ISSN 0233–7657. Biopolymers and Cell. 2012. Vol. 28. N 6. P. 413–423 doi 10.7124/bc.000130

REVIEWS

UDC 577.151.6 : 576.311.348 : 576.52

Взаємодія актину з плазміноген/плазміновою системою: механізми та фізіологічна роль

А. О. Тихомиров

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

artem_tykhomyrov@ukr.net

В огляді вперше проаналізовано та узагальнено літературні дані стосовно кооперації мультифункціональних білків: компонентів системи плазміноген/плазміну та актину. Розглянуто механізми, що лежать в основі міжмолекулярних взаємодій, та роль кринглових доменів плазміногену у міжбілковому розпізнаванні. Особливу увагу приділено екстрацелюлярному актину, який виконує функції білка поверхні плазматичної мембрани різних клітин. Обговорюється можлива роль поверхневого актину як універсального «негемостатичного» центра активації плазміногену, а також функціональне значення експонування цитоскелетного білка різними клітинами за нормальних фізіологічних умов та при розвитку патологій. Зокрема, описано механізм фрагментації плазміногену на поверхні ракових клітин за участі актину з утворенням ендогенних супресорів пухлинного росту та метастазування – ангіостатинів і залучення системи плазміноген/плазмін та поверхневого актину до регуляції релізингу біологічно активних речовин на прикладі катехоламінпродукуючих клітин. Комплексна оцінка стану плазміноген/плазмінової системи та актину пропонується як критерій функціонального статусу клітин, що може знайти застосування у діагностиці різних патологій.

Ключові слова: мультифункціональні білки, система плазміноген/плазмін, актин.

Під терміном «мультифункціональність» розуміють здатність білка виконувати не одну, а декілька альтернативних функцій. Наявність великої кількості мультифункціональних білків, яким притаманні мультикомпартменталізація та «всюдисущість», цілком доречно призводить до питання щодо взаємодії таких молекул і фізіологічної ролі подібної кооперації. Надходить все більше інформації стосовно того, що цілий спектр мультифункціональних білків (компоненти цитоскелету, гліколітичні ферменти, кінази, фактори транскрипції, фактори росту, шаперони, трансмембранні білки, білки екстрацелюлярного матриксу), які раніше вважали функціонально розрізненими, здатні до взаємодії [1]. Серед білків, «нові» функції котрих активно досліджуються, особливу увагу привертають актин і компоненти системи плазміноген/плазміну (Pg/Pm). Роль актину донедавна обмежували його участю у функціонуванні цитоскелету та скоротливого апарату клітини [2]. Однак з'являється все більше досить несподіваних повідомлень стосовно експонування актину деякими клітинами на зовнішній поверхні плазматичної мембрани, проте функціональне значення цього явища залишається незрозумілим [3–5]. Припускають, що актин клітинної поверхні може виконувати певні рецепторні функції, взаємодіючи з речовинами плазми або екстрацелюлярного матриксу [6]. Одними з білків, які розпізнаються і зв'язуються актином, є компоненти системи Pg/Pm [7]. Pg є зимогеном серинової протеїнази Pm, головна функція якого полягає у розщепленні фібринових згустків [8]. Крім плазми крові, компоненти системи Pg/Pm присутні у міжклітинному середовищі тканин і залучені до цілої низки нормальних і патофізіологічних процесів, регулюючи активність великої кількості клітин [9–10].

Особливу увагу привертають продукти обмеженого протеолізу Pg, відомі під назвою ангіостатини (AS), які проявляють потужні ангіостатичні і протизапальні ефекти, пригнічуючи патологічну неоваскуляризацію та метастазування. Утворення AS в організмі відбувається, головним чином, на поверхні плазматичної мембрани клітин, у тому числі пухлинних [11, 12], причому поверхневий актин виконує роль матриці для активації Pg і генерації AS. Експонування актину клітинами злоякісних пухлин розглядається як захисний механізм, спрямований на гальмування росту новоутворення і пригнічення метастазування [7]. Розкриття молекулярних механізмів появи AS та регуляції даного процесу може дати новий поштовх для розробки більш ефективних підходів у терапії злоякісних новоутворень та інших розладів, асоційованих з судинними патологіями.

Існують усі підстави припустити, що екстрацелюлярний актин відіграє також певну роль у перебігу нормальних фізіологічних процесів. Перелік клітин, що презентують актин на зовнішній поверхні плазматичної мембрани, є доволі широким: В-лімфоцити [3], ендотеліоцити [13], тромбоцити [14], моноцити [4], фібробласти [15], перицити [16], гладеньком'язові клітини [17], сперматозоїди [5]. Отримано вагомі докази того, що експонування поверхневого актину залежить від фізіологічного стану клітини. Так, трансформовані або стимульовані мітогенами лімфоцити експонують значно більші кількості поверхневого актину, ніж інтактні лімфоцити, причому екстрацелюлярний актин знаходиться лише на В-, але не на Т-лімфоцитах [3]. Припускають, що тромбоцити здатні експонувати актин протягом агоніст-індукованої активації [14]. На відміну від наведених вище прикладів активація моноцитів U-937, які презентують поверхневий актин у спокійному стані, призводить до зникнення цього білка з поверхні мембрани.

Враховуючи широке розповсюдження актину, можна передбачити, що даний білок на поверхні клітин може слугувати універсальним модулятором активності системи Pg/Pm.

Раніше на моделі катехоламінпродукуючих клітин показано, що екстрацелюлярний актин опосередковує утворення Pm і забезпечує участь протеїназ у регуляції релізингу гормонів [18].

На підставі аналізу літературних даних можна зробити припущення, що взаємодія між актином та білками системи Pg/Pm є важливою ланкою регуляторних і компенсаторних механізмів організму. У представленому огляді вперше зроблено спробу систематизувати відомості щодо молекулярних механізмів взаємодії актин–Pg/Pm, узагальнити фізіологічне значення такої кооперації, а також окреслити перспективи подальших досліджень і практичне застосування їхніх результатів для діагностики і терапії широкого кола патологій.

Актин і компоненти системи плазміноген/плазмін – мультифункціональні білки. Назва «актин» об'єднує родину білків, що кодуються окремими генами. Актини відзначаються високим ступенем структурного консерватизму. Відмінності в амінокислотній послідовності у різних актинів як одного виду, так і міжвидові дуже незначні: вони обмежуються не більш як 25 амінокислотними замінами. Актин є «всюдисущим» білком, оскільки його синтезують усі еукаріотичні клітини і, крім того, у переважної більшості з них він є найпредставленішим білком (10–15 % від загальної кількості білка) [19].

Загальноприйнято, що головні функції актину (скоротлива і цитоскелетна) реалізуються завдяки його існуванню у двох формах, які відрізняються за фізико-хімічними властивостями і перебувають у клітині в динамічній рівновазі. Глобулярний актин (G-форма) є одноланцюговим дводоменним поліпептидом з молекулярною масою (м. м.) приблизно 42 кДа, ізоелектричною точкою близько 5,4 і довжиною 375 амінокислотних залишків (а. з.). При полімеризації G-актина утворюються лабільні цитоскелетні структури – актинові філаменти, а полімеризований актин, що входить до їхнього складу, отримав назву F-актину.

У клітинах хребетних на сьогодні ідентифіковано шість різних ізоформ актину, що відрізняються одна від одної величиною ізоелектричної точки та стабільністю філаментних структур. Синтез ізоактинів є тканиноспецифічним і регулюється на рівні експресії відповідних генів. Так, до складу міофібрил скелетних м'язів, гладеньких м'язів і серця входять різні α-ізоформи актину, тоді як до складу мікрофіламентів цитоскелету нем'язових клітин – β- і γ-актини. Існують усі підстави припустити, що осо-

бливості сегрегації і компартменталізації ізоформ актину в клітинах різних гістотипів є свідченням їхньої функціональної нееквівалентності [20].

Сучасними дослідженнями доведено, що завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям, особливостям синтезу і компартменталізації діапазон функцій, які виконує актин, є значно ширшим. Актин залучений до регуляції активності іонних каналів [21], передачі внутрішньоклітинного сигналу в геном [22], транспорту мРНК і транскрипції [23], передачі медіаторів [24], регуляції активності ферментів [25]. Порушення процесів збирання–розбирання актинових структур цитоскелету призводить до дисфункції клітин та їхньої пухлинної трансформації [26]. Деякі патогенні бактерії використовують актинові мікрофіламенти для інвазії клітини-хазяїна [27]. Різноманіття морфофункціональних видів актину у клітині не обмежується мономерною, полімеризованою у вигляді філаментів та асоційованою з плазматичною мембраною формами. З'являється все більше даних щодо експонування різних ізоформ актину на зовнішньому боці плазматичної мембрани [1]. Важливо зауважити, що поверхневий актин зберігає фізичний зв'язок з актиновими мікрофіламентами цитоплазми клітини, а транслокація актину на поверхню мембрани залежить від функціонального стану клітини [28, 29].

Актин як у вигляді мономера, так і в полімеризованому стані виявляє високу реакційну здатність та взаємодіє у клітині з низкою речовин: іншими актиновими субодиницями, актин-асоційованими білками, ферментами, нуклеотидами, іонами тощо [29]. Як з'ясувалося, актин з високою афінністю зв'язується з деякими білками плазми крові, серед яких особливу увагу привертають компоненти системи Pg/Pm [7, 30]. Pg – неактивний зимоген серинової протеїнази Pm. Pg представляє собою одноланцюговий глікопротеїн з м. м. 92 кДа, який складається з 791 а. з. і містить близько 2 % вуглеводів. Pg у плазмі перебуває у вигляді нативного проензиму з NH_2-термінальним залишком глутамінової кислоти (Glu-Pg), його концентрація становить приблизно 0,15 г/л [30, 31]. Внаслідок обмеженого протеолізу останнього, що здійснює Pm, з'являється частково деградована молекула Pg, або Lys-Pg, який, до того ж, відрізняється від нативного Pg конформаційно. Встановлено, що Lys-Pg легше трансформується у Pm, аніж Glu-форма [32]. Активним ферментом Pg стає через розщеплення пептидного зв'язку Arg560-Val561. Процес перетворення Pm на Pg та активність самого ферменту в організмі суворо контролюються цілим набором активаторів та інгібіторів. Конвертацію Pg → Pm в організмі здійснюють, головним чином, тканинний активатор Pg (t-PA) і активатор урокіназного типу (u-PA). Існують також екзогенні активатори, найпотужніші з яких стрептокіназа і стафілокіназа. Негативним ефектором для Pm є специфічний ендогенний інгібітор α2-антиплазмін. До того ж утворення Pm з проензиму гальмується інгібіторами активаторів Pg (PAI-1, PAI-2, PAI-3) [8, 33].

Характерною рисою будови Pg/Pm є наявність п'яти високогомологічних трипетельних структур, які отримали назву кринглів. Кожний з п'яти доменів побудований у середньому з 80 а. з. і стабілізований трьома дисульфідними зв'язками. До складу кринглів входять центри зв'язування лізину (lysine binding sites – LBS). Саме LBS опосередковують взаємозв'язок Pg/Pm з іншими білками, зокрема, фібрином, забезпечуючи орієнтацію активного центра ферменту по відношенню до певних пептидних зв'язків молекули субстрату [34].

Головним органом, де відбувається синтез Pg, є печінка, звідки він потрапляє до плазми. Крім гепатоцитів, мРНК Pg виявлено у клітинах надниркових залоз, нирок, головного мозку, яєчок, серця, легенів, матки, селезінки, вилочкової залози, кишечника [35]. Існування вражаюче широкого переліку структур організму, клітини яких синтезують Pg, є передумовою для припущення, що даний білок відіграє роль не лише циркулюючого попередника активної протеази плазми, але й сигнальної молекули, функціонування якої, можливо, асоційоване з певними клітинними або субклітинними структурами. Молекулярні механізми залучення Pg/Pm до процесів клітинної сигналізації і реалізації регуляторних функцій активно досліджуються [36, 37]. Завдяки унікальним властивостям кринглових доменів молекули Pg та її здатності до конформаційної мінливості, стає можливою взаємодія даного білка з різними лігандами. На сьогодні ідентифіковано чималу кількість молекул, розташованих на поверхні

плазматичної мембрани клітин (моноцитів, макрофагів, тромбоцитів, ендотеліоцитів, фібробластів, клітин симпато-адреналової системи, сперматозоїдів тощо), які виконують функцію плазміногенових рецепторів: α-енолаза, білки інтегринової родини, анексин 2, цитокератин 8, тетранектин, гангліозиди [9, 38]. Особливе місце у цьому переліку займає екстрацелюлярний актин, оскільки цей білок відіграє ключову роль у модуляції активності системи Pg/Pm на поверхні клітини. Взаємодія Pg з рецепторними молекулами може мати різні наслідки, призводячи або до передачі сигналу усередину клітини, або до активації зимогену, проте це питання потребує подальшого вивчення.

Компоненти системи Pg/Pm залучаються до патогенезу таких хвороб і розладів, як пухлинний ріст [39], атеросклероз [40], аутоімунні захворювання [41], цукровий діабет [42], хвороба Альцгеймера [43], запалення [44], причому роль системи Pg/Pm у патологічних процесах неоднозначна. З одного боку, Pg на поверхні клітини може перетворюватися на Pm, який стимулює моноцити і макрофаги, активуючи тим самим запальні реакції, та розщеплює білки екстрацелюлярного матриксу, сприяючи ангіогенезу, інвазії ракових клітин і метастазуванню пухлин [45, 46]. З іншого боку, Pm, заякорений на мембранному сайті зв'язування, може піддаватися аутопротеолізу з утворенням продуктів часткового гідролізу – AS [47]. На противагу Pg, AS інгібують проліферацію і міграцію ендотеліоцитів, проявляючи, таким чином, ангіостатичну активність, запускають апоптоз у клітинах пухлин та слугують протизапальними агентами [48, 49]. Авторами роботи [50] встановлено, що для Pg єдиним центром перетворень Pg → Pm → AS з усіх відомих рецепторів є поверхневий β-актин. Можливо, що за участі поверхневого актину реалізується важлива ланка захисних механізмів організму, спрямованих на пригнічення пухлинного росту. Подальші дослідження мають виявити, чи існує позитивний кореляційний зв'язок між експонуванням пухлинними клітинами актину та тривалістю життя онкохворих. Дослідження механізмів взаємодії актину з Pg/Pm та подальшої генерації AS, регуляція цих процесів, їхня роль при патологіях, що супроводжуються неоваскуляризацією, запальними реакціями, малігнізацією тканин, є важливими для розробки нових діагностичних та терапевтичних підходів.

Взаємодія системи Pg/Pm з позаклітинним актином. Актин присутній у плазмі крові людей і тварин за норми, а при різних патологіях, що супроводжуються пошкодженням тканин і деструкцією клітин, його концентрація зростає до декількох мкМ, тому вважають, що головним джерелом циркулюючого актину є зруйновані клітини [50]. Проте, згідно з даними авторів [51], деякі типи клітин, зокрема, ембріональні міоцити за умов культивування секретують актин у поживне середовище, не втрачаючи при цьому життєздатності. Припускають, що аналогічним чином клітини організму за нормального функціонування цілеспрямовано секретують відповідні ізоформи актину до кровотоку. Ймовірно, що позаклітинний актин відіграє певну роль у регуляції активності білків плазми. В організмі функціонує білкова система, яка контролює концентрацію актину у плазмі. До її складу входять гельзолін плазми та вітамін D-зв'язувальний білок, або Gc-глобулін, призначенням яких є дефрагментація актинових філаментів, зв'язування мономерних поліпептидів і, зрештою, видалення актину з циркуляції [52]. Одними з білків плазми, здатних взаємодіяти з актином з високою афінністю, є Pg/Pm і t-PA (за даними різних дослідників, константа дисоціації K_d комплексу актин–Pg дорівнює 70–140 нМ, K_d актин-t-PA – 0,55 мкМ) [7, 53]. Проте фізіологічне значення такої взаємодії до кінця не розкрито. Авторами роботи [54] встановлено, що зв'язування мономерного актину з Pm призводить до інгібування його каталітичної активності та/або модифікації субстратної специфічності і зниження швидкості розщеплення фібринового згустка. З іншого боку, актин стимулює t-PA-опосередковану генерацію Pm як із Glu-, так і (з ще більшою швидкістю) з Lys-Pg. За присутності актину спостерігається зниження величини K_m для реакції Glu-Pg → Pm, яку каталізує t-PA – фермент, що має у своєму складі два кринглових домени. Механізм даного процесу полягає у взаємодії Pg і t-PA на поверхні актину (або актинового філамента) так, як це відбувається у разі формування так званого потрійного комплексу на поверхні фібринової матриці. Зв'язування Pg і t-PA з актином відбувається через LSB у складі кринглів

обох білків. На користь наведеного механізму свідчать дані стосовно того, що за присутності аналога лізину (6-аміногексанової кислоти, 6-АГК) спостерігається інгібування опосередкованої актином генерації Pm з Pg за участі t-PA. На відміну від полімеризованого фібрину, який гідролізується утвореним на його поверхні Pm, актин не є «зручним» субстратом для Pm. У дослідах *in vitro* з гідролізу актину чистим препаратом Pm встановлено, що фермент обмежено розщеплює актин за пептидним зв'язком у положенні Lys373-Cys374. Частково деградований актин порівняно з нативною молекулою з більшою афінністю зв'язує Glu-Pg. Припускають, що такий ефект має місце внаслідок зміни конформації молекули актину після гідролізу її Pm, зокрема, орієнтації лізинових залишків та появи додаткового центра зв'язування – С-кінцевого залишку Lys, з яким ефективно взаємодіють кринглові домени молекули Pg [53]. Спираючись на наведені дані, можна стверджувати, що циркулюючий актин зменшує потенціал фібринолітичної системи. По-перше, він з високою афінністю зв'язує Pg та прискорює його трансформацію у Pm, тим самим вичерпуючи пул зимогену в плазмі. По-друге, фермент у стабільному комплексі з актином перебуває в неактивному стані, перериваючи свою участь у фібринолітичному процесі. Важливо також відзначити, що в літературі не описано жодного випадку аутопротеолізу Pm, який утворився з Pg під дією t-PA і є зв'язаним з позаклітинним актином.

Поява актину в плазмі у кількостях, що перевищують ємність захисної системи, може мати несприятливі наслідки для організму. Особливу небезпеку це явище становить для функціонування мікросудин. Описано випадки швидкого утворення фібринового згустка в мікросудинах за присутності у плазмі високих рівнів позаклітинного актину [54]. Значення взаємодії двох білкових систем у патофізіологічних процесах поглиблюється завдяки їхній «всюдисущості». Запалення будь-якої локалізації призводить до загибелі клітин ендотелію судин, що супроводжується вивільненням актину та тілець Вейбеля-Паладе і наступним підвищенням локальної концентрації t-PA у місці пошкодження [55]. В свою чергу, циркулюючий актин здатний підсилювати ефекти медіаторів запалення і, як наслідок, сприяти формуванню порочного кола. Отже, стимульована актином генерація і подальша інактивація Pm можуть зробити суттєвий внесок у ті порушення гемостазу, які спостерігаються при сепсисі, запаленні, травмуванні тканин. Далі буде показано, що актин плазми та екстрацелюлярний актин, інкорпорований на зовнішньому боці плазматичної мембрани, справляють різні ефекти як на систему активації Pg, так і на активність Pm, у тому числі на здатність останнього до аутопротеолізу з утворенням AS.

Взаємодія системи Pg/Pm з актином на поверхні пухлинних клітин: механізм генерації AS. На зовнішній поверхні плазматичної мембрани деяких пухлинних клітин у надмірних кількостях (порівняно з нормальними клітинами того ж гістотипу) експонуються компоненти каскаду активації Pg, насамперед, u-PA та його рецептор (u-PAR) [47]. Існують вагомі експериментальні докази участі цих білків у процесах пухлинного росту і метастазування [56]. Встановлено, що паралельна гіперекспресія u-PA та u-PAR корелює зі ступенем агресивності раку молочної залози [57]. Порівняння профіля зв'язування Pg з нормальними і неопластичними клітинами показало, що даний білок ефективніше зв'язується з мембраною пухлинних клітин, особливо тих, яким притаманний високий метастатичний потенціал [58]. Ключовими молекулярними подіями на поверхні пухлинних клітин є високоефективна взаємодія Pg, зміна його конформації та подальше перетворення на Pm [47]. Як претенденти на зв'язування Pg розглядалися білки, що експонують С-термінальні залишки Lys, насамперед, цитокератин 8 та α-енолаза. Проте, як виявилося, ці рецептори відповідають за зв'язування всього 10 % Pg на поверхні клітин, що показано, зокрема, на клітинах лінії лімфоми U937 [59]. Подальша u-PA-залежна активація Pg призводить до появи мембраноасоційованого активного ферменту Pm, здатного спричиняти деградацію компонентів екстрацелюлярного матриксу, що є необхідною умовою для інвазії пухлинних клітин і метастазування. Пул ендотеліальних і пухлинних клітин, які містять мембраноасоційований Pm, має у 3 рази вищий інвазивний потенціал порівняно з Pm-негативними клітинами [60]. Показано, що взаємодія Pm з інтегриновим рецептором $\alpha v\beta 3$ на поверхні ен-

дотеліоцитів стимулює міграцію клітин [44]. Альтернативним механізмом реалізації Pm проангіогенних властивостей є індукція факторів ангіогенезу, насамперед VEGF-C і VEGF-D, через активацію відповідних пропептидів [61]. Існує ціла низка пухлинних або трансформованих клітин, здатних експонувати актин на зовнішній поверхні плазматичної мембрани, який може потенційно слугувати додатковим центром зв'язування і активації Pg [59].

Чи володіють ракові клітини здатністю сорбувати Pg за допомогою поверхневого актину та яких ознак вони набувають внаслідок перетворення зимогену на Pm? Ці питання видаються цілком слушними з огляду на надзвичайно важливі і, якоюсь мірою, несподівані спостереження. Як з'ясувалося, 50 % від загальної кількості Pg, зв'язаного з поверхнею пухлинної клітини, локалізуються саме на актині [13]. Більш того, за умов культивування трансформованих клітин, для яких характерною є висока щільність позаклітинного мембранозв'язаного актину, плазмінова активність на їхній поверхні за температури 37 °C знижується на 75 % протягом декількох хвилин після перетворення Pg на Pm [59]. Це спостереження можна пояснити швидкою інактивацією Pm α2-антиплазміном та/або аутопротеолізом Pm і, як наслідок, дисоціацією його комплексу з актином. Однак добре відомо, що Pm, який утворився на фібриновому згустку або клітинній поверхні, є захищеним від дії α2-антиплазміну [62]. Отже, цей інгібітор не може істотно вплинути на пригнічення плазмінової активності у фракції мембранозв'язаних білків. Вірним виявилося друге припущення: головною причиною втрати плазмінової активності є фізичне зникнення Pm з поверхні плазматичної мембрани внаслідок аутопротеолізу.

Дані інгібіторного аналізу з використанням лізину і його аналогів (6-АГК) демонструють, що Pg/Pm взаємодіють з актином через LBS кринглових доменів. Зі свого боку, у складі молекули актину до взаємодії з Pg/Pm залучаються залишки лізину у положеннях 61, 68 та 113, які є консервативними і зустрічаються в усіх відомих ізоформах актину. Найважливішим у міжмолекулярному розпізнаванні Pg/Pm–актин є залишок Lys61, оскільки він знаходиться на поверхні актинової глобули. Введення у положення 61 і 68 молекули актину замін лізинових залишків на аргінін практично повністю унеможливлює здатність Pg/Pm до зв'язування, а синтетичний пептид-аналог фрагмента поліпептидного ланцюга актину, до складу якого входять а. з. 55–69, конкурентно інгібує реакцію аутопротеолізу Pm за присутності актину.

Наступне спостереження є надзвичайно важливим для розуміння механізму, за яким актин залучається до розщеплення Pm. Як з'ясувалося, вказаний короткий пептид-аналог ланцюга актину у безклітинному середовищі ефективно зв'язується з Pm, але він не здатний стимулювати реакцію аутопротеолізу. Подальші досліди дозволили встановити, що для саморозщеплення Pm потрібна цілісна молекула актину, яка необхідна, по-перше, як матриця, де відбуваються конформаційні зміни молекули Pm, важливі для подальшої реакції, і, по-друге, як редукуючий агент. Фізико-хімічні властивості актину, а також особливості його просторової будови ідеально підходять для оптимальної орієнтації груп у складі активного центра Pm і подальшого його розщеплення. Аналіз продуктів аутопротеолізу Pm, зв'язаного з поверхневим β-актином на мембрані трьох типів пухлинних клітин людини: PC-3 (рак передміхурової залози), HT1080 (фібросаркома) і MDA-MB231 (рак молочної залози), виявив, що гідроліз пептидного зв'язку у положенні Arg530-Lys531 молекули Pm призводить до появи фрагмента з усіченим п'ятим кринглом – K1-4 плюс 85 % кринглу 5, що має назву K1-4,5 (AS 4,5). Звідси випливає, що за взаємодію Pg/Pm з актином відповідає інтактний кringл 5, оскільки утворений AS втрачає здатність взаємодіяти з актином [7, 47]. Роль п'ятого кringла у міжбілковому розпізнаванні потребує подальшої експериментальної перевірки, адже реакційні центри кringла 5 мають більшу афінність до залишків лізину, розташованих усередині поліпептидних ланцюгів порівняно з кринглами 1, 2 і 4 [63]. Фрагмент K1-4,5 вивільняється з поверхні клітини і потрапляє у системний кровотік [7]. Відомо, що K1-4,5, як і інші протеолітичні фрагменти Pg/Pm–AS, до складу яких входить різна кількість кringлів (K1-3, K2-3, K1-4, K1-5), володіє потужною антиангіогенною активністю, завдяки чому пригнічує неоваскуляризацію і метастазування пухлин. Крім того, AS можуть чинити пряму протипухлин-

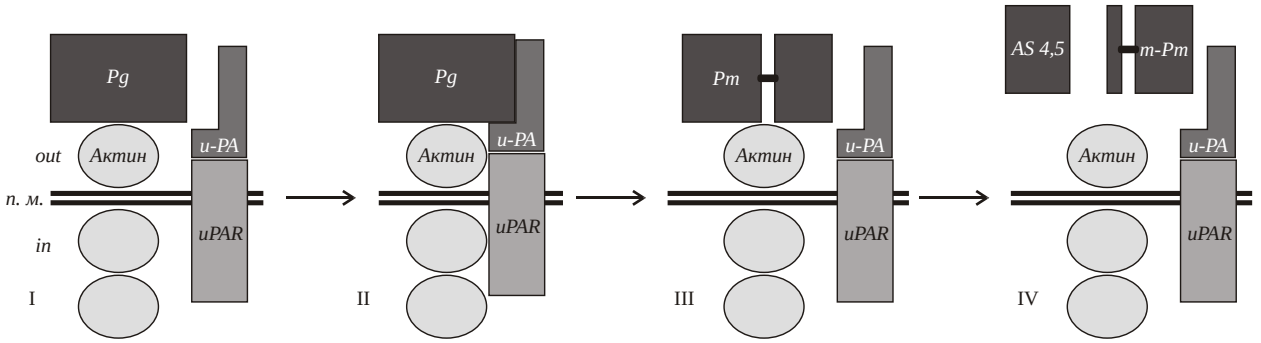

Рис. 1. Схема утворення ангіостатину K1-4,5 (AS 4,5) внаслідок аутопротеолізу плазміну (*Pm*) за участі актину, експонованого на зовнішній поверхні плазматичної мембрани (п. м.) пухлинної клітини: *I* – зв'язування плазміногену (*Pg*) з поверхневим актином за присутності активатора (*u-PA*) і його рецептора (*u-PAR*); *II, III* – розпізнавання активатором молекули *Pg* і перетворення останнього на Pm; *IV* – аутопротеоліз Pm з утворенням фрагментів: K1-4,5 (AS 4,5) і мікроплазміну (*m-Pm*) (за матеріалами [7, 47])

ну дію, запускаючи апоптоз ракових клітин [11, 48, 49]. Таким чином, продукту аутопротеолітичної деградації Pm притаманна фізіологічна активність, протилежно спрямована тій, що демонструє вихідна молекула.

Аутопротеоліз Pm з утворенням AS можна розглядати як чотиристадійний процес, основні етапи якого проілюстровано на рис. 1. Слід зауважити, що послідовність представлених подій можлива лише за одночасної наявності та близького просторового розташування усіх необхідних компонентів активації Pg: поверхневого актину, u-PA та відповідного рецептора (u-PAR). Експериментальні дані, отримані на сьогоднішній день, вказують на те, що дані молекули у кількостях, необхідних для генерації AS, зустрічаються лише на поверхні деяких пухлинних клітин [47].

Очевидно, що від особливостей протеому пухлинної клітини, сортингу та сегрегації білків і можливості реалізовувати останніми широкий спектр міжмолекулярних взаємодій залежить її метастатичний потенціал. З одного боку, підвищені рівні u-PA і u-PAR на мембранах клітин пухлини розглядаються як негативні прогностичні параметри за перебігу онкологічного захворювання, оскільки Pm, розщеплюючи білки екстрацелюлярного матриксу і активуючи металопротеїнази, індукує ангіогенез та інвазію клітин. З іншого боку, Pm є джерелом AS (однак лише у разі сумісного експонування u-PA, u-PAR та актину на поверхні клітини). Наведені літературні дані дають усі підстави розглядати поверхневий актин як додатковий прогностичний індикатор, рівень якого може позитивно корелювати з супресією пухлинного росту та подовженням життя пацієнта.

Отже, розглянутий випадок взаємодії двох мультифункціональних білкових систем певним чином дає пояснення парадигмі: чому Pm як індуктор ангіогенезу зумовлює локальні ефекти, тоді як AS пригнічують ангіогенез системно. Подальше дослідження механізмів міжбілкових взаємодій компонентів системи Pg/Pm з мембраноасоційованими лігандами, у тому числі поверхневим актином, є важливим для розуміння особливостей функціонування білків фібринолітичної системи у негемостатичних процесах.

Враховуючи вищенаведене, перспективною є розробка підходів, спрямованих на експонування актину клітинами пухлин як додаткового центра генерації AS – ендогенних інгібіторів пухлинного росту та метастазування.

Взаємодія системи Pg/Pm з актином на поверхні катехоламінпродукуючих клітин. Симпатоадреналова система регулює усі процеси життєдіяльності організму на різних етапах його онтогенезу. До числа медіаторів симпатоадреналової системи відносять катехоламіни: норадреналін (норепінефрин), адреналін (епінефрин) і дофамін, які синтезуються, в основному, хромафінними клітинами мозкової речовини наднирників і адренергічними нейронами ЦНС та симпатичних гангліїв. Їхній синтез і секреція підлягають суворому контролю з боку нейроендокринної системи, що здійснюється через низку гормоноподібних речовин пептидної природи [64]. Усі індуктори та інгібітори релізингу катехоламінів синтезуються у вигляді не-

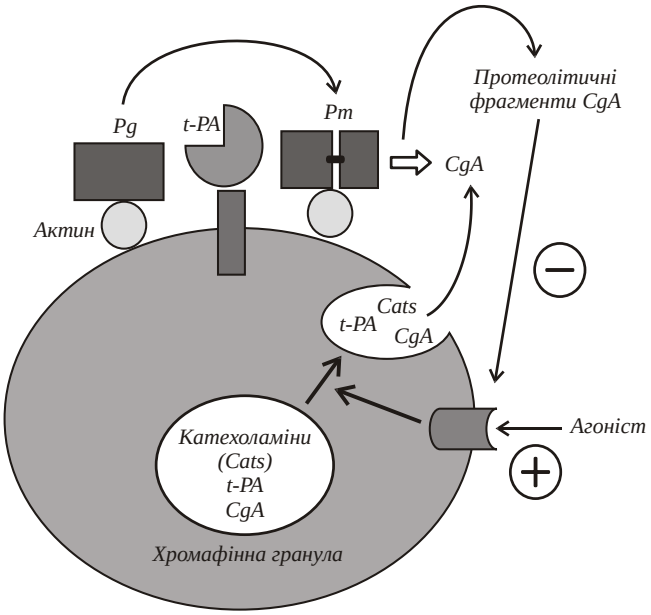

Рис. 2. Механізм процесингу хромограніну А (*CgA*) плазміном (*Pm*) на мембрані катехоламінпродукуючих клітин. Циркулюючий плазміноген (*Pg*) зв'язується з поверхневим актином і перетворюється на плазмін за участі t-PA, розташованого на мембранному рецепторі. Pm розщеплює CgA, який входить до складу хромафінних гранул разом з t-PA і катехоламінами і секретується клітинами у відповідь на стимуляцію. Протеолітичні фрагменти CgA за принципом негативного зворотного зв'язку інгібують секрецію і р**елі**зинг катехоламінів (за матеріалами [18, 67])

активних прогормонів, механізми процесингу котрих вивчено недостатньо. Відомо, що білок хромогранін А (Cg A), який міститься у багатьох клітинах нейроендокринної системи, є попередником цілої групи тканиноспецифічних пептидів, які модулюють секреторну функцію клітин [65]. Перші дослідження процесингу CgA дозволили встановити, що він найактивніше проходить за присутності хромафінних клітин [66]. Це спостереження дало усі підстави припустити, що самі гормонпродукуючі клітини здатні синтезувати речовини, які регулюють рівень пептидів, модулюючих релізинг катехоламінів за механізмом негативного зворотного зв'язку. Однак тривалий час природа ферментів катехоламінергічних клітин, які здійснюють обмежений протеоліз CgA, залишалася невідомою. Як з'ясувалося пізніше, бактерійна ендопротеїназа LysC і трипсин (ферменти, що не містяться у позаклітинному середовищі хромафінних клітин) здатні специфічно розщеплювати CgA за тим самим сайтом гідролізу, що й Pm, зимоген котрого присутній серед речовин екстрацелюлярного матриксу даних клітин [67, 68]. Цей факт навів на думку, яка була згодом експериментально підтверджена, що найголовнішою протеазою, залученою до інгібування релізингу катехоламінів через процесинг CgA, є Pm. Було досліджено механізм (рис. 2), за яким Pm розщеплює CgA з утворенням фізіологічно активних пептидів, здатних пригнічувати секрецію катехоламінів у відповідь на ацетилхолінову стимуляцію клітин феохромоцитоми PC12 та хромафінних клітин мозкового шару наднирників бика [18, 67]. На першому етапі Pg зв'язується з поверхнею клітин у декількох сайтах, у тому числі високоафінному (K_d = 77 нМ). Друга стадія процесу полягає в активації мембранозв'язаного Pg за участі t-PA, який, у свою чергу, секретується хромафінними клітинами як реакція на стимуляцію.

Авторами даних експериментів встановлено вирішальну роль взаємодії Pg з клітинною мембраною: по-перше, ця подія є необхідною умовою для конформаційних змін молекули зимогену, по-друге, як уже зазначалося, мембранозв'язаний Pm є захищеним від інгібуючої дії α2-антиплазміну.

Дослідження природи білків – потенційних рецепторів Pg на поверхні катехоламінергічних клітин, які проводили із застосуванням двовимірного електрофорезу, радіолігандблотингу і тандемної масспектрометрії, дозволили встановити, що за взаємодію Pg з мембраною клітин відповідають екстрацелюлярні β- та γ-ізомери актину, кількість молекул яких становить у середньому $9{,}8\,10^4$ на клітину. Про безпосереднє залучення поверхневого актину до процесингу білків свідчать також експериментальні дані, які показали, що внаслідок обробки культури хромафінних клітин антитілами проти актину відбувається паралельне зниження рівня активації Pg та інтенсифікація релізингу норепінефрину. Інгібіторні ефекти 6-АГК на зв'язування Pg з актином у клітинній культурі знову свідчать про участь у міжмолекулярній взаємодії LBS кринглових доменів Pg і залишків лізину у молекулі актину. Той факт, що обробка клітин карбоксипептидазою С на 90 % зменшує рівень активації Pg, вказує на залучення С-кінцевих залишків лізину (найвірогідніше, Lys373) у складі частково деградованого актину до взаємодії з Pg [18].

Функціонування ансамблю системи активації Pg та екстрацелюлярного актину на поверхні катехоламінергічних клітин, імовірно, відіграє ключову роль у модуляції секреції біологічно активних сполук. Важливо зауважити, що Pg і компоненти системи його активації виявлено також в інших нейроендокринних структурах, зокрема, нейронах кори головного мозку, мозочка, гіпокампу, а також у клітинах периферійної нервової системи [35, 69, 70]. Не виключено, що описана взаємодія системи Pg/Pm з поверхневим актином є універсальним механізмом регуляції нейросекреторної активності адренергічних клітин як у центральній, так і периферійній нервових системах.

Висновки. Плазміноген/плазмін та актин є прикладами мультифункціональних білків, здатних до взаємодії. Враховуючи «всюдисущість» актину, припускають, що даний білок, розташований на поверхні плазматичної мембрани клітин, може слугувати універсальним модулятором активності плазміноген/плазмінової системи. Актин індукує конформаційні зміни молекули Pm, що призводить до змін активності і модифікації субстратної специфічності ферменту. Плазмін у комплексі з поверхневим актином здійснює процесинг біологічно активних пептидів або підлягає аутопротеолізу з утворенням ангіостатину – потужного ендогенного інгібітора неоваскуляризації і метастазування. Розкриття механізмів сигналінгу за участі компонентів системи плазміноген/плазмін та актину розглядається як важливе фундаментальне питання і є перспективним для розробки нових підходів діагностики і терапії різних порушень, зокрема, тромботичних станів, онкологічних хвороб та патологій нервової системи.

A. A. Tykhomyrov

Interaction of actin with plasminogen/plasmin system: mechanisms and physiological role

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9, Leontovicha Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

In the present review, we have summarized and analyzed the literature data concerning cooperation between multifunctional proteins, the components of plasminogen/plasmin system and actin. The mechanisms underlying intermolecular interactions and the role of plasminogen kringle domains in protein-protein recognition are reviewed. A particular attention is paid to extracellular actin that serves as a surface protein of plasma membrane in various cells. A putative role of surface actin as the universal «non-hemostatic» center of plasminogen activation is discussed. The exposition of cytoskeletal actin on the outer surface of cellular membrane is thought to be a phenomenon, which is involved in both normal cell functioning and development of pathologies. In particular, the mechanism of plasminogen fragmentation on the surface of cancer cells mediated by actin, which results in generation of endogenous suppressors of tumor growth and metastazing (angiostatins), is described. It has been acknowledged that the plasminogen/plasmin system in concert with surface actin regulates releasing biologically active substances, e. g. catecholamines. The comprehensive assessment of plasminogen/plasmin system and surface actin exposition is proposed to be a criterion of functional status of cells and can be used as a diagnostic parameter at various pathologies.

Keywords: multifunctional proteins, plasminogen/plasmin system, actin.

А. А. Тихомиров

Взаимодействие актина с плазминоген/плазминовой системой: механизмы и физиологическая роль

Резюме

В обзоре впервые проанализированы и обобщены литературные данные относительно кооперации мультифункциональных белков: компонентов плазминоген/плазминовой системы и актина. Рассмотрены механизмы, лежащие в основе межмолекулярных взаимодействий, и роль кринговых доменов плазминогена в межбелковом распознавании. Особое внимание уделено экстрацеллюлярному актину, выполняющему функции белка поверхности плазматической мембраны различных клеток. Обсуждается возможная роль поверхностного актина как универсального «негемостатического» центра активации плазминогена, а также функциональное значение экспонирования цитоскелетного белка разными клетками при нормальных физиологических условиях и развитии патологий. В частности, описан механизм фрагментации плазминогена на поверхности раковых клеток при участии актина с образованием эндогенных супрессоров опухолевого роста и метастазирования – ангиостатинов и вовлечение системы плазминоген/плазмин и поверхностного актина в регуляцию релизинга биологически активных веществ на примере катехоламинпродуцирующих клеток. Комплексная оценка состояния плазминоген/плазминовой системы и актина предлагается в качестве критерия функционального состояния клеток и может найти применение в диагностике различных патологий.

Ключевые слова: мультифункциональные белки, система плазминоген/плазмин, актин.

REFERENCES

1. *Smalheiser N. R.* Proteins in unexpected locations // Mol. Biol. Cell.–1996.–**7**, N 7.–P. 1003–1014.
2. *Reisler E., Egelman E. H.* Actin structure and function: what we still do not understand // J. Biol. Chem.–2007.–**282**, N 50.–P. 36133–36137.
3. *Owen M. J., Auger J., Barber B. H., Edwards A. J., Walsh F. S., Crumpton M. J.* Actin may be present on the lymphocyte surface // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–1978.–**75**, N 9.–P. 4484–4488.
4. *Por S. B., Cooley M. A., Breit S. N., Penny R., French P. W.* Antibodies to tubulin and actin bind to the surface of a human mono-

cytic cell line, U937 // J. Histochem. Cytochem.–1991.–**39**, N 7.–P. 981–985.

5. *Liu D. Y., Clarke G. N., Baker H. W.* Exposure of actin on the surface of the human sperm head during *in vitro* culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding // Hum. Reprod.–2005.–**20**, N 4.–P. 999–1005.
6. *Moroianu J., Fett J. W., Riordan J. F., Vallee B. L.* Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial cells in culture // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–1993.–**90**, N 9.–P. 3815–3819.
7. *Wang H., Doll J. A., Jiang K., Cundiff D. L., Czarnecki J. S., Wilson M., Ridge K. M., Soff G. A.* Differential binding of plasminogen, plasmin, and angiostatin4.5 to cell surface beta-actin: implications for cancer-mediated angiogenesis // Cancer Res.–2006.–**66**, N 14.–P. 7211–7215.
8. *Lugovskoy E. V.* Molecular mechanisms of fibrin formation and fibrinolysis.–Kiev: Naukova Dumka, 2003.–224 p.
9. *Zhernossekov D. D., Yusova E. I., Grinenko T. V.* Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells // Ukr. Biochem. J.–2012.–**84**, N 4.–P. 5–19.
10. *Roka-Moya Y. M., Zhernossekov D. D., Grinenko T. V.* Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation // Biopolym. Cell.–2012.–28, N 5.–P. 352–356.
11. *Doll J. A., Soff G. A.* Angiostatin // Cancer Treat. Res.–2005.–**126**.–P. 175–204.
12. *Klys' Y. G., Zajtseva N. V., Kizim A. I., Verevka S. V.* Proteolytic derivates of plasminogen as a factor in malignancy development // Oncology.–2010.–**12**, N 1.–P. 17–21.
13. *Dudani A. K., Ganz P. R.* Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a) // Br. J. Haematol.–1996.–**95**, N 1.–P. 168–178.
14. *George J. N., Lyons R. M., Morgan R. K.* Membrane changes associated with platelet activation. Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion // J. Clin. Invest.–1980.–**66**, N 1.–P. 1–9.
15. *Giometti C. S., Willard K. E., Anderson N. L.* Cytoskeletal proteins from human skin fibroblasts, peripheral blood leukocytes, and a lymphoblastoid cell line compared by two-dimensional gel electrophoresis // Clin. Chem.–1982.–**28**, N 4, pt 2.–P. 955–961.
16. *Le Beux Y. J., Willemot J.* Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes // Anat. Rec.–1978.–**190**, N 4.–P. 811–826.
17. *Accinni L., Natali P. G., Silvestrini M., De Martino C.* Actin in the extracellular matrix of smooth muscle cells. An immunoelectron microscopic study // Connect. Tissue Res.–1983.–**11**, N 1.–P. 69–78.
18. *Miles L. A., Andronicos N. M., Baik N., Parmer R. J.* Cell-surface actin binds plasminogen and modulates neurotransmitter release from catecholaminergic cells // J. Neurosci.–2006.–**26**, N 50.–P. 13017–13024.
19. *Dominguez R., Holmes K. C.* Actin structure and function // Annu. Rev. Biophys.–2011.–**40**.–P. 169–186.
20. *Khaitlina S. Yu.* Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms // Tsitologiya.–2007.–**49**, N 5.–P. 345–354.
21. *Mazzocci C., Benos D. J., Smith P. R.* Interaction of epithelial ion channels with the actin-based cytoskeleton // Am. J. Physiol. Renal Physiol.–2006.–**291**, N 6.–F1113–1122.
22. *de Lanerolle P., Cole A. B.* Cytoskeletal proteins and gene regulation: form, function, and signal transduction in the nucleus // Sci. STKE.–2002.–**139**.–pe30.
23. *Percipalle P., Visa N.* Molecular functions of nuclear actin in transcription // J. Cell Biol.–2006.–**172**, N 7.–P. 967–971.
24. *Dillon C., Goda Y.* The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse // Annu. Rev. Neurosci.–2005.–**28**.–P. 25–55.
25. *Su Y., Kondrikov D., Block E. R.* Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase // Cell Biochem. Biophys.–2005.–**43**, N 3.–P. 439–449.
26. *Yamaguchi H., Condeelis J.* Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion // Biochim. Biophys. Acta.–**1773**, N 5.–P. 642–652.
27. *Cossart P., Sansonetti P. J.* Bacterial invasion: the paradigm of enteroinvasive pathogens // Science.–2004.–**304**, N 5668.–P. 242–248.
28. *Bachvaroff R. J., Miller F., Rapaport F. T.* Appearance of cytoskeletal components on the surface of leukemia cells and of lymphocytes transformed by mitogens and Epstein-Barr virus // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–1980.–**77**, N 8.–P. 4979–4983.
29. *Forlemu N. Y., Njabon E. N., Carlson K. L., Schmidt E. S., Waingeh V. F., Thomasson K. A.* Ionic strength dependence of F-actin and glycolytic enzyme associations: a Brownian dynamics simulations approach // Proteins.–2011.–79, N 10.–P. 2813–2827.
30. *Novokhatny V. V., Matsuka Y. V.* Plasminogen: structure and physico-chemical properties // Biochemistry of Animals and Human.–1989.–N 13.–P. 36–45.
31. *Ponting C. P., Marshall J. M., Cederholm-Williams S. A.* Plasminogen: a structural review // Blood Coagul. Fibrinolysis.–1992.–**3**, N 5.–P. 605–614.
32. *Fredenburgh J. C., Nesheim M. E.* Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis *in vitro* // J. Biol. Chem.–1992.–**267**, N 36.–P. 26150–26156.
33. *Hrynenko T. V., Iusova O. I., Zadorozhna M. B., Makohonenko Ie. M.* Features of the interaction between alpha2-antiplasmin and plasminogen/plasmin // Ukr. Biochem. J.–2002.–**74**, N 6.–P. 83–90.
34. *Castellino F. J., McCance S. G.* The kringle domains of human plasminogen // Ciba Found. Symp.–1997.–**212**.–P. 46–60.
35. *Zhang L., Seiffert D., Fowler B. J., Jenkins G. R., Thinnes T. C., Loskutoff D. J., Parmer R. J., Miles L. A.* Plasminogen has a broad extrahepatic distribution // Thromb. Haemost.–2002.–**87**, N 3.–P. 493–501.
36. *Plow E. F., Herren T., Redlitz A., Miles L. A., Hoover-Plow J. L.* The cell biology of the plasminogen system // FASEB J.–1995.–**9**, N 10.–P. 939–945.
37. *Miles L. A., Hawley S. B., Baik N., Andronicos N. M., Castellino F. J., Parmer R. J.* Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation // Front. Biosci.–2005.–**10**.–P. 1754– 1762.
38. *Herren T., Swaisgood C., Plow E. F.* Regulation of plasminogen receptors // Front. Biosci.–2003.–**8**.–d1-8.
39. *Ranson M., Andronicos N. M.* Plasminogen binding and cancer: promises and pitfalls // Front. Biosci.–2003.–**8**.–s294–304.
40. *Farris S. D., Hu J. H., Krishnan R., Emery I., Chu T., Du L., Kremen M., Dichek H. L., Gold E., Ramsey S. A., Dichek D. A.* Mechanisms of urokinase plasminogen activator (uPA)-mediated atherosclerosis: role of the uPA receptor and S100A8/A9 proteins // J. Biol. Chem.–2011.–**286**, N 25.–P. 22665–22677.
41. *Szekanecz Z., Besenyei T., Paragh G., Koch A. E.* Angiogenesis in rheumatoid arthritis // Autoimmunity.–2009.–**42**, N 7.–P. 563–573.
42. *Sodha N. R., Clements R. T., Boodhwani M., Xu S. H., Laham R. J., Bianchi C., Sellke F. W.* Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.–2009.–**296**, N 2.–H428–434.
43. *Vagnucci A. H. Jr., Li W. W.* Alzheimer's disease and angiogenesis // Lancet.–2003.–**361**, N 9357.–P. 605–608.

44. *Syrovets T., Lunov O., Simmet T.* Plasmin as a proinflammatory cell activator // J. Leukoc. Biol.–2012.–**92**, N 3.– P. 509–519.
45. *Tarui T., Majumdar M., Miles L. A., Ruf W., Takada Y.* Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin // J. Biol. Chem.–2002.–**277**, N 37.–P. 33564–33570.
46. *Sharma M., Ownbey R. T., Sharma M. C.* Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation // Exp. Mol. Pathol.–2010.–**88**, N 2.–P. 278–286.
47. *Wang H., Schultz R., Hong J., Cundiff D. L., Jiang K., Soff G. A.* Cell surface-dependent generation of angiostatin4.5 // Cancer Res.–2004.–**64**, N 1.–P. 162–168.
48. *Wahl M. L., Moser T. L., Pizzo S. V.* Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease // Recent Prog. Horm. Res.–2004.–**59**.–P. 73–104.
49. *Chavakis T., Athanasopoulos A., Rhee J. S., Orlova V., Schmidt-Woll T., Bierhaus A., May A. E., Celik I., Nawroth P. P., Preissner K. T.* Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment // Blood.–2005.–**105**, N 3.–P. 1036–1043.
50. *Mejean C., Roustan C., Benyamin Y.* Anti-actin antibodies. Detection and quantitation of total and skeletal muscle actin in human plasma using a competitive ELISA // J. Immunol. Methods.–1987.–**99**, N 1.–P. 129–135.
51. *Rubenstein P., Ruppert T., Sandra A.* Selective isoactin release from cultured embryonic skeletal muscle cells // J. Cell Biol.–1982.–**92**, N 1.–P. 164–169.
52. *Janmey P. A., Lind S. E.* Capacity of human serum to depolymerize actin filaments // Blood.–1987.–**70**, N 2.–P. 524–530.
53. *Lind S. E., Smith C. J.* Actin accelerates plasmin generation by tissue plasminogen activator // J. Biol. Chem.–1991.–**266**, N 26.–P. 17673–17678.
54. *Lind S. E., Smith C. J.* Actin is a noncompetitive plasmin inhibitor // J. Biol. Chem.–1991.–**266**, N 8.–P. 5273–5278.
55. *Huber D., Cramer E. M., Kaufmann J. E., Meda P., Masse J. M., Kruithof E. K., Vischer U. M.* Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both *in vitro* and *in vivo* // Blood.–2002.–**99**, N 10.–P. 3637–3645.
56. *Sidenius N., Blasi F.* The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy // Cancer Metastasis Rev.–2003.–**22**, N 2–3.–P. 205–222.
57. *Foekens J. A., Peters H. A., Look M. P., Portengen H., Schmitt M., Kramer M. D., Brunner N., Janicke F., Meijer-van Gelder M. E., Henzen-Logmans S. C., van Putten W. L., Klijn J. G.* The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients // Cancer Res.–2000.–**60**, N 3.–P. 636–643.
58. *Stillfried G. E., Saunders D. N., Ranson M.* Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity // Breast Cancer Res.–2007.–**9**, N 1.–R14.
59. *Andronicos N. M., Ranson M.* The topology of plasminogen binding and activation on the surface of human breast cancer cells // Br. J. Cancer.–2001.–**85**, N 6.–P. 909–916.
60. *Stack M. S., Gately S., Bafetti L. M., Enghild J. J., Soff G. A.* Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation // Biochem. J.–1999.–**340**, pt 1.–P. 77–84.
61. *McColl B. K., Baldwin M. E., Roufail S., Freeman C., Moritz R. L., Simpson R. J., Alitalo K., Stacker S. A., Achen M. G.* Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D // J. Exp. Med.–2003.–**198**, N 6.–P. 863–868.
62. *Schaller J., Gerber S. S.* The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects // Cell Mol. Life Sci.–2011.–**68**, N 5.–P. 785–801.
63. *Chang Y., Mochalkin I., McCance S. G., Cheng B., Tulinsky A., Castellino F. J.* Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen // Biochemistry.–1998.–37, N 10.–P. 3258–3271.
64. *Human* physiology: handbook / Ed. V. M. Pokrovsky, G. F. Koryt'ko.–Moscow: Medicine, 2003.–656 p.
65. *Feldman S. A., Eiden L. E.* The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia // Endocr. Pathol.–2003.–**14**, N 1.–P. 3–23.
66. *Metz-Boutigue M. H., Garcia-Sablone P., Hogue-Angeletti R., Aunis D.* Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites // Eur. J. Biochem.–1993.–**217**, N 1.–P. 247–257.
67. *Parmer R. J., Mahata M., Gong Y., Mahata S. K., Jiang Q., O'Connor D. T., Xi X. P., Miles L. A.* Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion // J. Clin. Invest.–2000.–**106**, N 7.–P. 907–915.
68. *Colombo B., Longhi R., Marinzi C., Magni F., Cattaneo A., Yoo S. H., Curnis F., Corti A.* Cleavage of chromogranin A N-terminal domain by plasmin provides a new mechanism for regulating cell adhesion // J. Biol. Chem.–2002.–**277**, N 48.–P. 45911–45919.
69. *Salles F. J., Strickland S.* Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus // J. Neurosci.–2002.–**22**, N 6.–P. 2125–2134.
70. *O'Rourke J., Jiang X., Hao Z., Cone R. E., Hand A. R.* Distribution of sympathetic tissue plasminogen activator (tPA) to a distant microvasculature // J. Neurosci. Res.–2005.–**79**, N 6.–P. 727–733.

Received 18.09.12