



УДК 576.097.3:577.159

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ
С3/С5-КОНВЕРТАЗЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА***Козлов Л. В., Чих В. П., Соляков Л. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Сефароза 4В при 37° С в присутствии ионов Mg^{2+} инициирует в сыворотке крови человека альтернативный путь активации системы комплемента с образованием С3/С5-конвертазы, связанной на поверхности гранул сефарозы. Конвертаза наряду с активацией факторов С3 и С5 действует на С2-, С4- и D-факторы комплемента. Обсуждается гипотетический механизм усиления действия мембраносвязанной альтернативной С3/С5-конвертазы за счет параллельного образования классической С3/С5-конвертазы.

Общим и существенным звеном в цепи активации классического и альтернативного путей комплемента является образование С3-конвертазы [1, 2]: $\overline{C4b2a}$ (классический путь активации) и $\overline{C3bBb}$ (альтернативный). Этот сложный фермент катализирует активацию $C3 \rightarrow \overline{C3b}$ и присоединение $\overline{C3b}$ к С3-конвертазе с образованием С5-конвертазы: $\overline{C4b2a3b}$ или $\overline{C3bBb3b}$ [1]. С3/С5-конвертаза обоих путей является мембраносвязанным ферментом — в ковалентном связывании с мембраной эритроцита, клеточной стенкой или какой-либо другой активирующей поверхностью участвуют $\overline{C3b}$ - и $\overline{C4b}$ -факторы. Функция С5-конвертазы состоит в активации $C5 \rightarrow C5b$, необходимой для инициации самосборки мембраноатакующего комплекса С5b-9. Таким образом, естественными субстратами для сериновых протеиназ $\overline{C2a}$ и \overline{Bb} , функционирующих в составе сложных белковых комплексов — С3/С5-конвертаз, являются факторы С3 и С5. Никаких других белковых субстратов для этих ферментов до настоящего времени, по-видимому, не найдено. Вообще для протеиназ системы комплемента известна выраженная специфичность в отношении белковых субстратов: отсутствие как гидролиза других белков, так и ингибирования другими (не принадлежащими системе) белковыми ингибиторами [1].

Инициация альтернативного пути активации завершается образованием С3-конвертазы. Инициаторами являются полисахариды, липополисахариды и агрегаты иммуноглобулина А [3]. Предположение о возможности инициации альтернативного пути сефарозой 4В высказывалось в работе [4], в которой инкубация сыворотки с сефарозой использовалась для получения связанного с сефарозой фактора С3.

Для инициации альтернативного пути активации комплемента человека мы решили использовать сефарозу 4В при 37° С, введя в систему ионы Mg^{2+} , необходимые для образования С3-конвертазы, и связав с помощью EGTA ионы Ca^{2+} , чтобы предотвратить активацию классического пути.

На рис. 1 показаны результаты инкубации сыворотки с сефарозой. Активность фактора В в растворе исчезает в первые же минуты инкубации, что свидетельствует о запуске альтернативного пути активации. В качестве контроля инкубацию проводили с реагентом RD (т. е. с сывороткой, лишенной активности фактора D путем связывания последнего с СМ-сефадексом С-50 [5]). В присутствии реагента RD фактор В полностью сохраняет свою активность при инкубации с сефарозой. Поэтому при инкубации сыворотки с сефарозой фактор В активируется фактором D. Активность фактора С3 также падает во времени.

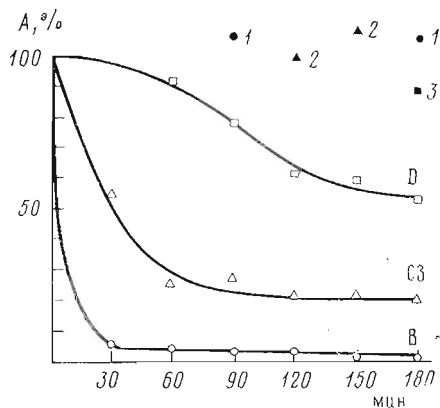


Рис. 1

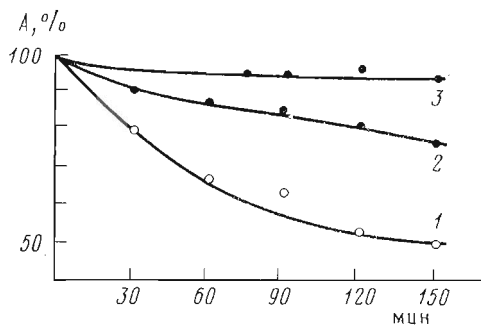


Рис. 2

Рис. 1. Падение активности факторов В, D и C3 при инкубации сыворотки с сефарозой 4В при 37° С в присутствии Mg-EGTA. Контроль: 1 — активность фактора В при инкубации реагента RD, остальные условия те же; 2 — активность фактора C3 при инкубации сыворотки в присутствии EGTA; 3 — активность фактора D при инкубации сыворотки в отсутствие сефарозы

Рис. 2. Падение активности фактора C2 при инкубации сыворотки с сефарозой 4В при 37° С в присутствии Mg-EGTA (1), EDTA (2) и при инкубации реагента RD (3) в условиях опыта 1

Кинетика падения активности фактора В в растворе отражает, по-видимому, кинетику образования C3-конвертазы альтернативного пути, связанной на поверхности гранул сефарозы. Падение активности фактора C3 связано с активацией $C3 \rightarrow C3b$ и иммобилизацией фактора $C3b$. В связи с этим мы полагаем, что инактивация фактора C3 в растворе обусловлена функционированием C3-конвертазы альтернативного пути, связанной с поверхностью (мембраносвязанной). Проведение инкубации сыворотки с сефарозой в присутствии EGTA (когда оба пути активации блокированы из-за отсутствия ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}) показало, что в этих условиях активность фактора C3 полностью сохраняется во времени (рис. 1). Мы показали также (см. работу [6]), что при инкубации сыворотки с сефарозой 4В в системе Mg-EGTA падает активность фактора C5 (скорость инактивации которого выше скорости падения активности фактора C3). Это означает, что образующаяся C3-конвертаза сразу же превращается в C5-конвертазу в результате связывания дополнительных молекул фактора $C3b$.

На рис. 1 показано также падение активности фактора D. В настоящее время трудно объяснить причину такой инактивации, поскольку, по литературным данным, фактор D всегда находится в активированной форме \bar{D} . Однако недавно мы доказали существование зимогенной формы фактора [5], причем обе формы D и \bar{D} не различаются в гемолитическом тесте. Единственное их различие заключается в том, что форма D устойчива к действию динитропропилфторфосфата. Используя этот факт, мы показали, что при инкубации сыворотки с сефарозой 4В, т. е. под действием мембраносвязанной C3-конвертазы, происходит активация зимогенной формы: $D \rightarrow \bar{D}$. Если допустить различие в устойчивости к инактивации факторов D и \bar{D} при 37° С, можно высказать предположение, что мембраносвязанная альтернативная C3/C5-конвертаза активирует зимоген D и образующийся активный фактор \bar{D} инактивируется во времени.

При инкубации сыворотки с сефарозой происходит также падение активности фактора C2 (рис. 2). Поскольку контрольная инкубация реагента RD не приводит к падению активности фактора C2, а в присутствии EDTA скорость инактивации фактора C2 также существенно ниже, мы сделали вывод о возможном инактивирующем действии мембраносвязанной альтернативной C3/C5-конвертазы, которое может осуществляться в результате активации фактора C2: $C2 \rightarrow C2a$, так как C2a в растворе

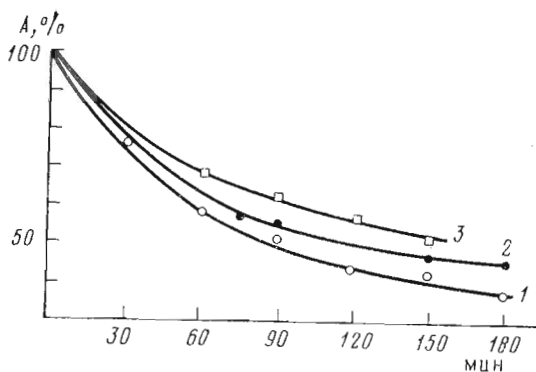


Рис. 3. Падение активности фактора С4 при инкубации сыворотки с сефарозой 4В при 37° С в присутствии Mg-EGTA (1), при инкубации реагента RD в тех же условиях (2), при инкубации сыворотки в присутствии EDTA (3), в условиях опыта 1

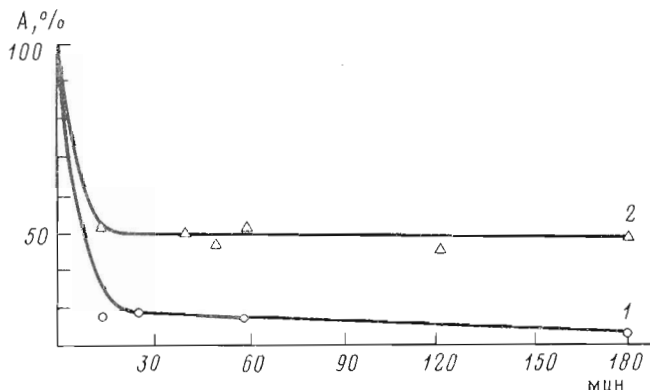


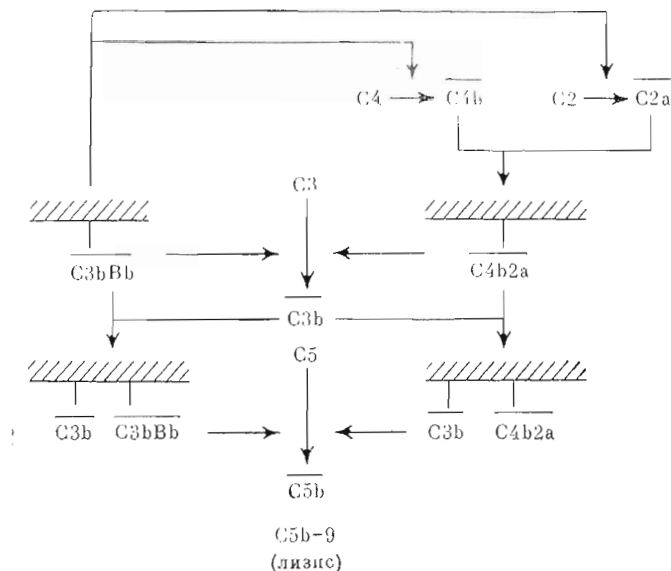
Рис. 4. Падение активности фактора С3 при инкубации окисленной сыворотки с сефарозой 4В при 37° С в присутствии Mg-EGTA (1) и сыворотки без окисления (2). Активность фактора С3 в опыте выражена в процентах от активности в пробах, инкубированных без сефарозы

нестабилен. Аналогичное явление происходит и с фактором С4 (рис. 3). Скорость падения активности фактора С4 в растворе при инкубации с сефарозой 4В в присутствии Mg-EGTA несколько превышает скорость его инактивации в контрольных опытах (в присутствии EDTA и реагента RD), что можно также предположительно объяснить процессом активации в результате действия мембраносвязанной альтернативной С3/С5-конвертазы: $C4 \rightarrow \overline{C4b} \rightarrow C4b$.

Поскольку известно [1], что связывание факторов $\overline{C4b}$ и $\overline{C2a}$, образующих в присутствии ионов Mg^{2+} комплекс $\overline{C4b2a}$, на мембране приводит к образованию относительно стабильной С3-конвертазы классического пути активации, которая при дальнейшем связывании фактора $\overline{C3b}$ превращается в С5-конвертазу, нельзя исключить возможность параллельного образования конвертазы классического пути активации, усиливающей ответ в альтернативном пути активации.

Для проверки сопутствующего образования мембраносвязанной классической конвертазы $\overline{C4b2a}$ при активации альтернативного пути сефарозой 4В мы воспользовались особенностью фактора С2 человека обнаруживать в несколько раз более высокую гемолитическую активность после окисления в нем сульфгидрильных групп иодом [6]. Мы предположили, что если классическая С3-конвертаза в наших опытах образуется, то инактивация фактора С3 должна протекать существенно быстрее в сыворотке, окисленной иодом. Поэтому был поставлен эксперимент по инактивации

Схема активации факторов C4 и C2 и образования классической C3/C5-конвертазы в результате действия C3/C5-конвертазы альтернативного пути активации комплемента (амплификация)



фактора C3 сефарозой 4В в системе Mg—EGTA при 37° С в двух параллельных опытах: в сыворотке без окисления и в окисленной сыворотке. Как показывает рис. 4, падение активности фактора C3 в окисленной сыворотке протекает существенно быстрее. Это свидетельствует в пользу образования в эксперименте классической C3-конвертазы в условиях бескальцевой среды, т. е. в отсутствие инициации классического пути активации комплемента.

На представленной схеме предлагается механизм усиления действия альтернативной C3/C5-конвертазы за счет параллельного образования классической C3/C5-конвертазы.

Полученные данные свидетельствуют об амплифицирующей роли альтернативной C3-конвертазы, которая усиливает ответ не только в результате действия положительной обратной связи путем постоянного увеличения количества $\overline{C3b}$, способного иницировать альтернативный путь активации, но и благодаря активации зимогенной формы фактора D и активации факторов C4 и C2, формирующих в свою очередь мембраносвязанную C3/C5-конвертазу классического пути активации комплемента.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (EGTA; Sigma, США), веронал и мединал (Serva, ФРГ), остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. отечественного производства.

Изотонический вероналовый буфер, pH 7,4 (VBS) готовили как описано в работе [6].

Реагент RD готовили согласно [5].

Определение активностей В- и D-факторов проводили в соответствии с работой [5].

Определение активностей факторов C2, C3 и C4 проводили как описано в работе [6].

Активация комплемента в сыворотке сефарозой 4В. Сефарозу 4В промывали 3 раза дистиллированной водой и 2 раза VBS, содержащим 5 мМ MgCl₂ и 10 мМ EGTA, суспендировали в свежей сыворотке крови человека, содержащей 5 мМ MgCl₂ и 10 мМ EGTA, в объемном отношении гель сефарозы — сыворотка 1:1. Суспензию инкубировали при 37° С, пери-

одически перемешивая и отбирая во времени пробы для определения активностей факторов C2, C3, C4, B и D. В качестве контролей проводили инкубацию: 1) сыворотки с сефарозой в присутствии EGTA, 2) сыворотки в условиях опыта, но при 4° C и без сефарозы, 3) реагента RD вместо сыворотки, остальные условия опыта те же.

Активацию комплемента в окисленной сыворотке сефарозой 4B проводили как описано выше, используя для окисления сыворотки метод, описанный в работе [6]. Параллельно осуществляли активацию неокисленной сыворотки. В качестве контроля обе сыворотки инкубировали без сефарозы. В отобранных во времени пробах определяли активность фактора C3. Активность, полученную в опыте, выражали в процентах от активности фактора C3, измеренной в контроле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Müller-Eberhard H. J. In: Molecular basis of biological degradative processes / Eds Berliner R. D., Hermann H., Lepow I. H., Tanzer J. M. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 65-114.
2. Reid P. B. M., Porter R. R. Ann. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 433-464.
3. Götze O., Müller-Eberhard H. J. Adv. Immunol., 1976, v. 24, p. 1-35.
4. Pepys M. B., Bell A. Y., Rowe I. F. В кн.: Иммуносорбенты в очистке белков. М.: Медицина, 1979, с. 110-115.
5. Козлов Л. В., Соляков Л. С. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 342-348.
6. Козлов Л. В., Крылова Ю. П., Чих В. П., Молчанова Н. Н. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652-659.

Поступила в редакцию
9.XII.1981

FUNCTIONAL SPECIFICITY OF MEMBRANE BOUND C3/C5-CONVERTASE OF THE ALTERNATIVE PATHWAY OF HUMAN COMPLEMENT ACTIVATION

KOZLOV L. V., CHIKH V. P., SOLYAKOV L. S.

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

Sepharose 4B at 37° C in the presence of Mg²⁺ initiates the alternative pathway of human complement activation in serum with the formation of a C3/C5 convertase bound at the surface of Sepharose granules. This convertase activates not only C3 and C5 but also acts on C2-, C4- and D-factors. A hypothetical mechanism for amplification of the membrane-bound alternative pathway C3/C5-convertase action is discussed which invokes the concomitant formation of a classical C3/C5 convertase.