

17. Freist W., Wiender H., Cramer F. Chemically modified ATP derivatives for the study of aminoacyl-tRNA synthetases from Baker's yeast: ATP analogs with fixed conformations or modified triphosphate chains in the aminoacylation reaction // Bioorg. Chem.—1980.—9, N 4.— P. 491—504.
18. Marytzky R., Flossdorf J., Kula M.-R. ATP analogs as substrates for the leucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* MRE 600 // Nucl. Acids Res.—1976.—3, N 8.— P. 2067—2077.
19. Led J. J., Switon W. K., Jensen K. F. Phosphorolytic activity of *Escherichia coli* glycyl-tRNA synthetase towards its cognate aminoacyl adenylate detected by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and thin-layer chromatography // Eur. J. Biochem.—1983.—136, N 3.— P. 469—479.
20. Ковалева Г. К., Дегтярев С. Х., Фаворова О. О. Аффинная модификация триптофанил-тРНК-синтазы алкилирующим аналогом триптофана // Молекуляр. биология.—1979.—13, № 6.— С. 1237—1246.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР,  
Москва

Получено 25.07.85

УДК 577.112.853.083

## ФРАГМЕНТ К 2—3 МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА СОДЕРЖИТ ЛИЗИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

В. В. Повохатний, Ю. В. Мацука, С. А. Кудинов

**Введение.** Плазминоген, неактивный предшественник фибринолитического фермента плазмина, представляет собой одноцепочечный гликопротеид с молекулярной массой 92 000. Его единственная полипептидная цепь состоит из 790 аминокислотных остатков с известной первичной последовательностью [1]. При активации плазминогена в плазме образуются тяжелая и легкая цепи, соединенные между собой двумя дисульфидными связями [1—3]. Легкая цепь плазмина содержит активный центр и гомологична трипсину и другим сериновым протеазам [2]. В составе тяжелой цепи плазмина имеется пять гомологичных трехпетлевых структур (кринглов) [4], имеющих молекулярную массу около 10 000 и состоящих примерно из 80 аминокислотных остатков. Стабильность этих структур обеспечивается тремя дисульфидными связями. Кринглы ответственны за способность плазминогена и плазмина специфически связывать лизин и некоторые другие ω-аминокарбоновые кислоты [5]. Согласно современным представлениям лизинсвязывающие участки играют решающую роль в регуляции физиологического фибринолиза [6]. Ими опосредуется взаимодействие плазминогена и плазмина с фибрином и α<sub>2</sub>-антиплазмином.

Несмотря на интенсивное изучение лизинсвязывающих свойств плазминогена, до настоящего времени строго не установлено количество связывающих участков в его молекуле. С помощью ограниченного протеолиза плазминогена показано [4, 7], что лизинсвязывающие участки имеются в первом и четвертом кринглах. На основании изучения химической природы лизинсвязывающего участка четвертого крингла и гомологичности крингловых структур Трекслер и соавт. [8] предположили существование участка со слабым сродством к лизину во втором крингле. Экспериментальным подтверждением этого предположения явились данные по плавлению плазминогена и его фрагментов [9]. В этой работе нами было показано, что ε-аминокапроновая кислота оказывает специфическое стабилизирующее действие на структуру первого, второго и четвертого кринглов. Однако строгое доказательство присутствия лизинсвязывающего участка во втором крингле можно получить лишь имея эту структуру в изолированном виде.

В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментов, указывающих на присутствие лизинсвязывающего участка во фрагменте К 2—3 молекулы плазминогена.

**Материалы и методы.** Лиз-плазминоген человека (модифицированная форма, содержащая в N-концевом положении преимущественно лизин) выделяли из фракции III по Кону методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе [10]. Смесь двух форм фрагмента К 1—3 (Тир 79 — Вал 337 и Тир 79 — Вал 353), содержащего три первые крингловые структуры, получали путем ограниченного протеолиза плазминогена эластазой с последующим разделением продуктов гидролиза аффинной хроматографией на лизин-сефарозе и гель-фильтрацией на сефадексе Г-75 [9]. При гидролизе фрагмента К 1—3 в качестве протеолитического фермента использовали пепсин с активностью 2585 ед./мг («Worthington», США). Гидролиз фрагмента К 1—3 и разделение образующихся при этом продуктов проводили следующим образом. Фрагмент К 1—3 растворяли в 50 мМ глициновом буфере, pH 2,7, до конечной концентрации 10 мг/мл. В этот раствор прибавляли пепсин в количестве, обеспечивающем отношение фермента к субстрату 1:100 (по массе). Гидролиз протекал при 18°C 3 ч, после чего его останавливали переводом реакционной смеси в щелочную среду, прибавляя к гидролизату 1 М трис-HCl, pH 9,0. При определении лизинсвязывающей способности гидролизат переводили в 50 мМ трис-HCl, pH 8,5, 50 мМ NaCl, на колонке с сефадексом Г-25. Электрофорез проводили в присутствии DS-Na в трис-боратной системе [11]. Аминокислотный анализ продуктов гидролиза фрагмента К 1—3 проводили на анализаторе аминокислот ААА-881 (ЧССР). Молекулярные массы полученных фрагментов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 приведена электрофореграмма, представляющая кинетику гидролиза фрагмента К 1—3 пепсином при pH 2,7. Как видно из рисунка, в результате протеолитической атаки пепсином фрагмента К 1—3 образуются три продукта с молекулярными массами 23 000, 19 000 и 12 000. При этом продукты протеолиза

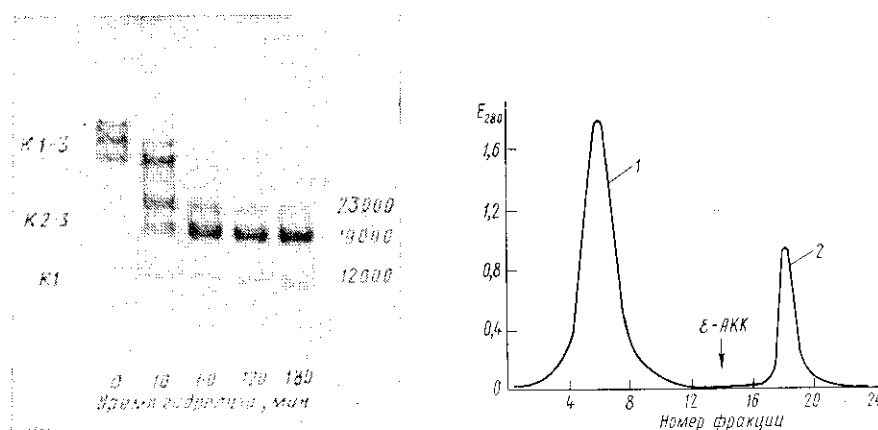


Рис. 1. Электрофореграмма, представляющая кинетику гидролиза фрагмента К 1—3 пепсином.

Fig. 1. Sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoretic patterns of timed pepsin digest of plasminogen fragment K 1-3

Рис. 2. Разделение пепсинового гидролизата фрагмента К 1—3 на колонке с лизин-сефарозой (2,5×20 см), уравновешенной 50 мМ трис-HCl буфером, pH 8,5, 50 мМ NaCl. Объем фракции 5 мл. Пики 1 и 2 — несвязавшийся и связавшийся белковый материал соответственно.

Fig. 2. Separation of a pepsin digest of fragment K 1-3 on the lysine-Sepharose column (2.5×20 cm) equilibrated with 50 mM tris-HCl buffer, pH 8.5, 50 mM NaCl. Fraction volume — 5 ml. Peaks 1 and 2 — unadsorbed and adsorbed protein material, respectively.

появляются уже через 10 мин и сохраняют относительную резистентность к гидролизу в течение всего исследуемого времени, что свидетельствует об их достаточно компактной структуре.

Для выяснения вопроса о наличии лизинсвязывающего участка во фрагменте К 2—3 продукты гидролиза К 1—3 наносили на колонку с лизин-сефарозой. При этом часть гидролизата не взаимодействовала с

аффинным сорбентом, в то время как другая часть белкового материала связывалась с лизин-сефарозой и элюировалась 200 мМ  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой (рис. 2). В дальнейшем и ту, и другую части гидролизата разделяли гель-фильтрацией на сефадексе Г-75 (рис. 3). В обоих случаях в первом пике выходили фрагменты, представленные на электрофореграммах дублетными полосами с молекулярными массами 23 000 и 19 000, а во втором пике — фрагмент с молекулярной мас-

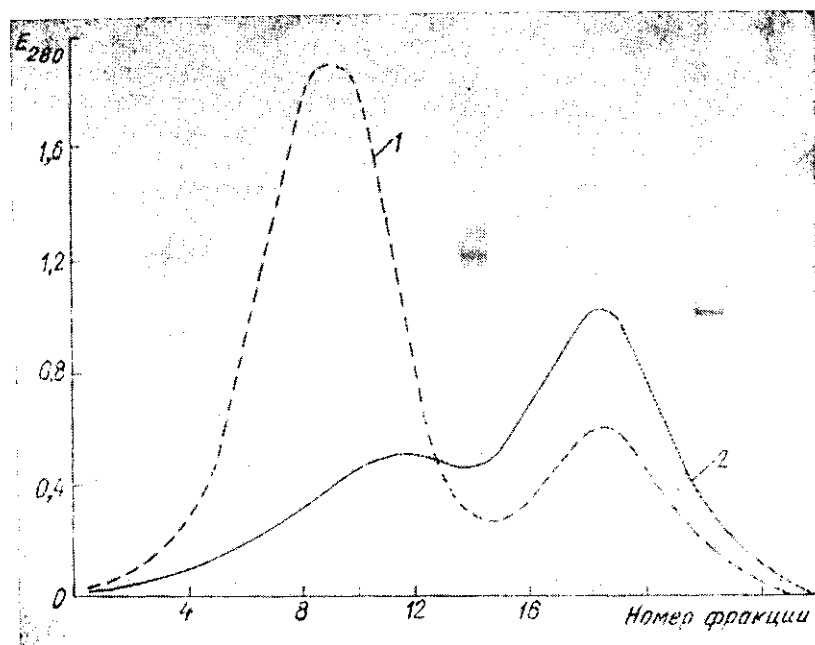


Рис. 3. Разделение пепсинового гидролизата фрагмента К 1—3 на колонке с сефадексом Г-75 (1,5×90 см), уравновешенной 50 мМ трис-НСl буфером, рН 8,5, 100 мМ NaCl. Объем фракции 4 мл. Электрофореграммы даны рядом. 1 — несвязавшийся и 2 — связавшийся с лизин-сефарозой гидролизаты.

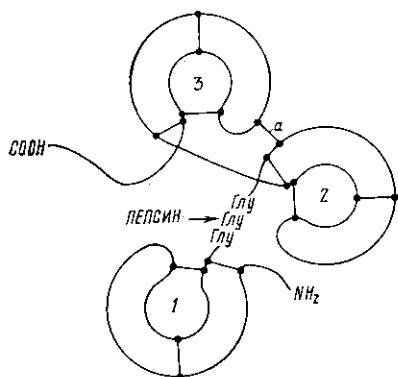
Fig. 3. Separation of a pepsin digest of fragment K 1-3 on the Sephadex G-75 column (1.5×90 cm) equilibrated with 50 mM tris-HCl buffer, pH 8.5, 100 mM NaCl. Fraction volume — 4 ml. Sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the material from each peak are given. 1 — hydrolyzate unadsorbed by lysine-Sepharose 2 — hydrolyzate adsorbed by lysine-Sepharose.

сой 12 000. Очевидно, различие между связавшимися и несвязавшимися продуктами пепсинолиза фрагмента К 1—3 состоит лишь в глубине протеолиза. Скорее всего у фрагментов, не взаимодействующих с аффинным сорбентом, расщеплены некоторые важные для лизинсвязывающей способности пептидные связи. Однако эти связи, видимо, не существенны для поддержания целостности их структуры, с чем и связано отсутствие изменений на электрофореграмме.

Возникает вопрос, каким структурам соответствуют полученные продукты пепсинолиза фрагмента К 1—3? На рис. 4 дано схематическое изображение структуры фрагмента К 1—3 молекулы плазминогена. Единственным местом гидролиза фрагмента К 1—3 пепсином может быть участок Глу 162 — Глу 163 — Глу 164 между первым и вторым кринглами. Это следует из характерного расположения дисульфидных мостиков в первых трех кринглах, при котором продукты с указанными выше молекулярными массами можно получить и разделить без восстановления дисульфидных связей только разрезав полипептидную цепь в данном месте.

Результаты аминокислотного анализа полученных фрагментов хорошо согласуются с аминокислотным составом соответствующих струк-

тур, определенным из известной первичной последовательности плазминогена (таблица). Таким образом, мы можем утверждать, что при пепсинолизе фрагмента К 1—3 образуются изолированный первый крингл ( $M_r=12\,000$ ) и фрагмент, содержащий второй и третий кринглы — К 2—3 ( $M_r=19\,000$  и  $23\,000$ ). Существование фрагмента К 2—3 в двух формах неудивительно, поскольку исходный фрагмент К 1—3 также состоит из двух молекулярных форм — Тир 79 — Вал 337 и Тир 79 —



Вал 353. Видимо, С-концевая часть фрагмента К 1—3 недоступна для протеолиза пепсином. Это подтверждается тем, что пепсин при гидролизе целой молекулы плазминогена расщепляет полипептидную цепь между четвертым и пятым кринглами и не затрагивает участок первичной струк-

Рис. 4. Схематическое изображение структуры фрагмента К 1—3 молекулы плазминогена: а — дисульфидные связи.

Fig. 4. Scheme of the structure of plasminogen fragment К 1-3: а — disulphide cross-links.

туры между третьим и четвертым кринглами [12], т. е. две формы фрагмента К 2—3 различаются, по всей вероятности, только своей С-концевой частью.

*Аминокислотный состав фрагментов К 1 и К 2—3*  
*Amino acid composition of fragments К 1 and К 2—3*

Аминокислота	К1		К 2—3	
	Теорет.*	Эксперим.	Теорет.	Эксперим.
Лиз	5	4,20	12	11,13
Гис	2	1,80	7	5,22
Арг	5	5,31	10	8,98
Асх (Асп+Асп)	11	11,66	21	23,86
Тре	8	6,75	15	14,52
Сер	7	7,29	14	16,10
Глх (Глу+Гли)	11	7,38	15	20,19
Про	8	9,80	18	18,60
Гли	6	4,59	8	11,86
Ала	1	1,17	5	4,52
Цис	6	3,87	14	10,98
Вал	0	0,32	5	4,21
Мет	1	0,60	2	0,81
Иле	2	1,47	4	2,33
Лей	3	1,50	6	5,46
Тир	6	5,40	7	8,92
Фен	1	1,44	3	2,51

\* Определены из известной первичной структуры плазминогена.

Таким образом, взаимодействие фрагмента К 2—3 с лизин-сефарозой прямо указывает на присутствие в нем лизинсвязывающего участка. Скорее всего (на основании работ [8, 9]) этот участок расположен во втором крингле.

## FRAGMENT K 2-3 OF PLASMINOGEN MOLECULE CARRIES A LYSINE-BINDING SITE

V. V. Novokhatny, Yu. V. Matsuka, S. A. Kudinov

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### Summary

Limited pepsin digestion of plasminogen fragment K 1-3 leads to the formation of the first kringle and structure which contains the second and third kringles (fragment K 2-3). The isolated fragments are characterized according to molecular masses and amino acid composition. Fragment K 2-3 is shown to be able of binding with lysine-Sepharose, which indicates the existence of a lysine-binding site in its structure.

1. *Collen D.* On the regulation and control of fibrinolysis // *Thromb. Haemostas.*—1980.—43, N 1.—P. 77—89.
2. *Wiman B.* Primary structure of the B-chain of human plasmin // *Eur. J. Biochem.*—1977.—76, N 1.—P. 129—137.
3. *Wiman B., Wallen P.* Activation of human plasminogen by insoluble derivative of urokinase. Structural changes of plasminogen in the course of activation to plasmin and demonstration of possible intermediate compound // *Ibid.*—1973.—36, N 1.—P. 25—31.
4. *The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one «Mini-plasminogen» (M. W. 38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis / L. Sottrup-Jensen, H. Claves, M. Zajdel et al. // Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis / Eds. J. F. Davidson, R. H. Roman, M. M. Samama, P. S. Desnoyers.—New York: Raven press, 1978, v. 3.—P. 191—209.*
5. *Castellino F. J.* Recent advances in the chemistry of the fibrinolytic system // *Chem. Rev.*—1981.—81, N 5.—P. 431—446.
6. *Wiman B., Collen D.* Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. // *Nature.*—1978.—272, N 5653.—P. 549—550.
7. *Wiman B., Wallen P.* The specific interaction between plasminogen and fibrin. A physiological role of the lysine binding site in plasminogen // *Thromb. Res.*—1977.—10, N 2.—P. 213—222.
8. *Trexler M., Vali Z., Patthy L.* Structure of the  $\omega$ -aminocarboxylic acid — binding sites of human plasminogen. Arginine 70 and aspartic acid 56 are essential for binding of ligand by kringle 4 // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 13.—P. 7401—7406.
9. *Novokhatny V. V., Kudinov S. A., Privalov P. L.* Domains in human plasminogen // *J. Mol. Biol.*—1984.—179, N 2.—P. 215—232.
10. *Deutsch D. G., Mertz E. T.* Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // *Science.*—1970.—170, N 3962.—P. 1095—1096.
11. *Cummins P., Perry S. V.* The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin // *Biochem. J.*—1973.—133, N 4.—P. 765—777.
12. *Новохатный В. В., Кудинов С. А.* Получение миниплазминогена и фрагмента К 1—4 пепсиновым протеолизом плазминогена человека // *Докл. АН УССР.*—1984.—№ 5.—С. 62—65.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР,  
Киев

Получено 3.07.85

УДК 535.339.047

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ РАСТВОРОВ АКТИНА МЕТОДАМИ КВАЗИУПРУГОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

П. Д. Добычин, А. В. Ломакин, Н. Г. Мевх,  
В. А. Поскин, С. М. Балабонов

**Введение.** Метод квазиупругого светорассеяния (КС) давно используют для изучения полимерного актина в растворе [1—4]. Основное внимание было уделено обсуждению конформационной жесткости (внутренней динамики) F-актина и комплексов на его основе. Использо-