



УДК 577.112:612.124.017

СВЯЗЫВАНИЕ АКТИВИРОВАННОГО КОМПОНЕНТА СЗб
С ЭФФЕКТОРАМИ КОМПЛЕМЕНТА*Козлов Л. В., Ростовцева Л. И., Ломака Т. С.,
Сутовская Н. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Различные нуклеофильные агенты (акцепторы) способны реагировать с тиолсложноэфирной связью активированного фрагмента (СЗб) третьего компонента комплемента в момент образования. Связывание СЗб с акцепторами препятствует превращению СЗ-конвертазы в С5-конвертазу и в результате ингибирует лизис клетки-мишени. Разработан удобный метод, позволяющий следить за ингибированием процесса превращения ЕАС142 в ЕАС1423 по снижению лизиса эритроцитов. Характер ингибирования согласуется с представлением о том, что ковалентному связыванию СЗб с акцептором предшествует стадия образования обратимого комплекса СЗб-акцептор. Метод позволяет определить величину максимального ингибирования образования С5-конвертазы и константу диссоциации обратимого комплекса СЗб-акцептор, отражающую аффинность СЗб по отношению к данному акцептору.

Связывание СЗб — активированного фрагмента третьего компонента комплемента (СЗ) — на поверхности клетки является главным звеном комплемент-опосредованного лизиса клетки-мишени. При активации компонента СЗ под действием классической или альтернативной СЗ-конвертазы происходит расщепление молекулы СЗ (186 кДа) на два фрагмента: апафилатоксин СЗа (8 кДа) и СЗб (178 кДа). Фрагмент СЗб содержит экспонированную тиолсложноэфирную связь, ранее скрытую в гидрофобном интерьере исходной молекулы СЗ. Тиолсложноэфирная связь, образованная остатками Cys и Glu последовательности $\text{-Gly-Cys-Gly-Glu-Glu-}$, консервативной для компонентов СЗ и С4 и α_2 -макроглобулина, обладает повышенной реакционной способностью. Эта связь, будучи экспонированной в растворитель, в течение долей секунды гидролизует водой либо ацилирует оказавшуюся поблизости нуклеофильную группу акцепторной молекулы. Известно также автолитическое расщепление молекулы СЗ в денатурирующих условиях в результате нуклеофильной атаки активированного карбонила атомом азота пептидной связи с образованием нового N-концевого пироглутамильного остатка. Постулируется, что при связывании СЗб с клеточной поверхностью также происходит ацилирование гидроксильной группы поверхности. Подборку статей по химии компонентов СЗ и С4 можно найти в отдельном выпуске «Химия и биология α_2 -макроглобулина» [1–9].

Связанный на клеточной поверхности СЗб может активировать альтернативный путь комплемента [6], а также взаимодействовать с рецепторами СЗб (называемыми CR1) на эритроцитах и клетках иммунной системы [7, 10]. Связанный СЗб (или его фрагменты) ответствен за опсонизацию, клеточную кооперацию, представление антигена макрофагами, клиренс иммунных комплексов и другие важные реакции иммунной системы (см. обзор, посвященный роли комплемента в индукции и регуляции иммун-

Сокращения: АТЭЕ — этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина; ЕА — эритроциты барана, покрытые кроличьими антителами против них; ЕАС14, ЕАС142, ЕАС1423 — комплексы ЕА с соответствующими компонентами комплемента; VBS — вероналовый изотонический буфер; VBSЕ — VBS, содержащий 50 мМ EDTA; VBS²⁺ — VBS, содержащий ионы Mg²⁺ и Ca²⁺.

ного ответа [11]). Поэтому компонент СЗ и его фрагменты являются не только ключевым звеном в активации комплемента по обоим путям — классическому и альтернативному, но, возможно, и важными медиаторами в реакциях иммунного ответа.

Мы предположили, что при взаимодействии нуклеофильных акцепторов с тиолсложноэфирной связью активированного фрагмента СЗв важна не только нуклеофильность атакующей группы, но и специфичность взаимодействия (типа фермент — субстрат) акцептора с «активным центром» СЗв, представляющим собой совокупность «каталитического участка» — ацилирующей группы и «сорбционного участка». Как отмечалось в работах Лоу и соавт. [12, 13], эффективность связывания с СЗв (имеется в виду ковалентное связывание) молекул с очень близкими размерами и структурами различна. Кроме того, в качестве акцепторов СЗв (или ингибиторов образования С5-конвертазы) применялись соединения различных классов — спирты, сахара, амины, аминокислоты [12, 13], а также соединения, содержащие фенольный гидроксил, и альдоксим [14], при этом не было прямой корреляции между эффективностью связывания и нуклеофильностью участвующих в реакции групп молекул-акцепторов.

Целью данной работы было создание удобного метода для количественной оценки связывания активированного СЗв с молекулами акцепторов. В литературе описаны два таких метода. Первый из них был представлен как метод исследования ингибирования превращения СЗ-конвертазы — ЕАС142, собранной из компонентов комплемента морской свинки, в С5-конвертазу [14]. В то время еще не было известно о ковалентном связывании СЗв. Однако в работе [14] не дана формула, по которой можно было бы определить константу ингибирования, хотя приводилась кривая насыщения при ингибировании образования С5-конвертазы возрастающими количествами ингибитора. Второй метод основан на оценке количества связанного радиоактивного эффектора при активации компонента СЗ его ферментативным гидролизом трипсином. Дается математическая модель процесса, согласно которой наличие концентрационной зависимости эффективности связывания с насыщением объясняется конкурентной инактивацией СЗв в результате гидролиза тиолсложноэфирной связи. Для количественного сравнения эффективности связывания небольших молекул определяли ингибирование этими молекулами связывания с СЗв радиоактивного эффектора, выбранного за стандарт (глицерина) [12, 13].

За основу мы взяли первый метод, упростив его путем использования для получения промежуточных комплексов разработанных нами ранее реагентов [15]. Идея метода состояла в получении на сенсибилизированных эритроцитах барана (ЕА) СЗ-конвертазы — ЕАС142^{oxy} и определении ингибирования лизиса ЕА в условиях дефицита компонента СЗ в результате акцептирования («перехвата») добавляемым эффектором («перехватчиком») активированных молекул СЗв* (звездочкой обозначаются молекулы СЗв с перасцепленной тиолсложноэфирной связью).

Вначале получали комплекс ЕАС14, обрабатывая ЕА реагентом R₂, как было описано ранее [15]. Затем готовили СЗ-конвертазу, содержащую компонент С2^{oxy}. Известно, что окисление С2 подом приводит к образованию более стабильной СЗ-конвертазы (ЕАС142^{oxy}) из-за увеличения сродства С2а к С4б [16]. Высокая скорость распада СЗ-конвертазы, содержащей обычный компонент С2 ($k=2 \text{ мин}^{-1}$ при 37°С для жидкофазной конвертазы [17]) существенно затруднила бы работу с ней. Для приготовления СЗ-конвертазы к комплексу ЕАС14 добавляли реагент R3^{oxy}, получаемый окислением реагента R3 [15]. Для выбора оптимального времени образования СЗ-конвертазы изучили динамику ее образования (рис. 4). После 2 мин инкубации наблюдается плато концентрации СЗ-конвертазы. В дальнейшем в качестве оптимального было выбрано время инкубации 5 мин.

Процесс образования СЗ-конвертазы останавливали добавлением EDTA. Известно, что ионы Mg²⁺, необходимые для образования СЗ-конвертазы, не нужны на дальнейших стадиях, а удаление их из раствора хелатирующим не разрушает уже образовавшуюся конвертазу. Однако действие хелатирующих агентов не мгновенно и какое-то количество СЗ-кон-

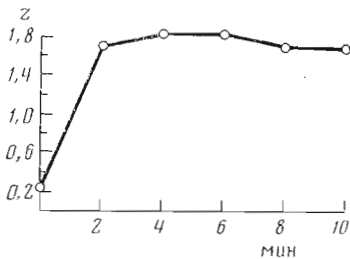


Рис. 1

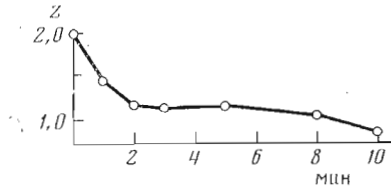


Рис. 2

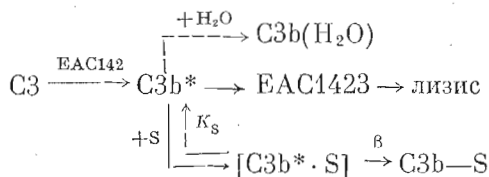
Рис. 1. Динамика образования С3-конвертазы (z — количество мембрано-атакующих комплексов, собираемых на одном эритроците)

Рис. 2. Определение времени, оптимального для действия EDTA

вертазы может образоваться в первые минуты после добавления EDTA. Для определения времени, необходимого для полного связывания ионов Mg^{2+} , мы исследовали динамику изменения количества С3-конвертазы при внесении в систему дополнительного количества начальных компонентов комплемента (в виде сыворотки) через разные промежутки времени после добавления EDTA (рис. 2). Через 2 мин количество С3-конвертазы стабилизируется, поэтому время инкубации с EDTA было выбрано равным 3 мин. Акцептор («перехватчик») вносили вместе с EDTA (буфер VBSE). В качестве источника С3 использовали небольшие количества сыворотки. Наличие в сыворотке ранних компонентов комплемента не может помешать, так как в присутствии EDTA они не работают, а компоненты мембраноатакующего комплекса в системе уже находятся в избыточном количестве, внесенные с реагентом R3, и небольшие дополнительные их количества, вносимые с сывороткой, не влияют на лизис. Лимитированные количества С3 позволяют оценить перехват С3b по ингибированию гемолиза, величина которого отражает количество образующейся С5-конвертазы. По уровню гемолиза определяли величину z — количество мембраноатакующих комплексов, собираемых на одном эритроците [18].

Для контроля влияния акцепторов на более поздние стадии действия комплемента — функционирования С5-конвертазы и мембранной атаки — была разработана система со сборкой С5-конвертазы. Для этого сенсibilизированные эритроциты (ЕА или комплекс ЕАС14) инкубировали с реагентом $R5^{oxy}$, получаемым аналогично R5 с последующим окислением иодом [15]. Далее опыт проводили аналогично исследованию С3b-перехвата, используя для остановки процесса образования С5-конвертазы EDTA, а в качестве источника С5 — небольшие количества сыворотки. На рис. 3 и 4, на которых показана динамика образования комплексного фермента — С5-конвертазы на ЕА и ЕАС14, прослеживается наличие двух плато. Более продолжительное плато на более низком уровне (с 8–10 до 26 мин) можно отнести к области существования конвертазы ЕАС142^{oxy}. Возвышающееся над этим плато более короткое (с 10 по 16 мин), по-видимому, соответствует С5-конвертазе, разрушение которой после 16 мин, вероятно, обусловлено инактивирующим компонент С3b действием факторов И и I [19]. За оптимальное время образования С5-конвертазы было принято 12 мин.

Ингибирование гемолиза в результате перехвата С3b* акцептором S можно описать следующей моделью:



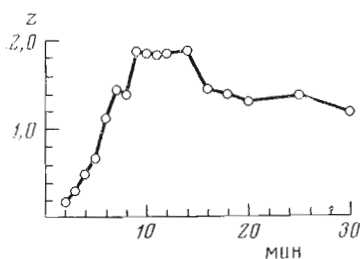


Рис. 3

Рис. 3. Динамика образования С5-конвертазы на ЕА

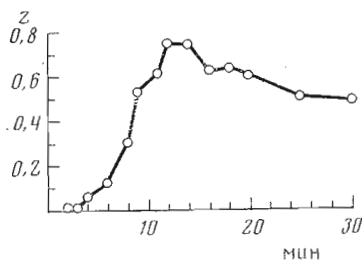


Рис. 4

Рис. 4. Динамика образования С5-конвертазы на ЕАС14

где $C3b(H_2O)$ — неактивная форма после гидролиза тиолсложноэфирной связи, $[C3b \cdot S]$ — обратимое промежуточное сорбционное соединение $C3b^*$ и эффектора, а $C3b-S$ — ковалентное соединение. $C3b-S$ — гемолитически неактивное соединение, однако для придания большей общности модели полезно считать, что лишь доля β молекул сорбционного комплекса превращается в гемолитически неактивную форму. Для простоты модели мы также полагаем, что доля молекул, превращаемая в гемолитически неактивную форму $C3b(H_2O)$, постоянна. С учетом этих допущений можно написать уравнение ингибирования (α) реакции гемолиза, когда концентрация $[S]$ много выше концентрации компонента С3:

$$\alpha = \frac{\beta [S]}{K_s + [S]},$$

внешне напоминающее уравнение Михаэлиса — Ментен. Последнее обстоятельство позволило нам применить для определения параметров этого уравнения итерационный метод Уилкинсона [20]. Ингибирование α рассчитывали по формуле

$$\alpha = (z_0 - z_s) \cdot 100\% / z_0,$$

где z_0 — число эффективных комплексов на один эритроцит в отсутствие ингибитора, а z_s — то же в его присутствии.

Адекватность метода была изучена на трех перехватчиках — раффинозе, этиловом эфире *N*-ацетил-*L*-тирозина и салицилальдоксима. Эти соединения были описаны как акцепторы $C3b$ [12] и ингибиторы образования С5-конвертазы [14]. На рис. 5–7 показаны экспериментальные точки зависимости ингибирования от концентрации акцепторов. Приведенные на этих рисунках теоретические кривые, удовлетворяющие предложенной математической модели, показывают хорошее совпадение экспериментальных значений и теоретического расчета.

Для того чтобы проверить, насколько полученные данные отражают перехват $C3b^*$, следовало учесть вклад ингибирования исследованными эффекторами последующих стадий: функционирования С5-конвертазы и действия мембраноатакующего комплекса. Такая проверка была осуществлена в опытах по ингибированию в системе с собранной С5-конвертазой.

Ингибирование образования С5-конвертазы

Акцептор	K_s , мМ	β , %	Ингибирование при данной концентрации акцептора				
			Концентрация, мМ	Ингибирование (α), %			Литературные данные
				С3-конвертазы	С5-конвертазы	разность	
Раффиноза	15,1±5,1	105±14	25	65,8	21,6	44,2	38 [12]
АТЭЕ	1,05±0,08	105±2	1	51,2	14,3	36,9	36,5 [14]
Салицилальдоксим	0,60±0,12	107±7	1	70	0	70	73 [14]

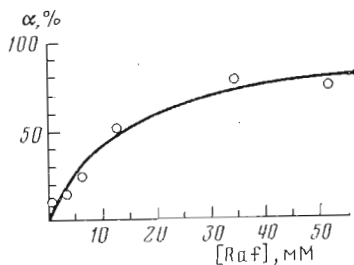


Рис. 5

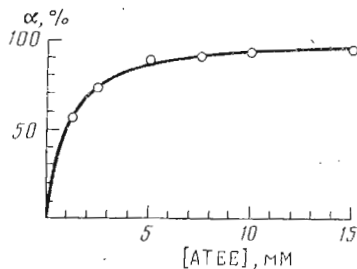


Рис. 6

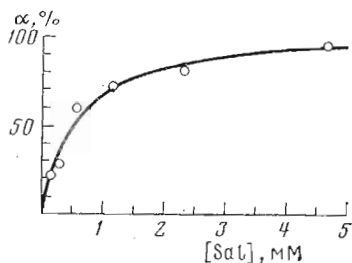


Рис. 7

Рис. 5. Ингибирование образования С5-конвертазы раффинозой (Ral). Здесь и на рис. 6, 7 точки соответствуют экспериментальным данным, а кривая построена исходя из теоретической математической модели

Рис. 6. Ингибирование образования С5-конвертазы АТЭЕ

Рис. 7. Ингибирование образования С5-конвертазы салицилальдоксимом (Sal)

В этих условиях салицилальдоксим не ингибировал процесс, а раффиноза и АТЭЕ ингибировали существенно слабее, чем в опытах с С3-конвертазой. Кроме того, в системе с С5-конвертазой ингибирование не обнаруживало характерной зависимости от концентраций, что может быть свидетельством неспецифического действия на гемолитическую систему. В таблице приведены параметры ингибирования С3-конвертазы (перехвата) — K_s и β , а также данные по ингибированию С3- и С5-конвертаз акцепторами в концентрациях, для которых имеются литературные данные. Полученные результаты по ингибированию С3-конвертазы с учетом последующего неспецифического действия показывают хорошее совпадение с литературными данными.

Как следует из данных таблицы, при насыщении акцептором наблюдается 100% торможения гемоллиза, что указывает на необратимое ковалентное связывание акцепторов с С3b. Отличия в константах ингибирования разными акцепторами мы относим за счет различного сродства С3b к этим соединениям. Не исключено, что «активный центр» С3b имеет определенную специфичность и настроен на связывание с определенными структурами клеточной стенки или иммуноглобулинов при формировании С5-конвертазы.

Экспериментальная часть

Получение сенсibilизированных эритроцитов (ЕА), приготовление комплекса ЕАС14, получение реагентов R3 и R5, а также окисление С2 подом описано в работе [15]. Все расчеты и построение графиков проводили на ЭВМ «Искра 226» с использованием разработанных нами программ.

Изотонический вероналовый буфер (VBS) и VBS^{2+} , содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} , готовили, как описано в работе [15].

Исследование динамики образования С3-конвертазы. К 200 мкл стандартной суспензии ЕАС14 ($1,5 \cdot 10^8$ клеток/мл) добавляли 50 мкл $R3^{oxy}$, разбавленного VBS^{2+} в соотношении 1:3. Инкубационную смесь выдерживали при $37^\circ C$ от 0 до 10 мин и добавляли 250 мкл разбавленной в VBSE сыворотки 1:2000. Через 40 мин инкубации при $37^\circ C$ добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли поглощение супернатанта при 412 нм (уровень гемоллиза) и вычисляли величину z [18].

Определение времени, оптимального для действия EDTA. К 200 мкл стандартной суспензии EAC14 добавляли 50 мкл $R3^{oxy}$, разбавленного VBS^{2+} (1:4). Инкубационную смесь выдерживали 5 мин при 37° С, добавляли 200 мкл VBSE и через 0–10 мин добавляли 50 мкл сыворотки, разбавленной VBSE (1:249). Инкубацию продолжали 40 мин при 37° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли уровень гемоллиза.

Исследование динамики образования C5-конвертазы. К 200 мкл стандартной суспензии EAC14 (или EA) добавляли 35 мкл VBS^{2+} и 50 мкл $R5^{oxy}$, разбавленного VBS^{2+} (1:4). Инкубационную смесь выдерживали 2–30 мин при 37° С, добавляли 200 мкл VBSE и через 3 мин вносили 15 мкл сыворотки, разбавленной VBSE (1:99). Инкубацию продолжали 40 мин при 37° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли уровень гемоллиза.

Определение ингибирования образования C5-конвертазы. К 200 мкл стандартной суспензии EAC14 добавляли 50 мкл $R3^{oxy}$, разбавленного VBS^{2+} (1:3), инкубировали 5 мин при 37° С, добавляли 200 мкл VBSE без ингибитора или с различными количествами ингибитора, через 3 мин в систему вносили 50 мкл разбавленной VBSE (1:249) сыворотки. Инкубацию продолжали 40 мин при 37° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли уровень гемоллиза.

Определение ингибирования C5-конвертазы и действия мембраноатакующего комплекса. К 200 мкл стандартной суспензии EAC14 добавляли 20 мкл VBS^{2+} и 50 мкл $R5^{oxy}$, разбавленного VBS^{2+} (1:4), инкубировали 12 мин при 37° С, добавляли 200 мкл VBSE без ингибитора или с различными концентрациями ингибитора, через 3 мин в систему вносили 30 мкл сыворотки, разбавленной VBSE (1:149), инкубировали 40 мин при 37° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли уровень гемоллиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Janatova J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 218–234.
2. Levine R. P., Finn R., Gross R. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 235–245.
3. Law S. K. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 246–258.
4. Sim R. B., Sim E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 259–276.
5. Iseman D. E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 277–290.
6. Pangburn M. K., Müller-Eberhard H. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 291–298.
7. Medof M. E., Iida K., Nussenzweig V. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 299–306.
8. Fey G. H., Wiebauer K., Domdey H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 307–312.
9. Venkatesh Y. P., Minich T. M., Levine R. P. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1983, v. 421, p. 313–315.
10. Schreiber R. D. Springer Semin. Immunopathol., 1984, v. 7, № 2–3, p. 221–249.
11. Egwang T. G., Befus A. D. Immunology, 1984, v. 51, № 1, p. 207–224.
12. Law S. K. A., Minich T. A., Levine R. P. Biochemistry, 1981, v. 20, № 26, p. 7457–7463.
13. Law S. K. A., Minich T. M., Levine R. P. Biochemistry, 1984, v. 23, № 14, p. 3267–3272.
14. Shin H. S., Mayer M. M. Biochemistry, 1968, v. 7, № 8, p. 3003–3006.
15. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Чух В. П., Молчанова Н. Н. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652–659.
16. Kerr M. A., Parkes C. Biochem. J., 1984, v. 219, № 2, p. 391–399.
17. Kerr M. A. Biochem. J., 1980, v. 189, № 1, p. 173–181.
18. Козлов Л. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С., Сизой М. Н., Ищенко А. М., Мартюшин С. В., Андреев С. В. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1047–1055.
19. Pangburn M. K., Schreiber R. D., Müller-Eberhard H. J. J. Immunol., 1983, v. 131, № 4, p. 1930–1935.
20. Wilkinson G. N. Biochem. J., 1961, v. 80, № 2, p. 324–332.

Поступила в редакцию
14.XII.1984

THE COVALENT BINDING OF NASCENT C3b WITH COMPLEMENT EFFECTORS

KOZLOV L. V., ROSTOVTSEVA L. I., LOMAKA T. S., SUTOVSKAYA N. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Various nucleophilic agents (acceptors) react with thiolester group of nascent activated fragment (C3b) of the third complement component. The C3b-acceptors binding prevents transformation of C3 convertase to C5 convertase and results in inhibition of the cell-target lysis. A convenient method of monitoring the EAC142 to EAC1423 transformation was elaborated. Character of the inhibition suggests that the covalent binding follows a stage of the reversible C3b-acceptor complex formation. The method allows to determine the maximum of inhibition of the C5 convertase formation and the dissociation constant of the reversible C3b-acceptor complex, which reflects the C3b affinity to this acceptor.