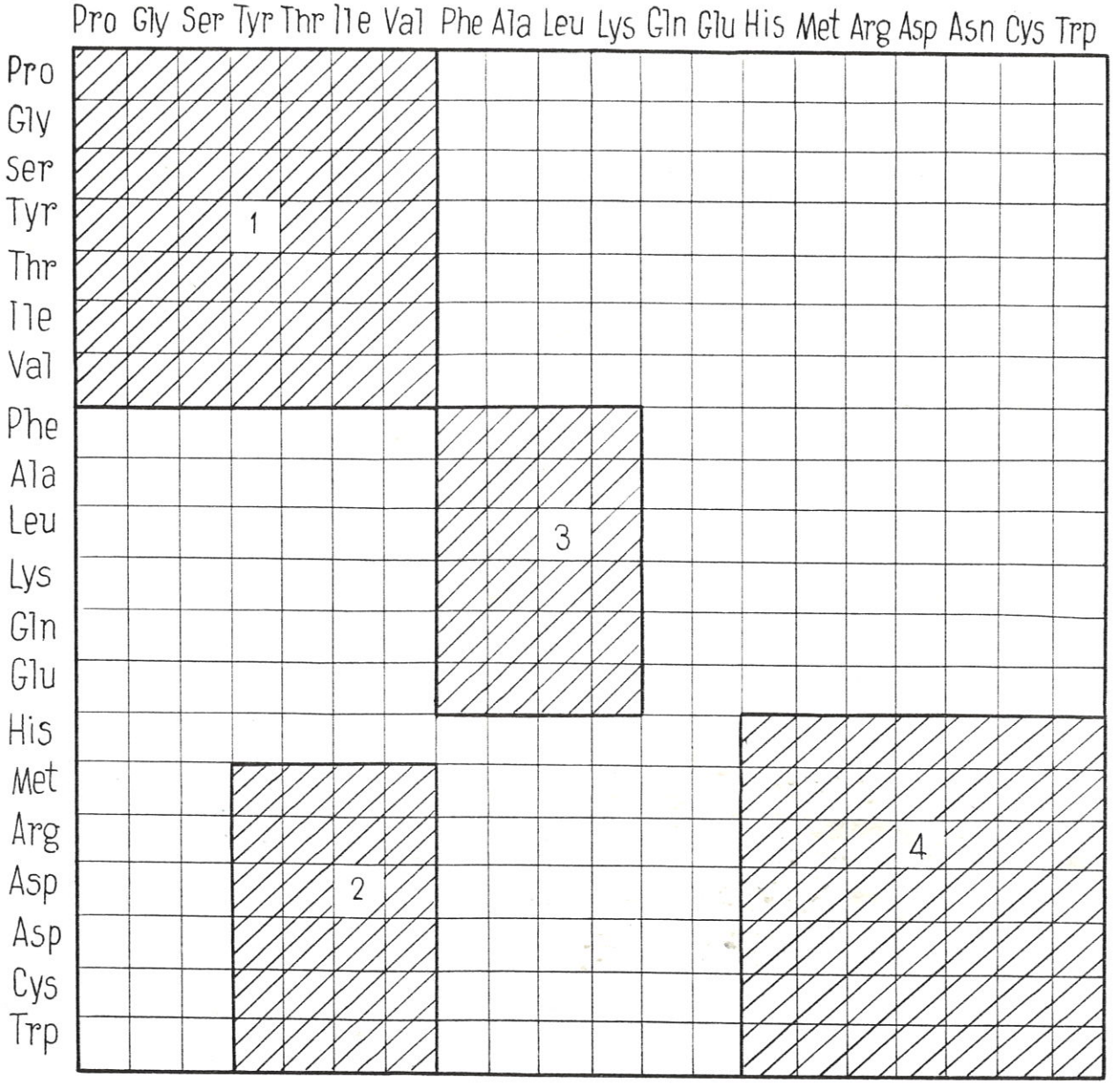


Рис. 10. Характерные зоны распределения соседних пар аминокислот на матрице 20x20 для белков различных структурных классов.

той зоны превышает 4,5% и отношение заселенностей второй и четвертой зон друг к другу меньше единицы.

Стадия 7. Если характер распределения дипептидов на матрице 20 х 20 соответствует карте преимущественного состояния дипептидов в неупорядоченной конформации, то такой белок считается без выраженной вторичной структуры.

Предсказание структурного класса глобулярных белков.

Для оценки эффективности предсказания структурного класса белков при помощи вышеописанного алгоритма был предсказан структурный класс 32 глобулярных белков (все белки взяты из множества используемого для получения алгоритма). Полученные результаты представлены в табл. 9 и 10.

Как видно из представленных данных, предлагаемый метод правильно предсказывает структурный класс всех рассмотренных полностью α-спиральных и β-структурных белков.

При предсказании структурного класса белков со смешанной вторичной структурой в одном случае $\alpha+\beta$-белок (стафилококковая нуклеаза) предсказывается как α/β-белок, а в другом случае α/β-белок (субтилизин) предсказывается как β-структурный белок.

Таким образом, для полностью α-спиральных белков метод правильно предсказывает структурный класс в 100% случаев. Для полностью β-структурных и $\alpha+\beta$-белков метод правильно предсказывает структурный класс в 97% случаев $(32-1)/32 \cdot 100\%$. При рассмотрении α/β белков метод правильно предсказывает структурный класс в 94% случаев $(32-2)/32 \cdot 100\%$.

При одновременном определении структурного класса всех бел-

Таблица 9

Заселенность различных зон (I–4) матрицы 20 x 20 распределения соседних пар аминокислот для полностью α-спиральных и β-структурных белков

№ п/п	Белок	I	2	3	4	Структурный класс
I.	Парвальбумин	6,5	I,9	30,0	2,8	α
2.	Гемэритрин	II,I	3,4	II,I	7,7	α
3.	Азомиогемэритрин	9,8	2,7	9,8	9,8	α
4.	Гемоглобин (α-цепь)	I0,7	I,4	I4,3	2,8	α
5.	Гемоглобин (β-цепь)	I0,3	2,8	I5,2	2,6	α
6.	Метмиоглобин	5,9	2,0	I9,7	2,6	α
7.	Карбоксигемоглобин	II,6	2,7	9,0	4,I	α
8.	Трипсин	27,9	5,4	4,5	2,7	β
9.	Щелочная сериновая протеаза В	44,6	6,0	3,3	3,8	β
I0.	Вариабельная часть белка Бенс-Джонса	29,2	6,6	6,6	I,9	β
II.	Fab -фрагмент иммуноглобулина	29,I	3,0	8,2	2,4	β
I2.	Супероксиддисмутаза	25,0	5,4	6,I	2,7	β
I3.	Конканавалин А	23,7	5,I	8,5	I,3	β
I4.	Преальбумин	25,4	4,I	8,2	2,4	β
I5.	Рубредоксин	22,6	5,7	5,7	3,8	β
I6.	ДНК-расплетающий белок	20,9	3,5	7,0	I,2	β

Во всех случаях наблюдаемый структурный класс совпадает с предсказываемым.

Таблица I0

Заселенность различных зон (I–4) матрицы 20 x 20 распределения соседних пар аминокислот для белков со смешанной вторичной структурой

№ п/п	Белок	I	2	3	4	Структурный класс
I.	Высокопотенциальный железосодержащий белок	3,6	3,6	I5,5	4,8	$\alpha+\beta$
2.	Стафилококковая нуклеаза*	8,7	6,I	I6,9	I,4	α/β
3.	Инсулин	I4,0	4,0	I0,0	6,0	$\alpha+\beta$
4.	Панкреатический ингибитор трипсина	I7,5	5,3	8,8	I0,5	$\alpha+\beta$
5.	Цитохром B_5	I3,I	I,2	8,3	4,8	$\alpha+\beta$
6.	Лизоцим	I2,5	8,6	I0,2	I5,6	$\alpha+\beta$
7.	Рибонуклеаза	I8,7	4,0	7,0	8,9	$\alpha+\beta$
8.	Белок из ядра скорпиона	I8,8	3,I	I0,9	4,7	$\alpha+\beta$
9.	Карбоангидраза	I9,6	2,7	9,4	5,5	$\alpha+\beta$
I0.	Тиоредоксин	I0,3	2,8	I4,0	I,9	α/β
II.	Аденилаткиназа	20,2	3,6	I0,4	2,6	α/β
I2.	Флаводоксин	I6,8	7,3	8,8	4,4	α/β
I3.	Субтилизин**	29,2	3,3	8,0	2,9	β
I4.	Карбоксипептидаза	23,5	2,9	9,8	4,2	α/β
I5.	Триозофосфатизомераза	I6,3	4,I	I3,0	3,6	α/β
I6.	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	22,0	4,0	I0,9	3,4	α/β

* Наблюдаемый структурный класс $\alpha+\beta$

** α/β, в остальных случаях – совпадает с предсказываемым.

ков метод правильно предсказывает структурный класс с общей эффективностью метода, равной 87,5% (32-4)/32 · 100%.

в) Предсказание вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности

Ранее нами был предложен алгоритм предсказания α-спиральных и β-структурных участков глобулярных белков, основанный на учете парных корреляций между соседними остатками, по данным рентгеноструктурных исследований 20 белков и показана его эффективность для предсказания вторичной структуры белков, взятых из множества, используемого для получения алгоритма (8). Было, однако, очевидно, что параметры алгоритма нуждаются в совершенствовании. Во-первых, в результате недостаточной выборки базисных белков отсутствовали вероятности встречаемости 25 дипептидов. Для этих дипептидов вероятность пребывания в любой конформации (α-спираль, β-структура, неупорядоченные участки) условно принималась равной 0,33 , что является неправомерным. Во-вторых, алгоритм сильно завышал число и протяженность β-структурных участков. Алгоритм также не учитывал того, что дипептиды типа Pro - X и X - Pro / X -любой аминокислотный остаток / могут занимать в α-спирали только первые три места с ее аминного конца. Поэтому было решено провести уточнение ранее предложенного алгоритма предсказания α-спиральных и β-структурных участков, а также разработать метод предсказания β-поворотов в глобулярных белках.

Вероятности встречаемости всевозможных дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях, необходимые для предсказания вторичной структуры, получены путем статистического анализа данных по пространственной структуре 46

белков и представлены в табл. 7.

Сопоставление графического изображения первичной структуры белков, полученных на основании вероятности встречаемости дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях, и элементов их нативной вторичной структуры позволило разработать алгоритм поиска вторичной структуры глобулярного белка.

Алгоритм предсказания α-спиральных и β-структурных участков глобулярных белков.

Стадия I. Первичная структура белка условно разбивается на ряд перекрывающихся дипептидов, которые последовательно нумеруются от N -конца цепи.

Стадия 2. Строится график зависимости между первичной структурой белка и вероятностью нахождения составляющих ее перекрывающихся дипептидов в α-спиральной, β-структурной и неупорядоченной конформациях (рис. II).

Стадия 3. α-Спиральным считается участок полипептидной цепи, на котором суммарная вероятность встречаемости дипептидов в α-спиральной конформации больше таковой в других конформациях. α-Спираль прерывается дипептидами, вероятность пребывания которых в спиральной конформации равна нулю, а также двумя и более перекрывающимися дипептидами, вероятности пребывания которых в неупорядоченной конформации больше, чем в α-спиральной конформации. Один дипептид не прерывает α-спираль, как бы ни была велика его вероятность встречаемости в нерегулярной конформации.

Учет пролин-содержащих дипептидов проводится исходя из того, что пролин может занимать в α-спирали только первые три

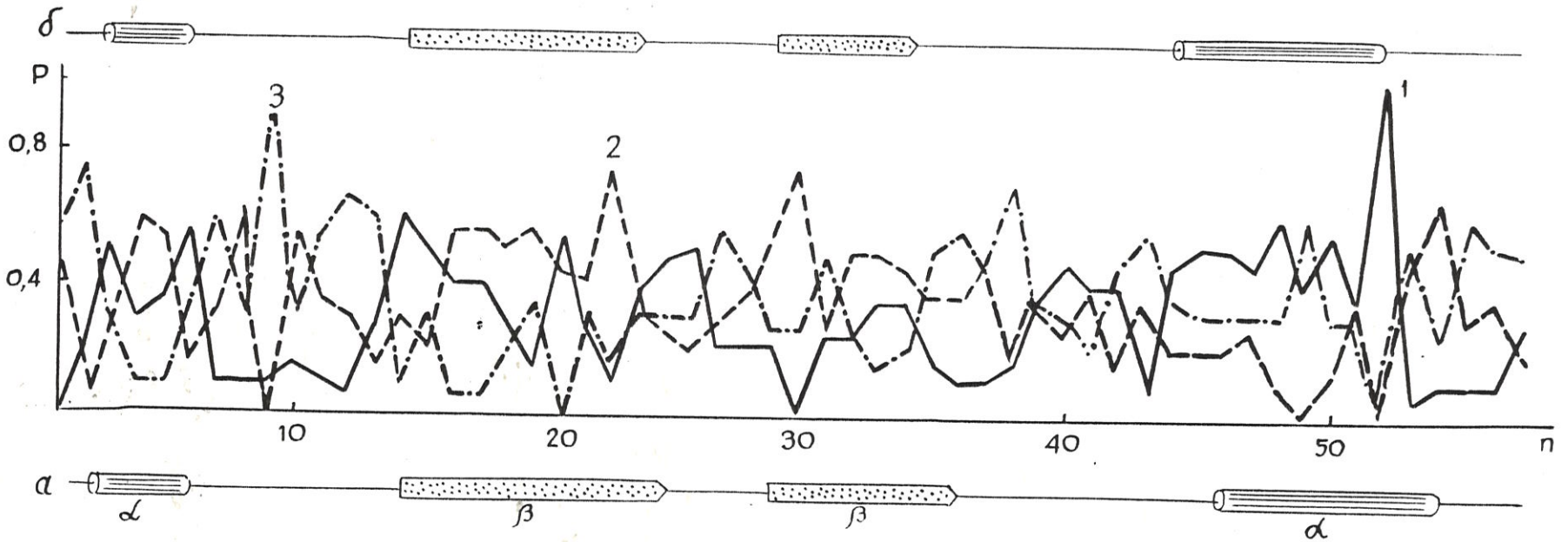


Рис. II. Вероятность образования (P) α-спиральной (I), β-структурной (2) и нерегулярной (3) конформации в панкреатическом ингибиторе трипсина (n – номер дипептида). а – локализация α-спиральных и β-структурных участков в нативном белке (264), б – предсказанная вторичная структура.

места с ее аминного конца.

Стадия 4. Локализация β-структурных участков проводится только на тех отрезках полипептидной цепи, на которых не были предсказаны α-спирали. β-Структурным считается участок полипептидной цепи, на котором суммарная вероятность встречаемости дипептидов в β-структурной конформации больше таковой в неупорядоченной конформации. β-Структура прерывается дипептидами, вероятность пребывания которых в β-структурных конформациях равна нулю, а также двумя и более перекрывающимися дипептидами, вероятность которых в нерегулярной конформации больше, чем в β-структурной конформации.

Предсказание вторичной структуры глобулярных белков.

Для получения количественных параметров, характеризующих эффективность предсказания элементов вторичной структуры при помощи вышеописанного алгоритма, нами были локализованы α-спиральные, β-структурные и неупорядоченные участки в 5 глобулярных белках (все белки взяты из множества, используемого для получения алгоритма). Полученные результаты представлены в табл. II.

Как видно из представленных данных, для α-спиральных участков метод правильно предсказывает структурное состояние 85,9% всех аминокислотных остатков, входящих в α-спирали. Для исследованных белков, содержащих в α-спиральном состоянии 249 аминокислотных остатков, метод исключает 35 "спиральных" аминокислотных остатков и включает в α-спиральные участки 43 "лишних" аминокислотных остатка.

В случае предсказания β-структурных участков метод правильно предсказывает структурное состояние 72,4% всех аминокис-

Таблица II

Параметры предсказания α-спиральных, (α), β-структурных (β) и неупорядоченных участков (γ) в глобулярных белках

№ п/п	Белок	Длина цепи	Количество правильно предсказанных остатков			% правильно предсказанных состояний остатков		
			α	β	γ	α	α, β	α, β, γ
I.	Азомиогемэритрин	II3	8I(90)	0(0)	I8(23)	90,0	90,0	87,6
2.	Ингибитор трипсина	58	I2(I5)	I9(26)	I7(I7)	80,0	75,6	82,8
3.	Нуклеаза	I49	32(38)	33(49)	48(62)	84,2	74,7	75,8
4.	Тиоредоксин	I08	37(44)	29(33)	2I(3I)	84,I	85,7	80,6
5.	Флаводоксин	I38	52(62)	29(44)	I9(32)	83,9	76,4	72,5
	Всего по 5 белкам	566	2I4(249)	II0(I52)	I23(I65)	85,9	80,8	79,0

лотных остатков, входящих в β-структуру. Метод неправильно определяет структурное состояние 42 аминокислотных остатков из I52, входящих в β-структурные участки и включает в эти участки I5 "лишних" остатков.

Следует отметить, что с помощью модифицированных правил Чоу-Фасмана, использующих параметризацию, выведенную на основании структурных данных по 70 белкам правильно предсказывается состояние 66% остатков в α-спиралях и 68% - в β-структуре (284).

При одновременном определении α-спиральных и β-структурных участков метод правильно предсказывает состояние 80,8% аминокислотных остатков, входящих в α-спирали и β-структуру рассмотренных белков; при одновременном же определении всех элементов вторичной структуры (α-спираль, β-структура, неупорядоченные участки) метод правильно предсказывает структурное состояние 79% всех аминокислотных остатков, входящих в рассмотренные белки.

Расхождение между рассчитанными и экспериментальными литературными данными, по-видимому, обусловлено влиянием дальних взаимодействий на формирование элементов вторичной структуры белков.

Распределение дипептидных фрагментов в областях β-поворотов и не -β- поворотов.

Формирование преобладающего количества β-поворотов в белках определяется ближними взаимодействиями в дипептидных фрагментах, а не взаимодействиями дальнего порядка. Существенное влияние дальних взаимодействий сказывается на формировании β-поворотов Гли-содержащих последовательностей; в случае же

последовательностей с полярными или ароматическими остатками важное значение играют взаимодействия с растворителем (369).

Учитывая важную роль локальных взаимодействий в дипептидных фрагментах в формировании β-поворотов, можно предположить, что разработка метода, учитывающего парные корреляции между соседними аминокислотными остатками, позволит улучшить точность предсказания β-поворотов в глобулярных белках по сравнению с методами, основанными на статистическом анализе отдельных аминокислотных остатков.

Предполагается, что I-й остаток полипептидной цепи может находиться в одном из двух конформационных состояний -β-поворотов и не -β- поворотов. Вероятности встречаемости всевозможных дипептидов в конформации β-поворота и не -β-поворота (табл. I2), необходимые для предсказания β-поворотов получены путем статистического анализа данных по пространственной структуре 30 белков, отобранных в работе (I44).

Всего проанализировано 3892 дипептида, из них: II97 - в участках β-поворотов и 2695 - в участках, не содержащих β-поворотов. Из 400 теоретически возможных дипептидов в участках, содержащих и несодержащих β-повороты, рассматриваемых белков не встретилось II дипептидов (около 3%). Клетки, соответствующие этим дипептидам, не заполнены.

Алгоритм предсказания β-поворотов в глобулярных белках

Стадия I. Первичная структура белка разбивается на ряд перекрывающихся дипептидов, которые последовательно нумеруются от N-конца.

Стадия 2. Строится график зависимости между первичной

Таблица I2

Вероятности встречаемости дипептидов в конформации β-поворотов (нижняя строка) и не-β-поворотов (верхняя строка)

	Ala	Leu	Ile	Val	Phe	Pro	Met	His	Lys	Arg	Tyr	Trp	Ser	Thr	Asp	Asn
Ala	0,6	0,9	0,8	0,9	I,0	0,6	0,5	0,5	0,6	0,7	0,8	0,7	0,5	0,7	0,4	0,4	0,7	0,8	0,5	0,4
	0,4	0,I	0,2	0,I	0,0	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,6	0,6	0,3	0,2	0,5	0,6
Leu	0,9	0,8	I,0	0,8	0,4	0,4	I,0	0,6	0,8	0,8	0,5	0,5	0,8	0,6	0,6	0,6	I,0	0,7	0,5	0,5
	0,I	0,2	0,0	0,2	0,6	0,6	0,0	0,4	0,2	0,2	0,5	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,0	0,3	0,5	0,5
Ile	0,9	0,7	0,9	0,6	I,0	0,5	0,5	0,5	0,7	0,8	0,7	I,0	0,6	0,8	0,5	0,6	I,0	0,7	0,5	0,6
	0,I	0,3	0,I	0,4	0,0	0,5	0,5	0,5	0,3	0,2	0,3	0,0	0,4	0,2	0,5	0,4	0,0	0,3	0,5	0,4
Val	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,4	I,0	0,8	0,7	0,8	0,8	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	I,0	0,8	0,8
	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,6	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,2	0,0	0,2	0,2
Phe	0,5	0,6	I,0	I,0	I,0	0,3	0,5	I,0	0,6	0,8	0,6	I,0	0,5	0,8	0,5	0,5	0,8	0,5	I,0	0,4
	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0	0,7	0,5	0,0	0,4	0,2	0,4	0,0	0,5	0,2	0,5	0,5	0,2	0,5	0,0	0,6
Pro	0,4	0,6	0,6	0,5	I,0	0,2	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	I,0	0,5	0,I
	0,6	0,4	0,4	0,5	0,0	0,8	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	0,8	0,8	0,0	0,5	0,9
Met	I,0	I,0	I,0	I,0	I,0	0,0	I,0	0,0	0,8	I,0	0,0		0,5	I,0	0,7	0,5	0,5			0,3
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	I,0	0,0	I,0	0,2	0,0	I,0		0,5	0,0	0,3	0,5	0,5			0,7
His	0,8	0,8	0,6	I,0	0,7	0,I	I,0	I,0	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	I,0		0,5	0,6		0,3	0,6
	0,2	0,2	0,4	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,0		0,5	0,4		0,7	0,4
Lys	0,6	0,7	0,6	0,9	0,8	0,2	I,0	0,4	0,6	0,5	0,4	I,0	0,6	0,6	0,4	0,4	0,8	I,0	I,0	0,2
	0,4	0,3	0,4	0,I	0,2	0,8	0,0	0,6	0,4	0,5	0,6	0,0	0,4	0,4	0,6	0,6	0,2	0,0	0,0	0,8
Arg	0,5	0,5	I,0	0,6	0,5	0,5	I,0	I,0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,2	0,5	0,2	I,0	0,2
	0,5	0,5	0,0	0,4	0,5	0,5	0,0	0,0	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,8	0,5	0,8	0,0	0,8

	Ala	Leu	Ile	Val	Phe	Pro	Met	His	Lys	Arg	Tyr	Trp	Ser	Thr	Asp	Asn	Glu	Gln	Cys	Gly
Tyr	0,6	I,0	I,0	0,8	I,0	0,4		I,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,7	0,4	0,5	0,2	0,6	0,5	0,2
	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6		0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,6	0,5	0,8	0,4	0,5	0,8
Trp	I,0	I,0	I,0	0,6	I,0	0,0	I,0	I,0	I,0	I,0		0,5	0,7	I,0	0,5			0,0		0,4
	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	I,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,5	0,3	0,0	0,5			I,0		0,6
Ser	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,2	0,3
	0,4	0,4	0,6	0,5	0,6	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,7	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,8	0,7
Thr	0,6	0,9	0,5	0,7	0,7	0,3	I,0	0,5	0,4	0,2	0,5	0,8	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,3
	0,4	0,I	0,5	0,3	0,3	0,7	0,0	0,5	0,6	0,8	0,5	0,2	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,7
Asp	0,4	0,8	0,5	0,6	0,5	0,2	I,0	I,0	0,2	0,0	0,7	0,5	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2
	0,6	0,2	0,5	0,4	0,5	0,8	0,0	0,0	0,8	I,0	0,3	0,5	0,8	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,5	0,8
Asn	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,2	I,0	I,0	0,5	0,2	0,I	0,3	0,I	0,2	0,3	0,4	0,3	0,6	0,5	0,2
	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5	0,8	0,0	0,0	0,5	0,8	0,9	0,7	0,9	0,8	0,7	0,6	0,7	0,4	0,5	0,8
Glu	0,8	0,6	0,5	0,5	0,7	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	I,0	0,0	0,5	0,8	0,4	0,4	0,7	0,8	0,5	0,3
	0,2	0,4	0,5	0,5	0,3	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	I,0	0,5	0,2	0,6	0,6	0,3	0,2	0,5	0,7
Gln	0,6	0,8	0,5	I,0	0,3	0,5	I,0	I,0	0,6	0,6	I,0	0,5	0,8	0,5	0,2	0,I	0,8	0,5	0,5	0,4
	0,4	0,2	0,5	0,0	0,7	0,5	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,5	0,2	0,5	0,8	0,9	0,2	0,5	0,5	0,6
Cys	0,4	0,7	I,0	0,6	I,0	0,2	0,5	0,0	0,3	0,4	I,0	I,0	0,6	0,5	0,2	0,4	I,0	0,2	I,0	0,5
	0,6	0,3	0,0	0,4	0,0	0,8	0,5	I,0	0,7	0,6	0,0	0,0	0,4	0,5	0,8	0,6	0,0	0,8	0,0	0,5
Gly	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2	0,0	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2
	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,8	I,0	0,6	0,7	0,6	0,7	0,5	0,8	0,7	0,8	0,5	0,6	0,8	0,7	0,8

структурой белка и вероятностью нахождения составляющих ее перекрывающихся дипептидов в конформации β-поворота и не-β-поворота. Для дипептидов, не встречающихся в выборке, вероятность пребывания в конформации β-поворота и не-β-поворота условно принята равной 0,50.

Стадия 3. β-Поворотом считается участок полипептидной цепи, на котором суммарная вероятность встречаемости дипептидов в конформации β-поворота больше таковой в конформации не-β-поворота. β-Поворот прерывается дипептидами, вероятность пребывания которых в конформации β-поворота равна нулю, а также любым дипептидом, вероятность встречаемости которого в конформации не-β-поворота больше, чем в конформации β-поворота.

Таблица I3

Параметры предсказания конформации β-поворотов (β_t) и не-β-поворотов (не-β_t) в глобулярных белках

№ п/п	Белок	Длина цепи	Количество правильно предсказанных остатков		% правильно предсказанных остатков	
			β_t	не-β_t	β_t	β_t, не-β_t
I.	Лизоцим	I29	46(6I)	57(68)	75,4	80,0
2.	Флаводоксин	I38	3I(49)	69(89)	63,3	72,4
3.	Ингибитор трипсина	58	I2(I6)	32(42)	75,0	75,9
4.	Кальций связывающий белок	I08	I5(24)	74(84)	62,5	88,I
5.	Ферредоксин	54	24(3I)	I7(23)	77,4	74,I
	Всего по 5 белкам	487	I28(I8I)	259(306)	70,7	80,0

Предсказание β-поворотов в глобулярных белках.

При помощи вышеописанного алгоритма нами были локализованы

β-повороты в 5 глобулярных белках (все белки взяты из множества, используемого для получения алгоритма). Полученные данные представлены в табл. I3.

Из представленных данных видно, что предлагаемый метод правильно предсказывает структурное состояние 70,7% всех аминокислотных остатков, входящих в β-повороты. При одновременном определении β-поворотных и не-β-поворотных участков метод правильно предсказывает состояние 80% аминокислотных остатков, входящих в рассмотренные белки.

Сравнительная оценка эффективности предсказания вторичной структуры глобулярных белков различными предсказательными методами.

Комбинация двух вышеприведенных алгоритмов использована для предсказания вторичной структуры аденилаткиназы и лизоцима Т 4, которые часто используются в качестве объектов предсказания при сравнении различных теоретических методов предсказания вторичной структуры белков. На первом этапе производили предсказание α-спиральных и β-структурных участков в этих белках. В дальнейшем на тех отрезках полипептидной цепи, на которых не были предсказаны α-спирали и β-структуры, производили предсказание β-поворотов. Локализацию β-поворотов производили с учетом того, что остатки β-поворота i и $i+3$ или оба одновременно могут входить в состав α-спиралей и β-структуры.

В качестве критерия для сравнения эффективности различных теоретических методов предсказания вторичной структуры белков с предлагаемым методом использовали коэффициент корреляции С (280). Полученные данные представлены в табл. I4. Как видно из представленных данных, предлагаемый метод дает гораздо лучшее

Таблица I4

Корреляция между экспериментальными данными и результатами предсказания вторичной структуры белков[x]

Метод	Аденилаткиназа			Лизоцим фага Т 4		
	C_α	C_β	$C_\beta t$	C_α	C_β	$C_\beta t$
Предлагаемый метод	0,67	0,78	0,49	0,65	0,63	0,50
Бургес и соавт.	0,25	–	–	0,38	–0,08	0,I9
Барри и Фридман	0,44	–	–	0,I4	0,22	–
Чоу и Фасман	0,5I	0,50	0,58	0,42	0,09	0,I2
Финкельштейн и соавт.	–	–	–	0,27	–0,06	0,2I
Гуззо	–	–	–	0,34	–	–
Котельчук и Шерага	0,0I	–	–	–	–	–
Либерман	–	–	–	0,32	–	–
Льюис и соавт.	0,24	–	–	–	–	–
Лим	0,46	0,58	–	0,2I	–0,08	–
Нагано	0,47	0,4I	0,58	–	–	–
Нагано и Хазегава	–	–	–	0,20	0,04	0,0I
Протеро	–	–	–	0,I9	–	–
Птицын и Финкельштейн	0,6I	0,58	–	0,23	–0,06	–
Робсон и Пейн	0,35	–	–	–	–	–
Шеллман	–	–	–	0,4I	0,34	–

[x] Значения коэффициентов корреляции для всех сравниваемых методов, кроме предлагаемого метода, взяты из работы (280).

соответствие предсказанных структур с данными рентгеноструктурного анализа по сравнению со всеми другими теоретическими методами предсказания вторичной структуры белков.

§ 3. Предсказание структурного класса и вторичной структуры тромбина и его предшественников. Структурные основы специфичности тромбина.

Проблема высокой специфичности тромбина остается невыясненной до сих пор, так как отсутствие экспериментальных данных о его пространственной организации не позволяет рассмотреть сходство и различия между тромбином и панкреатическими сериновыми протеиназами на уровне третичной структуры. В этой ситуации многими исследователями был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей тромбина и панкреатических сериновых протеиназ, который сыграл важную роль в понимании того, какие структурные особенности тромбина могут являться причиной его высокой специфичности. Вместе с тем, следует отметить, что рамки этого подхода, ограниченные первичной структурой, не позволили получить более полную информацию, необходимую для адекватного объяснения специфичности тромбина.

Разработанные нами предсказательные алгоритмы позволяют подойти к проблеме узкой специфичности тромбина с позиций сопоставления его теоретически предсказанной вторичной структуры с данными кристаллографических исследований гомологичных сериновых протеиназ. Подобный перенос акцента подчеркивает естественное стремление приблизиться к осмысливанию специфичности каталитического действия фермента на более высоком уровне его структурной организации.

Рассмотрение особенностей вторичной структуры β- и γ-

тромбина по сравнению с α-тромбином может дать определенную информацию о важности структурного состояния отдельных участков тромбина в осуществлении фибриноген-свертывающей функции фермента. Принципиальным является также вопрос о структурном состоянии тромбин-чувствительных связей и соседних с ними областей (на уровне элементов вторичной структуры) в молекуле фибриногена и других высокомолекулярных субстратах тромбина.

а) Предсказание структурного класса и вторичной структуры тромбина и его предшественников

Данные двумерного представления аминокислотной последовательности протромбина человека приведены в табл. I5. Из 400 всевозможных дипептидов в молекуле протромбина человека встречаются 275 дипептидов (69%). Наиболее часто встречающимися дипептидами являются Thr - Ala и Glu - Gly (по 8 раз). Частота встречаемости некоторых дипептидов значительно зависит от последовательности аминокислот. Так, дипептид Glu - Asn встречается 5 раз, а Asn - Glu вообще не встречается; Thr - Ala - 8 раз, Ala - Thr - 2; Lys - Pro - 4, а Pro - Lys - 0.

Характер заполнения дипептидами зон на матрице 20 x 20 в соответствии с разработанным алгоритмом предсказания структурного класса глобулярных белков (I зона - I5,3%, 2 - 5,0% , 3 - 7,8% и 4 - 5,5%) позволяет отнести протромбин к белкам со смешанной вторичной структурой, а именно к классу $\alpha + \beta$-белков.

В табл. I6 приведены данные теоретической локализации элементов вторичной структуры в протромбине человека. Как и следовало ожидать, α-спиральные и β-структурные участки протромбина имеют тенденцию быть разделенными по цепи. Расчеты показали, что используемый алгоритм предсказания вторичной структуры гло-

Таблица I5

Двумерное представление аминокислотной последовательности протромбина человека

	Pro	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Val	Phe	Ala	Leu	Lys	Gln	Glu	His	Met	Arg	Asp	Asn	Cys	Trp
Pro	2	2	I		I		4	2		2		I	I	I		4	4	I	I	3
Gly	2	I	3	4	I	2	I	I	3	4	5	3	3		I	5	5	4	I	
Ser	4	3	3	2	5	2	2		2	3	I		2		I	2	2	2		I
Tyr	2	2			3	3	I				2	3	I			I		I	2	
Thr	3	3	I		3		2	3	8				2	3		3	3	I	I	
Ile		2	2	I	4		2		I			I	3	2		I	2	I		
Val	I	I	2		5	I	I	2	2	3		2	3		2	2		2	3	I
Phe		3	I	I	I		I	I		I			I			2		3	3	I
Ala		3	3		2	I	3	2	3	4	2	I	2	I		2	2	2	3	I
Leu	2	2	2	I	I	I	3	2	4	5	3	2	5		I	I	2	I	I	I
Lys	4	3	4	2	I	2	I		I	2	3			2		I	I	I		I
Gln	I	I		I	I		3	I	I	2	I	I	3		I	I	2		I	
Glu	I	8	I	I	3	2			2	2	3	I	5			3	I	5	2	
His	3	I	I				I				I	I							I	
Met		I	I				I	I		I	2									
Arg	2	3	3	3	4	4	I		I	2	2	I	3			I	3	3		2
Asp	I	4	4	I		I	2	2	I	4	I	2	4			3		I		
Asn	3		2	2	I	I	I	3	I	4	2				I	3	I	I	2	I
Cys		3	2	2			2		2	4	I	I	3			2	2			
Trp		I		I		I	I		2			I				2		I	2	

Таблица I6

Теоретическая локализация элементов вторичной структуры в молекуле протромбина человека*

α -спираль	β -структура	β -повороты
I07 - III	44 - 48, 76 - 80	9 - I2, 52 - 55
I34 - I37	86 - 89,I27 -I29	67 - 70, 95 - 98
I96 - 203	I48 -I53,I76 -I78	I00 -I03,I04 -I07
302 - 306	I84 -I86,I9I -I95	II4 -I2I,I22 -I25
3I0 - 3I6	2I4 -2I6,232 -234	I39 -I42,I44 -I47
33I - 335	24I -243,3I8 -320	I57 -I60,I7I -I76
363 - 368	322 -325,336 -342	2I9 -226,234 -24I
420 - 429	353 -356,359 -36I	256 -260,26I -266
445 - 449	382 -386,39I -394	284 -287,288 -292
567 - 577	399 -40I,406 -409	325 -328,356 -359
	435 -438,439 -442	369 -372,373 -376
	459 -46I,482 -485	386 -390,409 -4I2
	493 -495,500 -504	442 -445,46I -464
	508 -5I0,53I -533	475 -478,495 -500
	543 -549,56I -566	5I3 -5I8,5I9 -522
		524 -530,538 -54I
		550 -555,556 -56I
		577 -58I

* Приведены порядковые номера аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

булярных белков предсказывает в молекуле протромбина человека I0 α-спиральных участков, содержащих 66 аминокислотных остатков, 30 β-структурных участков, содержащих I22 остатка и 35 участков β-поворотов, содержащих I7I остаток. На основании этих данных расчет процентного содержания элементов вторичной структуры в молекуле протромбина и продуктах его активации (табл. I7).

Таблица I7

Теоретический расчет содержания элементов вторичной структуры в протромбине человека и продуктах его активации

Белок	Длина цепи	Элементы вторичной структуры		
		α-спираль	β-структура	β-поворот
Протромбин	58I	66(II)	I22(2I)	I7I(29)
Претромбин I	426	57(I3)	99(23)	I29(30)
Претромбин 2	308	49(I6)	79(26)	90(29)
Фрагмент I-2	273	I7(6)	43(I6)	8I(30)
Фрагмент I	I55	9(6)	23(I5)	44(28)
Фрагмент 2	II8	8(7)	20(I7)	37(3I)
α-Тромбин, А-цепь	49	I2(24)	3(6)	9(I8)
α-Тромбин, В-цепь	259	37(I4)	76(29)	8I(3I)

В скобках дано процентное содержание элементов вторичной структуры.

Полученные результаты значительно отличаются от литературных данных (358) по предсказанию вторичной структуры фрагментов I и 2 протромбина человека методом Чоу-Фасмана.

Согласно экспериментальным оценкам протромбин содержит 8 -

I4% α-спиралей, I5-36% β-структуры и 50-77% неупорядоченных участков (I0, I57); фрагмент I - 6% α-спиралей, 3I% β-структуры и 63% неупорядоченных участков, а фрагмент 2 - 20% β-структуры и 80% неупорядоченных участков (I57). Сопоставление этих данных с результатами теоретического предсказания свидетельствует о том, что используемый нами алгоритм предсказания дает гораздо лучшее соответствие с экспериментальными оценками для α-спиральной конформации и худшее для β-структуры по сравнению с методом Чоу-Фасмана. Здесь уместно отметить, что в работе (I57) указывается, что полученные авторами экспериментальные величины процентного содержания α-спиралей и β-структуры не должны быть приняты в качестве истинных оценок содержания этих структур в протромбине и продуктах его активации. Дело в том, что авторы работы (I57) использовали для определения вторичной структуры белков наиболее распространенный метод кругового дихроизма (КД), в котором рассчитанный реперный спектр КД для α-спиралей хорошо согласовывается со спектром КД полилизина в α-спиральной конформации, а для β-структуры реперный спектр резко отличается от спектра КД полилизина в β-структурной конформации (I76, I77). Исходя из того, становится понятным удовлетворительное соответствие предсказания используемым нами алгоритмом и экспериментальных данных, полученных методом КД, для α-спиральной конформации и менее удовлетворительное для β-структурной конформации.

Неопределенность в оценке вторичной структуры белков из спектров КД связана также с неоднозначностью определения вторичных структур стандартных белков из рентгеноструктурных данных. При использовании единых для всех белков критериев определения

вторичных структур из данных кристаллографических исследований рассчитанные реперные спектры для α-спирали, β-структуры и нерегулярной формы хорошо согласуются со спектрами КД полилизина в соответствующих конформациях (I7).

Учитывая это, нами с помощью новых белковых реперных спектров, предложенных И.А.Болотиной и соавт. (I7), было проведено уточнение вторичной структуры протромбина и его фрагментов I и 2 по экспериментальным спектрам КД, полученным в работе (I57). Расчеты проводили на ЭВМ БЭСМ-6 на базе Института математики Академии наук БССР.

В табл. I8 приведены параметры вторичной структуры протромбина и продуктов его активации, рассчитанные нами по новым реперным спектрам КД.

Таблица I8

Параметры вторичной структуры протромбина и продуктов его активации по новым реперным спектрам

Белок	Процентное содержание		
	α-спираль	β-структура	неупорядоченная конформация
Протромбин	9 (II)	I0 (2I)	8I (68)
Фрагмент I	8 (6)	I5 (I5)	77 (79)
Фрагмент 2	4 (7)	I3 (I7)	83 (76)

В скобках дано процентное содержание предсказанных структур.

Сопоставление этих данных с результатами теоретического предсказания свидетельствует об удовлетворительном согласии теоретических и экспериментальных данных как для α-спиральной, так и β-структурной конформации. Некоторые различия, по-види-

мому, являются результатом несовершенства алгоритма предсказания и интерпретации экспериментальных данных.

Экспериментальные данные о вторичной структуре α-тромбина в литературе отсутствуют. Поэтому было решено провести исследование вторичной структуры α-тромбина методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). На рис. I2 проведен КР-спектр лиофилизованного препарата α-тромбина в области 500 - I700 $см^{-I}$. Видно, что в области колебаний Амид I наблюдается расщепление полосы на две компоненты с частотами $\sim$ I645 и I675 $см^{-I}$. В области колебаний Амид Ш (I230-I300 см) наблюдается ряд полос с частотами I238, I250, I270 и I288 $см^{-I}$. Формальное сопоставление этих частот с данными, приведенными в табл.I9, позволяет сделать качественный вывод о наличии в α-тромбине как α-спиральной, так и β-структурной конформации. На присутствие в α-тромбине α-спиральной конформации указывает также характерная интенсивная линия скелетного колебания при 900 $см^{-I}$ в КР-спектре (257).

Таблица I9

Отнесение полос колебаний Амид I и Амид Ш в спектрах КР полипептидов и белков (368)

Тип структуры	Амид I, $см^{-I}$	Амид Ш, $см^{-I}$
α-Спираль	I645 - I660	I265 - I300
β-Структура	I665 - I680	I230 - I240
Неупорядоченная структура	I660 - I670	I240 - I260

Количественное содержание β-структуры в α-тромбине, оцениваемое нами по методу (304), составляет приблизительно 30%,

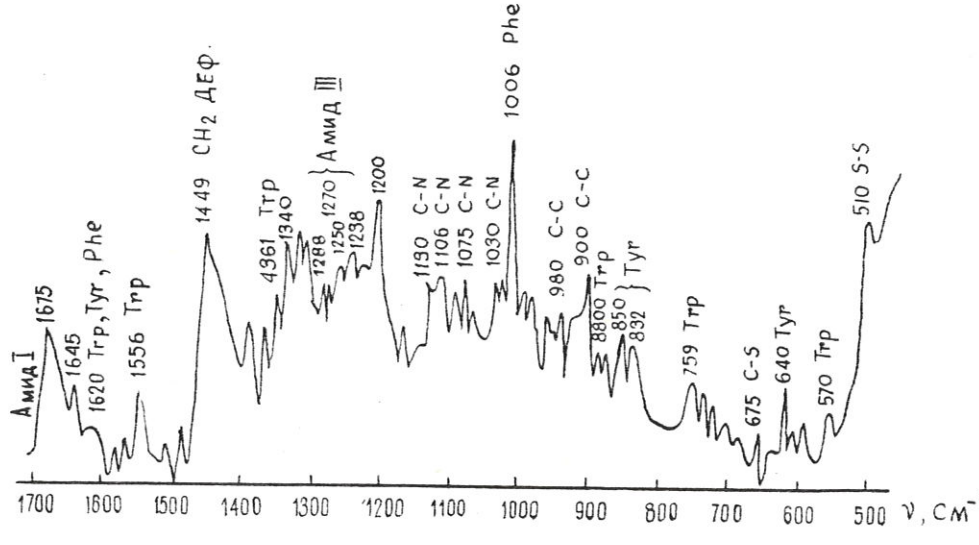


Рис. I2. Спектр комбинационного рассеяния α-тромбина в твердом состоянии. Возбуждающая лазерная линия 5I4,5 нм. Ширина щели 400 мкм. Мощность лазерной линии 250 мВт. Напряжение на ФЭУ I040 В. Скорость сканирования 50 $см^{-I}$/мин.

что находится в хорошем согласии с теоретически предсказанным содержанием β-структуры в претромбине 2, который является непосредственным предшественником α-тромбина (табл. I7).

Прежде чем перейти к рассмотрению структурных аспектов высокой специфичности α-тромбина остановимся более подробно на характеристике предполагаемой модели, полученной в результате предсказания его вторичной структуры. Согласно этой модели А-цепь α-тромбина содержит два спиральных участка, включающих I2 остатков: 29-33 и 37-43, один β-структурный участок 45-47 и два β-поворота II-I4 и I5-I9. В В-цепи α-тромбина предсказано 5 α-спиральных участков, включающих 37 остатков: 9-I3, 4I-46, 98-I07, I23-I27 и 245-255. Предсказано также I7 β-структурных участков, включающих 76 остатков: I4-20, 3I-34, 37-39, 60-64, 69-72, 77-79, 84-87, II3-II6, II7-I20, I37-I39, I60-I63, I7I-I73, I78-I82, I86-I88, 209-2II, 22I-227, 239-244, и I7 участков β-поворотов, включающих 8I остаток: 3-6, 34-37, 47-50, 5I-54, 64-68, 87-90, I20-I23, I39-I42, I53-I56, I73-I78, I9I-I96, I97-200, 202-208, 2I6-2I9, 228-233, 234-239 и 255-259. Наличие β-поворотов между участками β-структуры 3I-34 и 37-39, 60-64 и 69-72, I7I-I73 и I78-I82, I86-I88 и 209-2II, 22I-227 и 239-244 позволяет сделать предположение о вероятном образовании 5 антипараллельных β-складчатых листов в В-цепи α-тромбина. Кроме того, наличие β-поворота между участком β-структуры II7-I20 и α-спиралью I23-I27 может способствовать формированию в этой области α-β-шпильки.

Аминокислотные остатки триады активного центра входят в состав α-спиралей 4I-46 ($_{His}$ 43), 98-I07 ($_{Asp}$ 99) и β-поворота 202-208 ($_{Ser}$ 205).

Значительный интерес представляет также вопрос о структурном состоянии остатков тирозина и триптофана, необходимых для эффективного связывания тромбина с фибриногеном (35I). В соответствии с вероятной моделью вторичной структуры α-тромбина 3 остатка триптофана занимают крайнее положение в β-структуре (В-цепь - Trp I4, 37 и 227), 2 остатка - крайнее положение в β-поворотах (Trp 50 и 2I9), I - в середине α-спирали (Trp 249) и I - в нерегулярной конформации (Trp 92). Из I3 остатков тирозина 6 входят в состав β-структуры (А-цепь - Tyr 45, В-цепь - Tyr 7I, 85, II4, 22I и 240), 4 - в состав β-поворотов (В-цепь - Tyr 47, 90, I4I и 237) и 3 - в состав участков с нерегулярной конформацией (А-цепь - Tyr 6, В-цепь - Tyr I34 и I90).

Анализ состояния остатков тирозина и триптофана в молекуле α-тромбина был проведен также методами КР- и флуоресцентной спектроскопии.

Остатки тирозина дают ряд полос в спектрах КР белков, среди которых наиболее информативен ферми-резонансный дублет в области 800-900 $см^{-I}$ (330). В случае тромбина (рис. I2) отношение интенсивностей полос тирозинового дублета (J_{850}/J_{830}) имеет величину $\sim$ I,3, означая тем самым, что большинство гидроксильных групп тирозина свободно взаимодействует с растворителем.

В табл. 20 представлены флуоресцентные характеристики α-тромбина и ФМС -α-тромбина. Судя по значениям λ_{max} и $\Delta\lambda$ спектров флуоресценции, можно предположить, что в излучение α-тромбина основной вклад вносят триптофанилы I и II форм. Для приблизительной оценки вкладов модельных форм в спектр триптофановой флуоресценции α-тромбина пользовались диаграммой,

предложенной Э.А.Бурштейном (20). Оказалось, что нативная молекула тромбина содержит около 60% триптофанилов в форме I, 30% - в форме II и I0% - в форме III. Иными словами, в тромбине 4 остатка триптофана, по-видимому, находятся внутри молекулы, в жестком неполярном ядре, а остальные 3 остатка - на ее поверхности, в областях, доступных водному микроокружению.

Таблица 20

Флуоресцентные характеристики α-тромбина и ФМС-α-тромбина

Белок	λ max, нм	$\Delta\lambda$, нм	q	τ_1 нсек	τ_2 нсек	A_I/A_2
α-Тромбин	335	54,0	0,45	2,8I	5,79	3,36
ФМС-α-тромбин	335	55,5	0,35	2,76	5,5I	2,I4

τ_I и τ_2 - времена жизни флуоресценции, соответствующие двухэкспоненциальному затуханию с амплитудами A_I и A_2.

В спектре КР тромбина (рис. I2) полоса I36I $см^{-I}$ проявляется в виде интенсивной узкой линии, что также свидетельствует о наличии в его молекуле триптофанилов в гидрофобном микроокружении (367).

Поскольку в молекуле тромбина физическое окружение триптофанилов в гидрофобном микроокружении (367).

Поскольку в молекуле тромбина физическое окружение триптофанилов является неоднородным, то следует ожидать существенного отклонения кинетики затухания триптофановой флуоресценции от экспоненциального закона. Действительно, кинетические измерения триптофановой флуоресценции тромбина (рис. I3) выявили

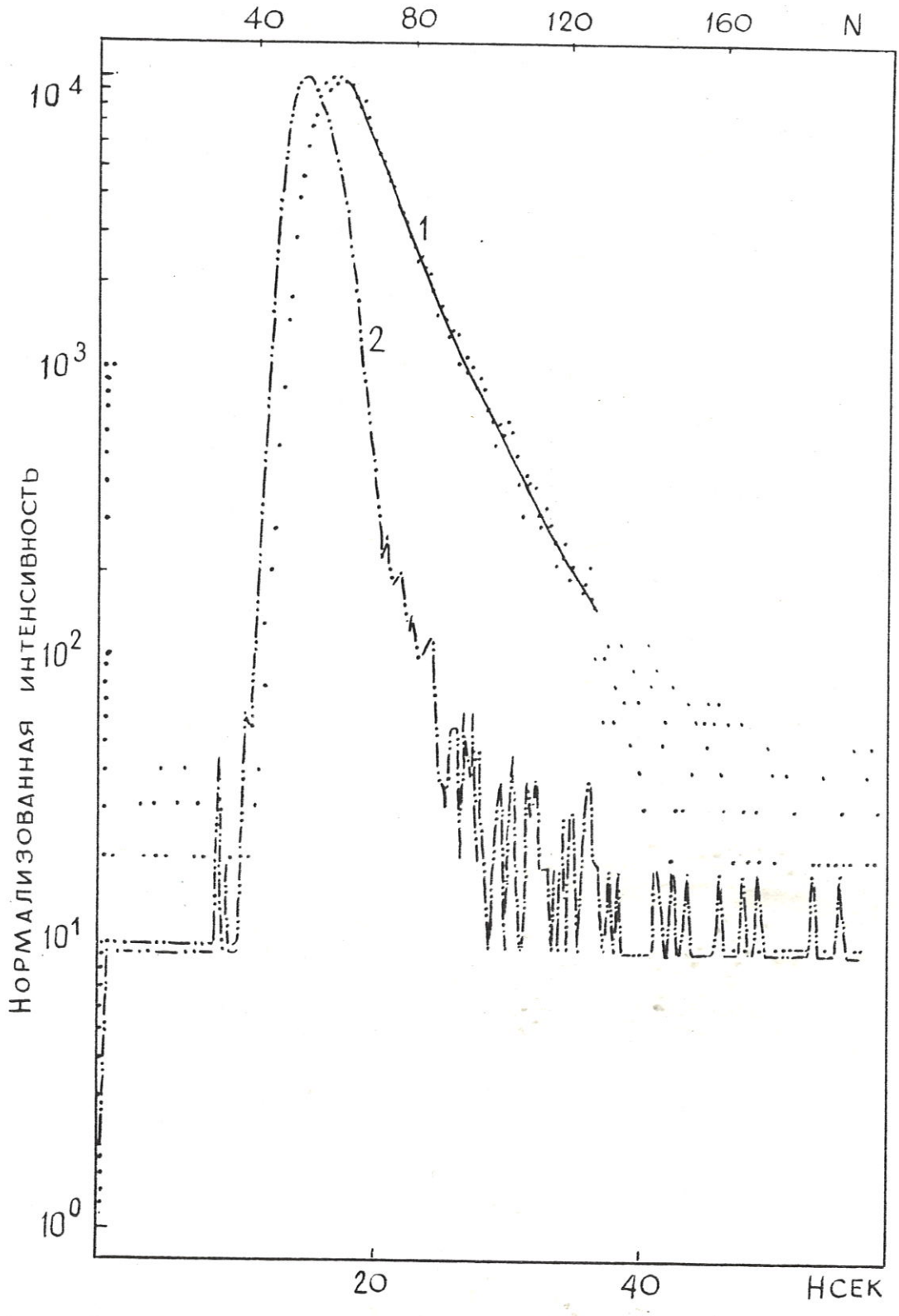


Рис. 13. Кинетика затухания флуоресценции α-тромбина (I), 2 - импульс возбуждения, N - номер канала (0,32 нсек/канал), $\lambda_{возб}$ = 296 нм, $\lambda_{исп}$ = 335 нм.

четко выраженный неэкспоненциальный закон затухания, характеризующийся как минимум двумя экспоненциальными процессами (табл. 20). Вклад короткоживущей экспоненты (τ_I=2,8I ± 0,36 нсек) в суммарную интенсивность составляет J_I=0,62, вклад длинноживущей экспоненты (τ_2=5,79 ±0,95 нсек) - J_2=0,38. Эти данные свидетельствуют о том, что в молекуле α-тромбина мы имеем дело как минимум с двумя различными типами флуоресцирующих остатков триптофана.

Высокое значение среднего квантового выхода триптофановой флуоресценции тромбина (табл. 20) позволяет идентифицировать принадлежность спектрально вырожденных внутренних остатков к подформе I б, обладающих высоким выходом, так как только в этом случае расчетное значение среднего квантового выхода ($q_{расч.}$= 0,40) находится в хорошем количественном соответствии с измеренным экспериментально ($q_{эксп}$=0,45).

У ФМС-α-тромбина наблюдается уширение спектра и уменьшение квантового выхода флуоресценции по сравнению с α-тромбином (табл. 20). Положение спектра флуоресценции является таким же как и у α-тромбина. Процесс затухания флуоресценции триптофанилов у ФМС-α-тромбина также описывается двумя экспонентами: у короткоживущей формы τ_I= 2,76 ± 0,62 нсек (J_I=0,52), у длинноживущей τ_2= 5,5I ± 0,99 нсек (J_2=0,48).

На рис. I4 представлены спектры флуоресценции α-тромбина (I), ФМС-α-тромбина (2) и их разностный спектр (3). Разностный спектр флуоресценции характеризуется положением максимума флуоресценции при 330 нм и полушириной спектра, равной 44 нм. Из этих данных следует, что модификация серинового остатка активного центра тромбина фенилметилсульфонилфторидом сопровождает-

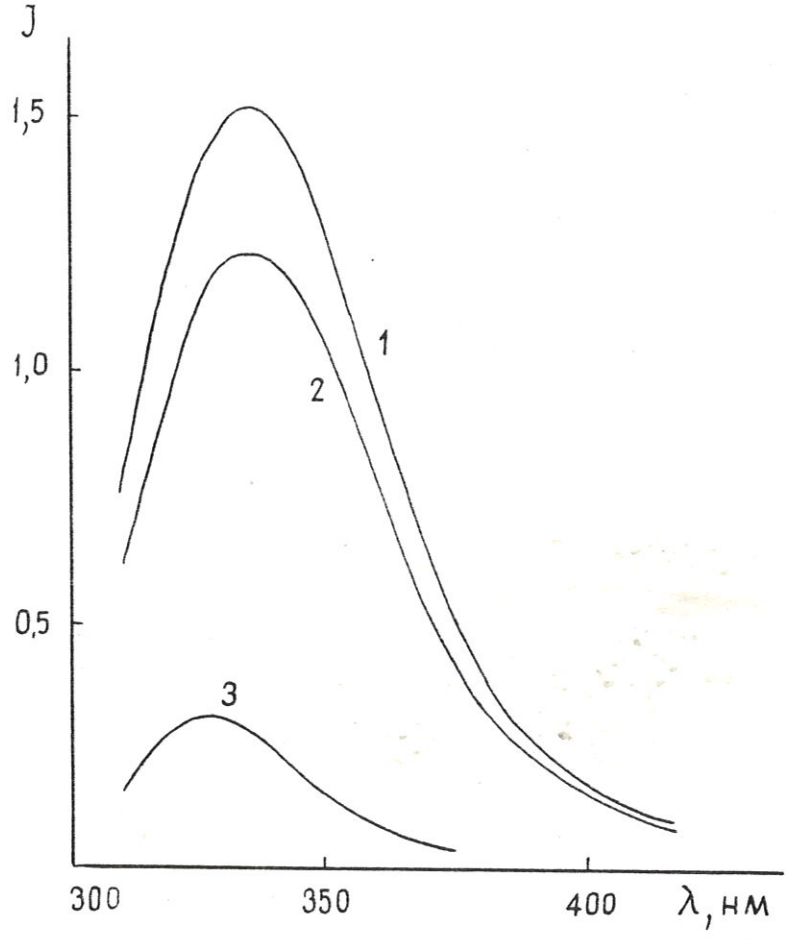


Рис. I4. Спектры флуоресценции водных растворов (0,0I М трис-HCI, pH 7,4) α-тромбина (I), ФМС-α-тромбина (2) и разностный спектр флуоресценции (3). Длина волны возбуждения 296 нм.

ся тушением флуоресценции остатков триптофана, находящихся в неполярном микроокружении. Оптимальное соответствие экспериментального квантового выхода ($q_{эксп}$=0,35) и его расчетного значения ($q_{расч}$=0,37) получено лишь для случая, если в молекуле ФМС-α-тромбина флуоресцирует только 2 из 4 остатков триптофана, принадлежащих к подформе Iб. Интересно отметить, что в комплексах тромбина с диизопропилфторфосфатом и бензамидином теряется реакционная способность двух остатков триптофана по сравнению с тромбином (355).

Таким образом, анализ собственных и литературных данных позволяет сделать предположение о том, что в непосредственной близости от остатков триады активного центра в трехмерной структуре молекулы α-тромбина находятся два остатка триптофана, которые, вероятно, принимают участие в формировании гидрофобного связывающего участка этого фермента.

б) Структурные аспекты функциональной специфичности α-тромбина.

Исследование структурных основ функциональной селективности тромбина имеет большое теоретическое и практическое значение. Разработка этой проблемы способствует не только дальнейшему развитию энзимологии, особенно в понимании усложнения центра связывания, обеспечивающего более узкую специфичность фермента в выборе физиологического субстрата при сохранении неизменным (в основном) самого физико-химического механизма катализа, но и дает фундаментальное обоснование целенаправленному синтезу ингибиторов тромбина - потенциальных антикоагулянтов для использования в медицинской практике (I02).

В этом разделе нами предпринята попытка подойти к рассмот-

рению некоторых структурных аспектов высокой специфичности α-тромбина на основе сравнения его вероятной модели вторичной структуры с данными рентгеноструктурного анализа для гомологичных сериновых протеиназ.

На рис. I5 представлена схематическая диаграмма расположения α-спиральных и β-структурных участков в В-цепях α-тромбина и α-химотрипсина. Наличие частичной гомологии в расположении элементов вторичной структуры, особенно в С-концевых областях В-цепей тромбина и химотрипсина, свидетельствует о том, что пространственная организация этих двух белков, по-видимому, в общих чертах является сходной. Вместе с тем, бросаются в глаза и значительные различия во вторичной структуре тромбина и химотрипсина. Рассмотрим их более подробно, поскольку анализ именно структурных различий, а не сходства может явиться ключом к пониманию функциональной специфичности тромбина. В первую очередь приступим к анализу структурных особенностей тромбина в области остатков, образующих систему переноса заряда и в области первичного центра связывания.

Согласно предлагаемой вероятной модели вторичной структуры тромбина His -43 активного центра входит в состав спирального участка 4I-46, в то время как у трипсина и химотрипсина аналогичный остаток включен в структуру β-поворота.

По данным теоретического предсказания вторичной структуры Asp 99 активного центра тромбина входит в состав спирального участка 98-I07. Предсказание α-спирали в этой области связано с заменами Arg 98 и Ala I04, склонность которых к встраиванию в α-спиральную конформацию выражена сильнее, чем в β-структуру. А.А.Серейская и соавт. (I04) также предполагают возмож-

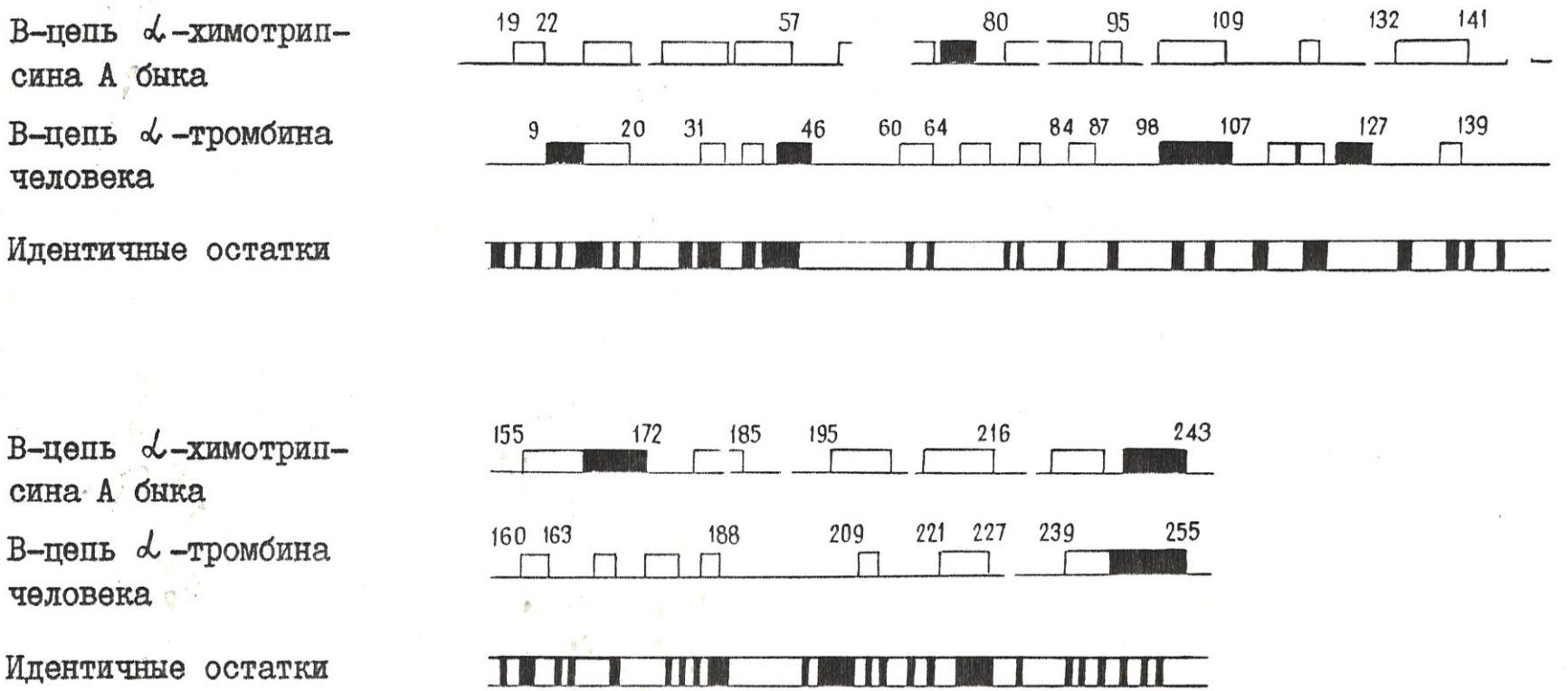


Рис. I5. Схематическая диаграмма расположения α-спиральных (▪) и β-структурных (▫) участков в В-цепях α-химотрипсина быка (рентгеноструктурный анализ) и α-тромбина человека (предсказание).

ность формирования α-спиральной конформации на этом участке В-цепи тромбина вместо β-структуры в соответствующем участке (I03-II0) химотрипсина. Как указывалось выше (глава I), у химотрипсина Asp I02 и His 57 активного центра пространственно сближены в результате формирования антипараллельного β-листа β-структурными участками 50-55 и I03-II0. Исходя из этого, можно предположить, что формирование α-спирали на участке 98-I07 Б-цепи тромбина приведет к изменению ориентации не только Asp 99, но и His 43.

Относительно структурного состояния Ser 205 активного центра тромбина имеется точка зрения, согласно которой этот остаток как и у трипсина входит в состав антипараллельного β-листа, сформированного участками β-структуры 205-2II и 22I-228 (I04). Действительно, в соответствии с данными, представленными в табл. I6 и на рис. I5, видно, что в В-цепи тромбина в этой области предсказываются два β-структурных участка 209-2II и 22I-228. Однако, согласно предлагаемой вероятной модели вторичной структуры тромбина Ser 205 входит в состав участка 202-208, имеющего конформацию β-поворота.

Таким образом, сравнительный анализ вторичной структуры панкреатических сериновых протеиназ и тромбина в области остатков триады активного центра свидетельствует о наличии в последнем структурных особенностей, которые могут сказаться на функции His 43, Asp 99 и Ser 205 в системе переноса заряда. Не исключено, что изменение структурного состояния аминокислотных остатков триады активного центра тромбина по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами может быть одним из факторов снижения его реакционной способности по отношению к низкомоле-

кулярным синтетическим субстратам.

Известно, что разница в специфичности сериновых протеиназ обусловлена структурными различиями участков связывания субстрата. В отличие от панкреатических сериновых протеиназ контактная зона тромбина формируется из трех локусов: I) кармана первичного связывания; 2) достаточно протяженной вторичной зоны; 3) дополнительного связывающего центра, расположенного вне классического активного центра тромбина (47, I05).

Способность тромбина гидролизовать подобно трипсину эфиры и амиды аргинина и лизина с блокированной α-аминогруппой показывает, что контактный участок его активного центра аналогичен трипсиновому (I03). У тромбина на дне кармана связывания расположена Asp I99, обусловливающая его трипсиноподобную специфичность путем электростатического взаимодействия с боковым радикалом аргинина, лизина и очень редко гистидина (234). Согласно гипотетической трехмерной модели тромбина (273) одну боковую стенку кармана образуют остатки 200-20I, а другую - 228-23I. Прочность структуры кармана фиксируется дисульфидным мостиком Cys 20I - Cys 23I. Функциональная роль замен в первичном центре связывания тромбина подробно рассмотрена в ряде обзоров (I02-I04). В то же время в литературе очень слабо освещен вопрос о возможной функциональной роли вставки I95-I98, расположенной у дна кармана связывания в молекуле тромбина, Интерес к этой вставке обусловлен тем, что появление в молекуле тромбина аминокислотных остатков Arg I97 - Gly I98 приводит к образованию трипептида Arg I97 - Gly - Asp I99, который имеется также в ряде белков (табл. 2I), специфически связывающихся с мембранными рецепторами различных клеток (305). Показано, что

этот трипептид является необходимым для взаимодействия фибронектина и фибриногена с поверхностными клеточными рецепторами (2I4).

В молекуле тромбина трипептид I97-I99 входит в состав предсказываемого β-поворота I97-200. Аминокислотный состав β-поворота I97-200 (наличие глицина и полярных остатков аргинина и аспарагиновой кислоты) позволяет полагать (239), что этот участок В-цепи тромбина находится на поверхности белковой глобулы. Такой характер пространственного расположения трипептида I97 - I99 с учетом близости к первичному центру связывания позволяет отнести его к важнейшим структурным элементам, отличающим тромбин от гомологичных сериновых протеиназ и приводящим к усложнению его контактной зоны.

Существенно также указать, что в аминокислотной последовательности В-цепи тромбина слева от трипептида I97-I99 имеется тетрапептид Cys I87 - Tyr I90, который также встречается и является высококонсервативным в β-субъединице некоторых гликопротеиновых гормонов (табл. 2I), несущей основные детерминанты для рецепторного связывания, и составляет часть их связывающего сайта (245). Согласно вероятной модели вторичной структуры тромбина участок полипептидной цепи между тетрапептидами I87 - I90 и трипептидом I97 - I99 находится в конформации β-поворота, что предполагает возможность их пространственного сближения. Не исключено, что эти участки полипептидной цепи могут играть важную роль в высокоаффинном связывании α-тромбина с клеточными рецепторами.

Согласно гипотетической трехмерной модели тромбина (273) возможными кандидатами на роль структур, ответственных за узкую

Таблица 2I

Сопоставление аминокислотных последовательностей участков В-цепи α-тромбина, некоторых белков и гликопротеиновых гормонов

В-цепь α-тромбина	(I86-200)	Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala
Фолликулостимулирующий гормон	(27-32)	Trp-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys
Хорионический гонадотропин	(33-38)	Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys
Лютеинизирующий гормон	(33-38)	Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys
Тиреотропин	(26-3I)	Val-Cys-Ala-Gly Tyr-Cys
Фибронектин		Gly-Arg-Gly-Asp-Ser
А α-цепь фибриногена	(94-98)	Leu-Arg-Gly-Asp-Phe
Рецепторный белок для лямбда-фага		Gly-Arg-Gly-Asp-Ser
Мембранный белок вируса Синдбис		Gly-Arg-Gly-Asp-Ser

специфичность, в его В-цепи являются два участка крупных вставок, характерных только для тромбина и расположенных вблизи активного центра: Lys 52 - Leu 60 и Val I48 - Gln I53. Значительные различия первичной структуры и аминокислотного состава последней вставки у тромбина человека и быка (различия по четырем остаткам) позволяют исключить ее возможную роль в проявлении высокой функциональной селективности тромбина. Наибольшего внимания заслуживает вставка у остатка Asn 5I как вероятный кандидат на роль центра узнавания высокомолекулярных специфических субстратов (I02-I04, II0).

По нашим данным (табл. I6) N -концевая часть вставки у остатка Asn 5I входит в состав β-поворота 5I-54, который наряду с β-поворотом 47-50, по-видимому, будет способствовать пространственному сближению этой вставки с аминокислотными остатками триады активного центра, в частности с His 43. Предсказание вторичной структуры С-концевой части вставки 52-60 является неопределенным, так как этот участок цепи в равной степени может входить как в состав предсказываемой α-спирали 58-62, так и β-структуры 60-64. Такая ситуация является отражением конформационной нестабильности участка цепи (324), поскольку в нем легко происходит конформационный переход типа α-спираль $\rightleftarrows$ β-структура, являющийся причиной существования конформеров белка с различной биологической активностью (I8I). Не исключено, что наличие нестабильности конформации В-цепи тромбина в области 58-64 является важной структурной особенностью, характеризующей приспособительную способность фермента взаимодействовать с субстратами в нескольких структурных, а следовательно, и различных функциональных состояниях.

По данным предсказания вторичной структуры пептидные связи В-цепи Lys 65-His 66 и Arg 73-Asn 74, подвергающиеся расщеплению в процессе превращения α-тромбина в β-тромбин, находятся в составе участков в конформации β-поворота и нерегулярной конформации, соответственно (табл. I6). Учитывая важную роль β-поворотов для обеспечения узнавания макромолекулами друг друга (332), можно полагать, что разрушение β-поворота 64-68 в результате расщепления связи Lys 65-His 66 является существенным моментом в деградации структуры, необходимой для узнавания фибриногена. Интересно отметить, что превращение β-тромбина в γ-тромбин также сопровождается разрушением -поворота I53-I56 в результате расщепления связи Lys I54-Gly I55.

Наличие β-поворотов, играющих, как указывалось выше, существенное значение в макромолекулярном узнавании, на участках 47-50, 5I-54, 64-68 и области нестабильной конформации как возможного структурного приспособительного элемента узнавания на участке 58-64 В-цепи тромбина, а также полная консервативность этих участков в молекулах тромбина быка и человека позволяет выдвинуть предположение о том, что элементы структуры α-тромбина, определяющие его высокую функциональную селективность, по-видимому, вовлечены в конфигурацию вставки Lys 52-Leu 60 и соседних с ней участков молекулы. Скорее всего дополнительный центр связывания макромолекулярных субстратов, обусловливающий уникальную специфичность фермента, локализован в области остатков 47-73 В-цепи α-тромбина. На это указывает также и тот факт, что в этом сегменте содержится по два остатка лизина и тирозина и один остаток триптофана, т.е. аминокислотные остатки, которые по данным химической модификации являются существенными для су-

перспецифичности тромбина (I03).

Другим подходом для выяснения узкой функциональной селективности тромбина является подход, основанный на анализе структурных особенностей его высокомолекулярных субстратов. Поэтому нами было проведено предсказание вторичной структуры в области тромбин-чувствительных связей у фибриногенов различного происхождения и других белковых субстратов.

Поскольку при взаимодействии тромбина с фибриногеном наиболее эффективно происходит расщепление связи Arg I6- GlyI7 в Aα-цепи, то основное внимание нами было уделено рассмотрению структурных особенностей фибринопептида А и прилегающих к нему областей.

Существует предположение о существовании у субстратов тромбина изогнутой конформации, благодаря которой боковой радикал аминокислотного остатка в положении P_9 является пространственно сближенным с боковым радикалом подцентра P_2 (I54). Первоначально полагали, что слева от подцентра P_1 фибринопептид А находится в конформации α-спирали (I54). В дальнейшем была высказана точка зрения, согласно которой пространственное сближение боковых радикалов аминокислот в подцентрах P_2 и P_9 обусловлено наличием β-поворота (3II). В.К.Кибирев и соавт. (46) пришли к выводу, что тромбин способен эффективно расщеплять только те субстраты, которые могут дополнительно экранировать Asp I99 от растворителя. Причем, главную роль в этом авторы отводят боковым радикалам аминокислот в подцентрах P_2 и P_9 субстрата. По их мнению архитектура вторичного связывающего центра тромбина такова, что комплементарный ему участок P_2-P_9 специфических субстратов имеет два гидрофобных ядра, которые сближены в пространстве благодаря

Таблица 22

Аминокислотные последовательности фибринопептидов А у различных млекопитающих

Млекопитающие	Аминокислотная последовательность
Человек	Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Макака резус	Ala-Asp-Thr-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Кролик	Val-Asp-Pro-Gly-Glu-Ser-Thr-Phe-Ile-Asp-Glu-Gly-Ala-Thr-Gly-Arg-
Борсук	Thr-Asp-Val-Lys-Glu-Ser-Glu-Phe-Ile-Ala-Glu-Gly-Ala-Gly-Val-Arg-
Собака	Thr-Asp-Ser-Lys-Glu-Gly-Glu-Phe-Ile-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Кошка	Gly-Asp-Val-Gln-Glu-Gly-Glu-Phe-Ile-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Осел	Thr-Lys-Thr-Glu-Glu-Gly-Glu-Phe-Ile-Ser-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Свинья	Ala-Glu-Val-Gln-Asp-Lys-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Лама	Thr-Asp-Pro-Asp-Ala-Asp-Lys-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Бык	Glu-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Pro-Ser-Gly-Asp-Phe-Leu-Thr-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Европейский бизон	Glu-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Ala-Ser-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Овца	Ala-Asp-Asp-Ser-Asp-Pro-Val-Gly-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Северный олень	Ala-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Ala-Gly-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-
Лань	Ala-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Ala-Ser-Ser-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-

β-повороту на участке подцентров P_7-P_4, и формируют неполярный участок, осуществляющий дополнительное гидрофобное экранирование Asp 199 и тем самым способствует эффективному расщеплению субстрата.

Таблица 23

Теоретическое предсказание элементов вторичной структуры фибринопептида А различных млекопитающих

Млекопитающие	Элементы вторичной структуры	
	α-спираль	β-повороты
Человек	7 - 11	1 - 7, 11 - 14
Макака резус	7 - 11	1 - 7, 11 - 14
Кролик	7 - 11	2 - 7, 11 - 14
Борсук	2 - 14	
Собака	7 - 11	1 - 4, 11 - 14
Кошка	2 - 11	11 - 14
Осел	2 - 11	11 - 14
Свинья	1 - 12	12 - 15
Лама	1 - 13	13 - 16
Бык	10 - 14	1 - 10,14 - 17
Бизон европейский	10 - 14	1 - 10,14 - 17
Овца	9 - 14	2 - 9,14 - 17
Олень северный	9 - 14	2 - 9,14 - 17
Лань	10 - 14	1 - 10,14 - 17

Результаты предсказания вторичной структуры различных фибринопептидов А по их аминокислотной последовательности (табл. 22) суммированы в табл. 23. У фибринопептидов различно-

го происхождения β-поворот предсказывается на участке P_3-P_6, что находится в хорошем согласии с предположением В.К.Кибирева и соавт. (46). Следует также обратить внимание на то, что остаток фенилаланина, занимающий у всех фибринопептидов А положение P_9, входит в состав предсказываемой α-спирали, расположенной слева от β-поворота. Такой характер расположения элементов вторичной структуры фибринопептида А несомненно будет приводить к пространственному сближению подцентров P_2 и P_9 и образованию гидрофобного кластера, состоящего из массивных гидрофобных радикалов фенилаланина (P_9) и валина (P_2), вблизи атакуемой тромбином пептидной связи Arg I6 - Gly I7. Это, в свою очередь, подразумевает существование неполярного связывающего участка на молекуле тромбина вблизи его активного центра. В предыдущем разделе на основе анализа собственных и литературных данных было сделано предположение о наличии двух остатков триптофана вблизи триады аминокислот активного центра тромбина. Вполне вероятно, что массивные боковые радикалы этих остатков триптофана образуют гидрофобную область фермента, комплементарную таковой в молекуле фибриногена и образованную боковыми радикалами фенилаланина (P_9) и валина (P_2).

Используя данные о первичной структуре N-концевых участков А α-цепи фибрина человека, быка, собаки и цыпленка (32I), нами было проведено предсказание их вторичной структуры. Оказалось, что на участке P^{I}_{3} - P^{I}_{6} предсказывается либо β-структура (человек, собака), либо α-спираль (бык, цыпленок). Интересно отметить, что такая топология элементов вторичной структуры вокруг тромбин-чувствительной связи в Аα-цепи фибриногена, т.е. наличие слева от расщепляемой связи β-поворота, а

справа от нее β-структуры или α-спирали, ранее найдена вблизи химозин-чувствительных связей в казеине (246). У генетически аномальных фибриногенов Детройт и Мюнхен, несмотря на замену аргинина в подцентре P_3^I на серин у первого и на аспарагин у второго (233), в области $P_3^I - P_6^I$ β-структурная конформация сохраняется. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что на эффективность тромбинового катализа, по-видимому, оказывает влияние не характер вторичной структуры участка Aα-цепи фибриногена справа от тромбин-чувствительной связи Arg I6 - Gly I7, а сам факт наличия в подцентре P_3^I аргинина.

Учитывая данные о том, что Aα-цепь фибриногена в области I-5I содержит основные структурные элементы, необходимые для специфического протеолиза тромбином, рассмотрим более подробно ее возможную вторичную структуру. Элементы вторичной структуры N-концевой части участка I-5I Aα-цепи фибриногена рассмотрены выше. Сведения о структурном состоянии С-концевой части этого участка представляют особый интерес в связи с существующими представлениями о локализации локуса узнавания тромбина именно в области 34-5I (I56).

По данным предсказания вторичной структуры участки 29-32, 37-40 и 45-50 Aα-цепи фибриногена находятся в конформации β-поворота. Ярко выраженной особенностью аминокислотного состава β-поворотов 29-32 и 37-40 является высокое содержание в них отрицательно заряженных остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. Между этими β-поворотами заключен тетрапептид Trp 33 - Pro - Phe - Cys 36, боковые радикалы которого, по-видимому, образуют в этой области Aα-цепи фибриногена гидрофобный кластер. Эти особенности аминокислотного состава и структу-

ры С-концевой части участка I-5I Аα -цепи фибриногена подразумевают наличие в дополнительном центре узнавания высокомолекулярных субстратов тромбина неполярной зоны и зоны с высоким содержанием аминокислотных остатков с положительно заряженными боковыми радикалами. Таким требованиям в полной мере удовлетворяет рассмотренный нами ранее участок В-цепи α -тромбина 47-73: неполярная зона может быть сформирована в районе последовательности Tyr 47 - Pro - Pro - Trp 50 или Leu 59 - Leu - Val - Arg - Ile 63, а зона концентрации положительных зарядов - остатками Arg 62, Lys 65, Arg 68, Arg 70 и Arg 73. По-видимому, эффективность узнавания тромбином фибриногена и точность контакта каталитического центра с пунктом Arg I6 - Gly I7 полипептидной Аα -цепи определяется как гидрофобными, так и электростатическими взаимодействиями. Не исключено, что резкое снижение скорости гидролиза тромбином N -концевого фрагмента I-5I Аα -цепи фибриногена, наблюдаемое при отщеплении участка 34-5I (I56), обусловлено разрушением гидрофобного кластера 33-36 и удалением зоны с повышенным отрицательным зарядом.

Рассмотрим вторичную структуру участков полипептидной цепи вблизи атакуемых пептидных связей в некоторых белковых субстратах, взаимодействие α-тромбина с которыми играет определенное физиологическое значение (I03).

Как указывалось выше (глава I), в молекуле протромбина человека и быка α-тромбин вызывает отщепление фрагмента I, приводящее к образованию претромбина I. Как в молекуле протромбина человека, так и быка слева от пункта протеолиза (на участке P_3-P_9) предсказывается β-структура. Важно отметить, что по одну сторону плоскости этой β-структуры расположены остатки

Val I48 (у быка Val I49), Val I50 (I5I) и Val I52 (I53), боковые радикалы которых, несомненно, будут образовывать гидрофобный кластер вблизи аргинина P_I. Не исключено, что как и в случае с фибриногеном, этот гидрофобный кластер связывается с комплементарным участком молекулы α-тромбина (вторичной контактной зоной).

Вторичная контактная зона α-тромбина вовлекается также во взаимодействие с белковыми ингибиторами, в частности, антитромбином Ш (I99). Интересно, что и в молекуле антитромбина Ш слева от расщепляемой α-тромбином связи Arg 385 - Ser 386 (I52) предсказывается β-структура (на участке P_3-P_7), на одной из сторон плоскости которой локализованы неполярные остатки Ala 379, Val 38I и Ala 383.

В молекуле фактора ХШ α-тромбин расщепляет связь Arg 36 - Gly 37 (343). Как и в вышеприведенных субстратах, в молекуле фактора ХШ слева от точки расщепления (на участке P_5-P_9) предсказывается β-структура, в которой по одну сторону плоскости расположены неполярные остатки Val 29 и Leu 3I.

Таким образом, для протромбина, антитромбина Ш и фактора ХШ, являющихся белковыми субстратами α-тромбина, характерно наличие слева от пункта протеолиза β-структурного участка, формирующего вблизи тромбин-чувствительной связи гидрофобный кластер в результате пространственного сближения неполярных боковых радикалов двух-трех аминокислотных остатков. По-видимому, специфичность этих субстратов во многом обусловлена вторичным неполярным связывающим участком α-тромбина.

§ 4. Заключение.

Формулируя задачу исследования в начале настоящей главы,

мы отмечали, что отсутствие сведений о трехмерной структуре α-тромбина и его белковых субстратов оставляет проблему суперспецифичности этого фермента открытой. Сравнительный анализ особенностей первичной структуры α-тромбина по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами, проведенный рядом авторов (I03, I04, I02), приблизил нас к пониманию структурных основ высокой специфичности α-тромбина, но, естественно, не позволил решить эту проблему до конца. Поэтому мы полагали, что подход, основанный на анализе вторичной структуры α-тромбина и его высокомолекулярных субстратов, даст возможность получить более полную информацию о структурных аспектах узкой селективности каталитического действия фермента. Такая постановка вопроса привела к закономерной необходимости тщательного исследования взаимосвязи между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белков.

На основании полученных данных о распределении пар соседних аминокислот в α-спиральных, β-структурных и нерегулярных участках 46 глобулярных белков с известной пространственной организацией разработаны алгоритмы предсказания структурного класса и вторичной структуры белков по их первичной структуре. Для полностью α-спиральных белков алгоритм правильно предсказывает структурный класс в I00% случаев; для β-структурных и $\alpha+\beta$ -белков - в 97% случаев; для α/β -белков - в 94% случаев. Алгоритм предсказания элементов вторичной структуры правильно предсказывает 85,9% остатков, входящих в α-спирали; 72,4% остатков, входящих в β-структуру и 70,7% остатков, входящих в β-повороты. Разработанный алгоритм дает гораздо лучшее соответствие предсказанных структур с данными рентгеноструктур-

ного анализа по сравнению со всеми другими теоретическими методами предсказания вторичной структуры белков (табл. 14).

Используя вышеприведенные алгоритмы, получена вероятная модель вторичной структуры α-тромбина, согласно которой А-цепь тромбина содержит 24% α-спиралей, 6% β-структуры и 18% β-поворотов, а В-цепь - 14% α-спиралей, 29% β-структуры и 31% β-поворотов. Результаты теоретического предсказания вторичной структуры α-тромбина находятся в удовлетворительном согласии с экспериментальными данными, полученными методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния.

В ходе дальнейшей работы было проведено сопоставление предлагаемой вероятной модели вторичной структуры α-тромбина с данными рентгеноструктурного анализа α-химотрипсина. Показано, что конформационное состояние аминокислотных остатков триады активного центра у α-тромбина значительно отличается от такового у α-химотрипсина. Высказано мнение о том, что изменение структурного состояния аминокислотных остатков триады активного центра α-тромбина по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами может быть одним из факторов снижения его реакционной способности по отношению к низкомолекулярным синтетическим субстратам. Кроме того, наличие в α-тромбине вблизи первичного центра связывания трипептида Arg 197 - Gly - Asp 199, являющегося частью связывающего сайта с рецепторами клеток в молекулах ряда белков, свидетельствует в пользу представлений об усложнении центра связывания у тромбина по сравнению с панкреатическими сериновыми протеиназами, что может быть существенным для его высокоселективного взаимодействия с клеточными рецепторами. Показана принципиальная возможность пространственного

сближения этого участка В-цепи α-тромбина с тетрапептидом Cys I87 - Tyr I90, входящим в состав детерминант для рецепторного связывания некоторых гликопротеиновых гормонов, что является важным аргументом, свидетельствующим о возможном вовлечении его в формирование достаточно протяженной вторичной контактной зоны α-тромбина.

Анализ собственных данных о наличии β-поворотов, играющих, как известно, важную роль в макромолекулярном узнавании, на участках 47-50, 5I-54, 64-68 и области нестабильной конформации на участке 58-64, а также литературных данных о полной консервативности этих участков в молекулах тромбина быка и человека и потере фибриноген-свертывающей функции α-тромбина при протеолитическом выщеплении октапептида His 66 - Arg 73 позволяет выдвинуть предположение о том, что дополнительный центр связывания макромолекулярных субстратов, по-видимому, формируется аминокислотными остатками участка 47-53 В-цепи α-тромбина.

У фибриногенов различного происхождения слева от пункта протеолиза Aα-цепи на участке P_3-P_6 предсказывается β-поворот, определяющий формирование гидрофобного кластера в результате пространственного сближения боковых радикалов неполярных аминокислотных остатков фенилаланина (P_9) и валина (P_2). Интересно отметить, что и в других белковых субстратах α-тромбина (протромбин, антитромбин Ш, фактор ХШ) предсказываемые элементы вторичной структуры также способствуют формированию гидрофобных кластеров слева от тромбин-чувствительной связи. Эти данные являются подтверждением правильности гипотезы В.К.Кибирева и соавт. (46) о том, что α-тромбин эффективно расщепляет только те субстраты, которые могут дополнительно экранировать Asp I99

от растворителя. По-видимому, обнаруженная нами кластеризация разделенных по цепи неполярных боковых радикалов слева от гидролизуемой связи приводит к формированию в этой области неполярной зоны, осуществляющей дополнительное экранирование Asp I99 от растворителя.

Сопоставление элементов теоретически предсказанной вторичной структуры и аминокислотного состава области локуса узнавания тромбина на Aα -цепи фибриногена (участок 34-5I) и предполагаемой области дополнительного центра узнавания высокомолекулярных субстратов тромбина (участок 47-73 B-цепи) указывает на то, что эффективность узнавания тромбином фибриногена, вероятно, определяется гидрофобными и электростатическими взаимодействиями.

Совокупность результатов, изложенных в этой главе, позволяет сформулировать следующие положения, отражающие новизну полученной информации.

По данным теоретического предсказания структурного класса и вторичной структуры, а также лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния α-тромбин относится к белкам со смешанной вторичной структурой и содержит I6% аминокислотных остатков в α-спиралях, 26% - в β-структуре, 29% - в конформации β-поворотов и 29% - в нерегулярной конформации. Конформационное состояние остатков, образующих систему переноса заряда в молекуле α-тромбина (His 43, Asp 99 и Ser 205) значительно отличается от состояния аналогичных остатков в гомологичных сериновых протеиназах, что может быть одним из факторов снижения реакционной способности тромбина по отношению к низкомолекулярным субстратам.

У α-тромбина наряду с усложненным по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами первичным центром связывания в результате формирования β-поворота 197-200, содержащего трипептид Arg - Gly - Asp , существует протяженный вторичный гидрофобный участок, составными частями которого, вероятно, являются два остатка триптофана, находящиеся в непосредственной близости от остатков триады активного центра, и тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr , а также дополнительный центр связывания высокомолекулярных субстратов, обусловливающий тонкую функциональную селективность фермента. Дополнительный центр узнавания высокомолекулярных субстратов, по-видимому, формируется структурами, расположенными на участке 47-73 В-цепи.

Для макромолекулярных субстратов α-тромбина (фибриноген, антитромбин Ш, протромбин, фактор ХШ) характерным является формирование слева от тромбин-чувствительной связи гидрофобного кластера в результате пространственного сближения разобщенных по цепи неполярных радикалов, которые, вероятно, осуществляют дополнительное гидрофобное экранирование Asp 199 α-тромбина и тем самым способствуют эффективному расщеплению этих субстратов.

ГЛАВА IУ. СОСТОЯНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТРОМБИН-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ.

§ I. Введение и постановка задачи

В середине 60-х годов группа клиницистов (28I) впервые сообщила, что протеазная обработка периферических лимфоцитов человека в культуре может действовать как митогенный стимул, приводящий к бласттрансформации. Впоследствии было убедительно доказано, что сериновые протеиназы действуют как митогены В-клеток при стимуляции бластогенеза (249, 356).

В качестве рабочей гипотезы для объяснения митогенности сериновых протеиназ было выдвинуто предположение, что как неспецифические митогены, так и антигены инициируют бласттрансформацию посредством высвобождения и /или/ активации эндогенной лимфоцитарной протеиназы, которая атакует поверхностные структуры своей собственной клетки или плазматические мембраны соседних лимфоцитов, запуская таким образом последующие события бласттрансформации (249). Согласно этой гипотезе экзогенная протеиназа действует непосредственно на поверхность лимфоцитов и инициирует бласттрансформацию, пропуская фазу митоген- или антиген-стимулируемого высвобождения эндогенной протеиназы.

В I976 году впервые было показано, что тромбин также является митогеном для лимфоцитов селезенки мыши (I75). Вклад протромбина, как потенциального митогена, в общую митогенную емкость плазмы достаточно высок и составляет приблизительно 30% (I74).

Несмотря на эти интересные сообщения, феномен активации

лимфоцитов тромбином не был по достоинству оценен и активно не исследовался. К началу наших исследований в литературе практически отсутствовали какие-либо сведения о молекулярных механизмах взаимодействия тромбина с лимфоцитами.

Физиологическое значение митогенности тромбина по отношению к лимфоцитам приобретает особый смысл в свете гипотезы о существовании в организме животных и человека иммунного механизма регуляции ферментативного гомеостаза в системе свертывания крови (64, I29-I3I), согласно которой проферменты системы свертывания крови являются иммунологически толерантными для собственного организма, но в процессе активации проферментов в результате ограниченного протеолиза или конформационных изменений появляются ранее скрытые аутоантигенные детерминанты, способные запустить иммунные механизмы ингибирования активных ферментов, наряду с их инактивацией известными ингибиторами сериновых протеиназ (α_2-макроглобулин, антитромбин Ш, антитрипсины, C_I-ингибитор и т.д.). Экспериментально доказано наличие в кровотоке здоровых людей и интактных животных лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецепторы к тромбину, а также аутоантител, ингибирующих свертывающую активность тромбина (I29).

Приведенные факты и соображения позволяют полагать, что специфическое взаимодействие активных факторов свертывания крови, в частности α-тромбина, с иммунокомпетентными клетками является одним из важнейших звеньев взаимосвязи между системами гемостаза и иммуногенеза.

К настоящему времени данные о влиянии основного медиатора системы гемостаза - тромбина - на функциональные свойства иммунокомпетентных клеток уже известны (63, 78-80, I45), однако,

в литературе эта взаимосвязь совсем не получила объяснения на языке биохимии и биофизики.

Учитывая возможность функциональной взаимосвязи между иммунными и гемостатическими процессами, представлялось интересным оценить состояние биосинтетических макромолекулярных процессов в тромбин-стимулированных иммунокомпетентных клетках. Наиболее удобной моделью для таких исследований ин витро представляется взаимодействие тромбина с лимфоцитами. Обоснование выбора лимфоцитов в качестве объекта исследования дано в главе II.

§ 2. Влияние α-тромбина на синтез и экскрецию ДНК лимфоцитами

Активация лимфоцита - это результат антигенного или митогенного воздействия на клетку, выражающийся в изменении ее морфологии, ее размножении и превращении, в конце концов, в одну из эффекторных клеток. Этот процесс протекает полноценно только при участии других клеток: макрофагов, Т-хелперов, Т-амплифайеров и т.д. (77). В связи с этим, "социальные" аспекты поведения лимфоцитов становятся сейчас предметом интенсивного изучения. Любая процедура фракционирования лимфоцитов отдаляет нас от ситуации, имеющей место ин виво. Именно поэтому в качестве исходной популяции мы использовали не чистую популяцию В-клеток, а тотальную популяцию лимфоцитов селезенки мыши, содержащую более 60% В-лимфоцитов (I27).

На первом этапе этого раздела работы было проведено исследование митогенного эффекта тромбина в трехдневных культурах лимфоцитов. Установлено, что оптимальный митогенный эффект α-тромбина проявляется в интервале концентраций I-5 мкг/мл

(табл. 24). Поскольку митогенный эффект тромбина проявляется в бессывороточной среде, то следует, что различные митогенные факторы сыворотки не являются необходимыми для индукции синтеза ДНК в лимфоцитах селезенки.

Таблица 24

Включение ^{3}Н-тимидина (имп/мин на культуру) в ДНК лимфоцитов под влиянием различных концентраций тромбина

Эффекторы	Концентрация, мкг/мл					
	0	I	2	5	I0	20
Тромбин	886±26 (5)	I502±46^{x} (5)	I56I±52^{x} (5)	I605±68^{x} (5)	I342±24^{x} (5)	67I±59 (5)
ФМС-тромбин	649±85 (5)			6I3±95 (5)		

Примечание: в скобках указано число опытов. Здесь и далее различные исходные величины связаны с тем, что лимфоциты получены от разных животных. ^{x} - Различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Для доказательства протеолитического механизма индукции синтеза ДНК использовали ФМС-тромбин в концентрации, соответствующей оптимальной митогенной для нативного фермента (5 мкг/мл). Видно (табл. 24), что инактивация тромбина приводит к полной потере его стимулирующего влияния на синтез ДНК в лимфоцитах. Кроме того, нами показано (данные не вошли в настоящую работу), что инактивация плазмина нитрофенилгуанидинобензоатом сопровождается аналогичной потерей его митогенной активности (7).

Имеются сведения, что трипсин-индуцируемая инициация синтеза ДНК предотвращалась, если протеиназу преинкубировали с соевым ингибитором трипсина или денатурировали нагреванием (249). Эти данные убедительно доказывают, что именно протеолитическая модификация лимфоцитов, а не иммунный ответ ин витро на протеиназы является ответственной за наблюдаемую стимуляцию синтеза ДНК. Вопрос о возможных механизмах индукции синтеза ДНК в лимфоцитах тромбином будет рассмотрен в следующих разделах настоящей работы.

Одной из отличительных особенностей лимфоцитов лимфоидных органов по сравнению с лимфоцитами периферической крови является их способность спонтанно синтезировать ДНК (98, 323).

Таблица 25

Распределение ^{3}Н-ДНК в ядрах и культуральных супернатантах интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Эффекторы	Радиоактивность ДНК имп/мин на 10^7 ядер		Радиоактивность ДНК культуральных супернатантов, имп/мин на 10^7 клеток	
	до фенольной экстракции	после фенольной экстракции	до фенольной экстракции	после фенольной экстракции
-	53393 ±4663 (4)	598 ± 44 (4)	6879 ± 756 (4)	78 ± 8 (4)
тромбин	80I0I ±7I04* (4)	429 ± 28* (4)	9894 ±I057* (4)	I69 ± I7* (4)
ФМС-тромбин	58552±6829 (4)	600 ± 8I (4)	7206 ±II78 (4)	84 ± I0 (4)

Данных о влиянии тромбина на спонтанный синтез ДНК в лимфоци-

тах лимфоидных органов в литературе не имеется. Поэтому решено было изучить влияние тромбина на спонтанный синтез ДНК в лимфоцитах селезенки мыши (табл. 25). Обращает на себя внимание факт очень высокой интенсивности включения ^{3}Н-тимидина в ДНК интактными клетками. Сопоставляя эти результаты с данными, приведенными в табл. 24, видно, что включение ^{3}Н-тимидина в клетки, спонтанно синтезирующие ДНК, т.е. культивируемые в течение первых 4-х часов после постановки культур, почти в 30 раз превышает эту величину для клеток трехдневных нестимулированных культур. Культивирование свежеизолированных лимфоцитов селезенки в присутствии оптимальной митогенной концентрации тромбина (5 мкг/мл) сопровождается еще более интенсивным (в I,5 раза) включением радиоактивного предшественника в ДНК. В присутствии ФМС-тромбина активации спонтанного синтеза ДНК в лимфоцитах не наблюдается. Этот результат еще раз указывает на важную роль протеолитической модификации лимфоцитов в механизме митогенного действия α-тромбина.

По данным гель-хроматографии лизатов клеток (рис. I6) видно, что как у интактных, так и тромбин-стимулированных лимфоцитов, спонтанно синтезирующих ДНК, ^{3}Н-тимидин-меченый материал является достаточно гетерогенным, однако основная его масса (~90%) приходится на высокомолекулярные компоненты, элюирующиеся в свободном объеме колонки.

При использовании критерия исключения из фенола после щелочной денатурации-нейтрализации (ЗI8) показано, что доля палиндромных последовательностей во вновь синтезированной ДНК ядер интактных лимфоцитов селезенки мыши составляет I,I% (табл. 25). Подобные результаты были получены при исследова-

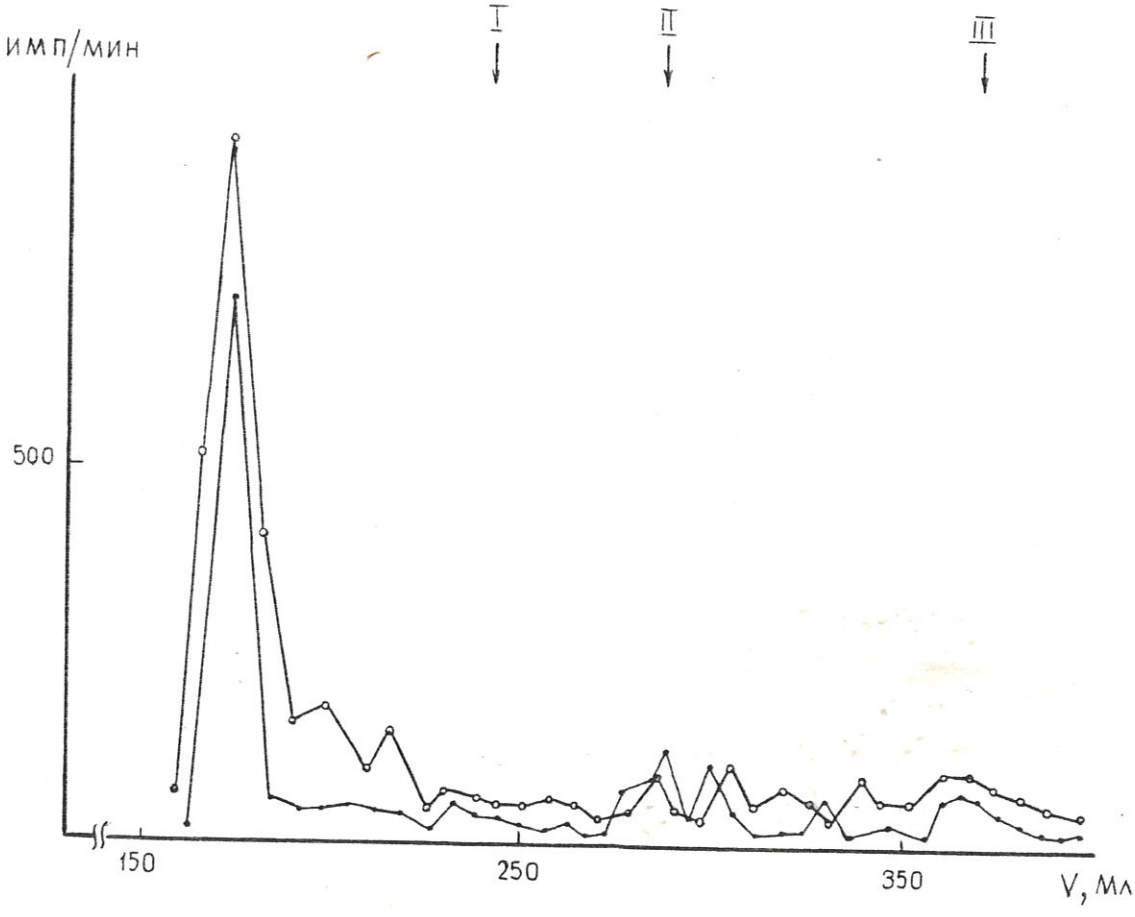


Рис. 16. Гель-хроматография на тойоперле HW-60 (колонка 2,0x140 см) ^{3}Н-ДНК-содержащего материала лизатов интактных (•) и тромбин-стимулированных (○) лимфоцитов селезенки мыши. Время культивирования лимфоцитов 4 часа. Стрелки - объемы выхода маркеров: I - рРНК, II - тРНК, III - уридин.

нии содержания палиндромных последовательностей в лимфоцитах периферической крови человека (318). Во вновь синтезированной ДНК ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов доля палиндромных последовательностей уменьшается до 0,5% (табл. 25). Обработка культур лимфоцитов периферической крови человека трипсином также приводит к быстрому уменьшению доли палиндромных последовательностей в ядерной ДНК (318).

Анализ литературных и собственных данных позволяет сделать предположение о том, что уменьшение доли палиндромных последовательностей в ДНК ядер лимфоцитов при обработке протеазами (тромбин, трипсин), по-видимому, обусловлено проникновением определенных участков генома из ядра в цитоплазму, а, возможно, и через плазматическую мембрану. На эту возможность указывают, в частности, данные об обнаружении ДНК немитохондриального происхождения в цитоплазме митоген-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши (337) и в культуральных супернатантах культивируемых лимфоцитов (123, 138, 218).

Биологический смысл уменьшения доли палиндромных последовательностей в ядерной ДНК при обработке лимфоцитов протеиназами не ясен. Тем не менее, известно, что в жизнедеятельности клеток большое значение могут иметь даже незначительные изменения в наборе последовательностей ДНК, приводящие к изменению транскрипции и дифференцировке клеток (119). Важным, на наш взгляд, является то, что протеолитическая модификация лимфоцитов, по-видимому, затрагивает в конечном итоге определенные нуклеотидные последовательности, причем, в основном не в уникальной, а в повторяющейся части генома, которым приписывается регуляторная роль (97).

В культуральных супернатантах интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов обнаружена ^{3}Н-ДНК, составляющая I0-I2% новосинтезированной в клетках ДНК (табл. 25). Обширный материал по экстраклеточной ДНК лимфоцитов представлен в обзоре Н.А.Федорова и И.С.Яневой (I23). Явление высвобождения ДНК известно также и в случае других типов клеток. Так дело обстоит, например, в случае превращения ретикулоцитов в эритроциты у млекопитающих. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о выделении ДНК фибробластами (244), клетками предсердия лягушки (338) и различными опухолевыми клетками (I3, 5I).

Многочисленные литературные и собственные данные о наличии ДНК в культуральных супернатантах лимфоцитов ставят вопрос о природе процесса, приводящего к появлению экстраклеточной ДНК, а именно: высвобождение ДНК из клеток является секреторным процессом или связано с частичным распадом или гибелью лимфоцитов в культуре.

Таблица 26

Кариометрические показатели интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	Площадь ядра, мкм^2	ИОП отн. ед.	СОП отн. ед.
Контроль	I4,2 ± 0,2 (I65)	5,24 ± 0,06 (I65)	0,382±0,004 (I65)
Опыт	I5,0 ± 0,3^{x} (I77)	4,80 ± 0,06^{x} (I77)	0,325±0,003^{x} (I77)

В этом аспекте значительный интерес представляют результаты кариометрического исследования лимфоцитов селезенки

(табл. 26). Видно, что стимуляция лимфоцитов тромбином уже через 4 часа культивирования сопровождается достоверным увеличением площади ядра; значения СОП и ИОП, наоборот, значительно уменьшаются. Интересно отметить, что уменьшение ИОП в тромбин-стимулированных лимфоцитах по сравнению с контрольными лимфоцитами составляет ~ I0%. Эта величина находится в хорошем согласии с количественными данными о содержании экстраклеточной ^{3}Н-ДНК в культуральных супернатантах тромбин-стимулированных лимфоцитов. Более выраженное относительное уменьшение СОП в тромбин-стимулированных лимфоцитах по сравнению с ИОП, по-видимому, обусловлено модификацией свойств хроматина, т.е. его деконденсацией. Интересно

Таблица 27

Кариометрические показатели контрольных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Лимфоциты	Условия	Состав,%	Площадь ядра,мкм^2	ИОП отн.ед.	СОП отн.ед.
Малые	Контроль	I6,4	9,9 ± 0,I	4,27 ± 0,06	0,430±0,004
	Опыт	I2,6	I0,0 ± 0,2	3,84 ± 0,05^x	0,38I±0,004^x
Средние	Контроль	6I,2	I3,6 ± 0,2	5,2I ± 0,05	0,385±0,003
	Опыт	59,4	I3,8 ± 0,2	4,62 ± 0,04^x	0,337±0,003^x
Большие	Контроль	22,4	I8,7 ± 0,3	6,I7 ± 0,I0	0,330±0,005
	Опыт	28,0	I9,8 ± 0,3^x	5,49± 0,I0^x	0,279±0,004^x

отметить, что характер изменений СОП и ИОП является одинаковым в малых (площадь ядра < II мкм^2), средних (II-I7 мкм^2) и больших (> I7 мкм^2) лимфоцитах (табл. 27).

Сопоставление полученного нами двумерного точечного распре-

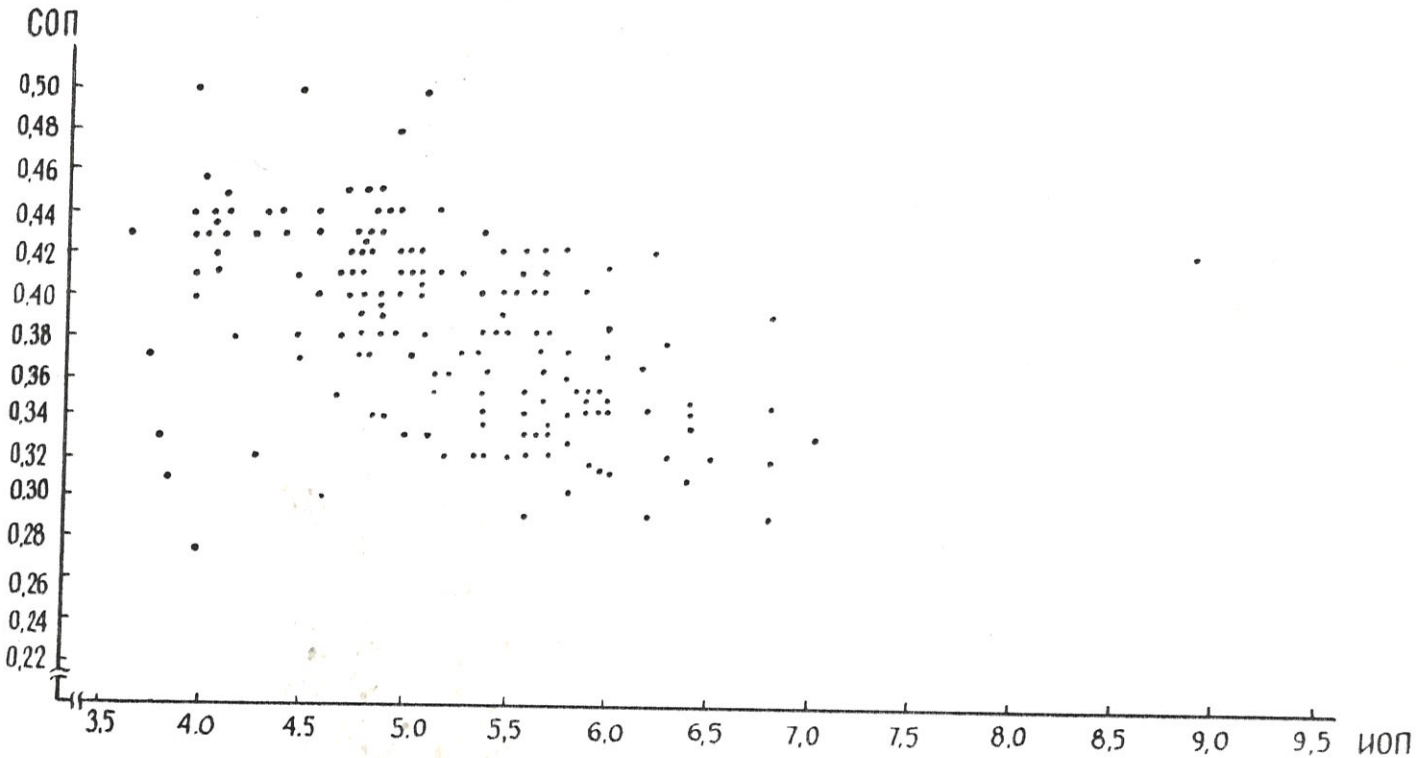


Рис. I7. Двумерное точечное распределение интактных лимфоцитов селезенки мыши. Ось абсцисс - интегральная оптическая плотность, отн. ед.; ось ординат - средняя оптическая плотность, отн. ед.

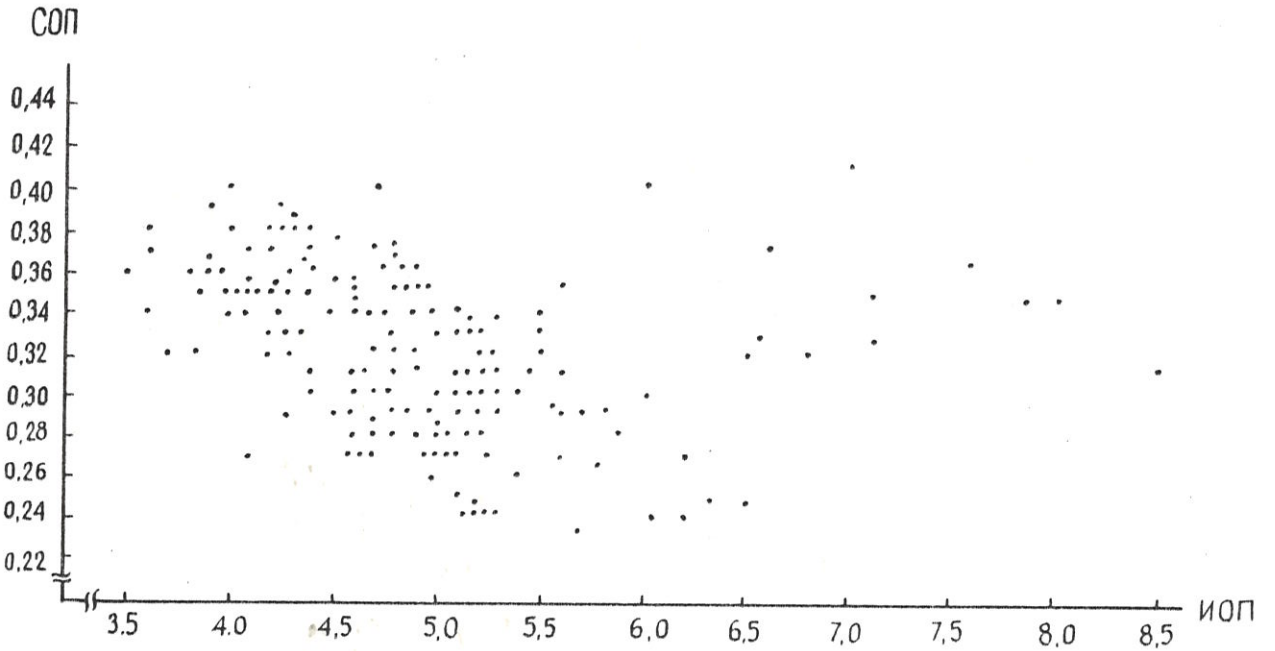


Рис. I8. Двумерное точечное распределение тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши. Ось абсцисс - интегральная оптическая плотность, отн.ед.; ось ординат - средняя оптическая плотность, отн. ед.

деления лимфоцитов с литературными данными (29, 52) позволяет предположить, что исходная популяция лимфоцитов селезенки мыши (рис. I7) представлена клетками, находящимися во всех фазах клеточного цикла. При стимуляции лимфоцитов тромбином (рис. I8) основная доля клеток переходит в зону низких значений СОП, что, по-видимому, обусловлено как уменьшением содержания ядерной ДНК, так и деконденсацией хроматина. Вместе с тем, в тромбин-стимулированных лимфоцитах увеличивается доля клеток с более высокими значениями ИОП (> 6,5). т.е. с более высоким содержанием ДНК. Это свидетельствует об увеличении доли клеток в S-периоде клеточного цикла, т.е. об усилении процессов пролиферации лимфоцитов в ответ на действие тромбина.

Естественно предположить, что если уменьшение содержания ядерной ДНК и появление экстраклеточной ДНК является результатом частичного лизиса или гибели лимфоцитов, то в культуральной среде должно выявляться соответствующее количество РНК и цитоплазматических ферментов.

Для контроля целостности клеток и чистоты выделяющегося из них ДНК-содержащего материала изучали активность лактатдегидрогеназы во внеклеточной среде и выход из лимфоцитов меченого ^{3}Н-РНК-содержащего материала.

Оказалось, что, несмотря на интенсивный синтез РНК в клетках (данные представлены ниже), выхода ^{3}Н-РНК-содержащего материала из клеток в культуральную среду интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов не наблюдается (рис. I9). Отсутствие нуклеазной активности в культуральных супернатантах интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, показанное нами в дополнительных исследованиях, исключает возможность быстрого гдиролиза

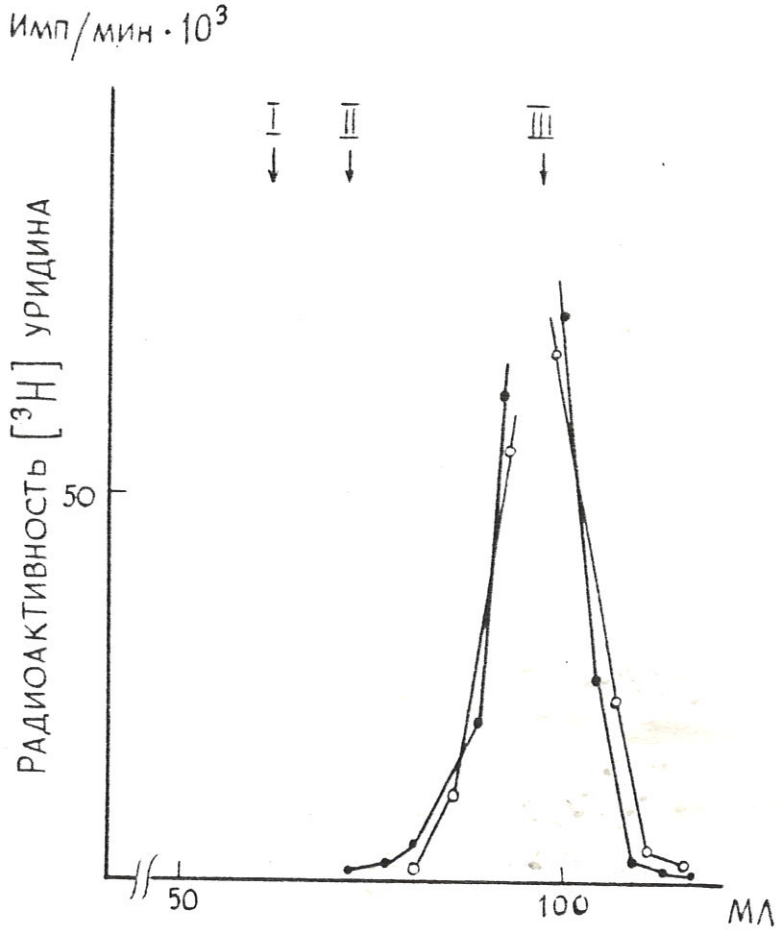


Рис. 19. Гель-хроматография на тойоперле HW-60 (колонка 1,5х65 см) культуральных супернатантов интактных (•) и тромбин-стимулированных (○) лимфоцитов. Стрелки - объемы выхода маркеров: I - рРНК, II - тРНК, III - уридин.

полимерных фракций РНК до низкомолекулярных фрагментов.

Активность маркерного фермента цитоплазмы лактатдегидрогеназы при тех же условиях культивирования в культуральных супернатантах лимфоцитов также не обнаружена.

Эти данные позволяют полагать, что уменьшение содержания ядерной ДНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах, отмеченное при кариометрических исследованиях, а также наличие ^{3}Н-ДНК в культуральных супернатантах обусловлены высвобождением ДНК из лимфоцитов в результате активного секреторного процесса и не связаны с разрушением или гибелью клеток в процессе культивирования.

Для сравнительной характеристики экстраклеточного ^{3}Н-ДНК-содержащего материала лимфоцитов было решено провести изучение кинетики его гидролиза ДНКазой I, оцениваемого по величине гиперхромного эффекта (рис. 20) и степени гашения интенсивности флуоресценции комплекса ДНК-бромид этидия (рис. 21). Анализ кривых показывает, что экстраклеточный ^{3}Н-ДНК-содержащий материал тромбин-стимулированных лимфоцитов более чувствителен к действию ДНКазы I. Различия в наклонах начальных линейных участков кривых свидетельствуют об увеличении скорости гидролиза ^{3}Н-ДНК-содержащего материала из культуральных супернатантов тромбин-стимулированных лимфоцитов по сравнению с интактными лимфоцитами. Небезынтересно отметить, что хроматин активированных клеток также проявляет большую чувствительность к действию нуклеазы (107). Это может быть обусловлено уменьшением заполнения матрицы белками в активированном хроматине и /или/ таким изменением характера их взаимодействия с ДНК, которое обеспечивает более легкое проникновение ферментов к матрице (107).

Отсутствие гиперхромного эффекта и гашения флуоресценции

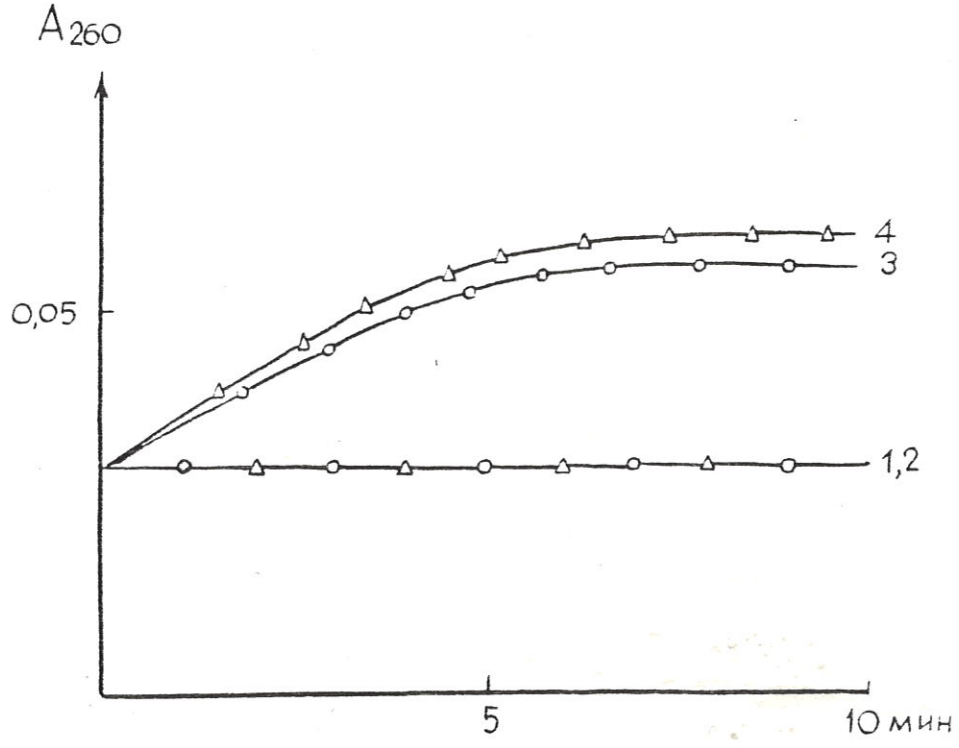


Рис. 20. Изменение поглощения ДНК-содержащего материала культуральных супернатантов интактных (о) и тромбин-стимулированных (Δ) лимфоцитов при обработке РНКазой А (I,2) и ДНКазой I (3,4).

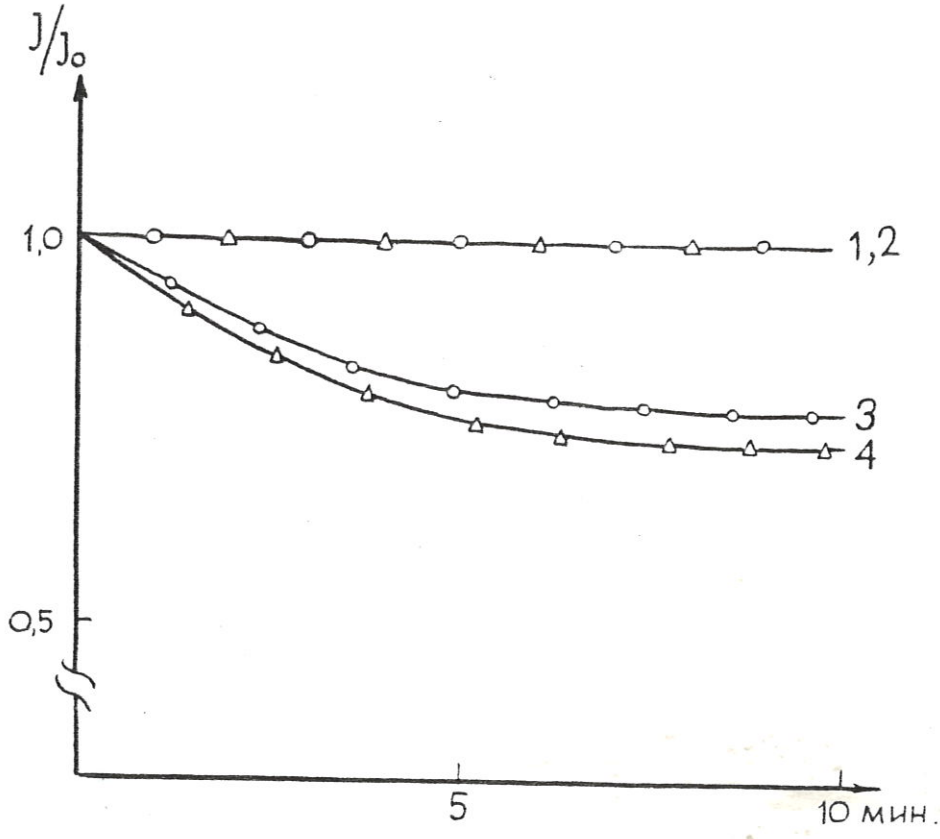


Рис. 2I. Изменение интенсивности флуоресценции комплекса ДНК - этидий бромид при обработке ДНК-содержащего материала культуральных супернатантов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов РНКазой А и ДНКазой I. Обозначения те же, что и на рис. 20.

этидия бромида при обработке экстраклеточных нуклеиновых компонентов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов РНКазой (рис. 20, 2I, прямые I, 2) служит еще одним доказательством того, что выделение ДНК из лимфоцитов представляет собой избирательный секреторный процесс.

Данные гель-хроматографического разделения ^{3}Н-ДНК-содержащего материала культуральных супернатантов лимфоцитов приведены на рис. 22. Профиль элюции радиоактивного материала, экскретируемого лимфоцитами, представлен тремя отчетливыми пиками. Видно, что интактные лимфоциты при культивировании выделяют в культуральную среду преимущественно высокомолекулярные фрагменты ДНК. При стимуляции тромбином лимфоциты, наряду с высокомолекулярными фрагментами, экскретируют также значительное количество фрагментов более низкой молекулярной массы.

§ 3. О биологической роли экстраклеточной ДНК

Тот факт, что пул экстраклеточной ДНК содержит вновь синтезированную ДНК, а по данным критерия исключения из фенола после щелочной денатурации-нейтрализации, нуклеазной деградации и хроматографического разделения является различным у интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов указывает на его биологическую значимость. К сожалению, истинная роль экстраклеточной ДНК до сих пор остается неизвестной. Имеются данные, что экзогенная ДНК быстро проникает во внутриклеточную среду путем пиноцитоза и регистрируется в составе суммарной кислотонерастворимой ДНК, выделяемой из цельных клеток, либо их ядер (I37, 25I). Наиболее подробно изучено взаимодействие экзогенной ДНК с иммунокомпетентными клетками. Показано, что связывание ДНК с нейтрофилами, моноцитами, Т- и В-лимфоцитами является активным процессом. Свя-

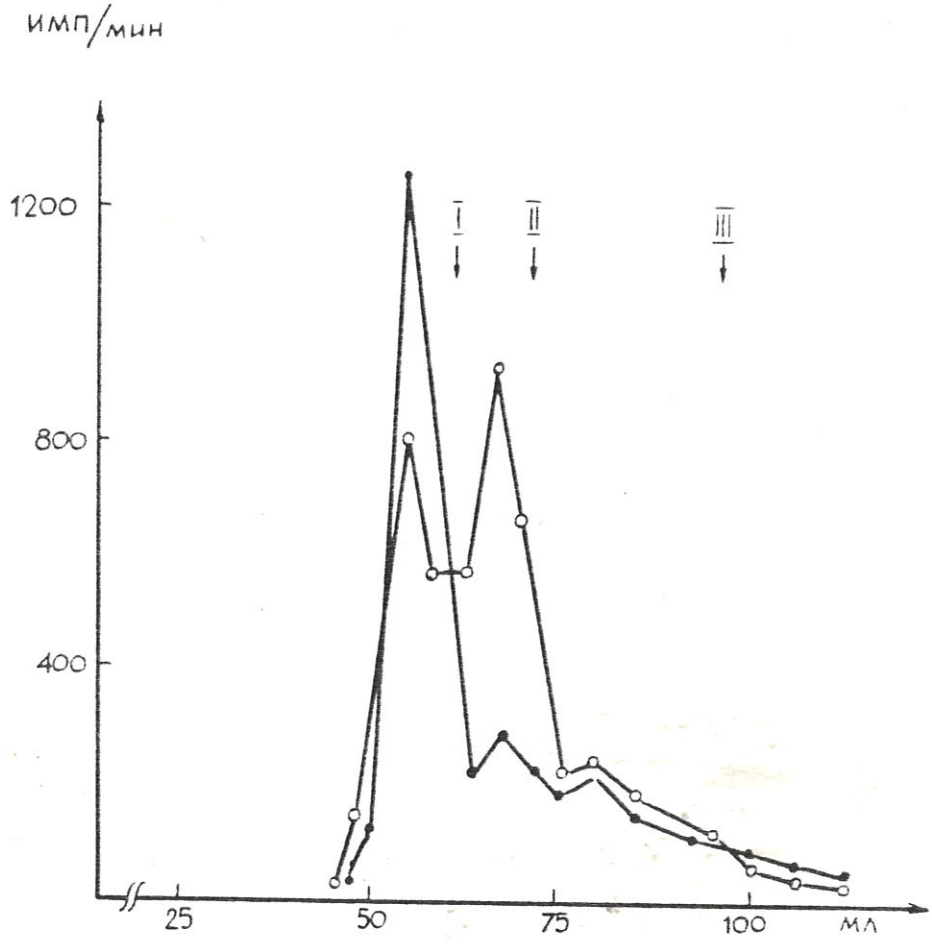


Рис. 22. Гель-хроматография ^{3}Н-ДНК-содержащего материала культуральных супернатантов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов. Обозначения те же, что и на рис. I9.

зывание ^{3}Н-ДНК происходит на поверхностной мембране всех субпопуляций лимфоцитов клеточными рецепторами белковой природы. Связавшаяся ДНК проходит процессы интернализации и деградации до олигонуклеотидов (148). Эти результаты показывают, что экзогенная ДНК может иметь важное значение в межклеточном обмене информацией.

Важно также отметить наличие специфических рецепторов к ДНК на тромбоцитах (204).

Учитывая вышеизложенное, нами было предпринято изучение влияния экскретируемой лимфоцитами ДНК на функциональные свойства иммунокомпетентных клеток и тромбоцитов.

На первом этапе представляло интерес изучить влияние экскретируемой лимфоцитами ДНК на включение ^{3}Н-тимидина в спонтанно синтезирующие лимфоциты селезенки крыс и мышей. Для этой цели животным внутрибрюшинно инъецировали ДНК (2 мг/кг). Селезенки удаляли на 5-ые сутки после введения ДНК и свежеизолированные лимфоциты исследовались на способность к спонтанному синтезу ДНК, оцениваемому по включению ^{3}Н-тимидина в ДНК в течение 4-х часов после начала культивирования. Контролем служили лимфоциты селезенки животных, которым внутрибрюшинно инъецировали растворитель (0,01 М трис-HCl, pH 7,4). Данные, представленные в табл. 28, свидетельствуют о том, что инъекция экскретируемой лимфоцитами ДНК приводит к значительному усилению интенсивности синтеза ДНК свежеизолированными лимфоцитами селезенки животных.

Механизм стимулирующего влияния экскреторной ДНК на пролиферативную активность лимфоцитов остается неизвестным. В литературе накоплено большое количество сведений о способности различных культивируемых клеток импортировать экзогенно добавленную

ДНК (339). Тестирование импортируемого генетического материала и исследование его состояния в реципиентной клетке показало, что экзогенная ДНК может подвергаться интеграции в геном растительных и животных клеток (138). Полагают, что между клеточной ДНК

Таблица 28

Влияние ин виво экстраклеточной ДНК на включение ^{3}Н-тимидина в ДНК лимфоцитов селезенки мышей и крыс

Источник лимфоцитов	Контроль, (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток)	ЭК-ДНК, (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток)	α-ЭК-ДНК, (имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток)
Селезенка мыши	5578 ± 213 (4)	31355 ± 926^{x} (4)	22640±436^{x} (4)
Селезенка крысы	15729 ± 682 (4)	23112 ±2759^{x} (4)	21390±928^{x} (4)

и импортируемой ДНК образуются стабильные дуплексы по типу связи "конец в конец", хотя не исключается возможность встраивания импортированной ДНК в частично поврежденные нити ДНК хозяина, т.е. использование ее для процессов репарации (213). Имеется также мнение, что введение в организм экзогенной ДНК не создает принципиально новых возможностей в обеспечении внутриклеточных синтетических процессов, а лишь заменяет временно в той или иной мере один из естественных механизмов обеспечения процессов внутриклеточного синтеза ДНК (137). Автор полагает, что стимуляции синтеза клеточной ДНК сопутствует интенсивная внутриклеточная деградация проникающих в реципиентную клетку фрагментов ДНК до мономерных продуктов. Такой механизм способствует увеличению внутриклеточного фонда и реутилизации предшественников синтеза

ДНК в фосфорилированной форме.

Способность иммунокомпетентных клеток селезенки к миграции ограничивает продолжение анализа их роли в реализации эффектов экскреторной ДНК на уровне целостного организма. Поэтому дальнейшие исследования особенностей взаимодействия лимфоцитов селезенки с экскреторной ДНК проводили ин витро. В табл. 29 представлены данные о влиянии экскреторной ДНК (5 мкг/мл) на включение ^{3}Н-тимидина в ДНК интактных, ФГА-стимулированных (культивирование 72 ч) и лейкознотрансформированных лимфоцитов (культивирование 4 ч) селезенки мыши. Видно, что культивирование интактных лимфо-

Таблица 29

Влияние экстраклеточной ДНК на включение ^{3}Н-тимидина в ДНК интактных, ФГА-стимулированных и лейкознотрансформированных лимфоцитов селезенки мыши

Эффекторы	Интактные клетки, имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток	Лейкоз La, имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток
-	1759 ± 176 (5)	130783 ± 8481 (5)
ФГА (10 мкг/мл)	4536 ± 486^{x} (5)	137078 ±13662 (5)
ЭК-ДНК (5 мкг/мл)	3781 ± 160^{x} (5)	143059 ±17204 (5)
ЭК-ДНК (5 мкг/мл) + ФГА (10 мкг/мл)	881 ± 97^{x} (5)	100159 ±12109^{x} (5)

цитов в присутствии экстраклеточной ДНК сопровождается активацией синтеза ДНК более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Сочетанное воздействие экстраклеточной ДНК и ФГА сопровождается

значительным угнетением синтеза ДНК. Аналогичные результаты были получены в работе (363), где показано, что экзогенная ДНК из лимфоцитов человека и тимуса теленка снижает включение ^{3}Н-тимидина, митотический индекс и отменяет увеличение числа клеток в культуре лимфоцитов, стимулированных ФГА и конканавалином А.

Культивирование лейкознотрансформированных лимфоцитов не сопровождается какими-либо изменениями интенсивности синтеза ДНК как в присутствии ФГА, так и экстраклеточной ДНК. Вместе с тем, одновременное присутствие в среде культивирования ФГА и экстраклеточной ДНК сопровождается угнетением синтеза ДНК в лейкознотрансформированных клетках.

Таблица 30

Влияние ин витро экстраклеточной ДНК на показатели фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови человека

Условия	Фагоцитарный показатель, %	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
Контроль	55,2 ± 8,7 (5)	2,4 ± 0,6 (5)	4,2 ± 0,7 (5)
ЭК-ДНК (37,5 мкг/мл)	66,2 ± 8,5^{x} (5)	3,8 ± 1,0^{x} (5)	5,4 ± 1,0^{x} (5)

Не располагая сведениями, позволяющими раскрыть интимные механизмы влияния экстраклеточной ДНК на пролиферацию лимфоцитов, тем не менее, можно сделать предположение, что приведенные выше результаты об активирующем эффекте на интактные лимфоциты и ингибирующем на ФГА-стимулированные свидетельствуют в пользу представлений о регуляторной роли экстраклеточной ДНК, связанной, по-

видимому, как со специфическими взаимодействиями с рецепторами гипотетических клеток-мишеней, так и внутриклеточными эффектами при ее интернализации.

Для оценки влияния экстраклеточной ДНК на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток периферической крови человека было проведено исследование фагоцитарной функции гранулоцитов (нейтрофильных лейкоцитов) и розеткообразующих клеток, основанное на взаимодействии специфических рецепторов Т-лимфоцитов с комплементарными им структурами на поверхности эритроцитов барана.

Взаимодействие экстраклеточной ДНК с гранулоцитами приводит к активации их фагоцитарной реакции, проявляющейся как увеличением количества клеток, участвующих в фагоцитарном процессе, так и увеличением фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа (табл. 30).

Оценку влияния экстраклеточной ДНК на реакцию спонтанного розеткообразования проводили по следующим критериям: а) процент розеткообразующих клеток, несущих на поверхности 3 эритроцита и более (Е-РОК); б) процентное содержание Е-РОК с различным числом эритроцитов. Нами установлено, что под влиянием экстраклеточной ДНК процент общих Е-РОК достоверно возрастает до 70,7%±1,6 по сравнению с контролем (60,7%±1,8). В то же время в присутствии экстраклеточной ДНК не выявлено никаких отклонений от контрольных показателей для лимфоцитов, несущих на поверхности 3,4,5,6 и более эритроцитов. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что увеличение Е-розеткообразующей активности Т-лимфоцитов обусловлено не просто возрастанием их адгезионных свойств неспецифического характера, что должно было бы привести к повышению процент-

ного содержания Е-РОК с большим числом эритроцитов, а достигается за счет истинного увеличения, по-видимому, ранее замаскированных рецепторных участков Т-лимфоцитов к эритроцитам барана.

Таблица 31

Влияние экстраклеточной ДНК на распределение Е-РОК, несущих на поверхности различное число эритроцитов

Условия	Е-РОК (% к общему количеству)				
	3	4	5	6	6
Контроль	18,8±2,6 (4)	17,0±1,6 (4)	12,6±1,6 (4)	12,0±1,6 (4)	39,5±4,7 (4)
ЭК-ДНК, 10 мкг/мл	19,9±2,2 (4)	17,3±2,4 (4)	11,9±1,3 (4)	9,4±0,4 (4)	41,4±5,0 (4)

Учитывая наличие на поверхности тромбоцитов специфических рецепторов к ДНК, было решено провести исследование влияния экстраклеточной ДНК на их агрегационную функцию. Оказалось, что добавление экскреторной ДНК (10-20 мкг/мл) к богатой тромбоцитами плазме доноров вызывает спонтанную агрегацию тромбоцитов. При внесении в плазму в фазу дезагрегации АДФ (4-6 мин исследования) отмечается потенциирование волны АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов (рис. 23). Важно отметить, что в последнем случае отсутствует фаза дезагрегации, наблюдаемая при АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов. Отсюда следует, что в присутствии экстраклеточной ДНК происходит перевод обратимой АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в необратимую.

Тромбоцитагрегирующие свойства экскретируемой лимфоцитами ДНК позволяют рассматривать ее как новое важное звено взаимосвя-

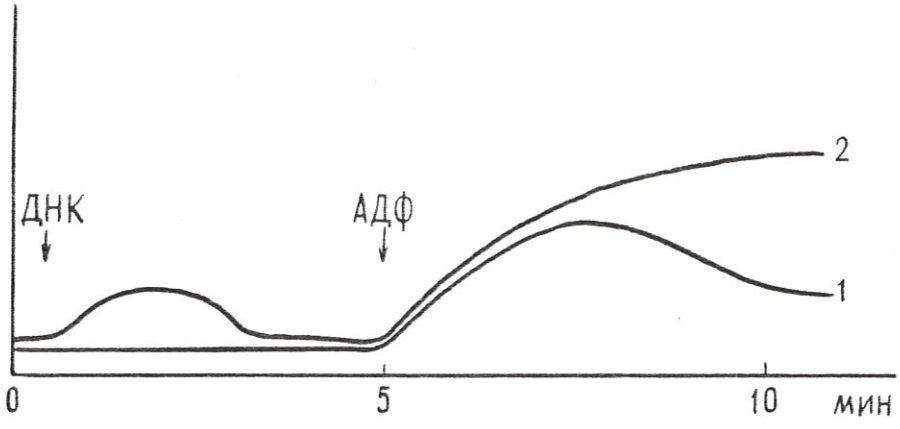


Рис. 23. Влияние экстраклеточной ДНК (10 мкг/мл) на агрегацию тромбоцитов (150 – 200 · 10^9 клеток/л) в плазме крови человека. 1 – контроль (0,01 М трис-HCl, pH 7,4), 2 – опыт (экстраклеточная ДНК). Конечная концентрация АДФ 4 · 10^{-7} М.

зи между системами иммунитета и гемостаза, имеющее непосредственное отношение к сосудисто-тромбоцитарному, или первичному, гемостазу.

§ 4. Влияние α-тромбина на синтез РНК и белка в лимфоцитах селезенки мыши

Переход клеток от состояния покоя к росту под действием различных регуляторных факторов, взаимодействие экзогенных индукторов с клеткой, процессы клеточной дифференцировки - все эти процессы в первую очередь находят отражение в метаболизме клеточных РНК. Поэтому сравнительное изучение интенсивности синтеза, процессинга и ядерно-цитоплазматического транспорта РНК в лимфоцитах может способствовать выяснению различий в метаболизме интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных механизмам транскрипции и трансляции в митоген-стимулированных лимфоцитах, до сих пор остается открытым вопрос о том, зависит ли биосинтез белка в этих клетках полностью от новосинтезированных молекул мРНК или обусловлен предсуществующими в цитоплазме покоящихся клеток мРНК, либо предсуществующими первичными транскриптами, процессинг которых приводит к образованию мРНК.

Имеется обширная литература о том, что увеличение синтеза белка происходит вскоре после антигенной или митогенной активации лимфоцитов (228, 229). Вполне логичное предположение, сделанное многими исследователями, состоит в том, что этому увеличению должно предшествовать усиление транскрипционной активности. Действительно имеются сведения об увеличении включения уридиновой метки менее чем через I час после митогенной стимуляции лимфоцитов (329). Однако некоторые авторы не обнаружили увеличе-

ния скорости транскрипции в течение нескольких часов после митогенной стимуляции (250). Существует представление о том, что в покоящихся лимфоцитах большая часть ^{3}Н-уридина включается в быстро оборачивающийся пул ядерной РНК, незначительная часть которого транспортируется в цитоплазму. Раннее влияние митогенов заключается в том, что эти быстро синтезируемые транскрипты РНК подвергаются ускоренному процессингу и транспорту в цитоплазму, приводящему к увеличению накопления меченой РНК в цитоплазме без увеличения транскрипционной активности (250).

В литературе отсутствуют какие-либо данные о влиянии тромбина на РНК-синтетическую активность и стабильность быстрометящихся РНК (бмРНК) в лимфоцитах. Поэтому было проведено изучение интенсивности синтеза и стабильности суммарных бмРНК в лимфоцитах селезенки мыши, пульс-меченых в течение I5 мин и чейз-инкубированных в течение 2-х часов. Пульс-чейз эксперименты проводили на свежеизолированных интактных лимфоцитах и лимфоцитах, предварительно обработанных оптимальной митогенной концентрацией тромбина (5 мкг/мл) в течение I часа (опыт). Чейз-эксперименты проводили с использованием актиномицина Д (I0 мкг/мл). Поскольку актиномицин Д немедленно вызывает высокоэффективный чейз, то разрушения суммарной бмРНК следует ожидать фактически от нулевого времени после добавления актиномицина Д (I50). Полученные данные представлены в табл. 32. При анализе данных по включению ^{3}Н-уридина в кислотоосаждаемый материал лимфоцитов пульс-меченых в течение I5 мин видно, что интенсивность синтеза бмРНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах не отличается от таковой в интактных лимфоцитах. Как в интактных, так и в тромбин-стимулированных лимфоцитах наблюдается увеличение включения ^{3}Н-уридина в кисло-

тоосаждаемый материал лимфоцитов после 20-ти минутного актиномицинового чейза по сравнению с таковым в нулевое время. Известно, что актиномицин Д подавляет синтез РНК в первую очередь благодаря замедлению реакции элонгации цепи, но слабо влияет на инициацию и терминацию. Поэтому в присутствии актиномицина Д могут возникать фрагменты РНК большего или меньшего размера в зависимости от того, насколько удален участок ДНК, связавший антибиотик, от начальной точки транскрипции (4). Исходя из этих представлений, а также ранее приведенных литературных данных о быстрой эффективности актиномицинового блока, можно полагать, что наблюдаемое увеличение включения ^{3}Н-уридина в кислотоосаждаемый материал лимфоцитов является результатом включения метки в неполные фрагменты РНК и в цепи РНК, заканчивающие рост. Дальнейшее культивирование лимфоцитов на фоне актиномицинового блока не сопровождается распадом быстрометящейся новосинтезированной РНК. Более того, в тромбин-стимулированных лимфоцитах через 2 часа наблюдается достоверное увеличение включения уридиновой метки в РНК по сравнению с интактными лимфоцитами. Возможно, это увеличение может быть обусловлено синтезом актиномицинустойчивых РНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах.

Приведенные выше собственные данные позволяют сделать два вывода: во-первых, на ранних стадиях активации лимфоцитов тромбином не наблюдается увеличения интенсивности транскрипционной активности по сравнению с интактными лимфоцитами, что согласуется с представленными данными о посттранскрипционном контроле раннего синтеза белка при действии митогенов и антигенов (250); и, во-вторых, новосинтезированные бмРНК представляют собой относительно стабильный пул, не подвергающийся деградации как мини-

Таблица 32

Влияние α-тромбина на включение ^{3}H-уридина (имп/мин) в бмРНК и их стабильность в лимфоцитах селезенки мыши

Условия	продолжительность актиномицинового блока, мин				
	0	20	30	60	I20
Контроль	20664 ± 9476 (4)	30082 ± I4005 ^{xx} (4)	30I87 ± II380 (4)	33860 ± I7855 (4)	2856I ± I2064 (4)
Тромбин (5 мкг/мл)	20537 ± III36 (4)	30704 ± III36 ^{xx} (4)	32272 ± II9I9 (4)	32592 ± I3068 (4)	35580 ± II358 ^{x} (4)

Примечание: ^{xx} – различия достоверны по сравнению с нулевым временем чейза ($p < 0,05$).

мум в течение 2-х часов после синтеза.

По мнению некоторых исследователей (345) в лимфоцитах в отличие от других типов клеток среди бмРНК преимущественно синтезируются гяРНК (до 90% от бмРНК). Время полужизни гяРНК в эукариотических клетках, обусловленное простой деградацией молекул, их процессингом и экспортом в цитоплазму, не превышает одного часа, т.е. в течение этого времени распадается половина новообразованной гяРНК (II7). Поэтому приведенные нами данные о стабильности новообразованной бмРНК в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах ставят под сомнение представление о преимущественном синтезе гяРНК среди бмРНК в лимфоцитах.

Для оценки доли 45 s пре-рРНК среди бмРНК лимфоцитов нами был использован метод селективного ингибирования синтеза рибосомных РНК низкими концентрациями актиномицина Д (6I). Для ингибирования синтеза 45 S пре-рРНК использовали актиномицин Д в концентрации 0,I5 мкг/мл (93).

Для оценки доли актиномицинустойчивой РНК использовали актиномицин Д в концентрации I0 мкг/мл (335).

Время инкубации с антибиотиком перед внесением ^{3}Н-уридина составляло I час, так как в течение этого времени достигается максимальное подавление синтеза РНК (303).

Полученные данные представлены в табл. 33. Видно, что в интактных свежеизолированных лимфоцитах селезенки мыши около 50% бмРНК составляют гяРНК + пре-тРНК. Остальная половина приходится на долю пре-рРНК и актиномицинустойчивую фракцию РНК. В лимфоцитах, престимулированных тромбином в течение одного часа, не обнаружено достоверных изменений в соотношении различных типов бмРНК. Отсюда следует, что на ранних стадиях активации лимфоци-

тов селезенки мыши тромбином не только тотальная РНК-синтетическая активность, но и интенсивность синтеза различных типов бмРНК остается неизменной по сравнению с интактными лимфоцитами. Важно, однако, иметь ввиду, что уровень любого вида РНК в клетке

Таблица 33

Соотношение разных типов бмРНК в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Содержание, %		
	пре-рРНК	гяРНК+пре-тРНК	Акт.уст. РНК
Контроль	25,7 ± 5,7 (8)	49,5 ± 2,I (8)	24,8 ± 6,0 (8)
Тромбин (5 мкг/мл)	I4,7 ± 7,0 (8)	6I,2 ±II,6 (8)	24,I ± 5,8 (8)

Примечание: доля тРНК, синтез которой не ингибируется низкими дозами актиномицина Д, определялась в данном случае вместе с гяРНК. За I00% в каждом случае принимали включение ^{3}Н-уридина, включенного в бмРНК в течение I5 мин, без преинкубации с актиномицином Д.

зависит не только от скорости его синтеза, но и от равновесия этого процесса со скоростью процессинга, транспорта в цитоплазму и стабильности новосинтезированных молекул. Поэтому для оценки уровня общего пула новосинтезированной РНК проводили более длительную инкубацию лимфоцитов с меченым предшественником, а не в течение I5 мин, как это осуществляли при исследовании интенсивности синтеза бмРНК. Время инкубации с ^{3}Н-уридином должно быть достаточным для включения метки во все типы бмРНК, их про-

цессинга и выхода зрелых молекул РНК в цитоплазму.

В табл. 34 представлены данные о включении ^{3}Н-уридина в тотальную РНК лимфоцитов, пульс-меченых в течение 4-х часов. Видно,

Таблица 34

Влияние актиномицина Д и кордицепина на включение ^{3}Н-уридина в РНК тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	имп/мин на $5 \cdot 10^{6}$ клеток		p
Интактные клетки	198337 ± 23358 (5)		
Клетки + тромбин (5 мкг/мл)	246145 ± 33567 (5)	<	$0{,}05^{X}$
Клетки + актиномицин Д (10 мкг/мл) + тромбин (5 мкг/мл)	17083 ± 6461 (5)	<	$0{,}001^{XX}$
Клетки + кордицепин (100 мкг/мл) + тромбин (5 мкг/мл)	197367 ± 36606 (5)	<	$0{,}05^{XX}$

Примечание: ^{X} - уровень значимости по отношению к интактным клеткам;

^{XX} - уровень значимости по отношению к тромбин-стимулированным клеткам.

что в тромбин-стимулированных лимфоцитах включение радиоактивной метки в РНК достоверно увеличено ($\sim$ на 25%) по сравнению с интактными лимфоцитами. Сопоставляя эти данные с результатами опытов по влиянию тромбина на интенсивность синтеза бмРНК, можно придти к выводу, что более высокий уровень новосинтезированной

РНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах, по-видимому, является результатом ускоренного процессинга, транспорта и накопления меченой РНК в цитоплазме без увеличения транскрипционной активности.

Преинкубация клеток в течение одного часа с кордицепином (100 мкг/мл) полностью снимает влияние тромбина на уровень новосинтезированной РНК в лимфоцитах. Известно, что кордицепин слабо влияет на синтез суммарной гяРНК, а действует специфически на метаболизм мРНК на уровне инициации синтеза поли(А)-блока на ее 3-ОН конце (190). Одновременно с этим кордицепин проявляет ингибирующее действие на синтез 45 S пре-рРНК и 4 S РНК (2). Поэтому отсутствие увеличения содержания новосинтезированной РНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах, преинкубированных с кордицепином, может быть обусловлено как угнетением полиаденилирования мРНК, так и ингибированием синтеза 45 S пре-рРНК и 4S или тем и другим одновременно.

Преинкубация клеток в течение одного часа с актиномицином Д (10 мкг/мл), как и следовало ожидать, приводит к значительному угнетению транскрипционной активности тромбин-стимулированных лимфоцитов. Доля РНК, синтез которых устойчив к высоким концентрациям актиномицина Д, в тромбин-стимулированных лимфоцитах, пульс-меченых в течение 4-х часов, составляет ~ 7%, что в 3,5 раза меньше доли актиномицинустойчивых РНК в бмРНК (табл. 33). Такое значительное уменьшение доли актиномицинустойчивых РНК по мере увеличения пульсовой метки, по-видимому, обусловлено не их быстрым распадом (табл. 32), а скорее всего непропорциональным накоплением в тромбин-стимулированных лимфоцитах других типов РНК.

Учитывая значительные различия в значениях молекулярных масс различных типов РНК, было решено провести фракционирование ^{3}Н-уридинсодержащего материала лимфоцитов методом гель-фильтрации. При фракционировании клеточных лизатов лимфоцитов, меченых в течение одного часа, обнаружено (рис. 24), что ^{3}Н-уридин-меченый материал разделяется на три четко отграниченные друг от друга фракции: а) высокомолекулярную, выходящую в свободном объеме колонки; б) фракцию, совпадающую с объемом выхода суммарного препарата дрожжевой тРНК; в) наиболее низкомолекулярную фракцию. Под влиянием тромбина имеет место увеличение включения уридиновой метки в компоненты всех трех фракций. Учитывая неизменный уровень РНК-синтетической активности в тромбин-стимулированных лимфоцитах по сравнению с интактными лимфоцитами, можно полагать, что это увеличение обусловлено накоплением ^{3}Н-уридин-содержащего материала на ранних стадиях активации клеток.

Обращает на себя внимание также тот факт, что более 90% радиоактивной метки включается во фракцию, совпадающую по объему выхода с суммарным препаратом дрожжевой тРНК, и наиболее низкомолекулярную фракцию. Остальная часть ^{3}Н-уридин-меченого материала детектируется в высокомолекулярной фракции, вероятно, соответствующей гяРНК и пре-рРНК. Несколько неожиданным является отсутствие в лизате интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов ^{3}Н-уридин-меченого материала, совпадающего с объемом выхода рРНК. Учитывая, что в этих условиях синтез пре-рРНК происходит (табл. 33), можно полагать, что отсутствие новосинтезированной рРНК в клетках является следствием неэффективного процессинга 45 s пре-рРНК как в интактных, так и тромбин-стимулированных лимфоцитах на ранних этапах их культивирования.

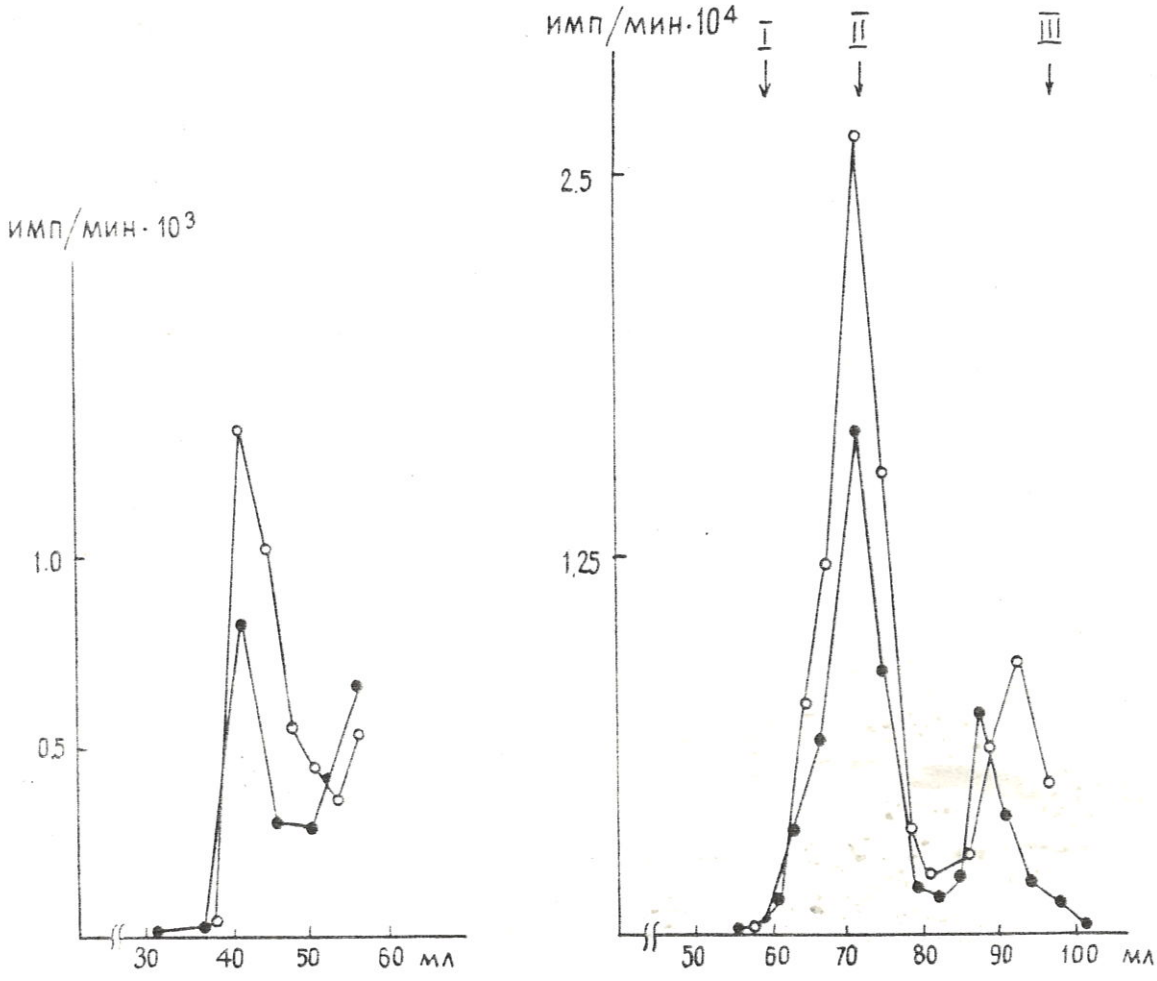


Рис. 24. Включение ^{3}H-уридина в РНК интактных (•) и тромбин-стимулированных (о) лимфоцитов селезенки мыши. Время культивирования лимфоцитов I час. Колонка (I,5x65 см) заполнена тойоперлом HW -60. Лимфоциты лизировали в 2%-ном додецилсульфате натрия и 2%-ном 2-меркаптоэтаноле при I00°C в течение I0 мин. Условные обозначения те же, что и на рис. I9.

Профиль элюции ^{3}Н-уридин-меченого материала из лизатов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, меченых в течение 4-х часов, отличается от такового при культивировании клеток с ^{3}Н-уридином в течение I часа. Это отличие сводится к появлению новой фракции ^{3}Н-уридин-меченого материала, объем выхода которой совпадает с объемом выхода рРНК (рис. 25). Таким образом, увеличение длительности культивирования клеток с радиоактивным предшественником приводит к накоплению в цитоплазме новосинтезированной рРНК, что и находит свое отражение в изменении профиля элюции лизатов лимфоцитов.

Несмотря на то, что некоторые авторы указывают на усиление синтеза белка сразу после добавления митогенов к культивируемым лимфоцитам (228, 229), нами обнаружено увеличение включения аминокислотной метки в тромбин-стимулированные лимфоциты только через 5-6 часов после начала культивирования клеток. В табл. 35 представлены данные об интенсивности синтеза белка, о котором судили по включению ^{3}Н-лейцина в кислотоосаждаемый материал лимфоцитов, культивируемых в течение 5 часов. В этих условиях имеет место достоверное увеличение включения метки в белки тромбин-стимулированных лимфоцитов по сравнению с интактными клетками.

В присутствии актиномицина Д (I0 мкг/мл) и кордицепина (I00 мкг/мл) наблюдается значительное подавление синтеза белка, индуцированного тромбином. Эти данные указывают на необходимость синтеза РНК *de novo* и постсинтетических модификаций (полиаденилирование) для стимуляции синтеза белка под влиянием тромбина. Если бы активация синтеза белка, индуцированная в лимфоцитах тромбином, была обусловлена ускоренным процессингом предсуществующих транскриптов мРНК, то актиномицин Д не оказывал бы влияния на ин-

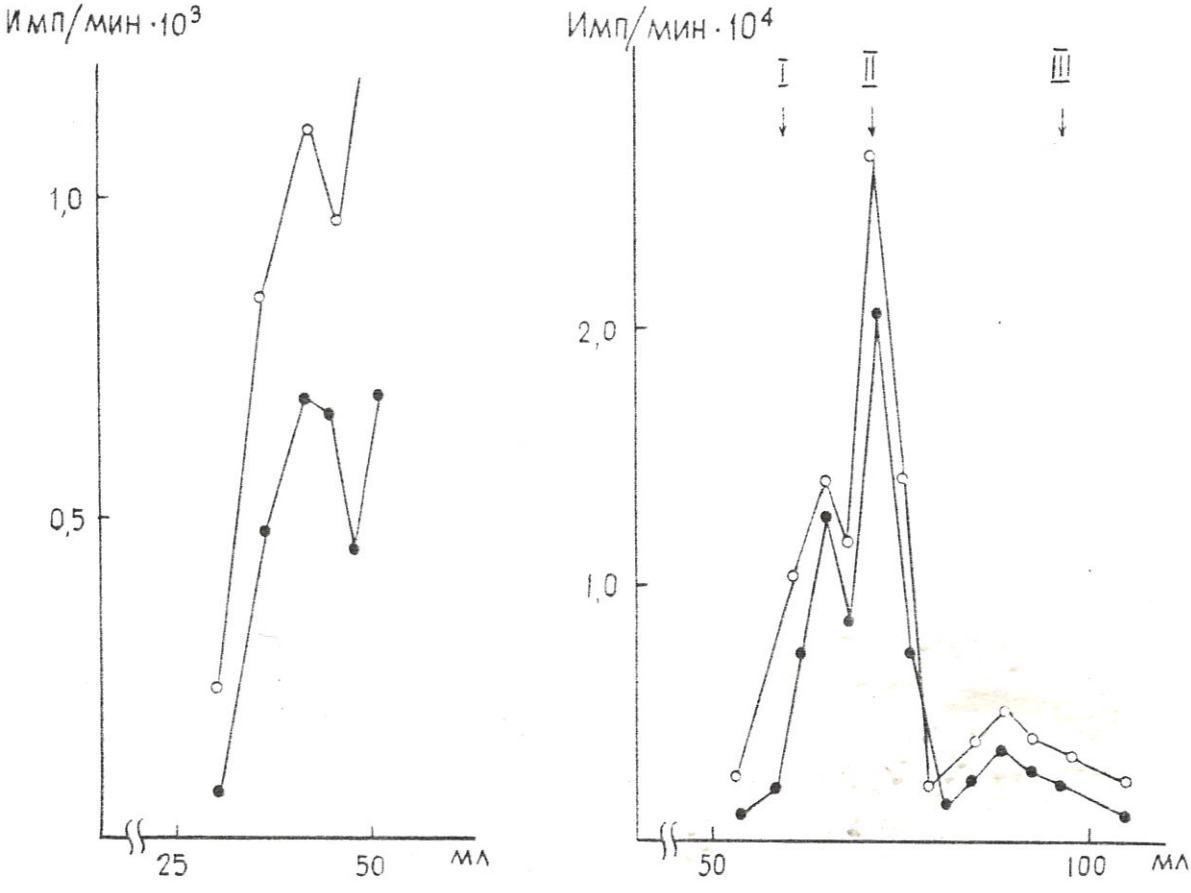


Рис. 25. Включение ^{3}H-уридина в РНК интактных (•) и тромбин-стимулированных (○) лимфоцитов селезенки мыши. Время культивирования лимфоцитов 4 час. Условные обозначения и условия эксперимента те же, что и на рис. 24.

тенсивность синтеза белка. С другой стороны, угнетение синтеза белка кордицепином указывает на необходимость процесса полиаденилирования мРНК в механизме тромбин-индуцируемой стимуляции синте-

Таблица 35

Влияние актиномицина Д и кордицепина на синтез белка в тромбин-стимулированных лимфоцитах

Условия	имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток	p
Интактные клетки	4230 ± 554 (4)	
Клетки + тромбин (5 мкг/мл)	5092 ± 616 (4)	< $0,05^{x}$
Клетки + актиномицин Д (10 мкг/мл) + тромбин (5 мкг/мл)	2605 ± 447 (4)	< $0,05^{xx}$
Клетки + кордицепин (100 мкг/мл) + тромбин (5 мкг/мл)	3965 ± 613 (4)	< $0,05^{xx}$

Примечание: условные обозначения те же, что и на рис. 34.

за белка.

На основании полного соответствия между степенью угнетения (~20%) синтеза РНК (табл. 34) и белка (табл. 35) в тромбин-стимулированных лимфоцитах, прединкубированных с кордицепином, можно предположить, что тромбин-индуцированная активация синтеза белка обусловлена трансляцией новосинтезированных молекул мРНК, а не активацией предсуществующих в цитоплазме интактных клеток мРНК. В то же время резко выраженному угнетению синтеза РНК (~ на 90%) в тромбин-стимулированных лимфоцитах, прединкубированных с актиномицином Д, соответствует только 50%-ное угнетение

синтеза белка. Несомненно, в этих условиях остаточный синтез белка осуществляется почти исключительно за счет долгоживущих стабильных мРНК. Это предположение хорошо согласуется с данными о том, что актиномицин Д в эукариотических клетках вызывает быстрое угнетение синтеза РНК (I50), но постепенное снижение синтеза белка (33I).

§ 5. Роль ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов в активации биосинтетических процессов в лимфоцитах селезенки мыши α-тромбином

В исследовании митогенеза лимфоцитов вопрос о том, каков молекулярный механизм передачи трансмембранного сигнала с поверхности внутрь клетки, или что служит в митогенезе вторичным мессенджером (или мессенджерами), т.е. регулятором, который передает внутрь клетки сигнал о посадке митогена на мембрану и запускает всю цепь биохимических событий, приводящих к пролиферации, является одним из ключевых. До сих пор этот вопрос остается открытым.

В настоящее время известны многочисленные данные, свидетельствующие о том, что для разных типов клеток основным в механизме действия многих физиологически активных соединений является активация транспорта Ca^{2+} в клетку (56). Поэтому ионы Ca^{2+} рассматриваются как возможный претендент на роль вторичного мессенджера в митогенезе. Данные об участии ионов Ca^{2+} в активации лимфоцитов разрозненны и часто противоречивы (3I). Основным препятствием на пути детального исследования роли ионов Ca^{2+} в активации лимфоцитов до последнего времени были методические трудности, связанные с регистрацией концентрации свободного кальция в цитоплазме

лимфоцитов. Использование высокоселективного и высокоаффинного Са-связывающего флуоресцентного зонда квин 2-АМ позволило показать, что при митогенной стимуляции конканавалином А наблюдается увеличение концентрации свободного цитоплазматического кальция в тимоцитах мыши (235). Авторы выдвигают рабочую гипотезу о том, что увеличение концентрации свободного цитоплазматического Ca^{2+} при митогенной стимуляции лимфоцитов является обязательным активирующим сигналом.

Сведений о влиянии протеолитической модификации лимфоцитов на уровень свободного цитозольного кальция в литературе не обнаружено. Поэтому было решено провести сравнительное исследование концентрации свободного цитоплазматического кальция в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах, культивируемых в течение I часа, так как в течение этого времени устанавливается равновесная концентрация ионов Ca^{2+} в митоген-стимулированных лимфоцитах (IOI). Полученные нами данные о содержании свободного ци-

Таблица 36

Влияние α-тромбина на уровень цитоплазматического свободного Ca^{2+} в лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Содержание ионов Ca^{2+}	
	% Ca^{2+}-квин комплексов	нМ
Контроль	71,0 ± 3,3 (5)	387,4 ± 68,6 (5)
Опыт	78,9 ± 3,9^{x} (5)	638,2 ±144,9^{x} (5)

тозольного кальция в интактных лимфоцитах селезенки мыши несколь-

ко выше (табл. 36), чем в тимоцитах мыши (235). Эти расхождения могут быть объяснены как особенностями ионного гомеостаза тимоцитов и спленоцитов мышей, так и разными условиями проведения опытов - более низкой концентрацией внешнего кальция (0,42 мМ), чем в наших опытах (2,5 мМ). Обработка лимфоцитов оптимальной митогенной концентрацией тромбина (5 мкг/мл) приводит к увеличению концентрации свободного цитоплазматического кальция в I,6 раза по сравнению с интактными клетками. Этот эффект тромбина может быть обусловлен как увеличением проницаемости плазматической мембраны лимфоцитов в результате ее структурной реорганизации (см. гл. У), так и высвобождения связанного кальция из внутриклеточных депо - митохондрий, эндоплазматического ретикулума, плазматической мембраны. На увеличение проницаемости клеточной мембраны для низкомолекулярных компонентов указывают полученные нами данные по поглощению лимфоцитами ^{14}С-дезоксиглюкозы. Через I час культивирования клеток наблюдается достоверное повышение поглощения ^{14}С-дезоксиглюкозы тромбин-стимулированными лимфоцитами (40I3 ± 68I имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток) по сравнению с контрольными лимфоцитами (I756 ± 3II имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток).

Для исследования роли трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} в активации лимфоцитов клетки обрабатывали блокатором кальциевых каналов - верапамилом (10^{-5} М). В опытах с верапамилом для достижения равновесного состояния процесса связывания ингибитора проводили 30-минутную инкубацию клеток с вышеупомянутым препаратом. В табл. 37 представлены данные о влиянии верапамила на включение радиоактивных предшественников в ДНК (инкубация 4 часа), РНК (инкубация 2 часа) и белка (инкубация 5 часов). Видно, что верапамил полностью снимает активирующий эффект тромбина на

синтез ДНК, белка и накопление РНК в лимфоцитах. Эти данные свидетельствуют о том, что в процесс активации лимфоцитов тромбином, несомненно, включены трансмембранные потоки ионов Ca^{2+}. Интерес-

Таблица 37

Влияние верапамила и трифторперазина на включение радиоактивных предшественников в ДНК, РНК и белки тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Эффекторы	Включение ^{14}C-тимидина, имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток	Включение ^{3}H-уридина, имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток	Включение ^{14}C-аминокислот имп/мин на $5 \cdot 10^6$ клеток
-	7091 ± 2062 (4)	48531 ± 6402 (4)	100961 ± 7517 (4)
Тромбин (5 мкг/мл)	8845 ± 1879^{x} (4)	67260 ± 3378^{x} (4)	138739 ± 7350^{x} (4)
Верапамил (10^{-5} М) + тромбин (5 мкг/мл)	3480 ± 911^{x} (4)	43221 ± 2878 (4)	119459 ± 6994 (4)
Трифторперазин ($2{,}5 \cdot 10^{-5}$ М) + тромбин (5 мкг/мл)	654 ± 73^{x} (4)	2934 ± 508^{x} (4)	120021 ± 10778 (4)

но отметить, что включение ^{3}H-уридина и ^{14}C-аминокислот в тромбин-стимулированные лимфоциты на фоне блокированных верапамилом трансмембранного переноса ионов Ca^{2+} остается на уровне контрольных клеток, а включение ^{14}C - тимидина в этих же условиях почти в 2 раза ниже, чем в контроле. Можно полагать, что трансмембранный перенос ионов Ca^{2+} является необходимым не только для акти-

вации синтеза ДНК под влиянием тромбина, но и для осуществления спонтанного синтеза ДНК вообще в свежеизолированных лимфоцитах селезенки мыши.

Анализируя приведенные выше данные о влиянии тромбина на концентрацию свободного цитозольного кальция и факт ингибирования синтеза ДНК, РНК и белка верапамилом в тромбин-стимулированных лимфоцитах, можно придти к выводу о том, что увеличение уровня цитоплазматического свободного кальция в результате его пассивного трансмембранного переноса, вероятно, служит в качестве внутриклеточного сигнала при ответе лимфоцитов на тромбин.

Главный внутриклеточный рецептор ионов Ca^{2+} - кальмодулин локализуется в цитозоле (растворимая форма) и мембранах (связанная форма) всех эукариотических клеток и является регулятором активности многих ключевых ферментов и клеточных процессов, включая пролиферацию клеток (178).

Данные о влиянии митогенной стимуляции на содержание кальмодулина в лимфоцитах свидетельствуют о том, что его уровень остается неизменным (143). Возможность перераспределения кальмодулина между различными клеточными компартментами при митогенной стимуляции лимфоцитов не изучалась. Поэтому было решено провести исследование влияния тромбина на уровень тотального и цитозольного кальмодулина в лимфоцитах селезенки мыши, культивируемых в течение I часа (табл. 38). Видно, что в интактных лимфоцитах соотношение растворимой и мембраносвязанной форм кальмодулина равно 2:I. При активации тромбином содержание тотального кальмодулина в лимфоцитах не изменяется. В то же время, в тромбин-стимулированных лимфоцитах имеет место достоверное увеличение уровня цитозольного кальмодулина по сравнению с контрольными клетками. Соот-

ношение растворимой и мембраносвязанной форм кальмодулина в тромбин-стимулированных лимфоцитах составляет ~ 5:I. Эти данные являются прямым доказательством того, что на ранних этапах активации лимфоцитов тромбином происходит транслокация мембраносвязанного кальмодулина в цитозоль. Существует мнение, что такой характер перераспределения клеточного кальмодулина между различными компартментами является тонким механизмом регуляции уровня кальмодулин-зависимых вторичных мессенджеров в клетке (230). Кроме того, известно, что возрастание уровня цитозольного кальмодулина может обусловливать инициацию синтеза ДНК в клетках (333).

Таблица 38

Содержание кальмодулина в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Содержание кальмодулина, нг/10^6 клеток	
	Общий	Цитозольный
Контроль	I48,4 ± 36,6 (5)	99,8 ± I4,8 (9)
Опыт	I72,0 ± 39,6 (5)	I42,8 ± I3,7^x (8)

Для исследования роли кальмодулин-зависимых процессов в активации лимфоцитов тромбином клетки обрабатывали специфическим антагонистом кальмодулина - трифторперазином (табл. 37). Для достижения равновесного состояния процесса связывания ингибитора проводили 30-минутную прединкубацию клеток с трифторперазином. Видно, что обработка клеток трифторперазином не только снимает

стимулирующий эффект тромбина на уровне синтеза ДНК, РНК и белка, но и приводит почти к полному ингибированию (~ на 95%) синтеза ДНК и РНК; в этих же условиях синтез белка также угнетается по сравнению с тромбин-стимулированными лимфоцитами, но достигает величин, сопоставимых с таковыми у интактных лимфоцитов. Способность трифторперазина резко угнетать синтез ДНК показана не только для митоген-стимулированных лимфоцитов (143, 354), но и других типов клеток (333). Установлено, что трифторперазин блокирует процессы, связанные с инициацией репликации ДНК, но не влияет на текущий синтез ДНК (333). Сопоставляя эти данные с полученными нами результатами по влиянию трифторперазина на макромолекулярные синтезы, можно придти к выводу о том, что кальмодулин выполняет специфическую регуляторную функцию в процессах активации биосинтеза ДНК, белка и накопления новосинтезированной РНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах.

На наш взгляд, заслуживает также особого внимания факт значительного несоответствия между степенью угнетения синтеза РНК (~ на 95%) и синтеза белка (~ на 15%) трифторперазином в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Иными словами, включение ^{14}C-аминокислот в белки является гораздо большим, чем следовало бы ожидать из данных по угнетению синтеза РНК трифторперазином. По-видимому, в этом несоответствии проявляется общая стратегия клетки на пути преодоления катастрофической ситуации, навязанной ей экспериментом (см. также данные по ингибированию синтеза РНК и белка в тромбин-стимулированных лимфоцитах актиномицином Д), заключающаяся в активации предсуществующих в цитоплазме клеток стабильных долгоживущих мРНК и, возможно, в использовании предсуществующих первичных транскриптов различных типов РНК.

Циклические нуклеотиды являются ведущим эффекторным звеном, опосредующим влияние на клетку гормонов, нейромедиаторов и других биологически активных веществ. Поэтому понятен интерес к изучению роли циклических нуклеотидов в качестве триггеров пролиферации лимфоцитов (126). Однако, ни одно молекулярное событие, причастное к активации лимфоцитов, не вызывает столько противоречий как изменение метаболизма циклических нуклеотидов (192).

Полученные нами данные (табл. 39) свидетельствуют, что протеолитическая обработка лимфоцитов оптимальной митогенной концентрацией тромбина (5 мкг/мл) приводит к увеличению внутриклеточного уровня цГМФ, обнаруживаемому уже через 15 минут инкубации; концентрация цАМФ в течение всего периода инкубации клеток остается неизменной. Культивирование лимфоцитов селезенки мыши в присутствии ФМС-тромбина в течение 15 минут не сопровождается изменением концентрации циклических нуклеотидов. Это указывает на то, что наблюдаемое увеличение уровня цГМФ в лимфоцитах при их обработке тромбином является протеазо-индуцируемым событием. Интересно отметить, что увеличение концентрации цГМФ при активации тромбином имеет место и в других типах клеток: тромбоцитах и фибробластах (165).

Повышение внутриклеточного уровня цГМФ и усиление синтеза ДНК в лимфоцитах селезенки мыши под влиянием тромбина, а также отсутствие этих эффектов при использовании инактивированного тромбина (табл. 39 и 24) свидетельствует в пользу того, что стимулирующее влияние тромбина на пролиферативные реакции иммунокомпетентных клеток реализуется, по-видимому, посредством цГМФ-зависимых механизмов. Можно предположить, что повышение внутриклеточного уровня цГМФ, обусловленное активацией гуанилатцикла-

Таблица 39

Динамика изменения внутриклеточной концентрации цАМФ и цГМФ (пмоль/10^7 клеток) в тромбин-стимулированных лимфоцитах

Эффекторы	Циклический нуклеотид	Время инкубации, мин				
		0	5	15	30	60
Тромбин	цАМФ	3,3 ± 0,4 (5)	3,2±0,3 (5)	3,4 ± 0,4 (4)	3,3 ± 0,4 (4)	3,4 ± 0,3 (4)
	цГМФ	0,24 ± 0,04 (5)	0,27 ±0,08 (5)	0,63 ± 0,10^x (5)	0,69 ±0,11^x (5)	0,48 ± 0,06^x (5)
ФМС-тромбин	цАМФ	3,4 ± 0,5 (5)		3,2 ± 0,3 (5)		
	цГМФ	0,33 ± 0,03 (5)		0,30 ± 0,04 (5)		

Примечание: различные исходные уровни циклических нуклеотидов обусловлены тем, что лимфоциты получены от разных животных.

зы, и последующий комплекс цГМФ-зависимых метаболических эффектов являются одними из первых биохимических звеньев в процессе тромбин-индуцированной стимуляции лимфоцитов. Последующие этапы включают повышение синтеза белков, индукцию синтеза тех или иных ферментов, переход метаболизма клеток на качественно новый уровень, характеризующий определенную стадию активации. Следует также отметить, что для реализации митогенного эффекта тромбина, вероятно, важно не только само по себе повышение уровня цГМФ, но и увеличение соотношения между внутриклеточной концентрацией цГМФ и цАМФ, вернее, создание оптимума этого соотношения (126).

Возможность вовлечения простагландинов в митогенез клеток обусловлена следующими фактами. Во-первых, простагландины могут сами по себе обладать митогенными свойствами (128, 255). Во-вторых, различные митогенные гормоны и негормональные митогены стимулируют синтез простагландинов (203, 316). И, наконец, в третьих, ингибиторы синтеза простагландинов супрессируют митогенные эффекты некоторых гормонов (299). Конкретные механизмы действия простагландинов на пролиферацию клеток практически не изучены.

Известно, что тромбин стимулирует синтез простагландинов в гепатоцитах (316) и фибробластах (161). В свете приведенных данных значительный интерес представляет исследование влияния тромбина на уровень простагландинов в лимфоцитах селезенки мыши (табл. 40). Видно, что в тромбин-стимулированных лимфоцитах через I час инкубации наблюдается увеличение концентрации простагландинов группы Е по сравнению с контрольными клетками; содержание простагландинов $F_{2\alpha}$ остается неизменным. Не исключено, что увеличение простагландинов группы Е может быть обусловлено

прямым активирующим влиянием тромбина на циклооксигеназу (I6I). Существенно отметить, что активация лимфоцитов фитогемагглютинином также сопровождается увеличением уровня простагландинов группы Е на фоне постоянной концентрации простагландинов $F_{2\alpha}$ (203).

Таблица 40

Содержание простагландинов (пкг/10^6 клеток) в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах

Простагландины	Время инкубации, мин		
	0	I5	60
$ПГF_{2\alpha}$	I93,I ± I5,4 (I6)	I89,I ± 22,0 (8)	20I,0 ± 29,2 (8)
ПГЕ	I03,8 ± I7,2 (I6)	III,0 ± 20,0 (7)	I7I,3 ± 3I,5^{x} (7)

Таким образом, полученные нами данные об изменении внутриклеточного уровня свободного цитозольного кальция, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов, свидетельствуют в пользу того, что в активацию лимфоцитов тромбином, по-видимому, вовлечены практически все потенциальные регуляторы клеточного метаболизма.

§ 6. Заключение

Выше мы рассмотрели состояние макромолекулярных биосинтетических процессов в тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши. Судя по опытам с включением ^{3}Н-тимидина в ДНК лимфоцитов, митогенный эффект тромбина проявляется в достаточно низких кон-

центрациях (1-5 мкг/мл), которые реально могут возникнуть в организме при повреждениях и различных патологических состояниях, сопровождающихся тромбинемией (сепсис, эмболия околоплодными водами, массивные травмы и операции и т.д.).

Доказан протеолитический механизм индукции синтеза ДНК в лимфоцитах под влиянием тромбина. Важно отметить, что стимуляция лимфоцитов различными митогенами сопровождается экспрессией протеолитической активности, связанной с их поверхностью (308). Кроме того, известно, что митогенную стимуляцию В-лимфоцитов можно затормозить за несколько часов до начала синтеза ДНК в клетке путем ингибирования активности сериновых протеиназ (260). Учитывая эти сведения, а также в соответствии с гипотезой (249), можно придти к выводу, что тромбин инициирует митогенез лимфоцитов, минуя стадию митоген- или антиген-зависимой экспрессии эндогенных аргинин-специфичных сериновых протеиназ.

Индуцирующее действие тромбина на лимфоциты биологически оправдано, так как в локальной области раны, где создается достаточная концентрация фермента, он может, в отличие от антиген-зависимой стимуляции, вызвать неспецифическую пролиферацию лимфоцитов и тем самым способствовать процессу заживления ран. Такая реакция является целесообразной, поскольку создает неспецифическую защиту еще до мобилизации специфического клеточного и гуморального механизмов. Тромбин может играть определенную роль в заживлении ран путем стимуляции пролиферации не только лимфоцитов, но и фибробластов (175). В аспекте заживления ран значительный интерес представляют также данные о стимулирующем влиянии тромбина на фагоцитарную активность макрофагов и уменьшении скорости их миграции из очага воспаления (63, 78, 79).

Однако этим не исчерпывается биологическое значение иммуностимулирующего влияния тромбина. Согласно гипотезе Б.И.Кузника и Н.Н. Цыбикова тромбин специфически взаимодействует с генетически детерминированным пулом В-лимфоцитов, что в конечном итоге приводит к синтезу аутоантител, инактивирующих активный фермент (64, I32). Состояния, сопровождаемые развитием гиперкоагуляции и ДВС-синдромом, приводят к уменьшению количества аутоантител сразу после стресс-воздействия. Это обусловлено связыванием аутоантител тромбином, появившимся в кровотоке при стрессе. В более поздние сроки количество антител возрастает, что отражает результат иммуностимулирующего действия тромбина (I29).

Нами показано, что как интактные, так и тромбин-стимулированные лимфоциты выделяют в культуральную среду около I0-I2% вновь синтезированной в клетках ДНК. Доказано, что высвобождение ДНК из клеток является секреторным процессом, а не связано с гибелью или частичным распадом лимфоцитов в процессе культивирования.

В ходе дальнейшей работы возник естественный вопрос о биологической целесообразности процесса экскреции лимфоцитами части новосинтезированной ДНК. В этом плане важно отметить, что ДНК экскретируется не только тромбин-стимулированными, но и интактными лимфоцитами в процессе культивирования. Более того этот процесс не является специфичным только для иммунокомпетентных клеток. Так, фибробласты, клетки предсердия лягушки и различные опухолевые клетки также способны экскретировать часть собственной ДНК во внеклеточную среду (I3, 5I, 244, 338). По-видимому, сам по себе процесс экскреции части собственной ДНК обычен для нормально функционирующей клетки и, вероятно, имеет

какой-то биологический смысл.

В настоящее время роль пролиферативных и дифференцировочных сигналов для лимфоцитов, по крайней мере, отводится веществам белковой и углеводной природы. Тем не менее, значительный интерес представляет рабочая гипотеза о регуляции роста и дифференцировке клеток сигнальными ростстимулирующими нуклеопротеидами, выделяющимися во внеклеточную среду при гибели клеток (84). В соответствии с этой гипотезой генетический способ регуляции роста клеток может осуществляться молекулами нуклеиновых кислот, копий которых достаточно много в клетке. Уникальные последовательности ДНК для этой цели не годятся. Более всего для этой цели подходят повторяющиеся последовательности ДНК, имеющие много копий (84).

Исходя из этих представлений, важно напомнить факт резкого уменьшения палиндромных последовательностей в новосинтезированной ДНК тромбин-стимулированных лимфоцитов, а также обогащение этими последовательностями экстраклеточной ДНК. Кроме того, нами показано, что как в условиях ин виво, так и ин витро экстраклеточная ДНК оказывает стимулирующее влияние на синтез ДНК лимфоцитами селезенки животных, а также на Е-розеткообразующую активность Т-лимфоцитов и фагоцитоз гранулоцитов крови человека в условиях ин витро (табл. 30,31). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что экстраклеточная ДНК может иметь отношение к функции кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток и выступать в качестве сигнала, несущего информацию о скорости роста лимфоцитов. В отличие от вышеизложенной гипотезы (84), предполагающей гибель клеток (а, следовательно выделение в среду информативного генетического материала) как необходимый ком-

понент регуляции их роста, мы считаем, что возможен также и активный процесс экскреции сигнальных нуклеопротеидов, контролирующих рост (и дифференцировку) нормально функционирующими живыми клетками.

В аспекте биологической значимости процесса высвобождения ДНК иммунокомпетентными клетками заслуживают особого внимания полученные нами данные о том, что экскретируемая лимфоцитами ДНК обладает не только тромбоцитагрегирующими свойствами (что важно уже само по себе), но и переводит в условиях ин витро обратимую АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в необратимую. Существование тесной функциональной связи между системами иммунитета и гемостаза (I32) позволяет выдвинуть предположение, что экскретируемая лимфоцитами ДНК может выступать в качестве одного из связующих звеньев между системами иммунитета и гемостаза, имеющего непосредственное отношение к сосудисто-тромбоцитарному гемостазу.

Показано, что на ранних этапах активации лимфоцитов тромбином (в течение I часа) не только тотальная транскрипционная активность, но и интенсивность синтеза различных типов бмРНК остается неизменной по сравнению с интактными лимфоцитами (табл. 32, 33). Вместе с тем, по данным гель-фильтрации (рис.24, 25) и включения ^{3}Н-уридина в кислотонерастворимый материал (табл. 34) наблюдается увеличение содержания меченой РНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Эти данные являются важным аргументом в поддержку гипотезы, согласно которой основным изменением метаболизма РНК на ранних стадиях активации лимфоцитов является ускорение процессинга, транспорта РНК из ядра и ее накопление в цитоплазме без увеличения транскрипционной активнос-

ти (250).

Судя по данным гель-фильтрации (рис. 24), ранние этапы культивирования интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов сопровождаются дефектом в накоплении рРНК и преимущественным синтезом низкомолекулярных РНК (более 90% от общего количества новосинтезированной РНК). Дефект в накоплении рРНК при стимуляции иммунокомпетентных клеток описан и другими авторами (353). Здесь уместно заметить, что отсутствие меченой РНК в объеме выхода рРНК при гель-фильтрации не может служить указанием на отсутствие синтеза 45S пре-рРНК. На наличие синтеза 45S пре-рРНК на ранних этапах культивирования интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов указывают данные о соотношении в них разных типов бмРНК (табл. 33). По-видимому, дефект в накоплении рРНК на ранних стадиях культивирования клеток (в течение I часа) обусловлен неэффективным процессингом новосинтезированных молекул 45S пре-рРНК, что является характерным для покоящихся лимфоцитов (187). Накопление рРНК как в интактных, так и тромбин-стимулированных лимфоцитах отмечено нами в культурах, пульс-меченых ^{3}Н-уридином в течение 4-х часов, причем в последних это накопление выражено в большей степени. Такой характер изменения уровня новосинтезированной рРНК позволяет объяснить значительное запаздывание активации синтеза белка в тромбин-стимулированных лимфоцитах (через 5 часов культивирования) по сравнению с увеличением уровня новосинтезированной тотальной клеточной РНК (через I час). Таким образом, накопление новосинтезированной рРНК предшествует активации синтеза белка в тромбин-стимулированных лимфоцитах, т.е. активация трансляции в лимфоцитах под влиянием тромбина не может быть приписана мобилизации предсуществующих в клетках ри-

босом. Судя по опытам с использованием актиномицина Д и кордицепина (табл. 34, 35), можно предположить, что для тромбин-индуцируемой активации синтеза белка необходим синтез de novo не только рРНК, но и мРНК.

Рассмотрение возможности участия ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов в тромбин-индуцированной активации лимфоцитов определило основную методологию этого раздела работы. Применение специфических антагонистов позволило убедительно доказать вовлечение Ca^{2+} - кальмодулиновой системы в активацию лимфоцитов тромбином. Кроме того, повышение внутриклеточного уровня цГМФ и активация синтеза ДНК в лимфоцитах под влиянием тромбина, а также отсутствие этих эффектов при использовании ФМС-тромбина позволило показать, что стимулирующее влияние тромбина на пролиферативные реакции лимфоцитов реализуются посредством цГМФ-зависимых механизмов. Этот вывод находится в согласии с работами, свидетельствующими о том, что повышение цГМФ стимулирует функциональную активность и триггирует пролиферативные реакции иммунокомпетентных клеток (183).

Совокупность данных, изложенных в настоящей главе, позволяет сформулировать следующие новые положения.

α-Тромбин, действуя как протеолитический фермент, вызывает активацию синтеза ДНК и белка в лимфоцитах селезенки мышей. Основным изменением метаболизма РНК на ранних стадиях активации лимфоцитов тромбином является накопление в их цитоплазме новосинтезированной РНК без увеличения транскрипционной активности, что, по-видимому, обусловлено ускорением процессинга и ядерно-цитоплазматического транспорта. Актиномициновый и кордицепиновый блоки полностью отменяют активирующее влияние тромбина на накоп-

ление новосинтезированной РНК и синтез белка в лимфоцитах. Эти результаты служат аргументом в пользу представлений о том, что регуляторные механизмы тромбин-индуцируемой активации лимфоцитов, вероятно, находятся как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях.

В активацию лимфоцитов тромбином включены трансмембранные потоки ионов Ca^{2+} и кальмодулин-зависимые ферменты, приводящие к запуску цГМФ - зависимых процессов, контролирующих пролиферацию лимфоцитов.

Митогенный эффект α-тромбина является биологически оправданным, так как тромбин, выполняя гемостатическую функцию, вызывает также неспецифическую пролиферацию лимфоцитов в локальной области раны, где создается достаточная концентрация фермента, и тем самым может способствовать процессу заживления ран. Эта реакция является целесообразной, поскольку создает неспецифическую защиту еще до мобилизации специфического клеточного и гуморального механизмов.

Интактные и тромбин-стимулированные лимфоциты экскретируют в культуральную среду часть новосинтезированной ДНК. Экскреторная ДНК вызывает активацию синтеза ДНК лимфоцитов селезенки животных, Е-розеткообразующей способности лимфоцитов и фагоцитоза гранулоцитов крови человека, т.е. обладает иммуностимулирующим действием. Эти результаты свидетельствуют о том, что экскретируемая лимфоцитами ДНК, по-видимому, может иметь отношение к функции кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток, а также выступать в качестве сигнала, несущего информацию о скорости роста лимфоцитов, т.е. в качестве пролиферативного сигнала.

Экстраклеточная ДНК обладает тромбоцитагрегирующими свойст-

вами, а также переводит в условиях ин витро обратимую АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в необратимую. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что экскретируемая лимфоцитами ДНК может выступать в качестве одного из звеньев сопряжения между системами иммунитета и гемостаза.

ГЛАВА У. РОЛЬ ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ МЕМБРАН И ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ α-ТРОМБИНА В АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

§ I. Состояние проблемы и постановка задачи

Жизнедеятельность клеток, выполнение ими специфических функций теснейшим образом связаны со структурно-функциональным состоянием многочисленных мембранных структур, при непосредственном участии которых происходят процессы преобразования энергии, транспорта ионов и метаболитов, образование комплексов с ДНК и РНК, компартментализация, а также обеспечивается целостность, гетерогенность клеток и взаимодействие между ними (I4, I9, 55). Характерной чертой клеточных мембран является их способность к структурным перестройкам, которые, по мнению ряда авторов, играют роль триггерного механизма в переключении клетки из одного метаболического состояния в другое (42, 54).

В середине 70-х годов С.В.Коневым была сформулирована современная концепция организации мембраны - твердокаркасная жидко-мозаичная модель, согласно которой непрерывная эластическая сеть, состоящая из белков, гликопротеидов, гликолипидов, микрофиламентов и микротрубочек, ответственна за хорошо известную гидродинамическую жесткость и формирует ячейки, заполненные жидким липидным бислоем со значительной подвижностью погруженных в него спиновых и флуоресцентных зондов (55).

Р.М.Хаитовым и Р.И.Атауллахановым (I26) развита концепция об интегральном состоянии плазматической мембраны клеток. Каждое конкретное состояние плазматической мембраны (до воздействия лиганда и после воздействия, но перед трансмиссией сигнала внутрь клетки) характеризуется определенным набором функциональных состояний каждой из мембранных систем (липидной матрицы, циклазной

системы, ион-транспортирующей системы и сократительного аппарата мембраны).

Под действием эффекторов различной природы биологические мембраны способны претерпевать структурные перестройки, которые характеризуются положительной кооперативностью и затрагивают как липидную, так и белковую фазы мембраны (53). Особая роль отводится структурным перестройкам мембран в процессе активации лимфоцитов различными митогенами. Имеющиеся сведения об изменении свойств мембран при активации лимфоцитов позволяют предполагать, что на уровне этих надмолекулярных структур проявляются важнейшие механизмы перехода клеток в стимулированное состояние (82, I26, 237, 3I5).

В настоящее время известно несколько типов молекулярных процессов, играющих ключевую роль в "запуске" реакции активации лимфоцита после связывания с его поверхностью молекул митогена или иммуногена, одним из которых является изменение фосфолипидного состава и текучести липидного бислоя мембран. Интерес к возможной роли изменений фосфолипидов в контроле функции лимфоцитов вообще и клеточном делении, в частности, был стимулирован в конце 60-х годов исследованиями, показавшими, что поликлональные митогены вызывают быстрые изменения в обороте фосфатидилинозитола (208). Затем было показано, что стимуляция лимфоцитов сопровождается также активацией синтеза и оборота фосфатидилхолина (209). Однако впоследствии оказалось, что более важным при активации лимфоцитов является увеличение оборота жирнокислотных цепей фосфатидилхолина и других фосфолипидов (3I4). Одна из моделей активации лимфоцитов предполагает, что это увеличение оборота ацильных цепей фосфолипидов связано с активацией ацилКоА-

лизофосфатидилхолинацилтрансферазы (202). Митоген-индуцированная активация ацилКоА-лизофосфатидилхолинацилтрансферазы сопровождается уменьшением ее сродства к насыщенным жирным кислотам, что приводит к преимущественному включению в фосфолипиды активированных лимфоцитов полиненасыщенных жирных кислот (315). Это изменение в ненасыщенности фосфолипидов представляет значительный интерес из-за возможного влияния на текучесть липидной фазы мембран, которая, в свою очередь, может быть связана с изменением мембранного транспорта и активности мембраносвязанных ферментов (296).

С целью обнаружения изменений жидкостного состояния липидов (текучести) мембран лимфоцитов после их активации митогенами проведено большое число флуоресцентных и ЭПР-исследований (189, 243, 253, 298). Результаты этих исследований оказались весьма противоречивыми. Эти противоречия могли быть вызваны различиями как в исследованных клетках и митогенах, так и в экспериментальных условиях, использованных авторами. Кроме того, в цитированных работах использовались зонды различного характера: липидспецифические (189, 253) и нелипидные гидрофобные зонды (243, 298). Липидспецифические флуоресцентные зонды максимально приближены по структуре к отдельным типам липидов клеточной мембраны (82). При использовании антрилвинилмеченых фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина было показано, что активация лимфоцитов конканавалином А приводит к увеличению текучести доменов мембран, обогащенных фосфатидилхолином, и уменьшению текучести доменов, обогащенных сфингомиелином; в доменах, обогащенных фосфатидилэтаноламином, текучесть не изменялась (82).

Изменение свойств липидов мембраны по типу фазового перехо-

да может иметь ключевое значение в механизме формирования сигнала, "сообщающего" внутрь клетки о взаимодействии лиганда с рецептором клеточной поверхности (126).

Одним из возможных механизмов "запуска" лимфоцитов к делению под влиянием митогенных лектинов является стимуляция метилирования фосфолипидов (237).

Накопление свободной арахидоновой кислоты является еще одним ранним метаболическим процессом, характерным для митоген-стимулированных лимфоцитов (237, 296).

Перечисленные факты значительно стимулировали интерес к липидам, как основным субстратам, определяющим кооперативные свойства субклеточных структур. Изучение изменений молекулярной организации липидов мембран лимфоцитов под влиянием тромбина представляет особый интерес не только с точки зрения выяснения механизмов активации, но и установления интимных механизмов взаимосвязи систем гемостаза и иммунитета. Вместе с тем, характер структурно-функциональных изменений биомембран лимфоцитов при их активации тромбином до сих пор совершенно не изучен. Неясным остается также вопрос о специфике влияния тромбина на метаболические пути различных фосфолипидов, которые, вероятно, вовлекаются в активацию лимфоцитов под действием митогенных лектинов.

Несомненно, инициация каскада активации лимфоцитов как тромбином, так и митогенными лектинами, требует их связывания с рецепторами плазматической мембраны, что, в конечном итоге, приводит к генерации вторичного посредника, запускающего целый ряд внутриклеточных процессов. Остается открытым вопрос о том, какова же судьба связавшегося с поверхностью лимфоцита тромбина и каким образом он вмешивается во внутриклеточные процессы.

В ряде работ последнего времени обосновывается гипотеза о том, что для ответа клеток на различные факторы роста и некоторые полипептидные гормоны необходимо поглощение клетками этих полипептидов (66). В этом аспекте значительный интерес представляют сведения о том, что клеточная поверхность не обязательно является единственным местом действия тромбина и существует альтернативная гипотеза о его внутриклеточном действии (242).

Учитывая вышеизложенные факты и соображения, было решено провести исследование, направленное на выяснение характера тромбин-индуцированной реорганизации клеточных мембран и установление возможности интернализации α-тромбина лимфоцитами.

§ 2. Морфологические и электрокинетические изменения тромбин-стимулированных лимфоцитов

Электронно-микроскопическое исследование показало, что в исходной популяции лимфоцитов селезенки мыши преобладают клетки округлой и овальной формы с гладкой или содержащей незначительное число микровиллей поверхностью (рис. 26, 27). Мягкая протеазная обработка лимфоцитов тромбином (5 мкг/мл) в течение 4-х часов сопровождается значительным увеличением доли клеток с большим числом поверхностных микровиллей (рис. 28, 29), что является характерным для стимулированных и трансформированных клеток (364). Хотя вполне вероятно, что увеличение числа поверхностных микровиллей может быть необходимым для тромбин-стимулированного клеточного деления, ясно, однако, что такое изменение макроструктуры клеточной поверхности вряд ли является достаточным для инициации митогенеза (185).

Учитывая, что заряд поверхности мембран является одним из наиболее важных элементов их структуры (38), было проведено ис-

Рис. 26. Трансмиссионная электронная микрофотография интактных мононуклеаров селезенки мыши. (х 17000)

Рис. 27. Сканнирующая электронная микрофотография интактных мононуклеаров селезенки мыши. (х 15000)

Рис. 28. Трансмиссионная электронная микрофотография тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши. (х I7000)

Рис. 29. Сканнирующая электронная микрофотография тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши. (х 20000)

следование влияния тромбина на ЭФП лимфоцитов. У интактных лимфоцитов среднее значение ЭФП составило (I,02 ± 0,0I4) $\cdot I0^{-4}$ $см^2 с^{-I} В^{-I}$, что согласуется с данными других авторов (22). Уже на ранних стадиях активации лимфоцитов тромбином (5 - I5 мин) наблюдается достоверное уменьшение их электрофоретической подвижности до уровня (0,87 ± 0,0I2)$\cdot I0^{-4} см^2 с^{-I} В^{-I}$.

Анализ профиля распределения интактных лимфоцитов селезенки мыши по их ЭФП (рис. 30, А) позволил выяснить две основные субпопуляции лимфоцитов со средними значениями ЭФП 0,87$\cdot I0^{-4}$ $см^2 с^{-I} В^{-I}$ и I,0I$\cdot I0^{-4}$ $см^2 с^{-I} В^{-I}$. Кратковременная обработка лимфоцитов тромбином (5 - I5 мин) приводит к значительному снижению количества лимфоцитов с высокой ЭФП и соответствующему увеличению количества лимфоцитов с низкой ЭФП (рис. 30, Б). Кроме того, анализ гистограммы тромбин-стимулированных лимфоцитов указывает на появление новой субпопуляции лимфоцитов со средним значением электрофоретической подвижности, равной 0,73$\cdot I0^{-4}$ $см^2 с^{-I} В^{-I}$.

Приведенные результаты свидетельствуют о значительном уменьшении плотности электрического заряда на поверхности тромбин-стимулированных лимфоцитов, которое может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, известно, что при физиологических значениях pH и ионной силы все клетки позвоночных, включая лимфоциты, несут на своей поверхности отрицательный электрический заряд (22), а тромбин в этих же условиях является катионом (I49). Поэтому уменьшение ЭФП тромбин-стимулированных лимфоцитов может быть связано с экранировкой отрицательно заряженных функциональных группировок плазматической мембраны в результате электростатического взаимодействия с тромбином. Во-вторых, не исключено, что наблюдаемые электрокинетические различия между

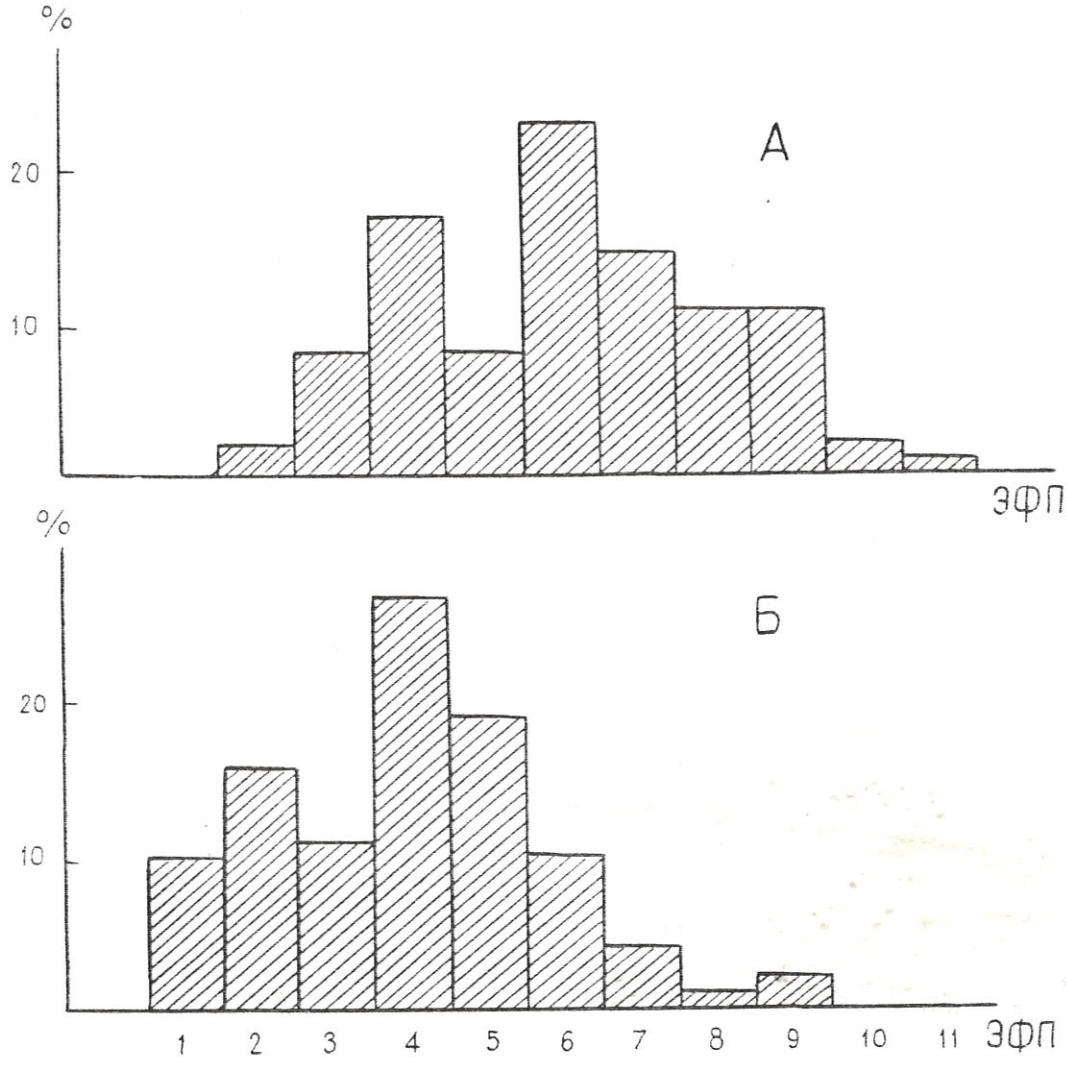


Рис. 30. Распределение клеток по электрофоретической подвижности в суспензии интактных (А) и тромбин-стимулированных (Б) лимфоцитов. По оси ординат - % содержание клеток; по оси абсцисс - электрофоретическая подвижность: I - 0,63-0,69, 2 - 0,70-0,76, 3 - 0,77-0,83, 4 - 0,84-0,90, 5 - 0,9I-0,97, 6 - 0,98-I,04, 7 - I,05-I,II, 8 - I,I2-I,I8, 9 - I,I9-I,25, I0 - I,26-I,32, II - I,33-I,39.

интактными и тромбин-стимулированными лимфоцитами могут быть обусловлены также изменением состава и химической модификацией фосфолипидов лимфоцитов под влиянием тромбина (см. ниже).

По-видимому, первичный акт взаимодействия тромбина с лимфоцитами представляет собой неспецифическую адсорбцию электростатического характера, приводящую к концентрированию фермента на их поверхности и дальнейшему образованию рецептор-лигандного комплекса.

§ 3. Холестерин и фосфолипидный состав лимфоцитов

Сравнительное исследование общего содержания холестерина и фосфолипидов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов показало, что в последних наблюдается значительное снижение холестерина (~ на 30%) и молярного отношения холестерин/фосфолипиды; общее содержание фосфолипидов остается постоянным (табл. 41).

Таблица 41

Содержание холестерина и общих фосфолипидов в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Холестерин (мкмоль/мг белка)	Фосфолипиды (мкмоль/мг белка)	Холестерин-фосфолипид (молярное отношение)
Контроль	0,070 ± 0,013 (9)	0,227 ± 0,022 (9)	0,344 ± 0,081 (9)
Опыт	0,049 ± 0,008^{x} (9)	0,207 ± 0,018 (9)	0,267 ± 0,062^{x} (9)

Наличие в клеточных мембранах двух различных пулов холестерина (50) позволяет предположить, что под влиянием тромбина происхо-

дит уменьшение легко удаляемого пула, оказывающего влияние на текучесть и структуру липидного бислоя.

Несмотря на постоянный уровень общих фосфолипидов, в тромбин-стимулированных лимфоцитах наблюдаются существенные изменения их фракционного состава: растет содержание фосфатидилхолина при одновременном снижении лизофосфатидилхолина, что приводит к более чем двукратному увеличению молярного отношения фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин; содержание сфингомиелина и фосфатидилэтаноламина не изменяется (табл. 42).

Таблица 42

Фосфолипидный состав интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	Фракции фосфолипидов (мкг Р на $4 \cdot 10^7$ лимфоцитов)			
	ЛФХ	СМ	ФХ	ФЭ
Контроль	1,97 ± 0,28 (8)	2,06 ± 0,21 (8)	3,83 ± 0,26 (8)	2,44 ± 0,34 (8)
Опыт	1,28 ± 0,18^{x} (8)	2,03 ± 0,32 (8)	5,45 ± 0,60^{x} (8)	3,14 ± 0,38 (8)

Известно, что на ранних этапах лектин-индуцированного митогенеза лимфоцитов происходит ацилКоА-лизофосфатидилхолинацилтрансферазы (202). Сопоставляя эти сведения с характером изменений фосфолипидного состава в тромбин-стимулированных лимфоцитах, можно сделать предположение об активации ацилирования лизофосфатидилхолина, являющегося акцептором КоА-производных жирных кислот, с образованием фосфатидилхолина. Вместе с тем, увеличение

содержания фосфатидилхолина в тромбин-стимулированных лимфоцитах выражено в значительно большей степени, чем можно было бы ожидать исходя из изменения уровня лизофосфатидилхолина. Это указывает на то, что ацилирование лизофосфатидилхолина, по-видимому, не является единственной причиной повышения уровня фосфатидилхолина в тромбин-стимулированных лимфоцитах. В связи с этим представляло значительный интерес оценить вклад фосфатидилхолина, синтезированного по цитидиндифосфат-холиновому пути и образованного путем трансметилирования фосфатидилэтаноламина, в общее увеличение его содержания при стимуляции лимфоцитов тромбином.

Для оценки интенсивности синтеза фосфатидилхолина в качестве радиоактивного предшественника использовали ^{14}C-холин хлорид. Оказалось, что уже через I час культивирования клеток наблюдается достоверное увеличение включения радиоактивной метки в липиды тромбин-стимулированных лимфоцитов (I472±284 имп/мин на $I0^6$ клеток) по сравнению с интактными лимфоцитами (I076±268 имп/мин на $I0^6$ клеток). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что увеличение содержания фосфатидилхолина в тромбин-стимулированных лимфоцитах обусловлено не только возможным увеличением ацилирования лизофосфатидилхолина, но и активацией синтеза фосфатидилхолина по цитидиндифосфат-холиновому пути.

Поскольку ацилКоА-лизофосфатидилхолинацилтрансфераза проявляет более высокую специфическую активность по отношению к активированным полиненасыщенным жирным кислотам по сравнению с насыщенными (342), то в случае её активации в тромбин-стимулированных лимфоцитах следует ожидать соответствующего изменения жирнокислотного состава фосфолипидов. Как видно из данных, представ-

Таблица 43

Жирнокислотный состав фосфолипидов интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	Жирные кислоты (% к общему количеству)				
	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{20:4}$
Контроль	28,7 ± 0,91	22,2 ± 0,38	18,7 ± 0,93	11,1 ± 1,07	19,3 ± 1,47
	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)
Опыт	25,3 ± 0,80^{x}	21,4 ± 0,50	17,7 ± 0,72	12,7 ± 1,06	22,8 ± 1,80^{x}
	(8)	(8)	(8)	(8)	(8)

Примечание: индекс ненасыщенности – отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным.

ленных в табл. 43, в общих фосфолипидах тромбин-стимулированных лимфоцитов наблюдается достоверное уменьшение содержания пальмитиновой кислоты и увеличение арахидоновой; индекс ненасыщенности фосфолипидов (отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным) достигает I,I4 по сравнению с 0,96 в контроле.

Для более глубокого понимания молекулярных изменений фосфолипидов при активации лимфоцитов тромбином было проведено исследование жирнокислотного состава основных фосфолипидных компонентов мембран лимфоцитов селезенки мыши - фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (табл. 44, 45).

Таблица 44

Жирнокислотный состав фосфатидилхолина интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	Жирные кислоты (% к общему количеству)				
	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{20:4}$
Контроль	39,8±0,9 (5)	16,4±2,7 (5)	18,2±1,1 (5)	9,6 ± 0,6 (5)	16,2±1,6 (5)
Опыт	39,3±0,7 (5)	13,7±0,5^{x} (5)	18,8±0,6 (5)	12,3 ± 0,6^{x} (5)	15,9±0,7 (5)

Сравнительный анализ жирнокислотного состава фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина интактных лимфоцитов свидетельствует о том, что последний характеризуется значительно меньшим содержанием пальмитиновой кислоты (уменьшение ~ в 3 раза) и более высоким содержанием арахидоновой (увеличение ~ в 2 раза) по сравнению с фосфатидилхолином. Отсюда следует, что фосфатидилхо-

лин, образующийся путем трансметилирования фосфатидилэтаноламина, должен содержать гораздо больше арахидоновой кислоты и меньше пальмитиновой кислоты, чем фосфатидилхолин, синтезируемый путем цитидиндифосфат-холинового пути.

Таблица 45

Жирнокислотный состав фосфатидилэтаноламина в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Жирные кислоты (% к общему количеству)				
	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{20:4}$
Контроль	13,5±1,6 (5)	29,0±0,7 (5)	16,3 ± 0,9 (5)	7,7±0,3 (5)	33,5±2,3 (5)
Опыт	14,5±1,9 (5)	27,6±0,6 (5)	14,3 ± 0,7 (5)	7,8±0,5 (5)	35,9±1,9^{x} (5)

Заслуживают особого внимания данные о характере изменений жирнокислотного состава фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина лимфоцитов под влиянием тромбина. Жирнокислотный состав фосфатидилхолина тромбин-стимулированных лимфоцитов характеризуется уменьшением стеариновой кислоты и увеличением линолевой по сравнению с содержанием таковых у интактных лимфоцитов (табл.44). Совсем иной характер носит изменение жирнокислотного состава фосфатидилэтаноламина (табл. 45). Активация лимфоцитов тромбином приводит к увеличению содержания арахидоновой кислоты в фосфатидилэтаноламине; относительное содержание пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот остается неизменным.

Отсутствие различий в содержании арахидоновой кислоты в

фосфатидилхолинах интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов не позволяет считать, что трансметилирование фосфатидилэтаноламина, приводящее к образованию фосфатидилхолина, может играть существенную роль в активации лимфоцитов тромбином.

§ 4. Физическое состояние липидов мембран лимфоцитов

Текучесть липидного бислоя биологических мембран увеличивается при уменьшении соотношения холестерин/фосфолипиды, сфингомиелин/фосфатидилхолин, а также при увеличении индекса ненасыщенности фосфолипидов (347). Причина такой взаимосвязи обусловлена тем, что текучесть в гидрофобной сердцевине мембраны пропорциональна молекулярному свободному объему, который является наименьшим у более жестких структур - полностью насыщенных ацильных цепей и холестерина.

Анализируя приведенные выше результаты собственных исследований о содержании холестерина, фракционного и жирнокислотного состава общих фосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, можно ожидать увеличения текучести липидов мембран при стимуляции лимфоцитов тромбином.

Прежде, чем приступить к рассмотрению собственных результатов оценки физического состояния липидной фазы мембран тромбин-стимулированных лимфоцитов следует отметить, что молекулы флуоресцентных зондов могут встраиваться не только в различные домены бислоя плазматической мембраны, но и в ядерную мембрану и мембраны различных клеточных органелл. Поэтому в данном случае использование параметров зондовой флуоресценции дает информацию об усредненном состоянии зонда в клеточных мембранах (347).

Спектральные характеристики исследуемых зондов, встроенных в мембраны интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, пред-

ставлены в табл. 46.

Флуоресцентный зонд АНС представляет собой анионный хромофор, который в полярных растворителях в возбужденном состоянии сильно взаимодействует с молекулами растворителя и имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции, а максимум спектра флуоресценции при этих условиях расположен в области 560 нм (38, 334). При уменьшении полярности растворителя, а также при связывании с гидрофобными областями белков и липидов квантовый выход АНС увеличивается, а положение максимума спектра смещается в коротковолновую область на величину до 100 нм (334).

При добавлении АНС к исследуемым суспензиям лимфоцитов интенсивность свечения зонда резко возрастала, максимум флуоресценции наблюдаемых спектров, как видно из табл. 46, располагался при 475 нм, а степень поляризации флуоресценции составляла $0,180 \pm 0,014$ и $0,192 \pm 0,020$ у интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, соответственно. Судя по значениям положения максимумов спектров и степени поляризации флуоресценции, можно предположить, что зонд связывается с липидными гидрофобными участками лимфоцитарных мембран (142).

Учитывая анионный характер АНС и приведенные выше собственные данные о меньшей плотности отрицательного заряда на поверхности тромбин-стимулированных лимфоцитов, можно было ожидать возрастания интенсивности флуоресценции связанного с клетками зонда при их активации тромбином. Однако величина интенсивности флуоресценции АНС в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах является одинаковой. По-видимому, для связывания АНС с лимфоцитарными мембранами более актуальными являются не ионные, а гидрофобные взаимодействия.

Таблица 46

Спектральные характеристики флуоресцентных зондов в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Зонд	Параметр	I	II
АНС	λmax	475 ± 0,8 (4)	476 ± I,0 (4)
	P	0,I80 ± 0,0I4 (4)	0,I92 ± 0,020(4)
	I max	2I,2 ± I,4 (4)	22,3 ± 2,I (4)
ДДА	P	0,066 ± 0,006 (4)	0,070 ± 0,005(4)
	τ	7,50 ± 0,05 (4)	8,02 ± 0,II (4)
ГДА	P	0,I05 ± 0,003 (4)	0,I04 ± 0,006(4)
	τ	8,I4 ± 0,I9 (4)	8,0I ± 0,43 (4)
ФНА		435 ± 0,9 (9)	435 ± I,I (9)
	P	0,I39 ± 0,009 (4)	0,073 ± $0,002^{x}$ (4)
	I max	I9,5 ± 2,3 (9)	34,0 ± $I,9^{x}$ (9)
ДФГТ	P	0,222 ± 0,008 (4)	0,I66 ± $0,0I3^{x}$ (4)
Пирен	I 374/392	0,74 ± 0,0I (II)	0,74 ± 0,02 (II)
	I 470/392	0,58 ± 0,02 (II)	0,76 ± $0,03^{x}$(II)
ПДК	I 380/399	I,05 ± 0,0I (6)	I,06 ± 0,0I (6)
	I 480/399	0,32 ± 0,05 (6)	0,40 ± $0,05^{x}$(6)

Примечание: I - интактные лимфоциты; II - тромбин-стимулированные лимфоциты. P - степень поляризации.
λmax - в нм; I max - в отн. ед.; τ - в нсек.

ДДА и ГДА, являющиеся катионными зондами, встраиваются в мембрану таким образом, что их флуоресцентный центр находится на ее поверхности в области "полярных" головок фосфолипидов, а углеводородный радикал погружен в гидрофобную область бислоя. Как видно из представленных данных (табл. 46) ГДА, встроенный в мембраны интактных лимфоцитов, характеризуется более высоким значением степени поляризации флуоресценции по сравнению с ДДА, время жизни возбужденного состояния обоих зондов является одинаковым. По-видимому, увеличение длины углеводородного радикала зонда оказывает влияние на степень его "заякоривания" в мембране, что и находит свое проявление в уменьшении подвижности флуоресцентного центра ГДА по сравнению с таковой у ДДА. Флуоресцентные параметры ГДА и ДДА (P,τ), встроенных в мембраны лимфоцитов, не изменяются при их активации тромбином.

На основании предположения, что изменение величины степени поляризации флуоресценции зондов отражает изменение текучести определенных областей мембран (38), следует считать, что текучесть мембран в областях связывания АНС, а также флуоресцентных центров ДДА и ГДА является одинаковой у интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов. Следует отметить, что это заключение касается лишь поверхностных слоев лимфоцитарных мембран, поскольку именно в этих областях локализуются мембраносвязанные ионы АНС и флуоресцентные центры ДДА и ГДА (38).

ФНА позволяет получить информацию о карбонил-содержащей области фосфолипидных мембран (278). При активации лимфоцитов тромбином наблюдается значительное возрастание интенсивности флуоресценции ФНА, связанного с мембранами. Почти двухкратное уменьшение величины степени поляризации ФНА в тромбин-стимулиро-

ванных лимфоцитах указывает на увеличение текучести мембран в области связывания зонда (табл. 46).

Пирен, являясь высоко липофильным флуоресцентным зондом, проникает в глубокие слои мембраны и характеризует подвижность ацильных цепей фосфолипидов в толще мембраны (36,38). Латеральная диффузия молекул пирена в углеводородной области биомембраны является ответственной за процесс образования эксимеров - комплексов возбужденной и невозбужденной молекул зонда (36). Этот процесс приводит к появлению широкой бесструктурной полосы с максимумом при 470-480 нм в спектре флуоресценции пирена. Если пирен связан с белком, эксимеризации не происходит (37). Таким образом, степень латеральной (поступательной) диффузии молекул пирена в мембране, а значит и ее текучесть можно оценить по соотношению интенсивностей флуоресценции эксимера (λmax =470 нм) и мономера (λmax =392 нм).

Статистически значимые различия величины отношения интенсивностей флуоресценции эксимера и мономера пирена, встроенного в мембраны интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, позволяет заключить, что при стимуляции клеток увеличивается текучесть в гидрофобной области мембран (табл. 46). Однако необходимо указать, что эффективность образования эксимеров пирена в мембранах определяется не только текучестью, но и объемом жидкой фазы гидрофобной области фосфолипидного бислоя, в котором растворен зонд. В биологических мембранах изменение белок-липидных взаимодействий, приводящее к изменению доступного для зонда объема, может привести к изменению эксимеризации зонда (24).

Соотношение колебательных полос I_{374}/I_{392} в спектрах флуоресценции пирена является одинаковым у интактных и тромбин-сти-

мулированных лимфоцитов, что указывает на отсутствие изменения полярности микроокружения зонда в мембранах лимфоцитов при их стимуляции (36).

ПДК локализуется в липидном бислое таким образом, что карбоксильная группа расположена на его поверхности в области "полярных" головок фосфолипидов, а жирнокислотная цепь погружена в гидрофобный бислой. Причем флуоресцентный центр зонда расположен на глубине I,2-I,4 нм от поверхности мембраны.

Данные о влиянии тромбина на параметры флуоресценции ПДК, встроенной в мембраны лимфоцитов, как и в случае пирена, свидетельствуют об увеличении текучести в области ацильных цепей липидной фазы клеточных мембран и неизменности полярности микроокружения флуоресцентного центра зонда (табл. 46). Интересно отметить, что встраивание ПДК в мембраны интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов приводит к падению на I5-20% интенсивности триптофановой флуоресценции клеток (рис. 3I). В этой связи уместно затронуть вопрос о роли пограничных липидов, непосредственно контактирующих с интегральными белками мембран (73). Не исключено, что обнаруженное нами уменьшение интенсивности триптофановой флуоресценции клеток обусловлено переносом энергии с триптофанилов интегральных мембранных белков на флуоресцентный центр зонда, находящийся, по-видимому, в тесном контакте с аннулярными липидами.

ДФГТ, как и пирен, являясь высоко липофильным зондом, также проникает в глубокие слои мембраны. Наблюдаемое уменьшение степени поляризации флуоресценции ДФГТ (табл. 46), характеризующей вращательную диффузию в мембранах, является еще одним доказательством увеличения текучести в глубоких слоях липидной фазы мемб-

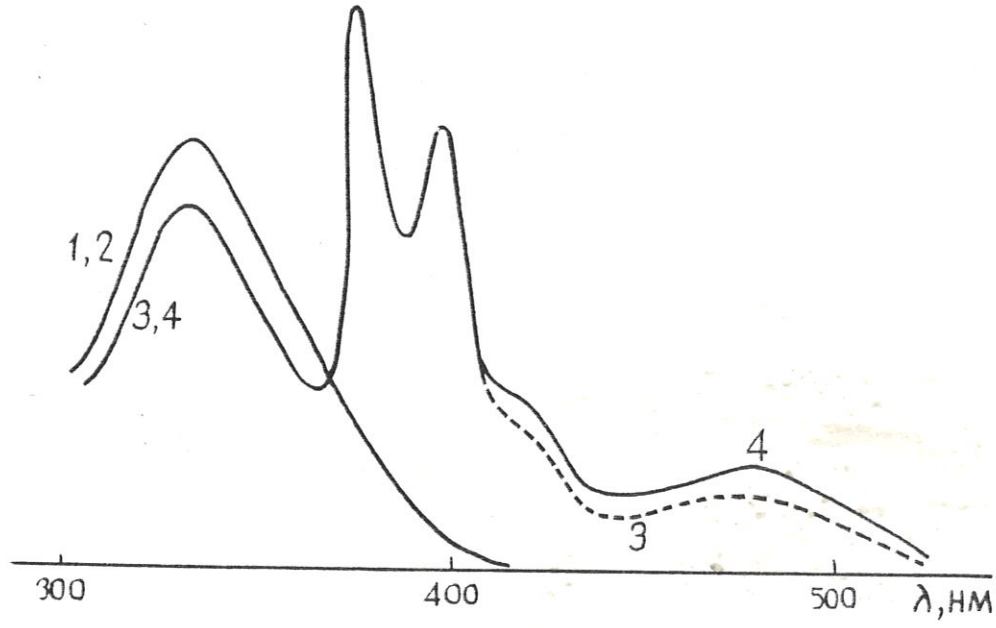


Рис. 3I. Спектры флуоресценции лимфоцитов селезенки мыши: в отсутствие зонда (I - интактные, 2 - тромбин-стимулированные) и через 45 мин после добавления пирендекановой кислоты (3 - интактные, 4 - тромбин-стимулированные). Длина волны возбуждения флуоресценции 280 нм, 37°С.

ран при активации лимфоцитов тромбином.

Изменение структурной организации мембран лимфоцитов при активации тромбином изучали также методом спиновых зондов. В качестве спинового зонда использовали производное стеариновой кислоты с нитроксильным фрагментом у 5-го углеродного атома. Таким образом, при встраивании в мембрану нитроксильный фрагмент зонда будет располагаться на глубине 0,6 - 0,8 нм от поверхности мембраны (86).

В табл. 47 представлены параметры ЭПР-спектров спинового зонда, встроенного в мембраны лимфоцитов. Видно, что значения показателя упорядоченности S спинового зонда, встроенного в мембраны тромбин-стимулированных лимфоцитов, достоверно ниже по сравнению с интактными лимфоцитами; величина изотропной константы сверхтонкого взаимодействия при стимуляции лимфоцитов тромбином не изменяется. Эти результаты указывают на то, что в тромбин-стимулированных лимфоцитах наблюдается увеличение подвижности ацильных цепей фосфолипидов на глубине 0,6-0,8 нм от поверхности мембраны без изменения полярности микроокружения спинового центра.

Сопоставляя данные исследований флуоресцентных зондов с результатами метода спиновых меток, можно придти к следующему заключению. Под влиянием тромбина происходит структурная реорганизация мембран лимфоцитов в сторону разрыхления и увеличения текучести липидов бислоя, что может быть связано с уменьшением отношения холестерин/фосфолипиды, лизофосфатидилхолина, увеличением фосфатидилхолина и индекса ненасыщенности мембранных липидов. Тромбин-индуцируемая структурная реорганизация мембран лимфоцитов не сопровождается изменением полярности гидрофобной

Таблица 47

Параметры ЭПР-спектров 5-нитроксилстеариновой кислоты в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки мыши

Условия	Параметры спектра ЭПР				
	T_{II}	T_{I}	$T_{II} - T_{I}$	S	a
Контроль	28,38±0,60 (6)	9,0I±0,34 (6)	I9,38 ± 0,27 (6)	0,698±0,0II (6)	I5,52±0,40 (6)
Опыт	27,98±0,22 (6)	9,32±0,27 (6)	I8,32 ± 0,32^{x} (6)	0,653±0,0I2^{x} (6)	I5,53±0,23 (6)

фазы мембран как в поверхностных слоях (на глубине 0,6-0,8 нм от поверхности мембраны), так и в более глубоких зонах (на глубине I,2-I,4 нм).

§ 5. Влияние α-тромбина на перекисное окисление в лимфоцитах

Анализ вероятных механизмов тромбиновой модификации мембран лимфоцитов был бы весьма неполон без оценки состояния ПОЛ. Это тем более справедливо, что тромбин оказывает существенное влияние на процессы ПОЛ в некоторых типах клеток (348). В то же время вопрос о влиянии тромбина на ПОЛ в лимфоцитах совершенно не изучен. Это и предопределило наши дальнейшие исследования.

Для оценки состояния ПОЛ в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах проводили определение конъюгированных диенов (первичные продукты) и флуоресцирующих оснований Шиффа (вторичные продукты). Полученные данные представлены в табл. 48. Видно, что в тромбин-стимулированных лимфоцитах содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ достоверно снижено по сравнению с интактными лимфоцитами. По-видимому, угнетение ПОЛ в тромбин-стимулированных лимфоцитах служит механизмом, предохраняющим плазматические и субклеточные мембраны от действия перекисей и свободных радикалов, образующихся особенно часто в метаболически активных клетках. Какова бы ни была причина уменьшения содержания продуктов ПОЛ ясно, что при стимуляции лимфоцитов тромбином трудно ожидать структурно-модифицирующих эффектов перекисного окисления: "выгорания" преимущественно тех липидов, которые содержат непредельные жирные кислоты, уменьшения индекса ненасыщенности, образования внутри- и межмолекулярных сшивок и т.д. (232).

Безусловно, в механизме действия тромбина как стимулятора лимфоцитов, помимо угнетающего влияния на процессы ПОЛ, имеют

Таблица 48

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах мыши

Условия	Продукты ПОЛ	
	Диеновые конъюгаты, ед.опт.плотности	Флуоресценция оснований Шиффа, отн.ед.
Контроль	0,378 ± 0,029 (I0)	I7,8 ± 0,8 (I0)
Опыт	0,323 ± 0,030^{x} (I0)	I0,6 ± I,2^{x} (I0)

значение и другие механизмы, которые определяют избирательность его взаимодействия с иммунокомпетентными клетками.

§ 6. Изменение активности мембраносвязанных ферментов при активации лимфоцитов α-тромбином

Физиологические последствия описанной выше тромбин-индуцированной реорганизации мембран лимфоцитов могут реализовываться через модулирование ферментативных свойств мембраносвязанных ферментов. Модификации подвержены лишь особо чувствительные субъединичные белковые молекулы, обладающие аллостерическими свойствами. К подобным белкам относят 5'-нуклеотидазу (34) и γ-глутамилтранспептидазу (I5).

Учитывая это, было решено провести сравнительное исследование активности 5'-нуклеотидазы и γ-глутамилтранспептидазы в ин-

тактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах. Полученные данные представлены в табл. 49. Видно, что активация лимфоцитов тромбином сопровождается достоверным снижением активности 5'-нуклеотидазы и увеличением - γ-глутамилтранспептидазы.

Таблица 49

Активность 5'-нуклеотидазы и γ-глутамилтранспептидазы в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах селезенки

Условия	5'-нуклеотидаза, мкг Р/10^7 клеток · ч	γ-глутамилтранспептидаза, мкм · $мин^{-1}$ · мг $белка^{-1}$
Контроль	45,0 ± 3,4	0,318 ± 0,046
	(16)	(14)
Опыт	31,0 ± 2,1^x	0,393 ± 0,054^x
	(16)	(14)

Перейдем к вопросу о возможных причинах и функциональной роли изменений активности мембрано-связанных ферментов в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Здесь мы с неизбежностью попадаем в область спекуляций, и это определяется прежде всего множественностью и сложностью эффектов тромбина на уровне клетки. Сюда относятся столь разнообразные и внешне друг с другом не связанные явления, как активация макромолекулярных биосинтетических процессов, экскреции ДНК, модификации липидного состава мембран, стимуляции транспорта глюкозы и т.д.

5'-Нуклеотидаза, будучи эктоферментом, располагается преимущественно на плазматической мембране лимфоцитов и гидролизует внеклеточные пиридиннуклеотидмонофосфаты с образованием соответ-

ствующих нуклеозидов (34). Функция 5'-нуклеотидазы важна для активации сократительных процессов, регуляции активности аденилатциклазы иммунокомпетентных клеток и транспорта в них аденозина через плазматические мембраны (33). Известно, что 5'-нуклеотидаза плазматической мембраны лимфоцитов тесно ассоциирована с микрофиламентами цитоскелета (171). Причем, фибриллярный актин оказывает ингибирующий эффект на активность 5'-нуклеотидазы. Учитывая литературные данные о рецептор-индуцированной полимеризации актина как решающем событии в активации иммунокомпетентных клеток (312), можно предположить, что угнетение 5'-нуклеотидазной активности в тромбин-стимулированных лимфоцитах обусловлено сдвигом вправо в системе глобулярный $\rightleftharpoons$ фибриллярный актин. Альтернативным объяснением может служить предположение о модулировании активности 5'-нуклеотидазы как в результате изменения физического состояния липидного бислоя, так и специфического влияния липидных компонентов мембраны (67).

С физиологической точки зрения важен тот факт, что аденозин угнетает функцию лимфоцитов, в частности их бласттрансформацию, вызванную поликлональными митогенами (35, 160). Поэтому можно полагать, что ингибирование 5'-нуклеотидазы в тромбин-стимулированных лимфоцитах будет вызывать угнетение внеклеточного гидролиза аденозинмонофосфата и поглощения аденозина лимфоцитами, устраняя тем самым отрицательное влияние аденозина, направленное на консервацию лимфоцитов в состоянии покоя (35).

Важно также отметить, что первичным эффектом ингибирования 5'-нуклеотидазы является активация синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот, необходимая для клеточного деления (340).

γ-Глутамилтранспептидаза в составе γ-глутамильного цик-

ла участвует в активном транспорте аминокислот через клеточную мембрану и выступает в качестве регулятора метаболизма глутатиона (I5, 30). Исходя из этих представлений, можно полагать, что наблюдаемая активация γ-глутамилтранспептидазы в тромбин-стимулированных лимфоцитах необходима для увеличения транспорта аминокислот и внутриклеточного пула восстановленного глутатиона, который принимает активное участие в защите белков и липидов мембран от перекисей и свободных радикалов (23I).

§ 7. О возможности внутриклеточного действия α-тромбина при стимуляции лимфоцитов

Ранее (глава I) уже указывалось, что стимуляция фибробластов тромбином происходит в два этапа: первый заключается в связывании со специфическими рецепторами на поверхности клетки и протеолизе одного или нескольких поверхностных белковых компонентов, а второй - в интернализации и взаимодействии с внутриклеточными субстратами (276).

Исходя из этого, можно предположить, что тромбин действует не только на поверхности лимфоцитов, но и на субстраты, расположенные внутриклеточно.

Для проверки этого предположения были проведены следующие эксперименты. Прежде всего было показано, что уже через 60 мин культивирования лимфоцитов с тромбином в лизате ядер обнаруживается его специфическая активность, оцениваемая по свертыванию фибриногена и по высвобождению флуоресцентно-меченых фибринопептидов из препаратов дансилированного фибриногена (табл. 50). Существенно, что лизаты ядер интактных лимфоцитов, а также лимфоцитов, подвергшихся кратковременной обработке тромбином (5-I0 мин), не проявляют фибриноген-свертывающей активности. Эти ре-

зультаты убедительно доказывают, что наличие фибриноген-свертывающей активности в лизатах ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов обусловлено интернализацией молекул тромбина в ядра клеток в процессе культивирования, а не адсорбцией на поверхности ядер при их выделении.

Значительный интерес представляют данные электрофоретического исследования ядерных белков интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов, культивируемых в течение 60 мин (рис. 32, 33). При значительном сходстве электрофоретического профиля анализируемых образцов обращают на себя внимание и некоторые различия, которые касаются в основном трех компонентов "а", "б" и "в", присутствующих только в ядрах тромбин-стимулированных лимфоцитов.

Другой интересной чертой, обнаруженной при анализе электрофореграмм, является значительное уменьшение количества гистона H I.

Таблица 50

Фибриноген-свертывающая активность лизата ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши

Условия	Время свертывания фибриногена, сек	Интенсивность флуоресценции фибринопептидов, отн. ед.
α-Тромбин (5 мкг/мл)	34,2 ± I,I (6)	73,8 ± 4,4 (6)
Лизат ядер ($5 \cdot 10^6$ клеток)	239 ± 8,4 (6)	II,3 ± 0,7 (6)

Появление в активированных лимфоцитах белковых ядерных компонентов, отсутствующих в интактных клетках, может иметь по крайней мере две равнозначные интерпретации. С одной стороны, оно мо-

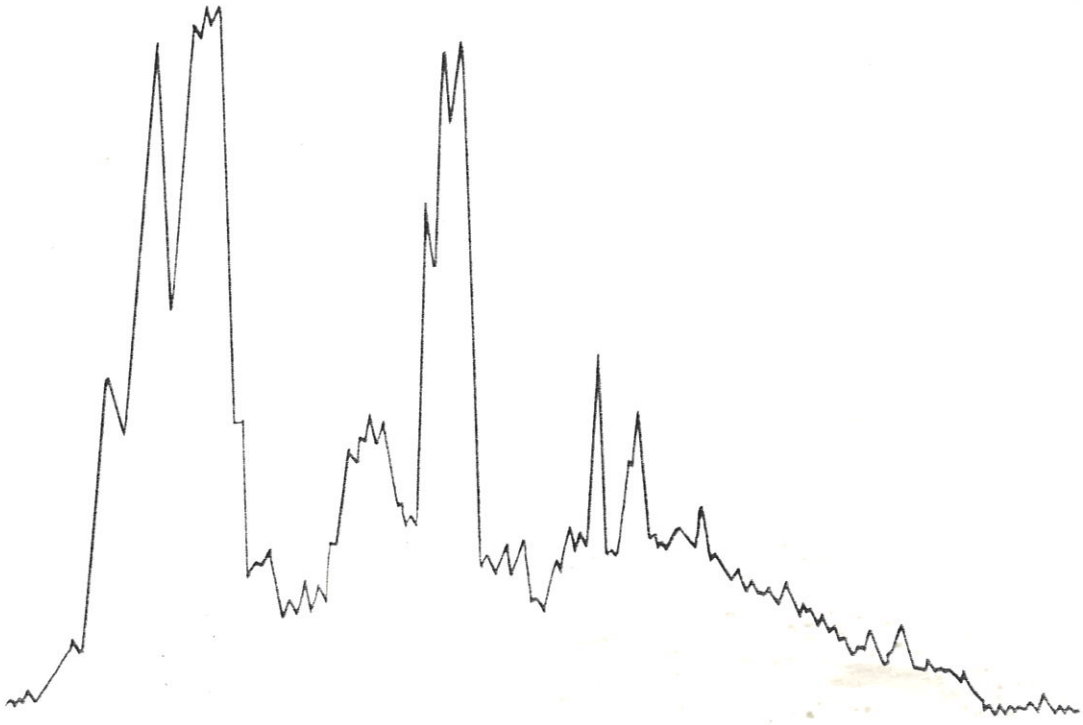


Рис. 32. Электрофорез в градиентном полиакриламидном геле ядерных белков интактных лимфоцитов селезенки мыши. Условия электрофореза: линейный градиент (8-20%) полиакриламидного геля с 0,2% додецилсульфатом натрия,0,38М трис-HCI, pH 8,8. Электродный буфер - 0,025 М трис, 0,I92 М глицин и 0,I% додецилсульфат натрия. Ядра лимфоцитов лизировали в 0,I М трис-HCI буфере, pH 6,8, содержащем 2%-ный додецилсульфат и 2%-ный 2-меркаптоэтанол.

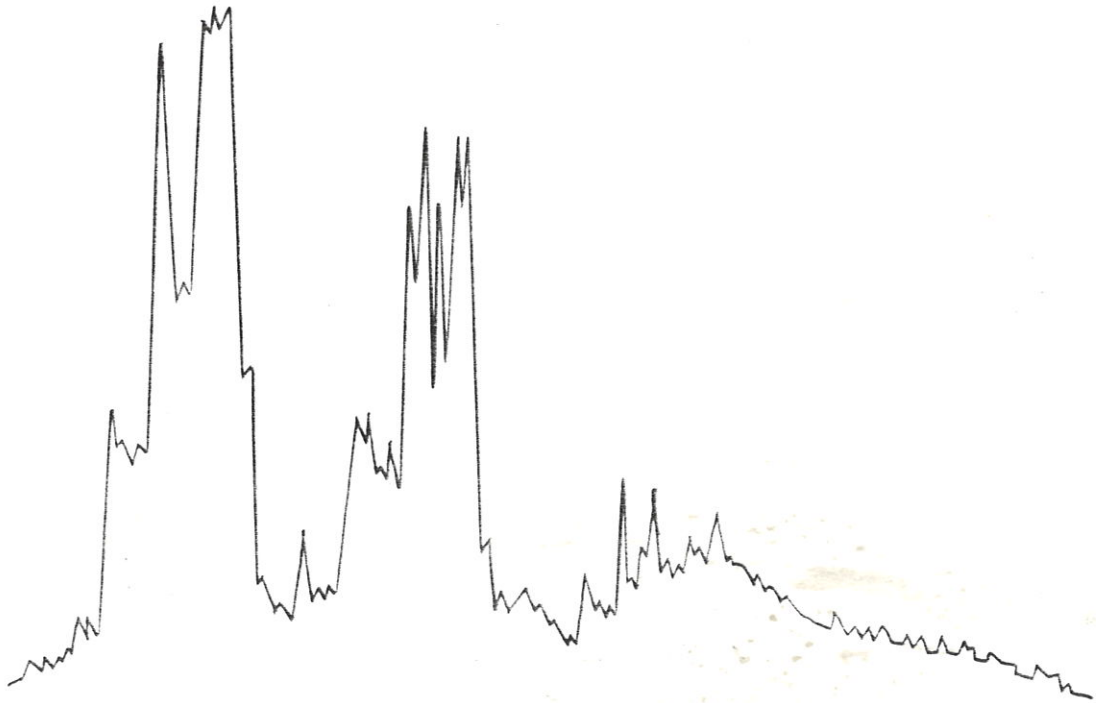


Рис. 33. Электрофорез в градиентном полиакриламидном геле ядерных белков тромбин-стимулированных лимфоцитов селезенки мыши. Условия электрофореза те же, что и на рис.32.

жет быть отражением синтеза новых белков, специфичных для тромбин-стимулированных лимфоцитов. Однако поскольку аналогичная электрофоретическая картина ядерных белков наблюдалась и при активации лимфоцитов на фоне ингибирования синтеза белка циклогексимидом (I00 мкг/мл), то возможность синтеза de novo этих белковых компонентов исключается. С другой стороны, возможна и другая интерпретация - эти белковые компоненты могут являться продуктами протеолитической деградации более высокомолекулярных ядерных белков. На эту возможность указывают следующие факты. Анализ электрофореграмм тромбин-стимулированных лимфоцитов показал, что гистон Н I и белковые компоненты "а" и "б" окрашиваются после электрофореза в полиакриламидном геле с помощью кумасси бриллиантового голубого R -250 в красный цвет, в то время как все другие окрашенные белки проявлялись в виде голубых полос. Для гистона Н I феномен метахромазии описан ранее (I97). Сопоставление этих сведений с приведенными выше собственными данными об уменьшении количества гистона Н I в тромбин-стимулированных лимфоцитах свидетельствует в пользу того, что при активации лимфоцитов тромбином, по-видимому, имеет место протеолитическая деградация гистона Н I, приводящая к образованию и появлению на электрофореграмме ядерных белков метахроматических фрагментов "а" и "б".

Установление природы третьего компонента "в", совпадающего по электрофоретической подвижности с В-цепью тромбина, представляет существенный интерес с точки зрения обоснования возможности внутриклеточного действия тромбина при активации лимфоцитов. Безусловно, сам по себе факт совпадения электрофоретической подвижности не является достаточным доказательством для заключения об

их идентичности. Для получения однозначного доказательства идентичности или различия этих двух белков было проведено исследование с использованием ^{125}I-тромбина, которое показало, что из всех ядерных белков на электрофореграмме только компонент "в" характеризуется наличием радиоактивной метки.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что -тромбин способен интернализоваться лимфоцитами и подвергаться транслокации в ядра культивируемых клеток. Не исключено, что уменьшение количества гистона Н I и появление продуктов его деградации в стимулированных лимфоцитах может быть результатом его ограниченного протеолиза тромбином.

§ 8. Заключение

Характеризуя состояние проблемы в начале настоящей главы, мы выделили следующие метаболические пути различных фосфолипидов, которые могут быть вовлечены в активацию лимфоцитов митогенными лектинами:

I. Синтез и распад фосфатидилинозитола (2I0).

2. Синтез и распад фосфатидилхолина (292).

3. Ступенчатое метилирование фосфатидилэтаноламина, приводящее к образованию фосфатидилхолина (238).

4. Оборот жирнокислотных цепей фосфолипидов, катализируемый фосфолипазой A_2 и ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазой (3I5).

5. Метаболизм свободной арахидоновой кислоты, приводящий к образованию простагландинов и липоксигеназных продуктов (237, 296).

В ходе работы возник естественный вопрос о роли этих метаболических путей в тромбин-индуцированной активации лимфоцитов. В условиях стимуляции лимфоцитов тромбином нами отмечено увеличение

синтеза фосфатидилхолина de novo , существенное изменение состава фосфолипидов: растет содержание фосфатидилхолина при одновременном снижении лизофосфатидилхолина, значительный сдвиг в жирнокислотном составе тотальных фосфолипидов: содержание насыщенных жирных кислот падает, а ненасыщенных возрастает. При исследовании жирнокислотного состава отдельных фосфолипидов установлено предпочтительное включение линолевой кислоты в фосфатидилхолин, а арахидоновой - в фосфатидилэтаноламин в тромбин-стимулированных лимфоцитах по сравнению с интактными лимфоцитами.

Взаимосвязь между этими метаболическими изменениями фосфолипидов и конечным митогенным эффектом в тромбин-стимулированных лимфоцитах не установлена. Поэтому осуществить выбор из множества метаболических изменений фосфолипидов, наблюдаемых в тромбин-стимулированных лимфоцитах, лишь тех, которые несут ответственность за конечную активацию синтеза ДНК, крайне сложно.

Как указывалось выше тромбин стимулирует в лимфоцитах синтез фосфатидилхолина. Однако имеются убедительные данные, что активация синтеза фосфатидилхолина не является существенным событием для проявления реакции бласттрансформации (292). Учитывая это, можно полагать, что наблюдаемая нами активация синтеза фосфатидилхолина проявляется параллельно с развитием раннего этапа митогенного ответа, но не является необходимым процессом для стимуляции синтеза ДНК в лимфоцитах под влиянием тромбина.

Сравнительное исследование жирнокислотного состава фосфатидилхолина интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов позволило исключить активацию метилирования фосфатидилэтаноламина как необходимый этап в процессе тромбин-индуцируемого митогенеза.

Характер изменений фракционного (табл. 42) и жирнокислотного

состава фосфолипидов (табл. 43-45) свидетельствует в пользу активации ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазы в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Для оптимального функционирования ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазы необходимо непрерывное образование лизофосфатидилхолина как акцептора активированных жирных кислот. Во многих типах клеток образование лизофосфатидилхолина происходит под влиянием фосфолипазы А. Однако попытки определить наличие этого фермента в высокоочищенных лимфоцитах не увенчались успехом (349). Интересно, что в клетках, лишенных активности фосфолипазы А, ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансфераза может катализировать реакции деацилирования фосфолипидов (201). Поскольку включение жирной кислоты в фосфолипиды и ее высвобождение катализируется одним и тем же ферментом, то при высоких концентрациях активированных жирных кислот (и лизофосфатидов) будет преобладать синтез фосфолипидов, тогда как высокие концентрации свободного КоА-SH будут вызывать деацилирование фосфолипидов.

Исходя из этих представлений, заманчиво предположить, что активация одного фермента, ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазы, может быть ответственной за ускоренный оборот жирнокислотных цепей фосфолипидов, приводящий к специфическим изменениям их жирнокислотного состава, обнаруженным в тромбин-стимулированных лимфоцитах.

Несмотря на то, что нами не проводилось исследование обмена фосфатидилинозитола уместно привести данные о том, что активация В-лимфоцитов липополисахаридом не приводит к индукции цикла этого фосфолипида, считающегося ключевым процессом на ранних стадиях активации (224). Кроме того, оказалось, что не все агенты, стимулирующие пролиферацию клеток, увеличивают оборот фосфатидилинози-

тола (285). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что активация обмена фосфатидилинозитола, по-видимому, не обязательная для стимуляции лимфоцитов.

Мнения относительно возможной роли в активации лимфоцитов изменения метаболизма свободной арахидоновой кислоты довольно противоречивы (296).

Таким образом, анализ собственных и литературных данных, касающихся вовлеченности обмена различных фосфолипидов в активацию лимфоцитов, позволяет придти к выводу о том, что наиболее вероятным кандидатом на роль раннего процесса необходимого как для лектин-, так и тромбин-индуцированного митогенеза является изменение жирнокислотного состава фосфолипидов клеточных мембран, проявляющееся в увеличении содержания полиненасыщенных жирных кислот. Такой характер изменения жирнокислотного состава фосфолипидов мембран лимфоцитов, по-видимому, обусловлен активацией оборота ацильных частей фосфолипидов, катализируемого ацилКоА-фосфатидилхолин-ацилтрансферазой.

Включение полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипиды путем ацилирования лизофосфатидов увеличивает текучесть липидного бислоя (201). Поэтому, на первый взгляд, было бы уместно рассмотреть потенциальную роль модификации состава липидов в повышении текучести липидной фазы мембран лимфоцитов. Однако на многочисленных примерах доказано отсутствие строгой корреляции между изменениями текучести, с одной стороны, и содержанием каких-либо определенных фракций липидов - с другой (19). Согласно представлениям Е.Б.Бурлаковой (19) текучесть липидов - величина интегральная, зависящая от многих факторов, и поэтому ее изучение не может быть заменено исследованием состава липидов.

Используя методы зондовой флуоресценции и ЭПР-спектроскопии нами установлено, что под влиянием тромбина происходит структурная перестройка мембран лимфоцитов, проявляющаяся увеличением текучести их липидной компоненты. Изменение физического состояния липидной фазы мембран в тромбин-стимулированных лимфоцитах не сопровождается изменением полярности бислоя как в поверхностных слоях (на глубине 0,6-0,8 нм от поверхности мембраны), так и в более глубоких зонах (на глубине I,2 - I,4 нм).

Известно, что пероксидация мембран приводит к увеличению полярности бислоя (86) и уменьшению текучести липидной фазы мембран (23, 85). И, наконец, имеются сведения о том, что активация ПОЛ приводит к тушению флуоресценции АНС, ФНА и пирена, встроенных в мембраны (36, 45).

Сопоставляя эти литературные данные с результатами собственных исследований, можно исключить возможность активации ПОЛ в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Действительно, нами показано, что при активации лимфоцитов тромбином интенсивность ПОЛ не растет, а, наоборот, падает (табл. 48). Этот результат заслуживает особого внимания в свете гипотезы о роли свободнорадикального механизма в регуляции размножения клеток, суть которой заключается в том, что увеличение количества антиоксидантов и уменьшение концентрации свободных радикалов приводят к ускорению пролиферации (I9). Интересно отметить, что природные и синтетические антиоксиданты, блокирующие образование перекисей липидов, стимулируют пролиферацию клеток (287). Исходя из этих представлений, а также данных об антиоксидантных свойствах различных иммуностимуляторов (68), можно предположить, что угнетение ПОЛ под влиянием тромбина, по-видимому, является одним из важнейших механизмов перевода

лимфоцитов в стимулированное состояние.

Обнаруженное нами изменение активности γ-глутамилтранспептидазы и 5'-нуклеотидазы, вероятно, обусловлено не только простым изменением физико-химических свойств липидной фазы мембран тромбин-стимулированных лимфоцитов, но и изменением специфических взаимодействий фосфолипид (жирная кислота) - фермент. Наблюдаемый характер изменений активности мембраносвязанных ферментов может способствовать , с одной стороны, увеличению внутриклеточного пула аминокислот и восстановленного глутатиона, являющегося антиокислителем (231), и активации синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот с другой стороны (340).

Данные о наличии фибриноген-свертывающей активности в ядрах тромбин-стимулированных лимфоцитов (табл. 50) и результаты экспериментов с ^{125}I-тромбином позволяют придти к заключению о возможности интернализации тромбина в процессе культивирования. Возможно, потенциальной внутриклеточной мишенью интернализованного тромбина является гистон Н I. На эту возможность указывают данные об уменьшении количества гистона Н I и появлении продуктов его ограниченного протеолиза среди ядерных белков тромбин-стимулированных лимфоцитов.

Обобщая результаты настоящего раздела, мы можем сформулировать следующие положения, отражающие новизну полученной информации.

При активации лимфоцитов α-тромбином происходит модификация липидного состава лимфоцитов, заключающаяся в уменьшении холестерина, лизофосфатидилхолина, соотношения холестерин/фосфолипиды и увеличении фосфатидилхолина, индекса ненасыщенности фосфолипидов, а также структурная перестройка мембран, проявляющаяся

увеличением текучести их липидной компоненты без изменения полярности бислоя и изменением активности мембраносвязанных ферментов: 5'-нуклеотидазы и γ-глутамилтранспептидазы.

Преимущественное включение полиненасыщенных жирных кислот в основные фосфолипидные компоненты мембран - фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин - и угнетение ПОЛ являются одними из важнейших пусковых механизмов активации лимфоцитов α-тромбином.

При взаимодействии с лимфоцитами α-тромбин оказывает не только трансмембранное влияние, но подвергается интернализации и транслокации в ядра клеток, где, по-видимому, его возможной мишенью является гистон Н I.

ГЛАВА УI. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Описанные в работе теоретические и экспериментальные данные дают возможность суммировать представления о структурных аспектах высокой специфичности α-тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам, выделить в его молекуле структуры, принимающие участие в формировании детерминант для рецепторного связывания со специфическими рецепторами клеток, а также предложить схему активации лимфоцитов α-тромбином.

Необходимо оговориться, что большинство структурных особенностей α-тромбина в сравнении с гомологичными сериновыми протеиназами были подробно рассмотрены в I и Ш главах работы. В настоящем заключении будет обращено внимание лишь на основные, отличительные структурные характеристики α-тромбина. Это сделано с единственной целью - связать воедино всю совокупность его уникальных структурных особенностей и найти конкретное приложение этих особенностей к объяснению высокой специфичности α-тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам.

Делая краткий исторический экскурс, напомним, что до сих пор трехмерная структура α-тромбина экспериментально не установлена. Пока сделаны лишь первые попытки кристаллизации и рентгеноструктурного анализа α-тромбина (283). К началу настоящей работы развитие прямых представлений о структурных основах специфичности α-тромбина было практически ограничено рамками сравнительного анализа первичных структур α-тромбина и гомологичных сериновых протеиназ (I02-I04, II0, I96, 27I, 34I). Такой анализ дал много важной информации о том, какие же структурные особенности α-тромбина могут являться причиной его высокой

функциональной селективности. Однако рамки этого подхода не позволили получить более полную информацию, необходимую для адекватного объяснения высокой специфичности α-тромбина. Поэтому в настоящей работе предпринята попытка осмысливания специфичности α-тромбина на более высоком уровне его структурной организации, а именно, на уровне элементов вторичной структуры. Такая постановка вопроса привела к необходимости разработки и совершенствования теоретических методов предсказания структурного класса и вторичной структуры глобулярных белков по их аминокислотной последовательности. Касаясь этой проблемы, следует указать, что конец 60-х и 70-ые годы характеризовались широким поиском корреляций между аминокислотной последовательностью и вторичной структурой белков (225, 70, 71, 94, 120, 180, 186, 258, 301, 303). Вместе с тем, в начале 80-х годов появились публикации, в которых в довольно категоричной форме отрицалась сама возможность использования таких корреляций для адекватного предсказания вторичной структуры белков (89). Наши первые работы по разработке метода предсказания вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности были начаты в упомянутый период сомнений (8). Приступая к исследованию этой проблемы, мы отдавали себе отчет в том, что только на конкретных примерах можно доказать обратное, т.е. убедиться в самом факте существования такой взаимосвязи, позволяющей производить предсказание вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности с достаточной достоверностью. Нам удалось сделать это. Так, сравнение количественных параметров точности предсказания элементов вторичной структуры глобулярных белков, полученных при помощи используемого нами алгоритма (8) и наиболее признанным методом, основанным

на общих стереохимических соображениях о возможности встраивания участков вторичной структуры в гидрофобное ядро (70, 71), дало основание полагать, что предлагаемый метод может быть эффективно применен для предсказания структурированных участков белков с неизвестной пространственной структурой. Однако, было очевидно, что параметры предложенного алгоритма нуждаются в совершенствовании. Во-первых, для получения более достоверных данных необходимо было увеличить выборку базисных белков с известной трехмерной структурой. Во-вторых, алгоритм значительно завышал число и протяженность β-структурных участков, а также не учитывал особенностей локализации пролина в α-спиральных участках и т.д. Стремление продолжить начатое и послужило отправной точкой последующей работы, положенной в основу Ш главы настоящей работы.

На первом этапе исследования было показано, что нулевую гипотезу о случайном спаривании аминокислотных остатков в β-структуре и нерегулярных участках белков можно исключить с высокой степенью надежности; распределение аминокислотных пар i , $i + I$ в α-спиралях не отличается от случайного. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что между ближайшими аминокислотными остатками существуют определенные предпочтения и поэтому информация из частот встречаемости пар остатков i , $i + I$, отражающая взаимодействие между близкими по цепи остатками, может быть использована как для разработки алгоритма предсказания структурного класса, так и для повышения качества предсказания вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности. К началу настоящей работы не существовало ни одного способа представления аминокислотной последовательности белка с неизвестной пространственной структурой, содержащего информацию о его структур-

ном классе.

На основе двумерного представления аминокислотной последовательности глобулярных белков на квадратных матрицах 20 x 20 нами разработан алгоритм предсказания структурного класса белков по их первичной структуре. Показано, что для полностью α-спиральных белков алгоритм правильно предсказывает структурный класс в 100% случаев; для β-структурных - в 97% случаев; для $\alpha+\beta$ и α/β белков - в 94% случаев. При одновременном определении структурного класса всех белков алгоритм правильно предсказывает структурный класс с общей эффективностью метода, равной 87,5%.

Данные о частотах встречаемости аминокислотных пар i , i+ I в белках с известной пространственной структурой позволили разработать также оригинальные алгоритмы предсказания α-спиралей, β-структуры и β-поворотов глобулярных белков. Алгоритмы правильно предсказывают 85,9% остатков, входящих в α-спирали; 72,4% остатков, входящих в β-структуру и 70,7% остатков, входящих в β-повороты.

На сегодняшний день предложенный нами способ двумерного представления аминокислотной последовательности является единственным теоретическим методом предсказания структурного класса глобулярных белков, а алгоритмы предсказания элементов вторичной структуры являются одними из лучших в сравнении со всеми ныне существующими вероятностными методами предсказания (табл. I4).

Переходя к обсуждению данных о структурных аспектах высокой специфичности α-тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам, необходимо напомнить, что эта проблема может представлять не только значительный академический интерес в связи с

дальнейшим развитием структурных основ ферментативного катализа, но и с точки зрения фундаментального обоснования целенаправленного синтеза ингибиторов тромбина - потенциальных антикоагулянтов для использования в медицинской практике.

Использование разработанных нами алгоритмов позволило впервые предложить вероятную модель вторичной структуры α-тромбина. Согласно этой модели, А-цепь α-тромбина содержит 24% α-спиралей, 6% β-структуры и 18% β-поворотов, а В-цепь - 14% α-спиралей, 29% β-структуры и 31% β-поворотов. Эти результаты находятся в удовлетворительном согласии с экспериментальными данными, полученными методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния.

Прежде чем непосредственно перейти к анализу структурных аспектов узкой специфичности α-тромбина по отношению к высокомолекулярным субстратам, уместно еще раз отметить, что свойства α-тромбина как биорегулятора обусловлены существованием в молекуле, наряду с собственно активным центром, первичного кармана связывания, вторичной контактной зоны, а также дополнительного центра узнавания высокомолекулярных субстратов, расположенного вне классического активного центра фермента (102-105, 110, 111). Однако, структуры, участвующие в формировании различных участков контактной зоны α-тромбина еще не выяснены.

Способность тромбина гидролизовать эфиры и амиды аргинина и лизина, хотя и меньшей каталитической активностью по сравнению с трипсином, свидетельствует о том, что контактный участок его активного центра аналогичен трипсиновому (103). Вместе с тем, согласно предлагаемой вероятной модели вторичной структуры α-тромбина конформационное состояние аминокислотных остатков триады ак-

тивного центра (His 43, Asp 99 и Ser 205) значительно отличается от состояния соответствующих остатков у трипсина и α-химотрипсина, что может быть одной из причин нарушения эффективности системы переноса протона, приводящих к снижению реакционной способности α-тромбина по отношению к низкомолекулярным синтетическим субстратам.

В молекуле α-тромбина в отличие от гомологичных сериновых протеиназ у дна кармана связывания первичного имеется вставка Gly I95 - Lys - Arg - Gly I98, аминокислотные остатки которой по данным теоретического предсказания элементов вторичной структуры участвуют в формировании β-поворота на участке I97-200 В-цепи фермента. Аминокислотный состав β-поворота I97-200 (наличие глицина и аминокислот с ионогенными боковыми радикалами) свидетельствует о локализации этого участка полипептидной цепи на поверхности глобулы α-тромбина. Важно отметить, что одним из внутренних аминокислотных остатков β-поворота I97-200 является остаток Asp I99, находящийся на дне кармана первичного связывания и обусловливающий трипсиноподобную специфичность α-тромбина. Формирование β-поворота у дна кармана первичного связывания в молекуле α-тромбина в отличие от гомологичных сериновых протеиназ, несомненно, приведет к структурному усложнению контактной зоны фермента, которое может играть определенную роль в механизме катализа тромбином высокомолекулярных субстратов.

Методом флуоресцентной спектроскопии α-тромбина и его комплексов с фенилметилсульфонилфторидом нами показано, что в непосредственной близости от остатков триады активного центра тромбина находятся два остатка триптофана, которые, вероятно, могут

принимать участие в формировании гидрофобного связывающего участка этого фермента. Имеются и другие экспериментальные данные, свидетельствующие о наличии неполярного участка вблизи активного центра тромбина (355). Если наше предположение об участии двух остатков триптофана в формировании неполярного связывающего участка фермента является правильным, то в белковых субстратах тромбина следует ожидать существования комплементарного неполярного участка вблизи тромбинчувствительных связей. Полученные нами данные убедительно подтвердили это предположение. Так, теоретическое предсказание элементов вторичной структуры в области тромбин-чувствительных связей показало, что у фибринопептидов А различного происхождения на участке P_3-P_6 предсказывается формирование β-поворота, который будет способствовать образованию гидрофобного кластера в результате пространственного сближения разобщенных вдоль цепи массивных гидрофобных радикалов валина (P_2) и фенилаланина (P_9) слева от атакуемой тромбином пептидной связи Arg I6 - Gly I7. Важно отметить, что и в других белковых субстратах α-тромбина (протромбин, фактор XIII, антитромбин III) нами показана принципиальная возможность образования гидрофобного кластера к N-концу от пункта протеолиза в результате пространственного сближения неполярных боковых радикалов двух-трех аминокислотных остатков. Эти данные находятся в согласии с ранее выдвинутой гипотезой о том, что α-тромбин эффективно расщепляет лишь те субстраты, которые могут дополнительно экранировать Asp I99 от растворителя (46).

На важную роль вторичных гидрофобных участков связывания в механизме каталитического действия α-тромбина указывают обширные данные субстратного, лигандного и ингибиторного анализа

(48, II0, I25, 293). Вместе с тем, имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что существование в структуре α-тромбина вторичного гидрофобного участка связывания хотя и необходимо для гидролиза высокомолекулярных субстратов, но не определяет узкой специфичности фермента (III).

Таким образом, вся совокупность приведенных нами собственных и литературных данных позволяет заключить, что гидрофобное взаимодействие между неполярным участком, находящимся вблизи активного центра α-тромбина, и комплементарным ему неполярным участком к $_{N}$ -концу от тромбин-чувствительной связи, приводящее к дополнительному экранированию $_{Asp}$ I99 на дне кармана первичного связывания от растворителя, является существенным фактором эффективного гидролиза белков, но не обеспечивает узкой специфичности фермента в выборе физиологических высокомолекулярных субстратов.

Как уже указывалось выше, в молекуле α-тромбина имеется особый, дополнительный участок связывания высокомолекулярных субстратов, комплементарный области фибриногена, обеспечивающей эффективность функции фермента (I2, I56). Локус узнавания тромбина находится в С-концевой области участка I-5I Аα -цепи фибриногена (I56). Конкретная же локализация центра связывания высокомолекулярных субстратов в молекуле α-тромбина еще не полностью ясна. Естественно, что локус узнавания α-тромбина в молекуле фибриногена предъявляет строго определенные структурные требования к центру связывания высокомолекулярных субстратов фермента. Поэтому понятен интерес к анализу первичной и вторичной структуры Аα -цепи фибриногена. Результаты предсказания свидетельствуют о том, что на участках 29-32, 37-40 и 40-45 Аα

-цепи фибриногена человека формируются β-повороты. Ярко выраженная особенность аминокислотного состава β-поворотов 29-32 и 37-40, заключающаяся в высоком содержании отрицательно заряженных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, предполагает их локализацию на поверхности молекулы. Учитывая важную роль поверхностных β-поворотов в макромолекулярном узнавании (332), можно полагать, что комплементарный участок узнавания высокомолекулярных субстратов α-тромбина должен характеризоваться высоким содержанием аминокислот с положительно заряженными боковыми радикалами. С другой стороны, анализ первичной структуры A α-цепи фибриногена указывает на то, что между β-поворотами 29-32 и 37-40 находится гидрофобный кластер, образованный боковыми радикалами тетрапептидного участка Trp 33 - Pro - Phe - Cys 36. Это, в свою очередь, требует наличия в центре узнавания высокомолекулярных субстратов α-тромбина комплементарного неполярного участка.

Известно, что превращение α-тромбина в β- и γ-формы сопровождается нарушением именно центра узнавания высокомолекулярных субстратов, ответственного за взаимодействие α-тромбина с фибриногеном (III). Поэтому для уяснения структурных основ уникальной специфичности α-тромбина существенный интерес представляло сравнение структурных особенностей α-тромбина и его модифицированных форм (β- и γ-тромбин), лишенных фибриноген-свертывающей активности. Данные теоретического предсказания вторичной структуры свидетельствуют о том, что пептидные связи Lys 65 - His 66 и Arg 73 - Asn 74, подвергающиеся расщеплению в процессе превращения α-тромбина в β-тромбин, находятся в конформации β-поворота и нерегулярной конформации, соот-

ветственно. Учитывая важную роль поверхностных β-поворотов в обеспечении узнавания макромолекулами друг друга (332), а также высокое содержание аминокислотных остатков с положительно заряженными боковыми радикалами (Lys 65, His 66 и Arg 68), выдвинуто предположение, что разрушение β-поворота 64–68 в результате расщепления связи Lys 65 - His 66 является существенным моментом в деградации структуры, необходимой для узнавания фибриногена. Следует также напомнить, что вблизи этого локуса биологической деградации α-тромбина находится вставка Lys 52 - Leu 60, аминокислотные остатки которой участвуют в формировании β-поворота 5I–54 и области нестабильной конформации на участке 58–64 В-цепи фермента, характеризующей, вероятно, потенциальную способность фермента реагировать с различными высокомолекулярными субстратами в нескольких структурно-функциональных состояниях. Существенно, что эти участки являются полностью консервативными в молекулах тромбина человека и быка. Вблизи этой вставки находятся участки В-цепи α-тромбина, способные формировать неполярную зону, комплементарную области фибриногена, обеспечивающей эффективность функции фермента. К ним могут быть отнесены участки: Tyr 47 - Pro - Pro - Trp 50 или Leu 59 - Leu - Val - Arg - Ile 63. Важно, что в рассматриваемом выше сегменте имеются остатки лизина, тирозина и триптофана, т.е. аминокислотные остатки, которые по данным химической модификации являются существенными для суперспецифичности α-тромбина (I03).

Вся совокупность перечисленных нами данных, касающихся локализации дополнительного центра узнавания высокомолекулярных субстратов в молекуле α-тромбина, позволяет заключить, что элементы структуры фермента, определяющие его высокую функцио-

нальную специфичность по отношению к белковым субстратам вовлечены в конфигурацию вставки Lys 52 - Leu 60 и соседних с ней участков молекулы. Скорее всего дополнительный центр связывания высокомолекулярных субстратов, обусловливающий уникальную специфичность фермента, формируется структурами, расположенными на участке 47-73 В-цепи α-тромбина.

Актуальность анализа структурных особенностей молекулы α-тромбина не ограничена только выяснением структурных основ его узкой специфичности по отношению к высокомолекулярным субстратам, но и обусловлена необходимостью объяснения высокого сродства связывания фермента с рецепторами клеток.

Известно, что α-тромбин связывается со специфическими рецепторами клеточных мембран со сродством, на 2-4 порядка превышающим сродство его к фибриногену (58, I05, I99). Молекулярная природа тромбиновых рецепторов на плазматической мембране клеток, а также структурные основы высокого сродства связывания α-тромбина с ними не выяснены до сих пор. На основе обширного экспериментального материала (III) выдвинута гипотеза об определяющей роли центра узнавания высокомолекулярных субстратов как в специфичности α-тромбина к белковым субстратам, так и к рецепторам клеток.

Признавая ведущую роль центра узнавания высокомолекулярных субстратов в высокоаффинном связывании α-тромбина с клетками, мы полагаем, что тромбин-рецепторное взаимодействие опосредуется не только структурами этого центра, но и другими структурами, которые могут быть ответственными за проявление более высокого сродства связывания фермента со специфическими рецепторами клеток по сравнению с белковыми субстратами. На роль этих струк-

тур реально могут претендовать структуры, расположенные на участке I86-200 В-цепи α-тромбина. На это указывают следующие факты. В составе участка I86-200 В-цепи α-тромбина имеется тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr, который является высококонсервативным в β-субъединице, несущей основные детерминанты для рецепторного связывания, некоторых гликопротеиновых гормонов: фолликулостимулирующего, лютеинизирующего, хорионического гонадотропина и тиреотропина (245). Не исключено, что и в молекуле α-тромбина этот тетрапептид, по аналогии с гормонами, будет принимать участие в формировании структур, необходимых для его рецепторного связывания. В этом аспекте важно отметить, что особенности, характерные для взаимодействия типа гормон-рецептор обнаружены при использовании реакции возбуждения тромбином хеморецепторов сосудистой стенки (III, I93). Низкие значения величин констант диссоциации (10^{-7} - 10^{-9} М) комплексов α-тромбин-рецептор также позволяют отнести это взаимодействие к типу гормон-рецепторного (III). Значительный интерес представляют данные о том, что трипсин, не имеющий аналога центра узнавания высокомолекулярных субстратов, но содержащий тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr, связывается с рецепторами клеток столь же эффективно, как и α-тромбин, а химотрипсин и эластаза, не содержащие этого тетрапептида, связываются с клетками почти в I00 раз слабее, чем α-тромбин (300). Эти данные служат важным аргументом в пользу представлений о том, что тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr может быть вовлечен в связывание α-тромбина со специфическими рецепторами клеток.

Другой структурной особенностью рассматриваемого I5-членного участка В-цепи α-тромбина является наличие в нем трипептида

Arg - Gly - Asp, который содержится также в белках, связывающихся с рецепторным аппаратом плазматических мембран различных клеток (305). Имеются сведения о том, что синтетические пептиды, содержащие трипептид Arg - Gly - Asp , препятствуют адгезии клеток в присутствии фибронектина (305), подавляют агрегацию тромбоцитов α-тромбином (214) и ингибируют связывание фибриногена с активированными тромбоцитами (320). Эти данные являются прямым доказательством участия трипептида Arg - Gly - Asp этих белков в связывании с рецепторами клеток.

Согласно вероятной модели вторичной структуры α-тромбина участок полипептидной цепи между тетрапептидом Cys - Ala- Gly - Tyr и трипептидом Arg - Gly - Asp находится в конформации β-поворота. Это предполагает принципиальную возможность пространственного сближения этих пептидных фрагментов, приводящего к формированию участка связывающего сайта, который совместно с дополнительным центром узнавания высокомолекулярных субстратов принимает участие в формировании уникальной структуры, ответственной за высокоаффинное связывание α-тромбина со специфическими рецепторами клеток.

Ведущая роль центра узнавания высокомолекулярных субстратов в формировании этой уникальной структуры, ответственной за высокое сродство связывания α-тромбина с клетками, проявляется в том, что нарушение центра связывания высокомолекулярных субстратов в β/γ -формах тромбина сопровождается утратой их способности к связыванию с высокоаффинными рецепторами клеток (III, 170, 216, 220).

Анализ полученных нами и литературных данных привел нас к заключению, что в молекуле α-тромбина, наряду с усложненным

карманом первичного связывания, имеется неполярный связывающий участок в непосредственной близости от аминокислотных остатков триады активного центра, необходимый для эффективного гидролиза тромбин-чувствительных пептидных связей, но не обеспечивающий узкой специфичности фермента, дополнительный центр связывания на участке 47-73 В-цепи α-тромбина, обусловливающий его узкую специфичность к высокомолекулярным субстратам, а также центр узнавания на участке 186-200, который совместно с центром узнавания высокомолекулярных субстратов формирует уникальную структуру, ответственную за высокоаффинное связывание со специфическими рецепторами клеток.

Учитывая рецепторную природу взаимодействия α-тромбина с иммунокомпетентными клетками (129, 145), наши дальнейшие исследования были посвящены изучению молекулярных механизмов тромбин-индуцированной активации лимфоцитов селезенки мыши как одной из наиболее удобных моделей анализа процессов роста и пролиферации животных клеток. К началу настоящей работы в литературе отсутствовали какие-либо сведения о механизмах активации лимфоцитов α-тромбином.

Весьма оригинальные, на наш взгляд, данные получены при исследовании роли липидной матрицы мембран в тромбин-индуцированной активации лимфоцитов (глава У). Методами флуоресцентных и спиновых зондов доказано, что при активации лимфоцитов α-тромбином происходит структурная реорганизация мембран лимфоцитов в сторону разрыхления и увеличения текучести липидов бислоя без изменения полярности гидрофобной фазы мембран как в поверхностных слоях (на глубине 0,6-0,8 нм от поверхности мембраны), так и в более глубоких зонах (на глубине 1,2-1,4 нм). При анализе

этого факта несомненный интерес представляют данные о модифицирующем влиянии α-тромбина на интенсивность (угнетение) процессов переокисления липидов и липидный состав лимфоцитов, приводящим к уменьшению холестерина, лизофосфатидилхолина, соотношения холестерин/фосфолипиды, увеличению фосфатидилхолина и индекса ненасыщенности фосфолипидов. Рассматривая первый из упомянутых здесь аспектов модифицирующего влияния α-тромбина в свете гипотезы свободнорадикальной регуляции процессов роста и размножения клеток (I9), нами выдвинуто предположение о том, что угнетение перекисного окисления липидов под влиянием α-тромбина является одним из важнейших триггерных механизмов перевода лимфоцитов в стимулированное состояние.

Конкретные механизмы изменения фракционного и жирнокислотного состава фосфолипидов лимфоцитов при их активации α-тромбином остаются неизвестными, и недостаток имеющихся данных можно компенсировать только спекулятивными рассуждениями.

Сравнительный анализ фосфолипидного состава интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов свидетельствует в пользу того, что в последних наблюдается активация процесса ацилирования лизофосфатидов. Данные об изменении жирнокислотного состава основных фосфолипидов мембран лимфоцитов, а именно, увеличение линолевой кислоты в фосфатидилхолине и арахидоновой в фосфатидилэтаноламине также указывают на возможность активации ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазы в тромбин-стимулированных лимфоцитах. Подробно этот вопрос рассмотрен в главе У настоящей работы. Здесь же уместно напомнить, что само по себе увеличение содержания линолевой кислоты в фосфатидилхолине мембран лимфоцитов сопровождается активацией ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазы

(315). Такая автокаталитическая активация этого фермента может быть ответственной за поддержание стимулированного состояния лимфоцитов, подвергнутых обработке α-тромбином. Существенно и то, что ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансфераза может также катализировать реакции деацилирования фосфолипидов (201). Исходя из этих представлений, можно полагать, что увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах тромбин-стимулированных лимфоцитов обусловлено активацией оборота ацильных частей фосфолипидов, катализируемого ацилКоА-фосфатидилхолинацилтрансферазой.

Физиологические последствия описанной выше тромбин-индуцированной реорганизации мембран лимфоцитов, несомненно, реализуются через модулирование ферментативных свойств мембраносвязанных ферментов. Нами показано, что активация лимфоцитов α-тромбином сопровождается изменением активности 5'-нуклеотидазы (угнетение) и γ-глутамилтранспептидазы (активация). Такой характер изменения ферментативной активности этих мембраносвязанных ферментов может способствовать активации синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а также увеличению транспорта аминокислот и накоплению внутриклеточного пула восстановленного глутатиона (231, 340).

Говоря о трансмембранном действии α-тромбина, нельзя не остановиться и на другой возможной роли этого фермента в активации лимфоцитов. Речь идет об интернализации α-тромбина и его транслокации в ядра клеток после связывания со специфическими рецепторами плазматических мембран лимфоцитов. Возможность этого явления в культурах фибробластов плодотворно обсуждалась в литературе (276, 310). Тем не менее, факт интернализации α-тром-

бина лимфоцитами показан нами впервые и заставляет по особому взглянуть на эту проблему. Особенность этого взгляда заключается прежде всего в том, что в клеточно-опосредованных реакциях α-тромбин ведет себя не просто как фермент-протеиназа, а скорее как гормон, обладающий каталитической активностью: сначала связывается с клеточной поверхностью, а затем подвергается интернализации.

Данные о состоянии макромолекулярных биосинтетических процессов в интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитах рассмотрены в IУ главе работы. Установлено, что α-тромбин в концентрациях $2{,}6 \cdot 10^{-8}$ - $2{,}6 \cdot 10^{-7}$ М вызывает стимуляцию синтеза ДНК в лимфоцитах. Доказан протеолитический механизм этого эффекта α-тромбина, что явилось прямым подтверждением гипотезы (249), в соответствии с которой экзогенные протеиназы инициируют бласттрансформацию лимфоцитов, минуя стадию экспрессии эндогенных сериновых протеиназ, являющуюся необходимой для митогенной и антигенной стимуляции лимфоцитов (146, 260).

Важно указать, что нами впервые обнаружен стимулирующий эффект α-тромбина на спонтанный синтез ДНК в лимфоцитах селезенки. В этих же условиях во вновь синтезированной ДНК ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов наблюдается двукратное уменьшение доли палиндромных последовательностей. Эти данные позволили выдвинуть положение о том, что определенные участки генома могут проникать из ядра в цитоплазму, а, возможно, и через плазматическую мембрану во внеклеточную среду. На эту возможность указывают литературные данные об обнаружении ДНК немитохондриального происхождения в цитоплазме и культуральных супернатантах митогенстимулированных лимфоцитов (123, 138, 218, 337). Нами также показано,

что в культуральных супернатантах интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов содержится около I0-I2% вновь синтезированной в клетках ДНК. Представленные в работе данные (глава IУ) об отсутствии в культуральных супернатантах новосинтезированной РНК и маркерного фермента цитоплазмы лактатдегидрогеназы свидетельствуют в пользу того, что высвобождение ДНК из клеток является секреторным процессом, а не связано с гибелью или частичным распадом лимфоцитов в процессе культивирования. Дополнительно к ним следует отнести результаты, указывающие на отсутствие гиперхромного эффекта и гашения флуоресценции комплексов бромид этидия - нуклеиновая кислота при обработке экстраклеточного нуклеинового материала интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов РНКазой А. Существенно, что процесс экскреции ДНК не является специфичным только для иммунокомпетентных клеток. Так, фибробласты, клетки предсердия лягушки и различные опухолевые клетки также способны экскретировать часть собственной ДНК во внеклеточную среду (I3, 5I, 244, 338). Биологическая роль экстраклеточной ДНК остается неясной до сих пор.

Принимая во внимание наличие специфических рецепторов к ДНК на иммунокомпетентных клетках (I48, 204), было проведено исследование влияния экскретируемой лимфоцитами ДНК на функциональные свойства этих клеток. Показано, что экстраклеточная ДНК обладает иммуностимулирующим (активация синтеза ДНК, фагоцитоза и Е-розеткообразования) и тромбоцитагрегирующим действием. Эти данные указывают, с одной стороны, на возможную роль внеклеточной ДНК в регуляции функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а с другой позволяют рассматривать ее как новое звено взаимосвязи между системами иммунитета и гемостаза.

Обработка лимфоцитов оптимальной митогенной концентрацией α-тромбина (5 мкг/мл) в течение I часа не оказывает влияния на их РНК-синтетическую активность и соотношение различных типов быстромеченой РНК. Вместе с тем, судя по данным включения ^{3}Н-уридина в тотальную РНК лимфоцитов, культивируемых в течение 4-х часов, содержание новосинтезированной РНК достоверно выше в тромбин-стимулированных лимфоцитах по сравнению с контрольными клетками. На это же указывают результаты гель-фильтрации ^{3}Н-уридин-содержащего материала интактных и тромбин-стимулированных лимфоцитов (рис. 24, 25). Анализируя эти данные, мы пришли к выводу о том, что основным изменением метаболизма РНК на ранних стадиях активации лимфоцитов α-тромбином является накопление новосинтезированной РНК без увеличения транскрипционной активности, обусловленное, вероятно, ускорением процессинга первичных транскриптов и ядерно-цитоплазматического транспорта зрелых форм РНК.

Установлено, что активации синтеза белка в тромбин-стимулированных лимфоцитах предшествует накопление новосинтезированной рРНК, т.е. активация трансляции в данном случае не может быть обусловлена мобилизацией предсуществующих в клетках рибосом.

С нашей точки зрения, представленные в работе данные достаточно убедительно свидетельствуют в пользу представлений о том, что регуляторные механизмы тромбин-индуцированной активации лимфоцитов находятся как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях. С этим выводом весьма тесно перекликаются данные о том, что актиномициновый и кордицепиновый блоки полностью отменяют стимулирующее влияние α-тромбина на накопление новосинтезированной РНК и синтез белка в лимфоцитах (табл. 34, 35).

Особый интерес для понимания и расшифровки молекулярных механизмов активирующего влияния α-тромбина на биосинтетические макромолекулярные процессы имеют данные по исследованию внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+}, кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов. Результаты этих серий опытов свидетельствуют о том, что протеолитическая модификация лимфоцитов оптимальной митогенной концентрацией α-тромбина (5 мкг/мл) сопровождается ростом внутриклеточного уровня цГМФ, простагландинов группы Е, свободного цитоплазматического кальция и цитозольного кальмодулина.

Показано, что культивирование лимфоцитов в присутствии ингибитора кальциевых каналов верапамила и специфического антагониста кальмодулина трифторперазина полностью снимает стимулирующий эффект α-тромбина на уровне синтеза ДНК, РНК и белка.

Перечисленные данные убедительно свидетельствуют о том, что в тромбин-индуцированную активацию лимфоцитов вовлечены трансмембранные потоки ионов Ca^{2+} и кальмодулин-зависимые процессы. По-видимому, увеличение концентрации ионизированного цитозольного кальция, сопровождающееся образованием Ca^{2+}-кальмодулинового комплекса, является "сигналом" для инициирования и развития тромбин-индуцированного митогенеза лимфоцитов. Подобная точка зрения о триггирующей роли ионов Ca^{2+} в митоген- и антиген-индуцированной активации лимфоцитов широко распространена в литературе (266, 361).

Характер изменения внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов в тромбин-стимулированных лимфоцитах находится в согласии с обширной литературой, свидетельствующей о том, что увеличение уровня цГМФ более тесно связано с активацией лимфоцитов,

чем изменение уровня цАМФ (I92). Известно, что в тех типах клеток, в которых после взаимодействия с внеклеточным первым "сигналом" увеличивается внутриклеточная концентрация цГМФ, это увеличение происходит в результате активации цитозольной гуанилатциклазы ионами Ca^{2+} (I06). В последние годы получены интересные данные об активации гуанилатциклазы в результате фосфорилирования, катализируемого протеинкиназой (370). Конкретные механизмы участия цГМФ в активации лимфоцитов α-тромбином неизвестны. Однако для их понимания представляются важными следующие факты. Циклический гуанозинмонофосфат способен изменять активность протеинкиназ, контролирующих фосфорилирование многих белков, в том числе гистонов, что играет существенное значение в регуляции процессов роста и размножения клеток. В частности, фосфорилирование гистона Н I является необходимым для инициации синтеза и редупликации ДНК (76). В свете этих представлений совершенно ясной становится взаимосвязь между повышением уровня цГМФ и усилением синтеза ДНК в лимфоцитах под влиянием α-тромбина, свидетельствующая о том, что его стимулирующий эффект на пролиферативные реакции лимфоцитов скорее всего реализуется посредством цГМФ-зависимых процессов. Не исключено, что цГМФ вместе с ионами Ca^{2+} являются вторичными мессенджерами и опосредуют тромбин-индуцированную активацию лимфоцитов селезенки мыши.

Установлено также, что активация лимфоцитов α-тромбином сопровождается увеличением внутриклеточного уровня простагландинов группы Е по сравнению с контрольными клетками. Такой эффект α-тромбина может быть обусловлен как его прямым активирующим влиянием на циклооксигеназу (I6I), так и активацией этого фермента под влиянием цГМФ (252, 295) и восстановленного глута-

тиона (365).

Литературные данные о значительном подавлении продукции супероксидных радикалов в иммунокомпетентных клетках простагландинами группы Е (262) позволяют полагать, что одной из возможных причин угнетения процессов перекисного окисления липидов в тромбин-стимулированных лимфоцитах является повышение внутриклеточного уровня простагландинов группы Е. Кроме того, существенно отметить, что простагландины группы Е оказывают стимулирующее влияние на фосфорилирование белков хроматина (128), что, как указывалось выше, может играть существенную роль в активации репликации.

Схема на рис. 34 представляет собой попытку резюмировать изложенные выше экспериментальные данные о механизмах тромбин-индуцированной активации лимфоцитов селезенки мыши и показывает, что формирование тромбин-рецепторного комплекса, инициирующего каскад активации, составляет первое звено процесса и приводит к трем взаимосвязанным наиболее существенным сдвигам, составляющим, на наш взгляд, ключевое, второе, звено процесса, а именно к увеличению вхождения в лимфоциты ионов Ca^{2+}, транслокации мембраносвязанного кальмодулина в цитозоль и, наконец, к структурной реорганизации мембран, обусловленной модификацией липидного состава и проявляющейся изменением физического состояния их липидной компоненты и активности мембраносвязанных ферментов. В цитозоле ионы Ca^{2+}, взаимодействуя с кальмодулином, образуют активный Ca^{2+}-кальмодулиновый комплекс, являющийся модулятором активности многих ферментов. Этот комплекс, наряду с ионами Ca^{2+}, активирует цитозольную гуанилатциклазу (143), что приводит к росту внутриклеточной концентрации цГМФ (третье звено). Этот важный сдвиг имеет два следствия. Во-первых, он активирует цГМФ-зависимые протеинкиназы,

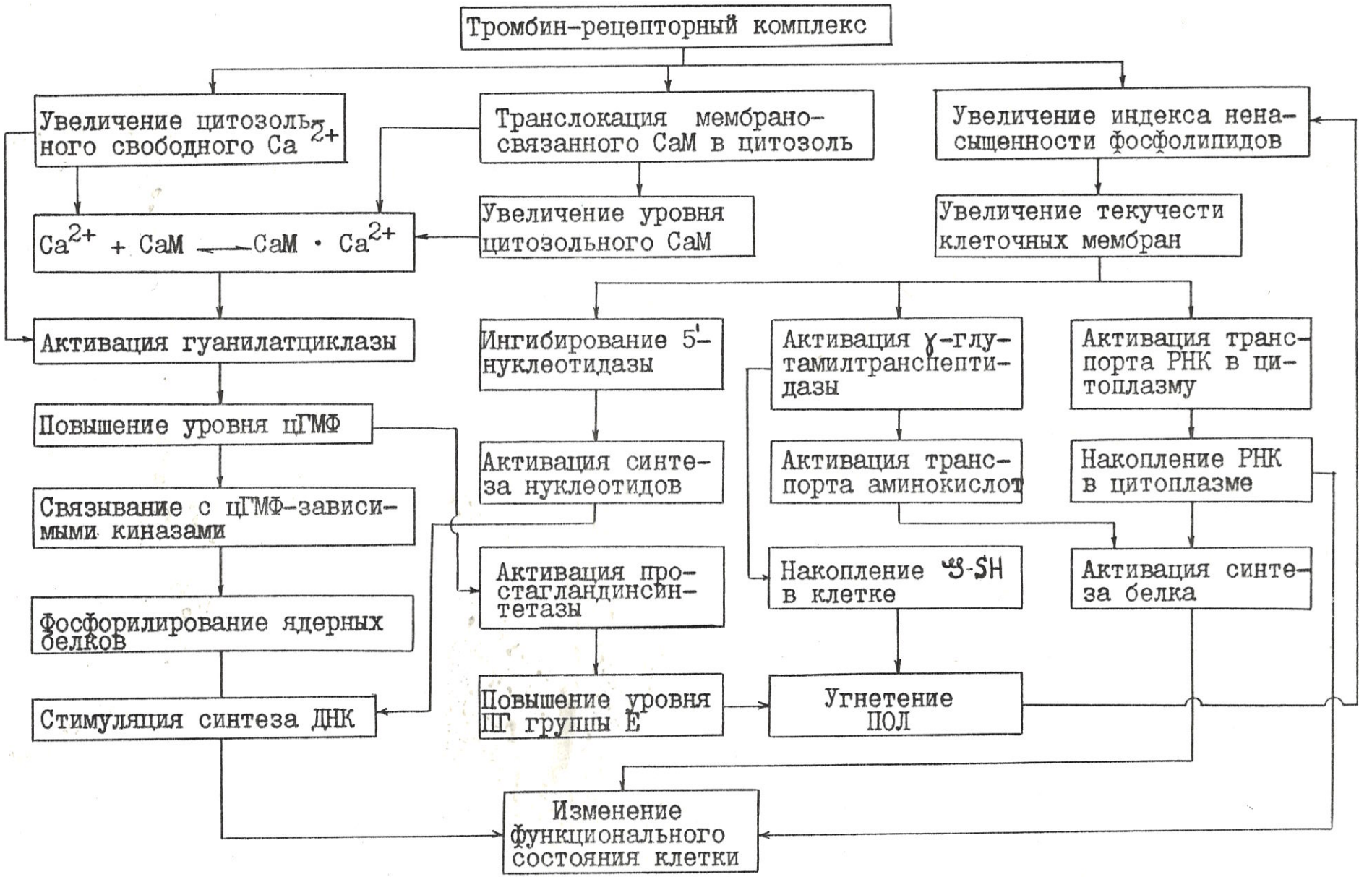


Рис. 34. Гипотетическая схема активации лимфоцитов α-тромбином.

приводящие к фосфорилированию белков хроматина (I92). Во-вторых, под влиянием цГМФ может происходить активация простагландинсинтетазы (252), что приводит к увеличению внутриклеточного уровня простагландинов группы Е, которые также стимулируют процессы фосфорилирования белков хроматина (I28) (четвертое звено). В дальнейшем процессы цГМФ- и простагландин Е-зависимого фосфорилирования белков хроматина приводят к стимуляции синтеза ДНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах (пятое звено). Определенный вклад в активацию синтеза ДНК в тромбин-стимулированных лимфоцитах может также вносить ингибирование в них активности 5'-нуклеотидазы (340). С другой стороны, активация γ-глутамилтранспептидазы, наряду с накоплением РНК в цитоплазме тромбин-стимулированных лимфоцитов, приводят к стимуляции синтеза белка в последних (шестое звено). В конечном итоге, в результате активации синтеза ДНК, белка и накопления РНК тромбин-стимулированные лимфоциты переходят в новое функциональное состояние (седьмое звено). Поддержание стимулированного состояния лимфоцитов может быть обусловлено не только активацией оборота ацильных частей фосфолипидов, но и ингибированием ПОЛ в результате увеличения внутриклеточного пула восстановленного глутатиона и простагландинов группы Е.

Таким образом, резюмируя все вышеизложенное, можно заключить, что α-тромбин является не только основным медиатором системы гемостаза, но и выступает в качестве одного из биологически активных веществ, принимающих непосредственное участие в регуляции метаболической активности лимфоцитов. Тромбин оказывает влияние на основные характеристики лимфоцитов, включая процессы синтеза ДНК, белка, накопления новосинтезированной РНК, функционирование мембран, внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+}, кальмодулина, цикли-

ческих нуклеотидов и простагландинов, определяющих функциональную активность иммунокомпетентных клеток.

Лимфоцит-опосредованные эффекты α-тромбина являются биологически оправданными, так как тромбин в локальной области раны или воспаления выполняет не только гемостатическую и фибринообразующую функции, но и вызывает неспецифическую пролиферацию лимфоцитов, способствуя тем самым процессу заживления ран и борьбе с внедрившейся инфекцией. Эта реакция является целесообразной, поскольку создает неспецифическую защиту еще до мобилизации специфического клеточного и гуморального механизмов.

ВЫВОДЫ

I. По данным теоретического предсказания структурного класса и вторичной структуры, а также лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния α-тромбин относится к белкам со смешанной вторичной структурой и содержит I6% аминокислотных остатков в α-спиралях, 26% - в β-структуре, 29% - в конформации β-поворотов и 29% - в нерегулярной конформации. Сопоставление вероятной модели вторичной структуры α-тромбина с данными рентгеноструктурного анализа α-химотрипсина выявило гомологию в расположении элементов вторичной структуры, что предполагает сходство в общих чертах пространственной организации этих белков. Конформационное состояние остатков, образующих систему переноса заряда в молекуле α-тромбина (His 43, Asp 99 и Ser 205), значительно отличается от состояния остатков триады активного центра в гомологичных сериновых протеиназах, что может быть одним из факторов снижения реакционной способности тромбина по отношению к низкомолекулярным субстратам.

2. α-Тромбин характеризуется структурным усложнением первичного центра связывания в результате формирования β-поворота I97-200, содержащего трипептид Arg - Gly - Asp , по сравнению с гомологичными сериновыми протеиназами. Кроме того, α-тромбин содержит протяженный вторичный гидрофобный участок, составными частями которого, вероятно, являются два остатка триптофана, находящиеся в непосредственной близости от остатков триады активного центра, и тетрапептид Cys - Ala - Gly - Tyr , а также дополнительный центр связывания высокомолекулярных субстратов, обусловливающий высокую специфичность фермента, и фор-

мирующийся структурами, расположенными на участке 47-73 В-цепи α-тромбина. У макромолекулярных субстратов α-тромбина (фибриноген, антитромбин Ш, протромбин, фактор ХШ) выявлено наличие гидрофобного кластера вблизи тромбин-чувствительной связи, который осуществляет дополнительное экранирование Asp I99 фермента от растворителя и тем самым способствует эффективному расщеплению этих субстратов.

3. Показано, что α-тромбин, действуя как протеолитический фермент, вызывает активацию синтеза ДНК и белка в свежеизолированных лимфоцитах селезенки мыши. Основным изменением метаболизма РНК на ранних стадиях активации лимфоцитов α-тромбином является накопление в цитоплазме новосинтезированной РНК без увеличения транскрипционной активности, что служит аргументом в пользу представлений об ускорении процессинга и ядерно- цитоплазматического транспорта. Актиномициновый и кордицепиновый блоки нивелируют активирующее влияние α-тромбина на синтез РНК и белка в лимфоцитах. Эти результаты свидетельствуют о том, что регуляторные механизмы тромбин-индуцируемой активации лимфоцитов селезенки мыши находятся как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях.

4. Установлено, что обработка лимфоцитов селезенки мыши оптимальной митогенной концентрацией α-тромбина приводит к увеличению концентрации свободного цитоплазматического кальция и транслокации мембраносвязанного кальмодулина в цитозоль. В указанных условиях наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ и простагландинов группы Е; уровень цАМФ и простагландинов $F_{2\alpha}$ при этом не изменяется. Верапамил и трифтазин полностью отменяют активирующее влияние α-тромбина на синтез

ДНК, РНК и белка в лимфоцитах. Эти данные указывают на то, что в процесс активации лимфоцитов α-тромбином включены трансмембранные потоки ионов Ca^{2+} и кальмодулин-зависимые ферменты, приводящие к запуску цГМФ-зависимых процессов, контролирующих пролиферацию лимфоцитов.

5. Интактные и тромбин-стимулированные лимфоциты селезенки мыши выделяют в культуральную среду 10-12% новосинтезированной ДНК. Наличие ^{3}Н-ДНК в культуральных супернатантах обусловлено высвобождением ДНК из лимфоцитов в результате активного секреторного процесса, а не связано с частичным разрушением или гибелью клеток в процессе культивирования. Экскреторная ДНК обладает тромбоцитагрегирующими свойствами, а также способна переводить в условиях ин витро обратимую АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в необратимую. Следовательно, экскретируемая лимфоцитами ДНК может выступать в качестве одного из звеньев сопряжения между иммунологическими реакциями и реакциями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

6. ДНК, экскретируемая лимфоцитами, вызывает ин виво и ин витро стимуляцию синтеза ДНК в лимфоцитах селезенки мышей и крыс, а также стимулирует фагоцитоз гранулоцитов и розеткообразующую активность Т-лимфоцитов периферической крови человека в условиях ин витро. Эти результаты свидетельствуют о том, что экскретируемые лимфоцитами дезоксинуклеопротеиды обладают иммуностимулирующим действием и, по-видимому, выступают в качестве одного из сигналов, несущих информацию о скорости роста лимфоцитов, т.е. в качестве пролиферативного сигнала.

7. При активации лимфоцитов селезенки мыши α-тромбином происходит структурная реорганизация клеточных мембран, приво-

дящая к увеличению текучести их липидной компоненты без изменения полярности бислоя, угнетению процессов перекисного окисления липидов и изменению активности мембраносвязанных ферментов. Показано модулирующее действие α-тромбина на липидный состав лимфоцитов, заключающееся в уменьшении содержания холестерина, лизофосфатидилхолина, соотношения холестерин/фосфолипиды, увеличении фосфатидилхолина и индекса ненасыщенности общих фосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Преимущественное включение полиненасыщенных жирных кислот в основные фосфолипидные компоненты мембран лимфоцитов - фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин - и угнетение процессов перекисного окисления липидов, способствующие увеличению текучести клеточных мембран, может выступать в качестве одного из важнейших пусковых механизмов активации лимфоцитов α-тромбином.

8. Установлено, что в тромбин-стимулированных лимфоцитах наблюдается уменьшение содержания гистона H I, сопровождающееся появлением продуктов его протеолитической деградации. Данные о наличии фибриноген-свертывающей активности в лизатах ядер тромбин-стимулированных лимфоцитов, а также электрофоретические исследования ядер лимфоцитов, обработанных ^{125}I - тромбином, доказали возможность проникновения тромбина внутрь лимфоцитов путем интернализации и дальнейшей транслокации в ядра клеток, где одной из внутриклеточных мишеней фермента может являться гистон H I.

9. Вся совокупность полученных в работе результатов свидетельствует о том, что α-тромбин является не только основным медиатором системы свертывания крови, но и выступает в качестве одного из биологически активных веществ, принимающих непосредст-

венное участие в регуляции метаболической активности лимфоцитов. Тромбин оказывает влияние на основные характеристики лимфоцитов, включая синтез ДНК, РНК, белка, функционирование мембран, внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+}, содержание кальмодулина, циклических нуклеотидов и простагландинов, определяющих функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Лимфоцит-опосредованные эффекты α-тромбина являются биологически оправданными, так как тромбин, в локальной области воспаления или раны, где создается достаточная концентрация фермента, выполняет не только фибринообразующую функцию, важную для ограничения очага воспаления, и гемостатическую функцию, но и вызывает неспецифическую пролиферацию лимфоцитов, способствуя тем самым борьбе с внедрившейся инфекцией и процессу заживления ран. Эта реакция является целесообразной, поскольку создает неспецифическую защиту еще до мобилизации специфического клеточного и гуморального механизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

I. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. М.: Мир, 1983. - 263 с.

2. Ананиев Е.Д., Георгиев Г.К. Кордицепин и механизм его действия в эукариотических организмах // Вестн. Моск. ун-та. Сер. I6, Биология. - 1983. - №2. - С. I9 - 27.

3. Андреенко Т.В. Фибринолиз. - М.: Изд-во МГУ, 1979. - 248 с.

4. Ашмарин И.П. Молекулярная биология. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1977. - 367 с.

5. Барковский Е.В. Сравнительная оценка эффективности предсказания вторичной структуры простых и лиганд-содержащих белков// Изв. АН БССР. Сер. биол. - 1985. - №5. - С. I09 - II0.

6. Барковский Е.В. Предсказание структурного класса глобулярных белков по их аминокислотной последовательности// Биофизика. - 1985. - Т.30, №5. - С 782 - 785.

7. Барковский Е.В.Влияние протеолитических ферментов на уровень циклических нуклеотидов и синтез ДНК в лимфоцитах// Укр.биохим. журн. - 1986. - Т.58, №6. - С. 23 - 27.

8. Барковский Е.В., Бандарин В.А. Предсказание структурированных участков глобулярных белков по их первичной структуре// Биоорган. химия. - 1979. - Т.5, №1. - С. 24 - 34.

9. Баскова И.П. Химические основы свертывания крови // Химия нашими глазами. - М., 1981. - С. 433 - 453.

I0. Баскова И.П., Мемон М.С., Романов В.В. Определение методом КД вторичной структуры протромбина при разной степени цитраконилирования// Биохимия. - 1977. - Т.42, №1. - С. 95 - 99.

II. Белицер В.А. Домены - крупные, функционально важные блоки молекул фибриногена и фибрина// Биохимия животных и человека:

Респ. межвед. сб. /АН УССР. Ин-т биохимии им. Палладина. - Киев, 1982. - Вып. 6. - С. 38 - 57.

12. Белицер В.А., Варецкая Т.В. Фибриноген и продукты его протеолиза// Казан. мед. журн. - 1977. - Т. 58, №1. - С. 6 - 30.
13. Белохвостов А.С. Включение ^{3}Н-тимидина в ДНК нуклеинового фактора асцитной жидкости рака Эрлиха// Эксперим.онкология.- 1985. - Т.7, №6. - С. 50 - 53.
14. Бергельсон Л.Д. Биологические мембраны. Факты и гипотезы. - М.: Наука, 1975. 183 с.
15. Березов Т.Г., Чернов Н.Н. Регуляция активности и синтеза гамма-глутамилтрансферазы тканей человека // Вестн. АМН СССР. - 1986. - №8. - С. 59 - 68.
16. Берчфилд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии: Пер. с англ.; Под ред. К.В.Чмутова. - М.: Мир, 1964. - 619 с.
17. Определение вторичной структуры белков из спектров кругового дихроизма. I. Белковые реперные спектры для α-, β- и нерегулярной структур / И.А.Болотина, В.О.Чехов, В.Ю.Лугаускас и др. // Молекуляр. биология. - 1980. - Т.14, №4. - С. 891 - 900.
18. Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие про - мРНК. XIУ. Исследование структуры с использованием этидия и флуорескамина / О.Ф.Борисова, А.А.Кричевская, В.В.Просвирнин, О.П.Самарина // Молекуляр. биология. - 1979. - Т. 13, №2. - С. 422 - 437.
19. Бурлакова Е.Б. Роль липидов в процессе передачи информации в клетке // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ: Сб. ст. - М., 1981. - С. 23 - 34.
20. Бурштейн Э.А. Люминесценция белка. Природа и применение:

Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. - Пущино, 1973. - 38 с.

21. Веремеенко К.Н. Роль протеолитических ферментов в регуляции обмена веществ // Биохимия животных и человека: Респ.межвед. сб. /АН УССР. Ин-т биохимии им. Палладина. - Киев, 1983. - Вып. 7. - С. 37 - 46.

22. Витебский Е.М., Стефани Д.В., Жебеленко О.В. Современное состояние клеточного электрофореза и пути его дальнейшего развития: (обзор литературы) // Лаб. дело. - 1983. - №3. - С. 3 - 7.

23. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.

24. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в использовании биологических мембран. - М.:Наука, 1980.- 320 С.

25. Владимиров Ю.А., Рощупкин Д.И., Потапенко А.Я., Деев А.И. Биофизика. - М.: Медицина, 1983. - 272 с.

26. Гаврилов О.К. Биологические закономерности регулирования агрегатного состояния крови и задачи ее исследования // Пробл. гематологии и переливания крови. - 1979. - №7. - С. 16 - 24.

27. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрические определения содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. - 1983. - №3. - С. 33 - 35.

28. Гаффни П.Дж. Метод спиновых меток. Теория и применение. - М.: Мир, 1979. - 613 с.

29. Гольдберг В.Е. Фотометрические параметры гемопоэтических клеток здоровых людей и при гемобластозах: Автореф.дис. ... канд.мед.наук. - М., 1983. - 20 с.

30. Горленко В.А., Филиппович Ю.Б. γ-Глутамилтрансфераза, свой-

ства и роль в обмене веществ // Успехи соврем. биологии. - 1970. - Т. 88, №3 (6). - С. 367 - 386.

31. Гуковская А.С. Роль ионов в активации лимфоцитов // Успехи соврем. биологии. - 1984. - Т. 97, № 2. - С. 179 - 192.

32. Денесюк А.И., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. Спиральная структура развернутых белковых цепей. // Биофизика. - 1974. - Т. 19, №3. - С. 549 - 575.

33. Дмитренко Н.П. Ферменты превращения внеклеточных адениннуклеотидов. // Укр. биохим. журн. - 1981. - Т. 53, №1. - С. 114 - 123.

34. Дмитренко Н.П. Аденозин, его метаболизм и возможные механизмы участия в функции клеток иммунной системы // Успехи соврем. биологии. - 1984. - Т. 97, № 1. - С. 20 - 35.

35. Дмитренко Н.П., Горошникова Г.В. Метаболизм внеклеточных адениннуклеотидов и поглощение аденозина тимоцитами крысы; влияние конканавалина А. // Укр. биохим. журн. - 1987. - Т. 59, № 2. - С. 61 - 65.

36. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды: оптические свойства и взаимодействие с мембранами // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. - 1979. - Т. 11. - С. 101 - 188.

37. Добрецов Г.Е., Векшин Н.Л., Владимиров Ю.А. Различия пространственной организации белково-липидных комплексов мембран эндоплазматического ретикулума печени и саркоплазматического ретикулума // Докл. АН СССР. - 1978. - Т. 239, № 5. - С. 1241 - 1244.

38. Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. Применение люминесцентных методов для изучения структуры мембран //Биомембраны. Структура, функции, методы исследования. М., 1977. - С. 90 - 104.

39. Зубаиров Д.М. Матричная гипотеза ферментативного каскада при свертывании крови // Казан. мед. журн. - 1977. - Т. 58, № 6. - С. 32 - 37.

40. Зубаиров Д.М. Биохимия свертывания крови. - М.: Медицина, 1978. - 176 с.

41. Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза. - Минск: Беларусь, 1983. - 221 с.

42. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. - М.: Наука, 1982. - 224 с.

43. Ичас М. Белковый текст // Теория информации в биологии:Докл. симпоз.: Пер. с англ.; Под ред. Л.А.Блюменфельда. - М., 1960. - С. 72 - 101.

44. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов: Пер. с англ. - М.: Мир, 1975. - 322 с.

45. Кеэп Т.В. Исследование с помощью флуоресцентных зондов перестроек в структуре мембран клеточных ядер при перекисном окислении липидов, вызванном γ-облучением // Радиобиология. - 1980. - Т.20, № 5. - С. 648 - 653.

46. Кибирев В.К., Романова В.П., Серебряный С.Б. Структурные основы специфичности тромбина. Роль вторичных взаимодействий // Биохимия. - 1983. - Т. 48, № 6. - С. 937 - 943.

47. Кибирев В.К., Серебряный С.Б., Серейская А.А. Кинетический и структурный анализ каталитического действия тромбина // У Всесоюз. биохим. съезд: Тез. докл. - М., 1985. - Т. 1. - С. 36 - 37.

48. Сравнительное исследование гидролиза метиловых эфиров арилсульфонил-валил-аргинина тромбином и трипсином / В.К.Кибирев, А.Л.Серейский, В.П.Романова, С.Б.Серебряный // Биохимия. -

I979. - Т. 44, № 4. - С. 6I6 - 62I.

49. Определение кинетических параметров отдельных стадий гидролиза эфиров N-арилсульфонил-d-аргинина тромбином и трипсином / В.К.Кибирев, А.А.Серейская, Д.М.Федоряк, С.Б.Серебряный // Биохимия. - I978. - Т. 43, № 4. - С. 7I7 - 722.

50. Влияние холестерина на физическое состояние и функционирование мембран лимфоцитов / Г.И.Клебанов, Л.И.Иванова, Э.М.Туркменова, Ю.А.Владимиров // Биофизика. - I986. - Т. 3I. № I- С. 73 - 77.

5I. Козак В.В., Шляховенко В.А., Юхименко М.Д. Характеристика нуклеинового компонента нуклеопротеидного комплекса, выделяемого опухолевыми клетками // Эксперим. онкология. - I985. - Т. 7, № 4, - С. 36 - 39.

52. Козинец Г.И., Котельников В.М., Гольдберг В.Е. Цитофотометрическое и микрофлуорометрическое исследование динамики процессов активации и пролиферации стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов периферической крови здоровых людей // Лаб. дело. - I985. - № I0. - С. 622 - 625.

53. Конев С.В., Аксенцев С.Л. Структурная лабильность мембран// Биохимия. - I977. - Т. 42, № 2. - С. I87 - I97.

54. Конев С.В., Волотовский И.Д. Структурные перестройки биологических мембран // Биомембраны. Структура, функции, методы исследования. - Рига, I977. - С. 42 - 76.

55. Конев С.В., Мажуль В.М. Межклеточные контакты. - Минск: Наука и техника, I977. - 288 с.

56. Костенко М.А. Ионная регуляция дифференцировки и регенерации нейронов в культуре // Успехи соврем. биологии. - I980.- Т. 90, № 2 (5). - С. 20I - 235.

57. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. - М.: Медицина, 1975. - 488 с.

58. Кудряшов Б.А., Струкова С.М. Значение молекулярных особенностей тромбина во взаимодействии с рецепторными структурами в организме // Успехи соврем. биологии. - 1984. - Т. 97, № 2. - С. 193 - 207.

59. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Калишевская Т.М. Явление неферментативного фибринолиза в организме человека и животных : А.с. 123 (СССР); Заявл. 23.IX.1964; Опубл. 20.XII. 1979.

60. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. - М. : Наука, 1976. - 212 с.

61. Кузнецова Н.В., Николаева Н.В., Иткин Б.З. Включение ^{3}Н-уридина в разные типы быстрометящихся РНК лимфоцитов крови и лимфы крупного рогатого скота в норме и при лимфолейкозе// Теоретические и практические вопросы ветеринарии. - Тарту, 1978. - С. 114 - 120.

62. Кузник Б.И. Универсальный механизм регуляции свертывания крови и фибринолиза // Успехи соврем. биологии. - 1979. - Т. 87, № 1. - С. 108 - 124.

63. Влияние тромбина на функциональную активность макрофагов и лимфоцитов / Б.И.Кузник, Л.П.Малежик, В.В.Альфонсов, Я.З.Мамедов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1985. - Т.99, № 5. - С. 597 - 598.

64. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н. Взаимосвязь между иммуногенезом и системой гемостаза: единая система защиты организма// Успехи соврем. биологии. - 1981. - Т. 92, № 2(5) - С. 243 - 260.

65. Агрегация тромбоцитов и антиагрегационная активность аорты у интактных и тимэктомированных крыс / Б.И.Кузник, Н.Н.Цыби-

ков, Д.Р.Хышова, Г.Ч.Махакова // Патол. физиология и эксперим. терапия. - 1983. - № 1. - С. 60 - 62.

66. Кусень С.И., Стойка Р.С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. - М.:Наука, 1985. - 236 с.
67. Кучеренко Н.Е., Блюм Я.Б. Роль мембранных фосфоинозитидов в опосредовании гормональных эффектов// Укр. биох. журн. - 1986. - Т. 58, № 1. - С. 86 - 101.
68. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. - М.:Медицина, 1985. - 255 с.
69. Ланкин В.З., Садовникова И.П. Простой количественный метод прямой переэтерификации высших жирных кислот в биологических образцах// Вопр. мед. химии. - 1971. - Т. 17, № 3. - С. 331 - 335.
70. Лим В.И. Стереохимическая теория вторичной структуры глобулярных белков. I. Общие положения // Биофизика. - 1974. - Т. 19, № 2. - С. 366 - 378.
71. Лим В.И. Стереохимическая теория вторичной структуры глобулярных белков. II. Методы локализации α-спиральных и β-структурных участков // Биофизика. - 1974. - Т. 19, № 3. - С. 562 - 576.
72. Липкинд Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М. Теоретический конформационный анализ метиламидов N-ацетилдипептидов. Конформации с внутримолекулярными водородными связями // Молекуляр. биология. - 1970. - Т. 4, № 4. - С. 509 - 515.
73. Литвинов И.С., Образцов В.В. Изучение вязкости свободных и связанных с белками липидов в мембранах // Биофизика. - 1982. - Т. 27, № 1. - С. 81 - 86.
74. Локшина Л.А. Регуляторная роль протеолитических ферментов//

Молекуляр. биология. - 1979. - Т. 13, № 6. - С. 1205 - 1229.

75. Локшина Л.А. Тиоловые пептидгидролазы животных тканей, их структура и функции // Молекуляр. биология. - 1986. - Т. 20, № 5. - С. 1157 - 1175.

76. Лю Б.Н., Ефимов М.Л. О некоторых биокибернетических аспектах размножения и дифференцировки клетки // Успехи соврем. биологии. - 1978. - Т. 85, № 3. - С. 390 - 408.

77. Ляшенко В.А. Трехсигнальная гипотеза активации лимфоцитов// Иммунология. - 1985. - № 2. - С. 86 - 90.

78. Малежик Л.П., Альфонсов В.В., Будажапова Д.Ц. Влияние тромбина на функциональную активность макрофагов и лимфоцитов// Гематология и трансфузиология. - 1983. - Т. 28, № 9. - С. 22 - 27.

79. Малежик Л.П., Альфонсов В.В., Кузник Б.И. Биологические эффекты тромбина// Физиол. журн. СССР им. Сеченова. - 1984. - Т. 70, № 1. - С. 16 - 22.

80. Клеточные механизмы регуляции гемостаза / Л.П.Малежик, Н.Л.Молчанова, Г.Н.Корешкова и др.// Вопросы физиологии и патологии иммуногенеза и гемостаза. - Чита, 1982. - С. 42-48.

81. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. - М.:Медицина, 1984. - 264 с.

82. Реорганизация липидов мембран лимфоцитов при их активации конканавалином А / И.М.Молотковская, Г.О.Гудима, В.А.Ляшенко и др.// Биол. мембраны. - 1985. - Т. 2, № 5. - С. 499-506.

83. Монастырский В.А., Бирка И.И. Протеазосвязывающий белок и его роль в регуляции воздействия тромбина на клетки // Гематология и трансфузиология. - 1986. - № 6. - С. 48 - 51.

84. Мустафин А.М. Об одном из возможных механизмов регуляции рос-

та многоклеточных организмов и его приложение к проблемам старения и канцерогенеза // Успехи соврем. биологии. - 1981. - Т. 92, № 2(5). - С. 261 - 277.

85. Исследование изменения структуры мембран эритроцитов при нефропатии методом спинового зонда / О.М.Панасенко, М.Л.Борин, Р.И.Шалина, О.А.Азизова // Биофизика. - 1984. - Т. 29, № 5. - С. 904.

86. Изучение методом спиновых зондов структурных изменений на различной глубине фосфолипидных мембран после их пероксидации / О.М.Панасенко, А.И.Деев, И.Б.Деева и др. // Биофизика. - 1985. - Т. 30, № 5. - С. 817 - 821.

87. Пирс Э. Гистохимия. Теорет. и прикладная. :Пер. с англ. - М.: Изд-во иностр. лит., 1962. - 962 с.

88. Попов Е.М. Подход к априорному расходу стабильных конформаций белковых молекул // Молекуляр. биология. - 1975. - Т. 9, №4. - С. 578 - 593.

89. Попов Е.М. Эмпирические корреляции между аминокислотной последовательностью и пространственным строением // Молекуляр. биология. - 1980. - Т. 14, № 1. - С. 35 - 63.

90. Попов Е.М. Количественная конформационная теория белковых молекул // Физика молекул. - Киев, 1980. - С. 69 - 113.

91. Поройков В.В., Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Особенности распределения идентичных аминокислотных остатков в первичной структуре белков // Биофизика. - 1976. - Т. 21, № 3. - С.397-400.

92. Поройков В.В., Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Особенности распределения триплетов аминокислот в первичной структуре глобулярных белков // Биофизика. - Т. 25, № 4. - С. 730 - 732.

93. Поспелова Т.В. Действие актиномицина Д на клеточную пролифе-

рацию, индуцированную в лимфоцитах человека фитогемагглютинином // Цитология. 1975. - Т. 17, № 6. - С. 660 - 666.

94. Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. Связь вторичной структуры глобулярных белков с их первичной структурой // Биофизика. 1970. - Т. 15, № 5. - С. 757 - 768.

95. Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. Проблема предсказания структуры белка // Итоги науки и техники. Сер. молекуляр. биология/ ВИНИТИ. - 1979. - Т. 15. - С. 6 - 41.

96. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Мисик: Вышэйш. шк., 1964. - 326 с.

97. Возрастные и тканевые различия внутригеномного распределения 5-метилцитозина в ДНК коров / Г.А.Романов, Г.Г.Зиньковская, Г.В.Бердышев, Б.Ф.Ванюшин // Биохимия. - 1979. - Т. 44, № 9.- С. 1576 - 1581.

98. Ингибирующее действие ФГА на спленоциты мышей, спонтанно синтезирующие ДНК / А.И.Свирновский, Т.В.Шиманская, В.М.Агейчик, В.Г.Цыганков // Теоретические и практические вопросы гематологии и переливания крови. - Минск, 1982. - С. 106 - 107.

99. Соотношение ДНК, РНК, гистонов и негистоновых белков в ядерных фракциях лимфоцитов лимфы крупного рогатого скота в норме и при лимфолейкозе / Л.П.Семенова, Н.В.Николаева, О.Ф.Беспалько и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. - 1974. - № 6. - С. 922 - 925.

100. Семенова О.А., Струкова С.М. Исследование прокоагулянтных свойств β/γ -тромбина // Вопр. мед. химии. - 1982. - Т.28, № 4. - С. 137 - 140.

101. Влияние конканавалина А на адсорбцию ионов кальция лимфоцитами / Н.С.Сергеева, Г.И.Клебанов, Ю.П.Козлов, М.В.Ситковский//

Биофизика. - I980. - Т. 25, № 3. - С. 508 - 509.

I02. Серебряный С.Б. Тромбин: его строение и особенности катализа// Биохимия животных и человека. - Киев. - I982. - № 6. - С. I4 - 26.

I03. Серейская А.А. О суперспецифичности тромбина // Молекуляр. биология. - Киев. - I980. - № 27. - С. 68 - 79.

I04. Серейская А.А., Кибирев В.К., Серебряный С.Б. Специфичность каталитического действия и структура тромбина // Биохимия животных и человека. - Киев. - I98I. - № 5. - С. 3 - 28,

I05. Серейская А.А., Струкова С.М. Особенности действия тромбина на высокомолекулярные субстраты // Докл. АН СССР. - I985. - Т. 282, № 2. - С. 48I - 484.

I06. Ситковский М.В. Молекулярные механизмы активации лимфоцитов// Итоги науки и техники. Сер. биол. химия. - I979. - Т. I3. - С. 236.

I07. Свойства активированного хроматина из печени крыс в ранние сроки после частичной гепатэктомии / О.Ю.Сондоре, И.Н.Батова, Г.Е.Федосеева и др.// Молекуляр. биология. - I980. - Т. I4, № 4. - С. 843 - 856.

I08. Струков А.И., Струкова С.М. Структурно-функциональные основы гемостаза и его патология// Арх. патологии. - I980. - № 9. - С. 3 - I6.

I09. Струкова С.М. Молекулярные превращения протромбина в тромбин. 2. Механизм протеолиза протромбина и свойства фрагментов протромбина // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология, почвоведение. - I956. - № I. - С. I7 - 40.

II0. Струкова С.М. Структурно-функциональные особенности тромбина // Биохимия животных и человека. - Киев. - I982. - № 6. -

С. 26 - 38.

III. Струкова С.М. Структурная обусловленность физиологических функций α-тромбина и его аналогов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. - М., 1983. - 41 с.

112. Струкова С.М., Баскова И.П., Кудряшов Б.А. Изучение процесса расщепления протромбина тромбином // Биохимия. - 1967. - Т.32, № 4. - С. 829 - 834.

113. Струкова С.М., Митрошина Т.М., Кудряшов Б.А. Активация гепарин-сефарозой превращения протромбина в претромбин I // Биохимия. - 1981. - Т. 46, № 5. - С. 904 - 910.

114. Струкова С.М., Семенова О.А., Киреева Е.Г. Гидролиз метиловых эфиров N-арил-сульфонил-аргинина и N-арил-сульфонил-валил-аргинина α и β/γ -тромбинами // Биохимия. - 1982. - Т. 47, № 4. - С. 528 - 533.

115. Струкова С.М., Семенова О.А., Кудряшов Б.А. Протеолиз протромбина β/γ -тромбином // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1980. - Т. 89, № 4. - С. 430 - 433.

116. Сравнение каталитических свойств α- и β-форм тромбина / С.М.Струкова, Б.А.Умарова, Е.Г.Киреева, Б.А.Кудряшов // Биохимия. - 1978. - Т. 43, № 4. - С. 708 - 716.

117. Тарантул В.З., Газарян К.Г. Гетерогенная ядерная РНК: структура и функция // Успехи биол. химии. - 1982. - Т. 22. - С. 26 - 62.

118. Тимербаев В.Н. Молекулярная структура и функция протромбина// Казан. мед. журн. - 1977. - Т. 58, № 6. - С. 19 - 28.

119. Тимофеева М.Я., Эйснер Г.И., Куприянова Н.С. Сравнительное исследование повторяющихся нуклеотидных последовательностей ДНК дифференцированных тканей при малигнизации// Молекуляр.

биология. - 1975. - Т. 9, № 1. - С. 126 - 133.

120. Троицкий Г.В., Завьялов В.П. Расчет конформации белков с помощью модифицированной номограммы // Молекуляр. биология. - 1972. - Т. 6, № 5. - С. 635 - 647.

121. Умарова Б.А., Струкова С.М. Активация фактора XIII β -тромбином // Биохимия. / 1979. - Т. 44, № 8. - С. 1524 - 1529.

122. Урбах В.Ю. К вопросу о корреляции между соседними аминокислотными остатками в белковых молекулах // Биофизика. - 1963.- Т. 8, № 5. - С. 536 - 542.

123. Федоров Н.А., Янева И.С. Экскреция ДНК лимфоцитами человека// Успехи соврем. биологии. - 1982. - Т. 93, № 2. - С. 171-182.

124. Гемофилия и ее лечение /Под ред. З.Д.Федоровой. - Л.: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1977. - 183 с.

125. О специфичности катализа тромбином / Д.М.Федоряк, В.К.Кибирев, А.А.Серейская, С.Б.Серебряный // Молекуляр. биология. - Киев, 1977. - № 17. - С. 64 - 75.

126. Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Мембранозависимые медиаторы, регулирующие метаболизм, пролиферацию и дифференцировку иммуноцитов // Итоги науки и техники. Сер. иммунология /ВИНИТИ.- 1981. - № 9. - С. 144 - 211.

127. Пролиферация клеток селезенки в ответ на Bordetella pertussis / В.В.Хоробрых, М.К.Бартенева, А.Е.Снегурова и др.// Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1983. - Т. 96, № 7. - С. 112 - 114.

128. Цудзевич Б.А., Кучеренко С.Н., Блюм И.Б. Влияние экзогенных простагландинов на интенсивность фосфорилирования белков хроматина и синтеза ДНК в пролиферирующих гепатоцитах // 5 Всесоюз. биохим. съезд.: Тез. докл. - М., 1986. - Т.2. - С.135.

I30. Цыбиков Н.Н. Мононуклеарные фагоциты - связующее звено между иммуногенезом, гемостазом и фибринолизом //Успехи физиол. наук. - I983. - Т. I4, № 4. - С. II4 - I23.

I3I. Цыбиков Н.Н., Кузник Б.И. Доказательство иммунного механизма регуляции ферментов гемостаза // Бюл. экспер. биологии и медицины. - I982. Т. 93, № 5. - С. 8-9.

I32. Цыбиков Н.Н., Кузник Б.И. Иммунный механизм регуляции гемостаза // Вопр. гематологии. - I986. - № 2. - С. 23 - 28.

I33. Цыбиков Н.Н., Соколов И.М. Фактор, активирующий тромбоциты,- новое звено сопряжения между иммуногенезом и гемостазом // Успехи соврем. биологии. - I985. - Т. 99, № 3. - С. 4I3-4I9.

I34. Чард Т. Радиоиммунологические методы: Пер. с англ. / Под ред. Я.М.Варшавского. - М.: Мир, I98I. - 246 с.

I35. Шитикова А.С. Изменение тромбоцитов под действием иммунных факторов // Терапевт. арх. - I982. - Т. 53, № 9. - С. I2I - I28.

I36. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков.- М.: Мир, I982. - 354 с.

I37. Шутко А.Н. Метаболические и функциональные аспекты взаимодействия внеклеточной ДНК с лимфоидными клетками облученного организма: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Л., I985.- 44 с.

I38. Adams D.H. The problem of cytoplasmic DNA: its extrusion uptake by cultured cells and its possible role in cell - cell information transfer// Int. J. Biochem.-I985.- Vol.I7, NII.- P.II33 - II4I.

I39. Adams D.H., Gahan P.B. Stimulated and non - stimulated rat spleen cells release different DNA - complexes//Differen-

tiation.- I982.- Vol.22, NI.- P.47 - 52.

I40. Bajaj S.P., Butkowsky R.J., Mann K.G. Prothrombin fragments, Ca^{2+} binding and activation kinetics// J. Biol.C Chem.- I975.- Vol. 250, N6.- P.2I50 - 2I56.

I4I. Protease - nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells/ J. B. Baker, D.A. Low, R.Z.Simmer et al.// Cell. - I980.- Vol.2I, NI.- P.37 - 45.

I42. Badley R.A., Schneider H., Martin W.G. The fluorescence behavior of I - anilino - 8 - naphtalene sulfonate in phospholipid and natural membranes// Biochem. Biophys. Res. Commun.- I972.- Vol. 49, N5.- P.I229 - I299.

I43. Bachavaroff R.J., Miller F., Rapaport F.T. The role of calmodulin in the regulation of human lymphocyte activation// Cell. Immunol.- I984.- Vol. 85, NI.- P.I35 - I53.

I44. Barkowsky E.V. Prediction of the secondary structure of globular proteins by their amino acid sequence// Acta. Biol. Med. Germ.- I982.- Vol. 4I, N9.- P.75I - 758.

I45. Chemotactid response of monocytes to thrombin/ R. Bar - Shavit, A. Kahn, J. Fenton, G.Wilner// J. Cell. Biol.- I983.- Vol. 96, NI.- P.282 - 285.

I46. Bata J., Martin M.P., Revillard J.P. Cell surface protease activity of human lymphocytes, its inhibition by L_I- antitrypsin// Experientia. - Vol.37, N5.- P.5I8 - 5I9.

I47. Benson B.J., Hanahan D.J. Structural studies on bovine prothrombin. Isolation and partial characterization of the Ca^{2+} binding and carbohydrate containing peptides of the N - terminis region // Biochemistry.- I975.- Vol. I4, NI4.- P.3265-

- 3277.

I48. Bennett R.M., Gabor G.T., Merritt M.M. DNA binding to human leucocytes - evidence for a receptor - mediated association, internationalization, and degradation of DNA// J. Clin. Invest.- I985.- Vol. 76, N6.- P.2I82 - 2I90.

I49. The isoelectric point of thrombin and its behavior compared to prothrombin at some solid surfaces/ W.Berg, B.Hillvarn , H.Arwin et al.// Thrombos. Haemostas.- I979.- Vol.42, N3.- P.972 - 982.

I50. Berger S.Z., Birkenmeier C.S. Studies on mRNA in resting and growing lymphocytes// Cell Biology and Immunology of leucocyte function.- New York, San Francisco, London, I979.- P.I2I - I27.

I5I. Birktoft J.J., Blow D.M. Structure of crystalline α- chymotrypsin. . The atomic structure of tosyl -α - chymotrypsin at 2A resolution// J. Mol. Biol.- I972.- Vol.68, N2.- P. I87 - 240.

I52. The site in human antithrombin for functional proteolytic cleavage by human thrombin/ J.Bjork, A.Danielsson, J.Fenton, H.Jornwall// FEBS Lett.- I98I.- Vol. I26, N2.- P. 7 - I3.

I53. Black J.A., Harkins R.N., Stenzel R. Non - random relation - ship among amino acids in protein sequences// Int. J. Peptide and Protein Res. - I976.- Vol. 8, N2.- P.I25 - I30.

I54. Synthetic peptides with anticoaqulant and vasodilating activity/ B.Blomback, M.Blomback, P.Ollson et al.// Scand. J. Clin. Lab. Invest. - I969.- Vol.24, NI07.- P. 59 - 64.

I55. A two - step fibrinogen - fibrin transition in blood coagu - lation/ B.Blomback, B.Hessel, D.Hogg, L.Therkildsen// Natu-

re.- I978.- Vol.275, N5680.- P.50I - 505.

I56. Fibrinogen and fibrin formation/ B.Blomback, D.Hogg, B. Gardlund et al.// Thrombos. Res. - I976.- Vol. 8, N2.- P.329 - 346.

I57..Bloom J.W., Mann K.G. Prothrombin domains: circular dichroic evidence for a lack of cooperationty// Biochemistry.- I979.- Vol. I8, NIO.- P.I957 - I96I.

I58. The dependence of the conformation on the synthetic poly - peptides on aminoacid composition/ E.R.Blout, C.Dezoze, S.M.Bloom, G.D.Fasman// J. Amer. Chem. Sod.- I960.- Vol.82, NI4.- P.3787 - 3789.

I59. Blow D.M. Structure and substrate specificity in serine enzymes// Israel J. Chem.- I974.- Vol. I2, NI/2.- P.483 - 494.

I60. Bonnafous J.C., Dornand J., Mani G.C. Concanavalin A - indiced decrease of cyclic AMP level in mouse lymphocytes// Immunobiology.- I98I.- Vol.I59, NI.- P. I64 - I65.

I6I. Bonser R.V., Chandrabose K.A., Cratrecasas P. Trombin and bradikinin modulate prostaglandin synthetase independently of phospholipase// Adv. Prostaglandin and Tromboxane Res.- I980.- Vol.6.- P.259 - 262.

I62. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal// Nature.- I962.- Vol.I94, N4832. - P.927 - 929.

I63. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes// Tissue Antigens.- I974.- Vol. 4, N4.- P. 269- - 274.

I64. Influences of thrombin factor XIII and fibronectin on the growth of tumor cells and leukemid cells in vitro/ H.D.

Bruhn, R.Bernsmeier, P.Luck et al.// Klin. Wochensch. - I983.- Vol.63, N2.- P.209 - 2II.

I65. Bruhn H.D. , Pohl J. Growth regulation of fibroblasts by thrombin, factor XIII and fibronectin// Klin. Wochensch.- I98I.- Vol.59, N2.- P.I45 - I46.

I66. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth// Nature.- I970.- Vol.227, N5254.- P.I70 - I7I.

I67. Busetta B., Hospital M. An analysis of the prediction of secondary structures// Biochim. et biophys. acta.- I984.- Vol. 70I, NI.- P.III - II8.

I68. Primary structure of human prethrombin 2 and α - thrombin/ R.J.Butkowski, J.Elon, M.R.Downing, K.G.Mann// J. Biol. Chem.- I977.- Vol.252. NI4.- P. 4942 - 4957.

I69. Carney D.H., Cunningham D.D. Transmembrane action of thrombin initiates click cell division// J. Supramol. Struct.- I978.- Vol.9, N3.- P.337 - 350.

I70. Carney D.H., Stiernberg J., Fenton J.W. Initiation of proliferative events by human α - thrombin requires both receptor binding and enzymic activity// J. Cell. Biochem.-I984.- Vol.26, N3.- P.I8I - I95.

I7I. Carraway C., Sindlen C., Weiss M. Association of 5^{I}- nucleotidase with microfilaments: demonstration by phallodin shifts on - velocity sedimentation sucrose gradients// J. Cell Biochem. - I985.- Suppl., N9B.- P.5.

I72. Continuous occupancy of α- thrombin receptor is required for persistant activation of Na^{+}/H^{+} antiport and ribosomal protein S6 phosphorylation/ J.Chambard, E.Van - Obber -

ghen - Schilling, S.Paris, J,Ponyssegur// Biol. Cell.- I984.- Vol.50,N3.- P.I8a.

I73. Chen L.B., Buckanan J.M. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I975.- Vol.72,NI.- P.I3I - I35.

I74. Chen I.B., Teng N.N., Buchanan J.M. The mitogenic activity and related effects of thrombin on chick embio fibroblasts // Proteases and Biological Control.- New York, I975.- P. 957 - 965.

I75. Chen I.B., Teng N.H., Buchanan J.M. Mitogenicity of thrombin and surface alterations on mouse splenocytes// Exp.Cell Res.- I976.- Vol.I0I, NI.- P.4I - 46.

I76. Chen I.H., Yang J.T., Martinez H.M. Determination of secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion// Biochemistry.- I972.- Vol.II,N22. - P.4I20 - 4I3I.

I77. Chen I.H., Yang Y.T., Chan K.H. Determination of the helix and β- form of proteins in aqueous solution by circular dichroism// Biochemistry.- I974.- Vol.I3, NI6.- P.3350 - - 3359.

I78. Cheung W.Y. Discovery and recognition of calmodulin: a personal account// J. Cycl. Nucleotide Res.- I98I.- Vol. 7, N2.- P.7I - 84.

I79. Chau P.Y., Fasman G.D. Conformational parameters for amino acids in helical, β- sheet, and random coil regions calculated from proteins// Biochemistry.- I974.- Vol.I3,NI.- P. 2II - 222.

I80. Chau P.Y., Fasman G.D. Prediction of protein conformation//

Biochemistry.- I974.- Vol.I3, NI.- P.222 - 244.

I8I. Chau P.Y., Fasman G.D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence// Adv. Enzymol. and Relat. Areas of Molecular Biology.- I978.- Vol. 47.- P. 45 - I48.

I82. Chau P.Y.,Fasman G.D. Prediction of β - turns// Biophys.J. - I979.- Vol.26, N3.- P.367 - 384.

I83. Coffey R.G. Cyclic nucleotide pharmacology of macrophage functions// Reticuloendothel. Syst: Compr. Treatise.- I985. - Vol. 8.- P.27 - 48.

I84. Cohen F.E., Sternberg M.J.E., Taylor W.R. Analysis and prediction of protein β - sheet structures by a combinatorial approach// Nature.- I980.- Vol.285, N5764.- P.378 - 382.

I85. Collard J.B., Teminink J.H.M. Surface morphology and agglutinability with Con A in normal and transformed murine fibroblasts// J.Cell Biol.- I976.- Vol.68, NI.- P.IOI - - II2.

I86. Cook D.A. The relation between amino acid sequence and protein conformation// J.Med. Biol.- I967.- Vol.29,NI.- P.I67 - I7I.

I87. Cooper H.Z. Analysis of precursor pool labeling kinetics without pool size measurement: A computer-assisted approach// Anal. Biochem.- I973.- Vol.53, NI.- P.49 - 63.

I88. Coutelle R., Hofacker G.Z. Influence of selective processes on the amino acid compositions of proteins: collagen, cytochrome c, ferredoxin and α - crystallin// J.Theor. Biol.- I982.- Vol.95, N4.- P.6I5 - 639.

I89. Curtain C.C.,Looney F.D., Smelstorius J.A. Lipid domain

and ligand - induced lymphocyte membrane changes// Biochim. and biophys. acta.- I980.- Vol.596, NI.- P.43 - 56.

I90. Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA/ J.E.Darnell, L.Philipson, R.Wall, M.Adesnik// Science.- I97I.- Vol.I74. N4007.- P.507 - 5I0.

I9I. Davie E.W., Fujikawa K. Basic mechanisms in blood coagulation// Ann. Rev. Biochem.- I975.- Vol.44. N5.- P.799 - 829.

I92. Decker J.M., Marchalonis J.J. Molecular events in lymphocyte activation: role of non - histone chromosomal proteins in regulating gene expressions// Contemporary Topics in Molecular Immunology.- I978.- Vol.7,NI.- P.365 - 4I3.

I93. Detwiller T.C., Wasiewski W.W. The equilibrion reaction of thrombin with platelets// Chemistry and Biology of Thrombin.- Michigan, I977.- P.465 - 478.

I94. Dieckhoff J., Mannherz H.G. The interaction of 5^{I}- nucleotidase purified from chicken gizzard and actin, and the reversible loss of the inhibitory capacity of actin on deoxyribonuclease I// Biochim. et Biophys. acta: Protein struct. and Mol. Enzymol.- I985.- Vol. 829 (P29), N2.- P. 209 - 220.

I95. Distelhorst C.W., Cramer K., Rogers J.C. Selective release of excreted DNA sequences from phytohaemagglutinin stimulated human peripheral blood lymphocytes// J.Clin.Invest.- I978.- Vol. 6I, N5.- P.I204 - I2I7.

I96. Thrombin structural features related to specificity/ M. Downing, J.Elion, R.Butkowski, K.Mann// Bibl. haematol.- I978.- Vol.44,NI.-P.39 -53.

I97. Duhamel R.C., Meezan E., Brendel K. Metachromatic staining

with Coomassie Brilliant Blue R - 250 of the proline - rich calf thumus histone HI// Biochim. et Biophys.acta .- I980.- Vol.626, N2.- P.432 - 442.

I98. Esnouf M.P. The prothrombin - converting complex// Biochem. Soc. Trans.- I977. - Vol.5, N5.- P.I244 - I247.

I99. Fenton J.W. Thrombin specificity// Ann. N.Y. Acad Sci. - I98I. - Vol.370.- P.468 - 495.

200. Human thrombins/ J.W. Fenton, B.H.Landis, D.A. Walz, J.S. Finlayson// Chemistry and Biology of Thrombin .- Michigan, I977.- P.43 - 70.

20I. Ferber E. Mechanisms of lymphocyte activation// Proc. I4 Int. Leucocyte Conf., Amsterdam e. a. , 7 - II June, I98I. - Amsterdam, I98I.- P. 5-I0.

202. Ferber E., Resch K. Phospholipid metabolism in stimulated lymphocytes: activation of acyl CoA - lysolecithin acyl - transferases in microsomal membranes// Biochim. et biophys. acta.- I973.- Vol.296, N2.- P.335 - 349.

203. Ferraris V., De Rubertis T.R. Release of prostaglandins by mitogen - and antigen - stimulated leucocytes in culture// J.Clin. Invest.- I974.- Vol.54,N2.- P.378 - 386.

204. Fiedel B.A., Frenzke M.E. Modulation of platelet activation by native DNA - initial description of platelet receptor type, number and discrimination for native DNA// Thrombos. Haemostas.- I98I.- Vol.45, N3.- P.263 - 266.

205. Finkelstein A.V. Theory of protein molecule self - organization.III. A calculating method for the probabilities of the secondary structure formation in an unfolded polupeptide chain// Biopolymers.- I977.- Vol.I6,N3.- P.497 - 524.

206. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. Statistical analysis of the correlation among amino acid residues in helical, β - structural and non - regular regions of globular proteins// J. Mol. Biol.- I97I.- Vol.62,N3.- P.6I3 - 624.

207. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. Theory of protein molecule self - organization.I. Thermodynamic parameters of local secondary structures in the unfolded protein chain// Biopolymers.- I977.- Vol.I6,N3.- P.469 - 495.

208. Fisher D.B., Mueller G.C. An early alternative in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I968. - Vol.60, N4.- P.I396 - - I402.

209. Fisher D.B., Mueller G.C. The stepwise acceleration of phosphatidylchaline synthesis in phytohemagglutinin - treated lymphocytes// Biochim. et biophys. acta.- I969.- Vol.I76, N2.- P.3I6 - 323.

2I0. Fisher D.B., Mueller G.C. Studies on the mechanism by which phytohemagglutinin rapidly stimulates phospholipid metabolism of human lymphocytes// Biochim. Biophys. Acta.- I97I. - Vol.248, N3.- P.434 - 448.

2II. A statistical analysis of amino acid sequence in protein chains/ P.Fleming, M.Milne, D.Morgan, M.Morris// Int. J. Bio - Medical Computing.- I972.- Vol.3,NI.- P.9I - I00.

2I2. Folch J., Lees M., Soloane - Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues// J.Biol. Chem..- I957.- Vol.I77,N6.- P. 75I - 766.

2I3. Fox M., Ayad S.R. Uptake and intergration of exogenous

DNA by lymphoma cells// Uptake of Informative Molecules by Living Cells.- Amsterdam,I972.- P.295 - 326.

2I4. Gartner T.K., Bennett G.S. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets // J.Biol. Chem.- I985.- Vol.260, N22.- P.II89I - II894.

2I5. Gladner J.A., Laki K. The inhibition of thrombin by diisopropyl phosphofluoridate// Arch. Biochem. Biophys.- Vol. 62,N2.- P.50I - 503.

2I6. Thrombin active site regions required for fibroblast receptor binding and initiation of cell division/ K.C.Glenn, D.H.Carney, J.W.Fenton, D.D.Cunningham// J.Biol. Chem.- I980.- Vol.255,NI4.- P. 6609 - 66I6.

2I7. Glover G., Shaw E. The purification of thrombin and isolation of a peptide containing active center histidine// J. Biol. Chem. - I97I.- Vol.246,NI4.- P.4594 - 460I.

2I8. Golan D.T., Borel Y. Spontaneous increase of DNA turnover in murine systemic lupus erythematosus// Eur. J.Immunol.- I983.- Vol.I3,N5.- P.430 - 433.

2I9. Goldfarb R.H., Timone T., Herberman R.B. Production of plasminogen activator by human natural killer cells. Large granular lymphocytes// J. Exp. Med.- I984.- Vol. I59, N3.- P.935 - 95I.

220. Gordon E.A.,Stiernberg J., Carney D.H. Thrombin binding to high affinity receptors increases cAMP levels in resting fibroblasts// J.Cell. Biol.- I984.- Vol.99, N4, Pt2.- P. 4I7.

22I. Gorman J. Inhibition of human thrombin assessed with diffe-

rent substrates and inhibitors. Characterization of fibrinopeptide binding interaction// Biochim. et. Biophys. acta.- I975.- Vol.4I2, N2.- P.273 - 282.

222. Gorman J.J., Castaldi P.A., Shaw D.C. The structure of human thrombin in relation to autolytic degradation// Biochim. et biophys. acta.- I976.- Vol.439, NI.- P.I - I6.

223. Introduction of prothrombin sythesis by prothrombin fragments/ C.B.Graves, T.W.Munns, T.L.Carlisle et al.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.- I98I.- Vol.78,N8.- P.4772 - 4776.

224. Grupp S.A. ,Harmony J.A.K. Increased phosphatidylinositol metabolism is an important but not an obligatory early event in B lymphocyte activation// J.Immunol.- I985.- Vol. I34, N6.- P.4087 - 4094.

225. Guzzo A.V. The influence of amino acid sequence on protein structure// Biophys. J.- I965.- Vol.5,N5.- P.809 - 822.

226. Hageman T.C., Scheraga H.A. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. Reaction of the N- terminal CNBr - fragment from the A α - chain of human fibrinogen with bovine thrombin// Arch. Biochem. and Biophys.- I974.- Vol.I64, N".- P.707 - 7I5.

227. Hageman T., Endres G., Scheraga H. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen// Arch. Biochem. and Biophys.-I975. - Vol.I7I,NI.- P.327 - 336.

228. Specific nuclear proteins generated by serum signals involved in lymphocyte stimulation/ R.Haire, D.Hall, J.O'Leary, A.Rosenberg// J.Cell Biol.- I984.- Vol.99, N4.- P.333.

229. Hall D.J., O'- Leary J.J., Rosenberg A. Early synthesis

of specific cytoplasm proteins is correlated with the rate of exit of lymphocytes from thf resting state// J. Cell Biol.- I984.- Vol.99, N5.- P.I8I4 - I82I.

230. Hanbauer I., Memo M. Long - term modulation of dopamine receptor sensitivity: participation of calmodulin// Apomorphine and other dopaminomimetics.- New York, I98I.- Vol.I.- P.I7I - I76.

23I. Hanigan M.H., Pitot H.C. Gamma - glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinigenesis// Carcinogenesis.- I985.- Vol.6, N2.- P.I65- I7I.

232. Hedner D. Age - dependance of molecular and functional changes in biological membrane properties// Mechanisms aging and develop.- I980.- Vol.I4, NI-2.- P.IOI -II8.

233. Human fibrinogen: sequence, sulfur bridges, glycosylation and some structural variants/ A.Henschen, E.Lottspeich, C.Southan, E.Topfer - Petersen// Protides Biol. Fluids. Proc. 28th Colloq.- Brussels,I980.- P.5I - 56.

234. On the specifity of thrombin: evidence for the selective cleavage of a histidyl boud/ A.Henschen, C.Southan, M. Kehl, W.Bode// Heppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.- I982.- Vol.363, N9.- P.982.

235. Duration of the calcium signal in the mitogenic stimulation of thymocytes/ T.Hesketh, S.Bavetta, G.Smith et al. // Biochem. J. - I983.- Vol.2I4, N2.- P.575 - 579.

236. Hewett - Emmett D., Walz D., Seegers W.H. Evolutionary and functional observations on the primary structure of the non - thrombin region (residues I - 273) of human prothrombin // Biochem. Soc. Trans.- I977.- Vol.5,N5.-

P.I452 - I455.

237. Biochemical cascade of lipid metabolism in activated lymphocytes/ F.Hirata, J.Axelrod, M.Iwata et al.// Mech. Lymphocyte Activ. Proc. I4 Int. Leucocyte Conf. - Heidelberg, I98I.- P.4I -46.

238..Phospholipid methylation: A biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis/ F.Hirata, S.Toyoshima, Y.Axelrod, Y.Waxdal// Proc. Natl.Acad.Sci. USA.- I980.- Vol.77,N2.- P.862 - 865.

239. Hodes Z., Nemathy G., Scheraga H.A. Influence of hydration on the conformational stability and formation of bends in terminally blocked dipeptides// Biopolymers.- I979.- Vol. I8.-N7.- P.I6II - I634.

240. Hu Kung W.I., Tulinsky A. X - ray crystallographic structure determination of proteins involved in the onset of blood coagulation// Regul. Coagulat.- New York, I980.- P. 8I - 88.

24I. Hymer W.C., Kuff P.C. Isolation of nuclei from mamalian tissues through the use of triton X - I00// J.Histochem. Cytochem.- I964.- Vol.I2, N5.- P.359 - 363.

242. Hynes R.O. Role of surface alterations in cell transformation: the importance of proteases and surface proteins// Cell.- I974.- Vol.I, N2.- P.I47 - I56.

243. Inbar M. Fluidity of membrane lipids: a single all analysis of mouse normal lymphocytes and malignant lymphoma cells// FEBS Lett.- I976.- Vol.67,N2.- P.I80 - I85.

244. Lipid droplets containing DNA - histones released in the culture medium of transformed rat fibroblasts (HY I)/K.

Ishii, T.Sudo, M.Kohno et al.// Cell Structure and Funct. - I983.- Vol.8, NI.-P.35 - 42.

245. Jacques E., Downing M.R. Structure of human thrombin: comparison with other serine proteases// Chemistry and Biology of Thrombin.- Michigan, I977.- P.97 -III.

246. Jolles P., Loucheux - Lefebvre M-H, Henschen A. Structural relatedness of casein and fibrinogen γ- chain// J. Mol. Evol.- I978.- Vol.II,N4.- P.27I - 277.

247. Jondall M.,Holm G., Wigzell H. Surface markers of human T and B lymphocytes. I . A large population . A large population of lymphocytes forming non - immune rosettes with sheep red blood cells// J.Exp. Med.- I972.- Vol.I36, N2.- P.207 - 2I3.

248. Kabsch W., Sander C. How good are predictions of protein secondary structure ?// FEBS Lett.- I983.- Vol.I55,N2.- P.I79 - I82.

249. Kaplan J.C., Bona C. Proteases as mitogens. The effects of trypsin and pronase on mouse and human lymphocytes// Exp. Cell Res.- I974.- Vol.88,N2.- P.388 - 394.

250. Kaplan J.G., Mitchell M., Bard E. Synthesis and processing of RNA in stimulated fibroblasts and lymphocytes// Cell. Biology and Immunology of leucocytes function.- New York, San Francisco, London, I979.- P.87 - I05.

25I. Keprtova J.,Minavova E., Incorporation of exogenous DNA into L cells outside the S phase// Folia biol. ($\bar{C}_{SSR}$).- I982.- Vol.28,NI.- P.60 -66.

252. Khullar A.K.,Schwarz V., Wilson P.D. The human eccrine sweat gland adenylate cyclase system: response to agonists

//Clin.Sci.- I985.- Vol.68,N4.- P.433 - 439.

253.Pulse fluorimetry of N - (I - pyrenesulfonyl) dipalmitoyl -ℒ-α- phosphatidyl - ethanolamine in concanavalin A - stimulated human lymphocytes/ N.Kido, K.Tanaka, N.Kaneda , K.Yagi// Biochim. et biophys. acta.- I980.- Vol.603,N2.- P.255 - 265.

254.Kingdon H.S., Noyes C.M., Lundblad R.Z. Some aspects of the primary structure of bovine alpha, beta and gamma Thrombin. - Michigan, I977.- P.9I - 96.

255.Kingston A.E., Ivanyai J.,Kay J.E. The effects of indometacin on T lymphocyte stimulation// Immun. Lett.- I984.- Vol.8, N6.- P.30I - 305.

256.Klapper M.H. The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides// Biochem. Biophys. Res. Communs.- I977.- Vol.78, N3.- P.I0I8 - I024.

257.Koenig J.Z. Vibrational spectroscopy of polypeptids and proteins// Infrared and Raman Spectrosc. Biol. Mol. Proc. NATO Adv. Study Just. Athens.- Dordrecht, I979.- P.I09 - I24.

258.Kotelchuck D., Scheraga H.A. The influence of shortrange interactions on protein conformation. II . A model for predicting the α- helical regions of proteins// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I969.- Vol.62, NI.- P.I4 - 2I.

259.Krzywicki A.,Slonimski P.P. Formal analysis of protein sequences: I.Specific long - range constraints in pair associations of amino acids// J. Theor. Biol. - I967.- Vol. I7, NI.- P. I36 - I58.

260.Ku G.S., Quigley J.P., Sultzer B.M. The inhibition of the mitogenic stimulation of B lymphocytes by a serine protea-

se inhibitor: commitment to proliferation correlates with an enchanced expression of a cell associated arginine - specific serine enzyme// J. Immunol.- I983.- Vol.I3I, N5. - P.2494 - 2499.

26I. Kudryashov B.A. Interrelations between the blood coagulating system and the physiological anticoagulating system // Nature.- I959.- Vol.I84, N4684.- P.454 - 455.

262. Role of prostaglandin in macrophage cell function/ S.Kunkel, S.Chensue, J.Fantone, P.Ward// Reticuloendothelial System: A comprehensive treatise.- New York, London, I984. - 6.- P.289 - 30I.

263. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4// Nature.- I970.- Vol.277, N5259.- P.680 -685.

264. Levitt M., Greer G. Automatic identification of secondary structure in globular proteins// J.Mol. Biol.- I977.- II4, N2.- P.I8I - 239.

265. Levy G.A., Edgington T.S. Lymphocyte cooperation is required for amplification of macrophage procoagulant activity// J.Exp. Med.- I980.- Vol.I5I, N5.- P.I232 - I244.

266. Lichman A.H., Segel G.B., Lichman A. The role of calcium in lymphocyte proliferation// Blood.- I983.- Vol.6I, N3.- P.4I3 - 422.

267. Protein measurements with Folin phenol reagent/ O.Lowry, N.Rosebrough, A.Farr, R.Randall// J.Biol.Chem.- I95I.- Vol.I93, NI.- P.265 - 275.

268. The covalent differences between bovine α and β - thrombin/ B.Lundblad, C.Noyes. K.Mann, H.Kingdon// J.Biol.

Chem.- I979.- Vol.254, NI7.- P.8524 - 8528.

269. Lyberg T., Prydz H. Lectin stimulation of tissue thromboplastin activity in human monocytes in vitro// Thromb. Haemost.- I980.- Vol.42, N5.- P.I574 - I579.

270. Mac Farlane R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier// Nature.- I964.- Vol.202, N493I.- P.498 - 499.

27I. Magnusson S. Homologies between thrombin and other serine proteinases// Biochem.J.- I968.- Vol.II0,N3.- P.25 -26.

272. Magnusson S. Thrombin and prothrombin// Plasma proteins.- Chichester. New York, I979.- P.254 -276.

273. Complete primary structure of prothrombin: isolation, structure, and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin/ S.Magnusson, T.Peterson, L.Sottrup - Jensen, H.Clayes// Proteases and Biological Control.- New York, I975.- Vol.2.- P.I23 - I49.

274. Prothrombin/ K.G.Mann, J.Elion,R.Butkowski et al.// Meth. Enzymol.- I98I.- Vol.80.- P.286 - 302.

275. The molecular mechanism of prothrombin activation/ K.G. Mann, C.M.Heldebrant, S.P.Bajaj et al.// Thromb. Diath. Haemorrhag.- I974.- Vol.52. Suppl.- P.I79 - I96.

276. Martin B.M., Qugley J.P. Binding and internalization of I^{I25} - thrombin in chick embryo fibroblasts: possible role in mitogenesis// J.Cell Physiol.- I978.- Vol.96, N2.- P.I55 - I64.

277. Marnuama I., Majerus P. The turnover of thrombin - thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endot-

helial cells and A549 lung cancer cells endocytosis and degradation of thrombin// J.Biol. Chem.- I985.- Vol.260, N29.- P.I5432 - I5438.

278. Matayoshi E.D., Kleinfeld A.M. Emission - wavelength - dependent decay of the fluorescent probe N - phenyl - I-naphthylamine// Biochim. et biophys. acta.- I98I.- Vol. 644, N2.- P.233 - 243.

279. Matthews B.W. Comparison of predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme// Biochim. Biophys. Acta.- I975.- Vol.405, N2.- P.442 - 45I.

280. Matthews B.W. X - ray crystallographic studies of proteins// Ann. Rev. Phys. Chem. - I976.- Vol.27, N4.- P.493-523.

28I. Mazzei D., Novi C., Bazzi C. Blast - forming effect of trypsin and chymotrypsin in short therm lymphocyte cultures of normal subjects// Boll. Ist. Sieroter. Milan.- I966.- Vol.45, N7 - 8.- P.398 - 406.

282. Mc Coy L.E. , Walz D.A., W.H. Seegers. Prethrombin and the ultimate formation of thrombin// Thrombos. Res. - I973.- Vol.3, N2.- P.357 - 36I.

283. Mc Kay D.B., Kay L.M., Strond K.M. Preliminary crystallization and X - ray difraction studies of human thrombin // Chemistry and Biology of Thrombin.- Michigan, I977.- P.II3 - I2I.

284. Mc Lachan A.D. Quantum chemistry and protein folding: the art of the possible// Int. J. Quant. Chem. - I978.- Vol. I2, Suppl.I.- P.37I - 385.

285. Oncogenes and inosital lipids// Nature.- I984.- Vol.308,

N5962.- P.770.

286. Mills T.A. The immunologic significance of antigen induced lymphocyte transformation in vitro// J.Immunol.- I966. - Vol.97, N2.- P.239 - 247.

287. Fatty acid metabolism and cell proliferation. . Evaluation of pathways for the generation of lipid peroxides/ N.Morisaki, J.Lindsey, J.Stitts et al.// Lipids.- I984.- Vol.I9,N6.- P.38I - 394.

288. Morris H.W. , Sherman N.A. , Shepperdson F.T. Variables associated with radioimmunoassey of prostaglandins in plasma// Prostaglandins.- I98I.- Vol.2I, N5.- P.77I - 788.

289. Morrison W.R. A fast simple and reliable method for the microdetermination of phosphor in biological materials// Anal. Biochem.- I964.- Vol.7, N2.- P.2I8 - 224.

290. Myrmel K.H., Lundblad R.Z., Mann K.G. Characteristics of the association between prothrombin fragment 2 and α-thrombin// Biochemistry.- I976.- Vol. I5, N8.- P.I767 - - I773.

29I. Nagano K. Triplet information in helix prediction applied to the analysis of supersecondary structures// J.Mol. Biol.- I977.- Vol.I09, N2.- P.25I - 274.

292. Nathaniel D., Mellors A. Mitogen effects on lipid metabolism during lymphocyte activation// Mol. Immunol.- I983.- Vol.20, NI2.- P.I259 - I265.

293. Neisheim K., Prendergast F., Mann K. Interactions of a fluorescent active site - directed inhibitor of thrombin // Biochemistry.- I979.- Vol.I8,N5.- P.995 - I003.

294. A low resolution model of fragment I from bovine proth-

rombin/ G.Olsson, L.Andersen, O. Lindqvist et al.// FEBS Lett.- I982.- Vol.I45, N2.- P.3I7 - 322.

295. Ondinet J.P., Hassid A. Calcium modulation of prostaglandin din (PG) biosynthesis in vascular smooth muscle cells// Prostaglandins.-I984.- Vol.27, Suppl.- P.I2I.

296. Parker C.W. Arachidonic acid metabolism in activated lymphocytes// Mech. Lymphocyte Activ. Proc. I4 Int. Leucocyte Conf., Heidelberg, I98I. Amsterdam e.a., I98I.- P. 47-57.

297. Parker C.A., Rees W.T. Correction of fluorescent spectra and measurements of fluorescence quantum efficiency// Analyst.- I960.- Vol.85, NI0I3.- P.587 - 6oo.

298. Activation of human lymphocytes by concanavalin A or purified proteins derivate results in no alteration of fluorescence polarization of lipid probes although the electro - phoretic mobility of the cells is changed / A.H.Parola , J.H.Kaplan, S.H.Lockwood, E.E.Uzgiris// Biochim. et bio - phys. acta.- I98I.- Vol.649, N3.- P.6I6 - 624.

299. Pawlikowski M. Are prostaglandins involved in the mitogenic actions of hormones?// Exp. and Clin. Endocrinol.- I983.- Vol.8I,N3.-P.233 - 238.

300. Protease mitogenic response of chick embryo fibroblasts and receptor binding/processing of human α - thrombin/ J.Perdue, W.Lubenskyi, E.Kivity et al.// J.Biol. Chem. - I98I.- Vol.256,N6.-P.2767 - 2776.

30I. Periti P.F. A Bayesian approach to the recognition of discrete patterns with an application to a problem of protein molecular structure// Bull. Chim. Farm. - I974.- Vol.

II3,N2.- P.I87 - 2I8.

302. Periti P.F., Guagliarotti G.,Liquori A.M. Recognition of α- helical segments in proteins of known primary structure// J. Mol . Biol.- I976.- Vol.24,N2.- P.3I3 - 322.

303. Perry R.P., Kelley D.E. Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells// Cell.- I974.- Vol.I, NI.- P.37 - 44.

304. Perolet M., Pigeon - Gosselin M., Coulombe L. Laser Raman investigation of the conformation of human immmnoglobulin G// Biochim. et biophys. acta.- I976.- Vol.453,N2.- p.502 - 5I2.

305. Pierchbacher M.D., Hayman E.G., Ruoslahti E. The cell attachment determinant in fibronectin// J. Cell. Biochem.- I985.- Vol.28,NI.-P.II5 - I26.

306. Plopsis V.A., Strickland D.F., Castellino F.J. Calorimetric evaluation of the existance of separate domains in bovine prothrombin// Biochemistry.- I98I.- Vol.20,NI.- P.I5 - 2I.

307. Polliak A. Normal, transformed and leukemic leucocytes. A scanning electron microscope atlas.- Berlin, Heidelberg, New York: Springer - Verlag, I977.- I40 p.

308. Effect on concanavalin A on membrane - bound enzymes from mouse lymphocytes/ G.Pommier, A.Ripert, E.Azoulay, R.Depieds// Biochim. Biophys. Acta.- I975.- Vol.389,N3.- P. 483 - 494.

309. Ptitsyn O.B. Statistical analysis of the distribution of amino acid residues among helical and non - helical regions in globular proteins// J.Mol.Biol.- I969.- Vol.42, N3.- P.50I - 5I0.

3IO. Involvementof serine proteases in growth control and malignant transformation/ I.P.Quigley, B.M.Martin, R.H. Goldfarb et al.// Horm. and Cell. Cult. Book A. Cold Spring Harbor, I979.- P.2I9 - 238.

3II. Rae I.D., Scheraga H.A. ^{I}H and ^{I4}C nuclear magnetic resonance spectra of some peptides with fibrinogen - like reactivity// Int. J. Peptide Protein Res.- I979.- Vol.I3,N3. - P.304 - 3I4.

3I2. Rao K., Varani I. Actin polymerization induced by chemotac tic peptide and concanavalin in a rat neutrophils// J. Immunol.- I982.- Vol.I29, N4.- P.I605 - I607.

3I3. Reddan J.R., Dziedzic D.C., Mc Lee S.J. Thrombin induces cell division in rabbit lenses cultured in a completely definite serum - free medium// Invest. Opthalmol. Vis.Sci. - I982.- Vol.22,N5.- P.486 - 493.

3I4. Resch K., Ferber E. Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes, effects of phytohemagglutinin, concanavalin A and anti - immunoglobulin serum// Eur. J. Biochem.- I972 -Vol.27,NI.- P.I53 - I6I.

3I5. The role of phospholipids in the signal transmission of activated T lymphocytes/ K.Resch, M.Brennecke, M.Goppelt et al.// Progr. Immunol. V. 5 Int. Congr. Immunol.- Kyoto, I983. Tokyo e.a., I984.- P.349 - 359.

3I6. Rigas A., Levine L. Arachidonic acid metabolism by rat liver cells (The C - 9 cell line)// J. Pharmacol. and Exp. Ther.- I984.- Vol.23I, N2.- P.230 - 235.

3I7. Robson B., Suzuki E. Conformational properties of amino acid residues in globular proteins// J.Mol. Biol.- I976.-

Vol.I07, N3.- P.327 - 356.

3I8. Rogers J.C., Rucinsky T.E. Unstable high molecular weight inverted repetitive DNA in human lymphocytes// Nucl. Acids. Res.- I982.- Vol.I0,NI8.- P.5483 - 550I.

3I9. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex/ J.Rosing, G.Tans, J.Glovers - Riemslag et al.// J.Biol.Chem.- I980.- Vol.255, NI.- P.274 - 283.

320. Inhibition of platelet function with synthetic peptides designed to be high - affinity antagonists of fibrinogen binding to platelets/ Z.Ruggeri, R.Houghten, S.Russel, T. Zimmerman// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.- I986.- Vol.83,NI5. - P.5708 - 57I2.

32I. Russel R.F. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen// Ann. N.Y. Acad.Sci.- I983.- Vol.408.- P.I3 - 26.

322. Sanchez - Crespo M., Alonso F., Egito J. Platelet activating factor in anapxylaxis and phagocythosis// Immunol. - I980.- Vol.40, N4.- P.645 - 655.

323. Discrepances between flow cytometric analysis and ^{3}H thymidine incorporation in stimulated lymphocytes/ M. Sasvari - Szekely, G.Szabo, M.Staub et al.// Biochim. Biophys. Acta.- I983.- Vol.763, N3.- P.452 - 457.

324. Sawaryn A. Predicted structure for haptoglobulin// Biomol. Struct. Conform. Funct. and Evol. Proc. Int. Symp.- Madras, I978.- Vol.2.- P.III - II6.

325. Schiffer M., Edmundson A.B. Correlation of amino acid sequences and conformation in tobacco mosaic virus// Biophys. J.- I968.- Vol.8,NI.- P.29 - 39.

326. Schroter W. Erythrocyte enzymes// Clin. Biochem. Princ.

Methods.- 1974.- Vol.2.- P.1178 - 1207.

327. Seegers W.H., Landaburu R.H. Esterase and clotting activity derived from purified prothrombin// Amer. J. Physiol.- 1957.- Vol.191.N1.- P.167 - 173.

328. Isolation and some properties of thrombin - E and other prothrombin derivatives/ W.H.Seegers, D.A.Walz, J.Renterby. L.E.McCoy// Thromb.Res.- 1974.- Vol.4,N4.- P.829 - 860.

329. Sharma O.K., Loeb Z.A. Methylation of transfer RNA during transformation of human lymphocytes by phytohemagglutinin // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1973.- Vol.50.N1.- P. 172 - 178.

330. Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds/ M.N.Siamwisza, R.C.Lord, M.C.Chen et al. // Biochemistry.- 1975.- Vol.14,N22.- P.4664 - 4668.

331. Singer R.,Penman S. Stability of HeLa cell mRNA in actimomycin// Nature.- 1972.- Vol.240, N5376.-P.100 - 102.

332. Smith J.A., Pease L.G. Reverse turns in peptides and proteins// CRC Crit. Rev. Biochem.- 1980.- Vol.8,N4.- P.315-399.

333. Effect of trifluoperazine on DNA synthesis during liver regeneration/ M.Soriano, R.Pinol, C.Enrich, O.Bachs//Cell and Tissue Kinet.- 1985.- Vol.18,N5.- P.475 - 481.

334. Steiner M. Fluorescence studies of platelet tubulin// Biochemistry.- 1980.- Vol.19, N19.- P.4492 - 4499.

335. Stern R., Friedman R. Double - stranded RNA synthesized in animal cells in the presence of actinomycin D//Nature. - 1970.- Vol.226,N5246.-P.612 - 616.

336. Initiation of DNA synthesis by human thrombin: relationships between receptor binding, enzymic activity, and stimulation of $^{86}Rb^{+}$ influx/ J.Stirnberg, D.Carney, J. Fenton, E.La Belle// J.Cell. Physiol.- I984.- Vol.I20, N3. - P.289 - 295.

337. Strauss P.R., Andrutis A.T., Leong S. Cytoplasmic DNA from murine splenocytes// Immunobiology.- I982.- Vol.I63, N2 - 4: I5 Int. Leucocyte Cult. Conf., Asilomar, I982.- P.I88.

338. Stroun M., Anker P. Transcription of spontaneously release bacterial deoxyribonucleic acid in frog auricles// J. Bacteriol.- I973.- Vol.II4, NI.- P.II4 - I20.

339. Circulating DNA in higher organisms/ M.Stroun, P.Anker, P.Maurice, P.Gahan// Int. Rev. Cytol.- I977.- Vol.5I,NI.- P.I - 48.

340. Sun A.S., HollandJ.F. Implications of 5' - nucleotidase and its inhibitor for cellular aging and cancer// Mol. Biol. Aging Proc. Symp., Upton, N,Y,I984. New York, London, I985.- P.I63 - I80.

34I. Suttie J.W., Jackson C.M. Prothrombin Structure, activation and biosynthesis// Physiol. Rev.- I977.- Vol.57, NI.- P. I - 70.

342. Szamel M.,Resch K. Inhibition of lymphocytes activation by oubain. Interference with the early activation of membrane phospholipid metabolism// Biochim. Biophys. Acta.- I98I.- Vol.647, N2.- P.297 - 30I.

343. Takagi T., Doolittle R.F. Amino acid sequence studies of factor XIII and the peptide released during its activa-

tion by thrombin// Biochemistry.- I974.- Vol.I3,N4.- P. 750 - 756.

344. Teale F.W., Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids// Biochem. J.- I957.- Vol.65,N3.- P. 476 - 482.

345. Torelli U. Characteristics of geterogeneous nuclear RNA in normall small lymphocytes and in acute leukemia blast cells// Acta haematol.- I975.- Vol.54, N4.- P.234 - 24I.

346. Tracy P.B., Eide L.L., Mann K.G. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations// J. Biol. Chem.- I985.- Vol.260, N4.- P.2II9 - 2I24.

347. Traill K.N., Wick G., Lipids and lymphocyte function// Immunol. Today.- I984.- Vol.5,N3.- P.70 - 76.

348. Increased platalet sensitivity and tromboxane B_2 formation in type - II hyperlipoproteinaemic patients/ E.Tremoli, P.Maderna, S.Colli et al.// Eur. J. Clin. Invest.- I984.- Vol.I4, N5.- P. 329 - 333.

349. Acyltransferase - catalyzed cleavage of arachidonic acid from phospholipids and transfer to lysophosphatides in lymphocytes and macrophages/ G.Trotter, I.Flesh, B.Schmidt, E.Ferber// J.Biol. Chem.- I982.- Vol.257, N4.- P. I8I6 - I823.

350. Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.Y. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator // J. Cell. Biol. - I982.- Vol.94, N2.- P.325 - 334.

35I. Uhteg L.C., Lundblad R.J. The modofication of tryptophan in bovine thrombin// Biochim. Biophys. Acta.- I977.-Vol. 49I, N2.- P.55I - 557.

352. Van Nispen Y. W., Hageman T.C., Scheraga H.A. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen// Arch. Biochem. and Biophys.- I977.- Vol.I82, NI.- P.227 - 243.

353. Varesio I., Kowall R. RNA metabolism and macrophage activation // Immunobiology.- I982.- Vol.I63, N2-4:I5 Int. Leucocyte Cult. Conf., Asilomar, I982.- P.42I.

354. Veigl M.Z., Vanaman T.C., Sedwick W.D. Calcium and calmodulin in cell growth and transformation// Biochim. Biophys. Acta.- I984.- Vol.738, NI/2.-P.2I -48.

355. Changes in the exposure of tryptophan and tyrosyl residues in thrombin due to diisopropylphosphorofluoredecte and benzamidine inhibitions/ G.B.Villanueva, C.W.Batt, E.Sauswille et al.// Biochem. and Biophys. Res., Communs.- I975.- Vol.67,NI.- P.359 - 365.

356. Visher T.Z. Stimulation of mouse B lymphocytes by trypsin // J. Immunol.- I974.- Vol.II3, NI.- P.58 - 62.

357 . Walker F.I., Esmon C.T. The effect of prothrombin fragment 2 on the inhibition of the thrombin by antithrombin III// J.Biol. Chem.- I979.- Vol.254, NI3.- P.56I8 - 5622.

358. Walz D.A., Hewett - Emmett D., Seegers W.H. Amino acid sequence of human prothrombin fragments I and 2// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.- I977.- Vol.74,N5.-P.I969 - I972.

359. Walz D.A., Seegers W.H. Amino acid sequence of human thrombin A chain// Biochem. Biophys. Res. Commun.-

I974.- Vol.60,N2.- P.7I7 - 722.

360. Proteolytic specifisity of thrombin/ D.A.Walz, W.H.Seegers, J.Renterby, L.McCoy// Thrombos. Res.- I974.- Vol. 5,N3.- P.7I3 - 7I6.

36I. Wedner H.J. Biochemical events associated with lymphocyte activation// Surv. Immunol. Res.- I984.- Vol.3,N4.- P.295 - 303.

362. White G.C., Lundhlad R.L., Griffith M.J. Structure - function relations in platelet - thrombin reactions. Inhibition of platelet - thrombin interactions by lysine modifications// J.Biol.Chem. - I98I.- Vol.256, N4.- P.I763 - I766.

363. Wiktorowicz K., Szyfter K., Mackievich A. The effect of exogenous DNA on proliferation of human lymphocytes in vitro// Immunol. pol.- I985.- Vol.I0,NI.- P.I5 - 23.

364. Willingham M.C., Pasten I. cAMP modulates microvillus formation and agglutinability in transformed and normal mouse fibroblasts// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I975.- Vol.72, N4.- P.I263 - I267.

365. Endoperoxide aggregator (LASS), formed in platelets in response to thrombotic stimuli. Purification, identification, and unique biological significance/ A.L.Willis, F. M. Vane, D.C.Kuhn et al.// Prostaglandins.- I974.- Vol. 8, N6.- P.453 - 507.

366. Wu T.T., Kabat E.A. An attempt to locate the non - helical and permissively helical sequences of proteins: Application to the variable regions of immunoglobulin light and heavy chains// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I97I.-

Vol.68,N9.-P.I50I - I506.

367..Yu N.T. Comparison of protein structure in crystals, in lyophilized state and in solution by laser Raman spectroscopy. II . Ribonuclease A and carboxypeptidase// J.Amer. Chem. Soc. - I973.- Vol.95, NI6.- P.5033 - 5037.

368. Raman spectroscopy of liver alcohol dehydrogenase/ K.T. Yue. J.P.Yang, C.L.Martin et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun.- I984.- Vol.I22,NI.-P.225 - 229.

369. Zimmerman S.S., Sceraga H.A. Local interactions in bends of proteins// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- I977.- Vol.74, NIO.- P.4I26 - 4I29.

370. Zwiller J., Revel M., Malviya A. Protein kinase C catalyzes phosphorylation of quanilate cyclase in vitro// J. Biol. Chem.- I985. - Vol.260, N3.- P.I350 - I353.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
(руководитель и титул учреждения
I ММИ им. И.М.Сеченова
принявшего предложение для
профессор Н.В.Чебышев
внедрения)

№ 25-61

"13" апреля 1987 г.

"13" апреля 1987 г.

м.п.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научных достижений.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: Тюкавкиной Н.А., зав. кафедрой органич.химии, профессор; Зурабяна С.Э., доцента, д.хим. н.; Ручкина В.Е., доцента, канд.хим.н.
(ФИО и должность)

составили настоящий акт в том, что наше подразделение кафедра органической химии I Московского медицинского
(наименование подразделения и его учреждение)
института им. И.М.Сеченова

использует в повседневной работе с 1986 г. следующее предложение
(дата)

данные о строении пептидной связи, данные для предсказания вторичной структуры белковой молекулы и структурного класса глобулярных белков
(наименование предложения)

по теме НИР "Научные основы подготовки и воспитания молодых специалистов в медицинском вузе" и входящей в состав этой
(название темы НИР подразделения, подавшего предложение для внедрения)
проблемы темы: "Принципы построения обучающих задач и адекватного контроля в курсах органической и биоорганической химии"

авторы предложения Барковский Е.В., доцент кафедры биохимии Минского медицинского института
(ФИО, должность, учреждение)

В течение 1,5 лет данное предложение было использовано в
(срок)
практике работы и получены следующие результаты: Данные работ Е.В.Барковского используются при чтении лекций
(конкретное перечисление обобщенных результатов, медицинских и другие эффекты, предложения по дальнейшему пути реализации)
по теме "Пептиды и белки" и способствуют выработке путей предсказания вторичной структуры белковых молекул.

Протокол заседания кафедры органической химии

№4 от 9.10.85 г.

Заключение: Предложение Е.В.Барковского о предсказании вторичной структуры белковых молекул может быть использовано в лекциях и на практических занятиях со студентами медицинских и фармацевтических вузов, ~~а также со слушателями ФПК~~.

(может быть использовано в практической работе или требует доработки)

Подписи:

ФИО и должность состава комиссии

Зав. кафедрой органической химии, доктор химических наук, профессор — Н.А.Тюкавкина

Доцент кафедры органической химии, доктор химических наук — С.Э.Зурабян

Зав. учебной частью кафедры органической химии, доцент, кандидат химических наук — В.Е.Ручкин

Подписано к печати 1.12.85 г.
Зак.№ 880 Тир.1000экз.

"Утверждаю"
И.о. зам. директора ЦНИИГПК
по научной работе, доктор медицинских наук Афонин Н.И.

Акт

о внедрении способа определения активности тромбина В.А. Сятковского и Е.В. Барковского (авторское свидетельство SU 1161878 A; Бюл. № 22, 15/VI-85) в Центральном НИИ гематологии и переливания крови МЗ СССР

Способ, предложенный В.А. Сятковским и Е.В. Барковским использует в качестве субстрата для тромбина фибриноген, содержащий флюоресцентную метку благодаря предварительной его обработки 5 - диметиламиносульфанилхлоридом. Инкубация такого дансилированного фибриногена с тромбином позволяет судить об активности последнего по интенсивности флюоресценции надосадочного раствора, получаемого осаждением белков трихлоруксусной кислотой. Применени флюориметрического метода взамен метода Лоури увеличило примерно в 100 раз чувствительность определения активности тромбина и в несколько раз сократило время процедуры измерения.

В лаборатории биохимии, в лаборатории патологии гемостаза и клинико-диагностической лаборатории ЦНИИГПК способ определения активности тромбина , описанный в авторском свидетельстве В.А.

Сятковского и Е.В. Барковского внедрены и применяются в тех случаях, когда нет возможности производить определение активности тромбина на основе коммерческих хромогенных субстратов

Зав. лабораторией
биохимии,
профессор / Н.А. Фёдоров /

Зав. лабораторией
патологии гемостаза,
доктор мед. наук / В.А. Макаров /

У Т В Е Р Ж Д А Ю

Проректор по учебной работе Гродненского государственного медицинского института

д о ц е н т Н.К.ЛУКАШИК

24 марта 1987г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Мы, нижеподписавшиеся, зав. учебной частью кафедры биоорганической и биологической химии, доцент Г.А.Доста, ассистент, кандидат мед. наук В.В.Лелевич удостоверяем, что результаты научных работ Е.В.Барковского, касающиеся предсказания вторичной структуры и структурного класса глобулярных белков, опубликованные в журналах: "Биоорганическая химия", 1979, т 5, №1, с. 24-34; "Известия АН БССР", сер.биол.наук, 1981, №6, с. 118; " Acta Biol. Med. Germ. " 1982, v. 41, №9, p. 751-758; "Биофизика", 1985, т.30, №5, с. 782-785 "Биофизика", 1985, т.30, №5, с.786-790; "Известия АН БССР", сер. биол. наук, 1985, №5, с. 109-110 и др., внедрены в учебный процесс (лекционный курс) кафедры биоорганической и биологической химии Гродненского медицинского института.

Результаты работ Е.В.Барковского используются при чтении лекций по темам: "Строение и функции белков", "Биополимеры".

Ответственные за внедрение:

Зав. учебной частью кафедры биоорганической и биологической химии

д о ц е н т Г.А.ДОСТА

Ассистент, канд. мед.наук В.В.ЛЕЛЕВИЧ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Белорусского государственного
института усовершенствования
врачей

доцент В.И.ТЕРНОВ

10.04.87г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Мы, нижеподписавшиеся, зав.кафедрой гематологии и трансфузиологии, доктор медицинских наук, профессор Иванов Е.П., зав.учебной частью кафедры гематологии и трансфузиологии, кандидат медицинских наук, доцент Большов В.В., удостоверяем, что результаты научных работ Барковского Е.В., касающиеся молекулярных механизмов лимфоцит-опосредованных эффектов α-тромбина, опубликованные в журналах: "Украинский биохимический журнал", 1986, т.58, № 6, с.23-27; "Украинский биохимический журнал", 1987, т.59, № 2, с.33-39, а также в материалах Всесоюзной конференции "Актуальные проблемы гематологии в клинической практике", Москва 1987,с.217-218 и III Республиканского съезда врачей-лаборантов Белорусской ССР, Минск, 1986, с.199 и др., внедрены в учебный процесс (лекционный курс) кафедры гематологии и трансфузиологии.

Данные работ Барковского Е.В. используются при чтении лекций по темам: "Функциональные компоненты системы гемостаза", "Система свертывания крови", "Иммунокомпетентная система и гемостаз".

Ответственные за внедрение:

Зав.кафедрой гематологии и трансфузиологии, профессор /Иванов Е.П./

Зав.учебной частью кафедры гематологии и трансфузиологии, доцент /Большов В.В./

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Минского ордена Трудового Красного Знамени государственного медицинского института

профессор /Кубарко А.И./

20.12.85 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Мы, нижеподписавшиеся, зав. кафедрой биоорганической и биологической химии, доктор медицинских наук, профессор Кухта В.К., зав. курсом биоорганической химии, кандидат медицинских наук, доцент Романовский И.В., зав. учебной частью кафедры биоорганической и биологической химии, кандидат медицинских наук, доцент Олецкий Э.А. удостоверяем, что результаты научных работ Барковского Е.В., касающиеся предсказания вторичной структуры и структурного класса глобулярных белков, опубликованные в журналах: "Биоорганическая химия", 1979, т.5, № 1, с. 24-34; "Известия АН БССР", сер.биол.наук, 1981, № 6, с. 118; " Acta Biol. Med. Germ. ", 1982, v .41, № 9, p. 751-758; "Биофизика", 1985, т.30, № 5, с. 782-785; "Биофизика", 1985, т.30, № 5, с. 786-790 "Известия АН БССР", сер.биол.наук, 1985, № 5, с. 109-110 и др., внедрены в учебный процесс (лекционный курс) кафедры биоорганической и биологической химии Минского медицинского института.

Данные работ Барковского Е.В. используются при чтении лекций по темам: "Биополимеры", "Строение и функция белков".

Ответственные за внедрение:

Зав. кафедрой биоорганической и биологической химии, профессор /Кухта В.К./

Зав. курсом биоорганической химии, доцент /Романовский И.В./

Зав. учебной частью кафедры биоорганической и биологической химии, доцент /Олецкий Э.А./