

Изучение роли регуляторного аргинил-связывающего участка каталитической цепи плазмина в гидролизе фибриногена

Э. Н. Золотарева*, Н. Н. Бугрименко

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины,
252601, Киев, ул. Леонтовича, 9

Изучено влияние аргинина и изолированного D_h-фрагмента фибриногена на скорость фибриногенолиза под действием Lys77-плазмина и его частично деградированных форм. Полученные данные свидетельствуют о низком сродстве к аргинину так называемых аргинил-связывающих участков каталитической цепи по сравнению с аргинил-связывающими участками некаталитической цепи фермента. В то же время показано, что торможение гидролиза фибриногена в присутствии D_h-фрагмента обусловлено участком, расположенным в каталитической цепи Lys77- или Lys530-плазмина. Показано, что этот эффект проявлялся на этапах как образования X-фрагментов, так и их разрушения. Обсуждается роль регуляторного участка каталитической цепи на отдельных этапах фибриногенолиза.

Введение. Плазмин (КФ 3. 4. 21. 7) относится к классу сериновых протеиназ, его активный центр способен гидролизовать белковые субстраты по связям, образованным лизином или аргинином. Кроме того, в молекуле плазмина и его неактивного предшественника (плазминогена) имеется целый ряд регуляторных участков, проявляющих специфическое сродство к лизину или аргинину, а также к их химическим аналогам [1—3]. Эти участки, по-видимому, определяют высокий уровень специфичности плазмина по отношению к фибрину, активаторам и ингибиторам. Они расположены в крингловых структурах некаталитической цепи молекулы плазмина. Энергия взаимодействия этих участков с лигандами может быть различной и зависит от химической природы лиганда или его ближайшего окружения [3, 4].

Изучению особенностей взаимодействия крингловых структур плазмин(оген)а с низкомолекулярными и белковыми лигандами, а также их роли в процессе фибрин(оген)олиза посвящен целый ряд работ. Менее изученным остается вопрос о значении регуляторных участков каталитической цепи. Известно, что в каталитической цепи плазмина имеются отличные от активного центра участки, которые по характеру аффинности являются аргинил- или бензамидин-связывающими [4, 5]. О важном значении этих участков для протеолиза свидетельствует то, что аналогичные зоны имеются и в молекуле трипсина.

В данной работе сделана попытка подобрать лиганд, обладающий

*Correspondence address.

специфическим сродством к регуляторным участкам каталитической цепи плазмина, а также выявить возможность вовлечения этих участков в протеолиз фибриногена.

Материалы и методы. В работе использовали реактивы марки не ниже х. ч. Lys77-плазминоген выделяли из донорской плазмы аффинно-хроматографическим методом [6]. Профермент активировали стрептокиназой («Streptase», Швейцария) [7]. Препараты Val442-плазмина и Lys530-плазмина, полученные согласно ранее описанным методам [7—9], были любезно предоставлены С. И. Андриановым. Протеолитическую активность плазмина и его форм определяли казеинолитическим методом [7] и выражали в казеиновых единицах (1 к. е. соответствует 450 мкг ТХУ-растворимого тирозина, образованного за 1 ч). Удельные активности Lys77-плазмина, Val442-плазмина и Lys530-плазмина составляли 10—15, 25,6 и 40,5 к. е. на 1 мг белка соответственно.

Фибриноген получали из бычьей плазмы после ступенчатого высаливания Na-сульфатом [10]. Введение радиоактивной метки осуществляли в присутствии Na-¹²⁵I и хлорамина Т [11]. Удельная радиоактивность полученного [¹²⁵I]-иодфибриногена составляла 4—5 МБк на 1 мг белка. В опытах использовали смесь меченого и исходного фибриногена в расчетном соотношении.

D_h-фрагмент получали ограниченным протеолизом фибриногена плазмином по описанному методу [12] с незначительными модификациями. Гидролиз проводили в течение 90 мин при 37 °С в среде, содержащей 59 мкМ фибриноген, 0,08 к. е./мл плазмина, 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,2, 0,15 М NaCl, 0,1 мМ CaCl₂. Время гидролиза подбирали в предварительных опытах таким образом, чтобы в гидролизатах присутствовало максимальное количество D_h и отсутствовали другие, более легкие формы этого фрагмента. Реакцию останавливали добавлением *p*-нитрофенилгуанидинбензоата и дифторфосфата до конечных концентраций 0,1 и 0,2 мМ соответственно. Последующее разделение продуктов гидролиза осуществляли на колонке с сефадексом G-200, уравновешенной 50 мМ трис-НСl буфером, рН 7,2, 0,15 М NaCl, 0,01 % NaN₃. Собирали фракции, содержащие смесь D_h- и E-фрагментов. Элюат диализовали против 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 6,2, 0,01 % NaN₃. Фрагменты D_h и E разделяли при помощи ионообменной хроматографии на колонке с КМ-сефадексом С-50, предварительно промытым 100 мМ Na-фосфатным буфером, рН 6,2, и уравновешенным 10 мМ Na-фосфатным буфером, рН 6,0. Примеси E-фрагмента элюировали этим же буфером; D_h-фрагмент — 100 мМ Na-фосфатным буфером, рН 7,2, 300 мМ NaCl.

Электрофореграммы полученных препаратов представлены на рис. 1.

Фибриноген гидролизовали при 37 °С. Среда реакции содержала 50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7, 0,15 М NaCl. Концентрация субстрата составляла 29 мкМ; для получения количественной характеристики спектра

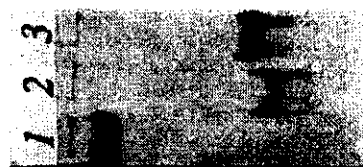


Рис. 1. Электрофореграммы в 5 %-м ПААГе с 2 % DS-Na полученных препаратов: 1 — фибриноген (340 кДа); 2 — Lys77-плазмин (81 кДа); 3 — D_h-фрагмент фибриногена (95 кДа)

продуктов гидролиза использовали ^{125}I -меченный фибриноген, удельная радиоактивность которого составляла 0,03 МБк на 1 мг белка. В качестве ингибиторов плазмина и его форм в инкубационную среду вводили L-аргинин или D_h -фрагмент в различных концентрациях. Реакцию начинали добавлением в среду протеолитических ферментов, конечное содержание которых составляло от 0,02 до 0,08 к. е. в 1 мл. Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением равного объема 10 М мочевины с 2 % Ds-Na.

Продукты реакции разделяли в 5 %-м ПААГе с 2 % DS-Na. После окрашивания и высушивания гелей вырезали соответствующие зоны, после чего просчитывали их радиоактивность на γ -счетчике. Скорость отдельных этапов протеолиза рассчитывали по исчезновению белка в определенных электрофоретических зонах за соответствующие промежутки времени.

Результаты и обсуждение. Поскольку было показано, что участки, находящиеся в кринглах 1, 5 некаталитической цепи молекулы плазмина, а также отличные от активного центра регуляторные участки каталитической цепи, могли проявлять аффинность к аналогам аргинина [4, 5], нам представлялось интересным сравнить влияние этого лиганда на скорость фибринолиза, осуществляемого плазмином и его частично деградированными формами. Мы использовали полностью активированную форму фермента, Lys77-плазмин, его частично деградированную форму, у которой некаталитическая цепь укорочена до фрагмента, соответствующего кринглу 5, Val442-плазмин, а также Lys530-плазмин, некаталитическая цепь которого почти полностью деградирована и кринглы отсутствуют. На рис. 2 представлены кривые, отражающие влияние аргинина на скорость исчезновения белка в высокомолекулярных фракциях фибриногена и X-фрагментов (Fg+X). В условиях эксперимента в среде, содержащей аргинин, наблюдалось частичное ингибирование: Lys77-плазмина — в присутствии микромолярных, Lys77- и Val442-плазмина — в присутствии миллимолярных концентраций. Резкое подавление активности всех трех форм фермента происходило в среде, содержащей 100 мМ аргинин. Исходя из полученных данных мы предположили, что аргинином в низких концентрациях блокировался участок, находящийся в области первых четырех кринглов (согласно литературным данным, такой участок может присутствовать в крингле 1 [3, 4]). Эффект миллимолярных концентраций аргинина мог быть связан с

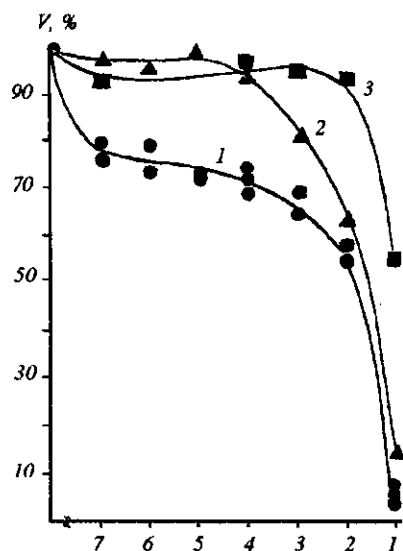


Рис. 2. Влияние L-аргинина на скорость фибринолиза под действием Lys77-плазмина (1), Val442-плазмина (2) и Lys530-плазмина (3). Скорость реакции (V, %) измеряли по исчезновению белка в суммарной фракции фибриногена и X-фрагментов (Fg+X) и выражали в процентном отношении к соответствующим значениям в отсутствие ингибитора. Ошибка опыта составляла 4,5 %. По оси абсцисс — lg [L-аргинин], М

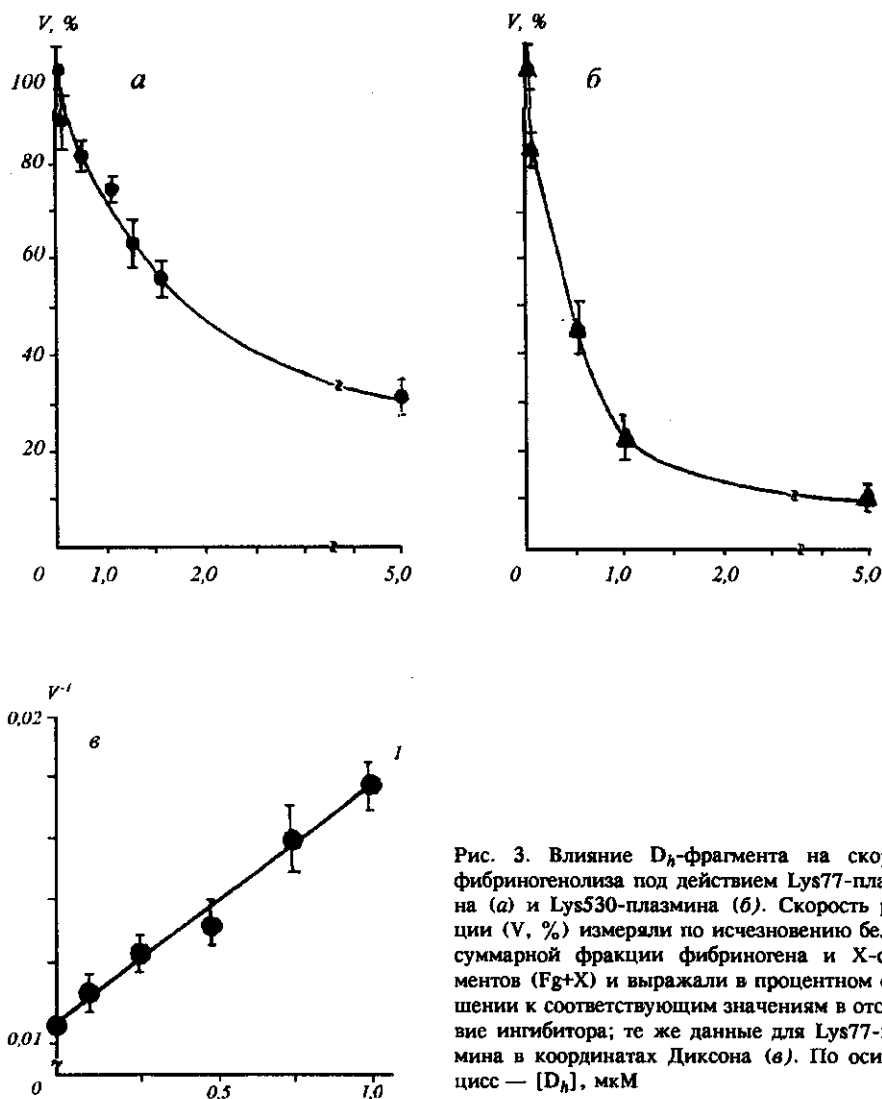


Рис. 3. Влияние D₄-фрагмента на скорость фибринолиза под действием Lys77-плазмина (а) и Lys530-плазмина (б). Скорость реакции (V, %) измеряли по исчезновению белка в суммарной фракции фибриногена и X-фрагментов (Fg+X) и выражали в процентном отношении к соответствующим значениям в отсутствие ингибитора; те же данные для Lys77-плазмина в координатах Диксона (в). По оси абсцисс — [D₄], мкМ

насыщением участка крингла 5. И только в высоких концентрациях аргинин блокировал участки каталитической цепи, поскольку лишь в таких условиях снижалась активность Lys530-плазмина. Таким образом, чувствительность регуляторного участка каталитической цепи к аргинину могла быть на порядок ниже, чем у крингла 5. По-видимому, свободный аргинин, имеющий дипольную природу (в его молекуле присутствует не только положительно заряженная гуанидиновая, но и отрицательно заряженная карбоксильная группа), вряд ли можно считать специфическим лигандом для направленного воздействия на регуляторные участки каталитической цепи плазмина.

Для этой цели необходимо было подобрать другой лиганд. Известно, что в результате гидролиза фибриногена плазмином образуются фрагменты E (из центральной области молекулы) и D (из периферической области). Эти продукты, вероятно, вследствие их определенного сродства к различным участкам молекулы плазмина могут быть конкурентными ингибиторами последнего. В литературе отмечен ингибирующий эффект E-фрагмента, а также различных форм D-фрагмента [13, 14]. Методом равновесной аффин-

ной сорбции было показано, что тяжелый D_h -фрагмент был единственным продуктом гидролиза, взаимодействие которого с плазминогеном нарушалось в присутствии аргинина, но не аналогов лизина [15]. С другой стороны, с D_h мог связываться не только интактный профермент, но и его форма, лишенная в результате протеолитической деградации первых четырех крингловых доменов (Val442-плазминоген), а также изолированная каталитическая цепь плазмينا с заблокированным активным центром; эти взаимодействия нарушались только в присутствии аргинина [16]. Поскольку участки, аффинные к аргинину и бензамидину, были обнаружены в крингле 5 и в области каталитической цепи [5], предполагалось, что именно эти участки плазмин(оген)а могли вовлекаться во взаимодействие с D_h -фрагментом [16]. Тем не менее, данные, свидетельствующие о непосредственном связывании крингла 5 с D_h , отсутствовали. Поэтому мы исследовали влияние изолированного D_h -фрагмента на фибриногенолиз, предполагая выявить эффекты, связанные с регуляторными участками каталитической цепи плазмينا.

На рис. 3, а, показано влияние этого белка на активность Lys77-плазмينا. Скорость реакции определяли по исчезновению высокомолекулярных фракций фибриногена и X-фрагментов (Fg+X). Из этих данных следует, что торможение гидролиза наблюдалось в присутствии D_h в концентрации менее 10^{-6} М. На рис. 3, в, те же данные представлены в координатах Диксона. Прямолинейная зависимость величины обратной скорости реакции от концентрации ингибитора свидетельствует о существовании в молекуле плазмина только одного участка взаимодействия с D_h . Рис. 3, б, отражает результаты аналогичных исследований с Lys530-плазмином. Торможение гидролиза, как и в реакции с Lys77-плазмином, наблюдалось в присутствии D_h в концентрации ниже 10^{-6} М. Поскольку ингибирующий эффект в обоих случаях был аналогичным, он мог быть опосредован участком, расположенным в каталитической цепи Lys77- или Lys530-плазмينا. Кроме того, из данных, приведенных на рис. 3, а и б, следует, что, несмотря на резкое снижение активности ферментов в присутствии низких концентраций D_h , дальнейшее увеличение концентрации ингибитора с 1 до 5 мкМ не приводило к существенному торможению гидролиза. Такой характер кривой может свидетельствовать не о полном, а частичном характере ингибирования, когда ингибирующий агент насыщает отличный от активного центра участок фермента.

Таким образом, мы предполагаем, что как в наших, так и в экспериментах других авторов [15, 16] белок-белковые взаимодействия различных форм плазмин(оген)а с D_h -фрагментом обусловлены единственным регуляторным участком, соответствующим области каталитической цепи. Как видно из вышеприведенных рисунков, а также данных других авторов, полученных при использовании фрагмента D_h [13], существенное торможение фибриноген(олиз)а может служить свидетельством важной роли регуляторного участка каталитической цепи плазмينا в протеолизе. Эти предположения косвенно подтверждаются также результатами, полученными с использованием метода химической модификации, о том, что для прохождения начального этапа фибриногенолиза важное значение имеет взаимодействие плазмينا с аргинильными остатками субстрата [17].

Следует отметить, что гидролиз фибриногена плазмином является сложной многостадийной реакцией. Первый этап ее связан со ступенчатым отщеплением от интактного фибриногена α C-доменов и N-концевых участков цепей B β ; в результате появляются X-фрагменты, различающиеся разной степенью деградации [18, 19]. На втором этапе гидролиза происходит отделение одного из D-доменов; продуктом этой реакции является Y-фрагмент. В дальнейшем, на третьем этапе, от Y-фрагмента отщепляется

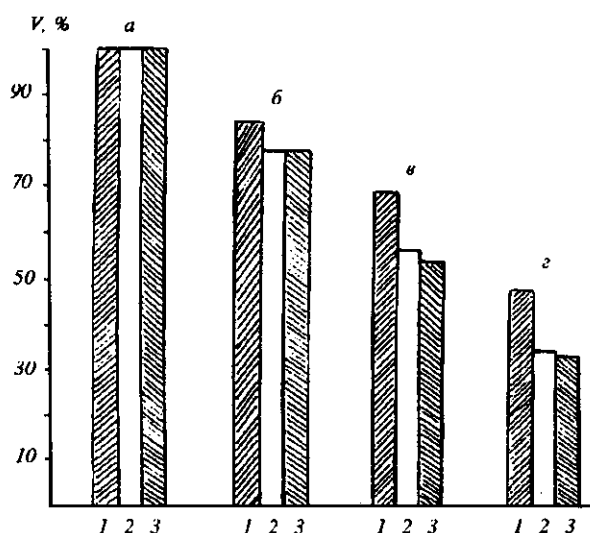


Рис. 4. Влияние D_n -фрагмента на скорость отдельных этапов фибринолиза: а — вариант без ингибитора; б — 0,5; в — 1,0; з — 5,0 мкМ D_n (1 — скорость исчезновения белка во фракции фибриногена (Fg); 2 — в суммарной фракции фибриногена и X-фрагментов (Fg+X); 3 — в суммарной фракции фибриногена, X- и Y-фрагментов (Fg+X+Y)). Скорости выражены в процентном отношении к соответствующим значениям в отсутствие ингибитора

второй D-домен. Мы попытались оценить значение регуляторного участка каталитической цепи плазмينا на отдельных этапах фибринолиза. Для этого сравнили влияние изолированного D_n -фрагмента на скорости исчезновения белка во фракции фибриногена (Fg), в суммарной фракции фибриногена и X-фрагментов (Fg+X), а также в суммарной фракции фибриногена, X- и Y-фрагментов (Fg+X+Y). Эти показатели, по нашему мнению, должны отражать соответственно первый, второй и третий этапы фибринолиза. Диаграммы на рис. 4 демонстрируют соотношение этих показателей при различном содержании изолированного D_n -фрагмента в инкубационной среде. В присутствии D_n снижались все три показателя, причем первый из них (Fg) в меньшей степени зависел от концентрации ингибитора, чем второй (Fg+X) и третий (Fg+X+Y), а два последних практически не различались. Таким образом, можно предположить, что D_n -фрагмент частично тормозит первый этап реакции, а на втором этапе наблюдается дополнительный ингибирующий эффект. Учитывая данные о сродстве D_n -фрагмента к регуляторным участкам каталитической цепи, можно допустить возможность их вовлечения как в первый, так и во второй этапы фибринолиза.

На третьем этапе эффект не проявлялся, вероятно, вследствие того, что количество добавленного в среду инкубации «экзогенного» D_n было незначительным по сравнению с количеством образовавшегося в результате второго этапа «эндогенного» D-фрагмента. Хотя нам не удалось выявить ингибирующего эффекта D_n на этапе расщепления Y-фрагмента, есть данные о существовании на Y-фрагменте центров, комплементарных аргинил-связывающим участкам плазминогена [15], что позволяет предположить важную роль этих участков и при разрушении Y.

Известно, что тяжелый D_n -фрагмент, являясь одним из конечных продуктов фибринолиза, в свою очередь, хотя и со значительно меньшей скоростью, может подвергаться протеолитической деградации плазмином. С использованием метода химической модификации нами было показано, что для протеолиза D_n -фрагмента важное значение имеют его аргинил-содержащие центры, причем их роль реализуется при взаимодействии с регуляторными участками, а не с активным центром плазмина [17]. Однако в условиях блокирования всех крингловых структур некаталитической цепи плазмина аналогом лизина — 6-аминогексановой кислотой —

превращение тяжелого фрагмента D_h в легкий D_l не замедлялось [20]. Поэтому эта реакция проходит, по-видимому, под контролем только участков каталитической цепи.

Ранее мы показали, что в начальные этапы фибринолиза вовлечены крингловые структуры некаталитической цепи плазмина: в первый этап — кринглы 1 и 5, во второй — крингл 4 [21]. По-видимому, необходимым компонентом каждого гидролитического акта является также непосредственное взаимодействие регуляторного аргинил-связывающего участка каталитической цепи плазмина с остатками аргинина на субстрате. Во всяком случае, такая возможность как на начальных, так и на конечных этапах фибрин(оген)олиза представляется вполне вероятной. Однако данное предположение требует дальнейшей работы в плане как поиска более удобного низкомолекулярного специфического лиганда, так и более подробного исследования роли аргинил-связывающего регуляторного участка в протеолизе специфических и неспецифических субстратов.

Авторы выражают искреннюю благодарность С. И. Андрианову и Т. В. Гриненко за консультации и помощь, оказанные в работе.

Е. М. Золотарева, Н. Н. Бугрименко.

Вивчення ролі регуляторної аргиніл-зв'язуючої ділянки каталітичного ланцюга плазмину у гідролізі фібриногена

Резюме

Вивчено вплив аргініна та ізольованого D_h -фрагмента фібриногена на швидкість фібринолізу під дією Lys77-плазмину та його частково деградованих форм. Одержано дані, що свідчать про низьку спорідненість до аргініна так званих аргиніл-зв'язуючих ділянок каталітичного ланцюга у порівнянні з аргиніл-зв'язуючими ділянками некаталітичного ланцюга ферменту. У той же час показано, що гальмування гідролізу фібриногена у присутності D_h -фрагмента обумовлено ділянкою каталітичного ланцюга Lys77- або Lys530-плазмину. Показано, що цей ефект виявляється як на стадії утворення X-фрагментів, так і на стадії їх руйнування. Обговорюється роль регуляторної ділянки каталітичного ланцюга на окремих етапах фібринолізу.

E. N. Zolotaryova, N. N. Bugrimenko

The role of regulatory arginyl-binding site of plasmin catalytic chain in fibrinogen hydrolysis

Summary

The effect of arginine and fibrinogen D_h -fragment on fibrinogenolysis velocity under the action of Lys77-plasmin and its partially degraded forms was studied. The results obtained revealed the low affinity to arginine of so-called arginyl-binding sites of the catalytic chain compared with arginyl-binding sites of the enzyme non-catalytic chain. At the same time fibrinogen hydrolysis inhibition at D_h -fragment presence was shown to be determined by the site located in the catalytic chain of Lys77- or Lys530-plasmin. This effect was found to occur at the stage of both X-fragments formation and their destruction. The role of catalytic chain regulatory site at some stages of fibrinogenolysis is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcus G., De Pasqual G. L., Wissler F. C. Quantitative determination of the binding of ϵ -aminocaproic acid to native plasminogen // J. Biol. Chem.—1978.—253, N 3.—P. 727—732.
2. Holleman W. H., Andress W. W., Weiss L. J. The relationship between the lysine and the *p*-aminobenzamidine binding sites of human plasminogen // Thromb. Res.—1975.—7, N 5.—P. 683—693.
3. Мацука Ю. В. Локализация и структурная характеристика лизин-связывающих участков молекулы плазминогена: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1989.—17 с.
4. Верева С. В., Кудинов С. А., Гриненко Т. В. Аргинил-связывающие участки плазминогена человека // Докл. АН УССР.— Сер. Б.—1985.— N 1.—С. 56—59.
5. Varadi A., Patthy L. Kringle 5 of human plasminogen carries a benzamidine-binding sites // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1981.—103, N 1.—P. 97—102.

6. *Deutsch D. G., Mertz S. T.* Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography // *Science*.—1970.—170, N 3962.— P. 1095—1096.
7. *Robbins K. C., Summaria L.* Human plasminogen and plasmin // *Meth. Enzymol.*—1970.—19.—P. 184—186.
8. *Powell J. R., Castellino F. J.* Isolation of human Val442-plasminogen // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1981.—102, N 1.—P. 46—52.
9. *Wu H. L., Shi G. Y., Woni R. C. et al.* Structure and formation of microplasmin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 23.—P. 8793—8795.
10. *Варецька Т. В.* Мікрогетерогенність фібриногена // *Укр. біохім. журн.*—1960.—32, N 1.—С. 13—24.
11. *McConahey P., Dixon F.* Radioiodation of protein by the use of chloramine-T method // *Meth. Enzymol.*—1980.—70.—P. 210—213.
12. *Медведь Л. В., Новохатний В. В., Привалов П. Л.* Получение и исследование структурной организации активной и неактивной форм D-фрагмента молекулы фибриногена // *Молекуляр. биология*.—1982.—16, N 6.—С. 1195—1202.
13. *Лежен Т. И., Кудинов С. А.* Изучение влияния фрагментов Д и Е на плазминовый гидролиз фибринового сгустка // *Биохимия*.—1986.—51, N 6.—С. 967—969.
14. *Розенфельд М. А., Фатеева Л. А., Гонтарь И. Д.* Фрагмент D фибриногена — ингибитор фибринолитического процесса // *Там же*.—1983.—48, N 7.—С. 1135—1141.
15. *Гриненко Т. В., Третьяченко В. Г., Кудинов С. А., Медведь Л. В.* Плазминоген-связывающие центры фибриногена, фибрина и продуктов их протеолиза // *Там же*.—1987.—52, N 10.—С. 1732—1739.
16. *Кудинов С. А., Лежен Т. И.* Взаимодействие плазминогена, тяжелой и легкой цепей плазмина с Д и Е-фрагментами фибриногена // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*—1982.—N 6.—С. 58—60.
17. *Золотарева Э. Н., Гриненко Т. В., Скоморовская Е. В., Кудинов С. А.* Влияние химической модификации остатков аргинина фибриногена и его D_h-фрагмента на скорость гидролиза этих белков плазмином // *Укр. биохим. журн.*—1994.—66, N 2.—С. 79—85.
18. *Mosesson M.* Fibrinogen heterogeneity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1983.—408.—P. 97—120.
19. *Горкун О. В., Медвідь Л. В.* Структурна організація ранніх продуктів плазмінового гідролізу фібриногену X1- і X2-фрагментів // *Докад АН УССР. Сер. Б.*—1984.—N 3.—С. 56—59.
20. *Золотарьова Э. М.* Вивчення ролі лізин- та аргініл-зв'язуючих ділянок плазміну на окремих етапах гідролізу фібриногену: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.— Київ, 1995.—14 с.
21. *Золотарева Э. Н.* Изучение роли лизин- и аргинил-связывающих участков плазмина на начальных этапах гидролиза фибриногена // *Биополимеры и клетка*.—1995.—66, N 3, 4.—С. 96—103.