

УДК 577.151.4

АКТИВАЦИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРЕПТОКИАЗОЙ И ЭФФЕКТ ФИБРИНА

Е. И. Юсова

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: yusova07@mail.ru

Получено 09.12.2013

Целью работы было изучение плазминогенактиваторной активности 36-кДа фрагмента стрептокиназы, влияния на этот процесс desAB-фибрина, а также низкомолекулярной стрептокиназы на каталитические свойства плазмينا.

Фрагмент стрептокиназы с молекулярной массой 36 кДа, у которого отсутствуют 63 N- и 34 C-концевых аминокислотных остатка, получали из химотрипсинового гидролизата нативной стрептокиназы препаративным электрофорезом. Показано, что этот фрагмент активирует Glu-плазминоген в растворе только при высоких концентрациях реагирующих компонентов ($2 \cdot 10^{-7}$ М). Процесс активации начинается после длительного лаг-периода и происходит в 100 раз медленнее по сравнению с нативной стрептокиназой. В отличие от нативной Glu-формы, активация частично деградированной Lys-формы проэнзима и мини-плазминогена (Val442-плазминоген) происходит при значительно более низкой концентрации протеинов ($5 \cdot 10^{-8}$ М), при этом скорость реакции с мини-плазминогеном на порядок выше, чем с Lys-плазминогеном, и равна $4,3 \cdot 10^{-2}$ и $5,0 \cdot 10^{-3}$ оп. ед.·мин⁻¹ соответственно. DesAB-фибрин эффективно увеличивает скорость активации Glu- и Lys-плазминогена 36 кДа-стрептокиназой и практически не влияет на скорость активации мини-плазминогена. Низкомолекулярная стрептокиназа, в отличие от нативной, не влияет на амидазную и фибринолитическую активность плазмينا и не предотвращает ингибирования энзима α_2 -антиплазмином. Плазмин в присутствии этого фрагмента стрептокиназы не проявляет активирующей способности по отношению к плазминогену.

Результаты этих исследований свидетельствуют, что при активации плазминогена низкомолекулярной стрептокиназой в присутствии desAB-фибрина определенный участок молекулы фибрина выполняет функцию N-концевого пептида нативной стрептокиназы, индуцируя в проэнзиме конформационные изменения, необходимые для быстрого образования комплекса с 36 кДа-стрептокиназой, и формирование активного центра в молекуле проэнзима этой формой стрептокиназы.

Ключевые слова: стрептокиназа, 36 кДа-фрагмент стрептокиназы, плазминоген, фибрин.

Стрептокиназа — тромболитик, который успешно применяется в отечественной и зарубежной медицине при различных сердечно-сосудистых заболеваниях для растворения тромбов и реканализации сосудов. Стрептокиназа — протеин (47 кДа), активатор плазминогена бактериального происхождения, не является энзимом и активирует плазминоген уникальным, некаталитическим путем без расщепления пептидной связи Arg561–Val562. Существенным недостатком стрептокиназы как тромболитического агента является способность активировать не только ассоциированный с поверхностью полимерного фибрина, но и свободноциркулирующий плазминоген. Поэтому современные исследования на-

правлены на поиск возможных путей превращения стрептокиназы в тромболитик направленного действия, который будет активировать плазминоген по фибринзависимому механизму.

Превращение проэнзима плазминогена в сериновую протеиназу плазмин (К.Ф.3.21.7), обеспечивающий расщепление фибриновой основы тромба, относится к ключевым реакциям системы фибринолиза. При физиологических условиях активация плазминогена обеспечивается двумя высокоспецифическими протеиназами — тканевым активатором плазминогена (К.Ф.3.4.21.68.) и урокиназой (К.Ф.3.4.21.31.). Существуют и неэнзимативные активаторы плазминогена — стрептокиназа и стафилокиназа [1, 2].

Тканевой активатор и стрептокиназа применяются в тромболитической терапии при остром инфаркте миокарда, остром тромбозе вен, тромбоэмболии легочной артерии и других нарушениях процесса фибринолиза. Всестороннее изучение молекулярных механизмов действия этих активаторов — важная медико-биологическая задача, направленная на совершенствование тромболитической терапии и создание новых тромболитических агентов.

Согласно современным представлениям, активация пламиногена тканевым активатором происходит вследствие гидролиза активационной пептидной связи Arg561-Val562. Новая N-концевая группа образует солевой мостик с Asp740, расположенной вблизи Ser741, входящего в состав каталитической триады, что вызывает конформационные изменения, которые приводят к формированию активного центра фермента [3]. Тканевой активатор специфически сорбируется на фибрине и действует на поверхности тромба [4, 5]. В настоящее время созданы препараты рекомбинантного тканевого активатора, соизмеримые по эффективности с нативным ферментом [6].

Стрептокиназа не является ферментом и активирует пламиноген уникальным не-протеолитическим способом. На первой стадии реакции она образует эквимольный комплекс с пламиногеном человека, на второй — вызывает изменения конформации в серинпротеиназном домене проэнзима, приводящие к формированию активного центра и появлению каталитической активности. На следующей стадии активаторный комплекс ферментивным путем расщепляет в молекуле субстратного пламиногена активационную пептидную связь с образованием плазмин-стрептокиназного комплекса (Пм-Ск) или, при каталитическом количестве стрептокиназы, свободного плазмина [7]. Описанная Пм-Ск-комплексом активация пламиногена не зависит от присутствия в системе фибрина, что приводит к активации растворенного проэнзима. Это является существенным недостатком стрептокиназы в качестве тромболитика. Образующийся при внутривенном введении стрептокиназы свободный плазмин инактивируется α_2 -антиплазмином, что приводит к снижению фибринолитического потенциала крови [8]. Кроме того, при быстром появлении плазмينا в системе циркуляции высока вероятность возникновения артериальной гипотензии вследствие резкого увеличения количества брадикинина [9].

Специфичность Пм-Ск в отношении высоко- и низкомолекулярных субстратов существенно отличается от специфичности плазмина. Пм-Ск эффективно активирует пламиноген, избирательно расщепляя пептидную связь Arg561-Val562, амидазная активность комплекса возрастает, а протеолитическая активность в отношении физиологического субстрата — фибрина, напротив, снижается. Связанный со стрептокиназой плазмин защищен от ингибирования α_2 -антиплазмином и аутолиза [10, 11].

Известно, что стрептокиназа в составе Пм-Ск-комплекса нестабильна и быстро подвергается частичному гидролизу [12, 13]. Уже через 10 с существования комплекса формируется несколько производных форм с молекулярной массой от 47 до 36 кДа. В течение 30 мин практически вся 47 кДа-стрептокиназа переходит в 36 кДа-фрагмент, сохраняющийся в течение последующих 5 ч на фоне появления еще более низкомолекулярных фрагментов. При этом амидазная и фибринолитическая активность деградируемого плазмин-стрептокиназного комплекса практически не изменяется, сохраняется и способность стрептокиназы защищать плазмин от ингибирования α_2 -антиплазмином и аутолиза. В то же время активаторное действие в отношении Glu-пламиногена снижается почти на 50% [14].

В 1999 г. Reed et al. получили рекомбинантную стрептокиназу, лишенную 59 N-концевых аминокислотных остатков (rСк Δ 59), и установили, что, по сравнению с нативной стрептокиназой, она в 600 раз медленнее активирует растворенный пламиноген. В присутствии же фибрина (но не фибриногена) активирующая способность восстанавливается [15]. Добавление rСк Δ 59 к раствору плазмы, содержащему полимерный фибрин, приводило к полному лизису последнего, в то время как фибринолиз практически отсутствовал. Это свидетельствует о селективной активации пламиногена, сорбированного на поверхности фибрина. Поэтому возникает ряд вопросов, связанных с возможным активационным действием формирующегося при ограниченном протеолитическом действии стрептокиназы ее 36 кДа-фрагмента (Ск36), лишенного 63 N- и 34 C-концевых аминокислот. Каково его действие на пламиноген в отсутствие и в присутствии фибрина? Оказывает ли Ск36 модифицирующее действие на активный центр плазмина и если оказывает, то насколько оно подобно действию интактной стрептокиназы? Выяснение этих вопросов и являлось целью проведенных нами исследований.

Материалы и методы

Glu-плазминоген выделяли методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе из донорской цитратной плазмы [16] в присутствии панкреатического ингибитора трипсина — апротинина («Контрикал», Меркле ГмбХ, Германия).

Lys-плазминоген выделяли методом аффинной хроматографии из фракции плазмы III-2 по Кону на лизин-сефарозе [16].

Мини-плазминоген (Val442-плазминоген), состоящий из пятого крингла и серинпротеиназного домена, выделяли из эластазного гидролизата плазминогена гель-фильтрацией на сефадексе G-75 с последующей аффинной хроматографией на лизин-сефарозе [17].

α_2 -Антиплазмин выделяли из донорской плазмы [18] со следующими модификациями. Плазму, истощенную по плазминогену на лизин-сефарозе, пропускали через две последовательно соединенные колонки с I и II аффинно-хроматографическими формами кринглов 1–3 плазминогена, иммобилизованными на BrCN-активированной сефарозе 4В. Колонки предварительно уравнивали 0,04 М Na-фосфатным буфером с 0,5 М NaCl, pH 7,0. Неспецифически адсорбированные протеины элюировали тем же буфером. Элюцию проводили отдельно с каждой колонки 0,05 М 6-аминоксановой кислотой (6-АГК), растворенной в вышеуказанном буфере. С первой колонки элюировали гистидинбогатый протеин и примесь фибриногена, с другой — α_2 -антиплазмин. 6-АГК удаляли диализом против воды. Активность α_2 -антиплазмина определяли по ингибированию амидазной активности плазмина при молярном соотношении ингибитора к энзиму 1:1. Препараты α_2 -антиплазмина содержали более 90% активного ингибитора. Протеин хранили при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Плазмин получали активацией плазминогена урокиназой, иммобилизованной на BrCN-активированной сефарозе 4В [19]. 1 мг плазминогена инкубировали с 0,5 мл геля урокиназ-сефарозы (1250 МЕ/мл) в течение 1 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$ в 50 мМ трис-НСl-буфере, pH 7,4, содержащем 25% -й глицерол. Эффективность активации оценивали по скорости гидролиза образующимся плазмином специфического хромогенного субстрата S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl) и данным электрофореза в 10% ПААГ с 0,1% ДСН в присутствии 2% β -меркаптоэтанола.

Коммерческий препарат стрептокиназы (Kabikinase, Pharmacia & Upjohn, Швеция) отделяли от стабилизатора (альбумина че-

ловека) аффинной хроматографией на голубой сефарозе CL-6В, уравновешенной 0,05 М трис-НСl-буфером, pH 7,4 [20]. Основное количество стрептокиназы содержалось в протеиновых фракциях, объем которых был равен свободному объему колонки. Концентрацию стрептокиназы определяли по молярному коэффициенту экстинкции. По данным электрофореза в 10% ПААГ с 0,1% ДСН стрептокиназа была гомогенной. Хранили препарат при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

36 кДа-фрагмент стрептокиназы выделяли препаративным электрофорезом [21]. Гидролиз стрептокиназы α -химотрипсином (Sigma, USA) проходил в 0,05 М трис-НСl-буфере, pH 7,4, в течение 10 мин при комнатной температуре, при весовом соотношении энзима к протеину 1:150. Реакцию останавливали 3 мМ фенолметилсульфонилфторидом. Электрофорез фрагментов стрептокиназы проводили в 16% трисин-ПААГ с ДСН. Полиакриламидный гель отмывали в течение 2 ч в 2,5% тритоне X-100 для удаления ДСН и нарезали на полоски с протеиновыми зонами разной молекулярной массы. Фрагменты стрептокиназы экстрагировали 12 ч при $0\text{ }^\circ\text{C}$ в 0,05 М трис-НСl-буфере (pH 7,4), содержащем 0,15 М NaCl, 0,1 мМ *n*-нитрофенилгуанидинбензоат. Выделенные фрагменты анализировали в 10% трисин-ПААГ с ДСН и сохраняли при $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Молекулярную массу фрагментов стрептокиназы определяли с помощью пакета ImageMaster TotalLab.

Фибрин desAB получали активацией фибриногена (2,5 мг/мл) тромбином (1 ед. NIH/1 мг фибриногена) в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 4 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$. Реакционная среда содержала ингибитор фактора XIIIa — *n*-хлор-ртутибензоат Na (0,35 мг/мл реакционной смеси) и 0,1 М 6-АГК для удаления примеси плазминогена. Образовавшийся сгусток растворяли в 0,125% -й уксусной кислоте при $0\text{ }^\circ\text{C}$, дважды переосаждали — в 0,06 М K-фосфатном буфере, pH 6,5, далее — в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,13 М NaCl. Препарат фибрин-мономера растворяли в 0,125% -й уксусной кислоте до концентрации 1,5–2,0% и сохраняли при $0\text{ }^\circ\text{C}$.

Кинетику активации Glu-, Lys- и мини-плазминогена эквимольным количеством низкомолекулярной стрептокиназы в присутствии и в отсутствие desAB-фибрина изучали по скорости освобождения образующимся плазмином *n*-нитроанилина из специфического хромогенного субстрата S-2251. Поглощение *n*-нитроанилина

регистровали на микроридере (Titertek Multiskan MC, Финляндия) в двухлучевом режиме при 405 и 492 нм через определенные промежутки времени. Отсчет времени начинался от момента добавления S-2251 (конечная концентрация 0,3 мМ). Реакции проводили в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,4), с 0,15 М NaCl при 37 °С в микропланшетах для иммуноэнзимного анализа. Объем реакционной смеси — 0,25 мл. Концентрации протеиновых компонентов: Glu-, Lys-плазминоген — 45 нМ; мини-плазминоген — 50 нМ; 36 кДа стрептокиназа — 45 или — 50 нМ; desAB-фибрин — 1,2 мкМ.

Скорость активации рассчитывали по формуле: $V = \Delta A_{405} / \Delta t$, где ΔA_{405} — изменение поглощения при длине волны 405 нм, Δt — промежуток времени, в течение которого проводилось измерение изменения поглощения.

Амидазную активность плазмينا в присутствии 36 кДа стрептокиназы определяли по скорости освобождения *n*-нитроанилина из хромогенного субстрата S-2251. В инкубационную среду последовательно вносили 0,05 М Na-фосфатный буфер, с 0,15 М NaCl, рН 7,4, плазмин (5 нМ), 36 кДа стрептокиназу (5 нМ), S-2251 (3 мМ). Объем реакционной смеси — 0,25 мл. В контрольную пробу вместо стрептокиназы вносили соответствующий объем буфера. При изучении влияния 36 кДа-стрептокиназы на ингибирование плазмينا α_2 -антиплазмином в реакционную смесь дополнительно добавляли 5 нМ α_2 -антиплазмينا. Поглощение *n*-нитроанилина регистрировали на микроридере в двухлучевом режиме при 405 и 492 нм.

Для определения плазминогенактиваторной активности плазмينا в присутствии эквимольного количества 36 кДа стрептокиназы в реакционную среду последовательно вносили 0,05 М Na-фосфатный буфер, с 0,15 М NaCl, рН 7,4, плазмин (1 нМ), 36 кДа стрептокиназу (1 нМ), Glu-плазминоген (100 нМ), S-2251 (3 мМ). Конечный объем — 0,25 мл. Контрольные пробы вместо Glu-плазминогена содержали такой же объем буферного раствора. Поглощение *n*-нитроанилина фиксировали через определенные промежутки на микроридере в двухлучевом режиме при 405 и 492 нм.

Фибринолитическую активность плазмينا в присутствии эквимольного количества 36 кДа-стрептокиназы исследовали с помощью турбидиметрии, регистрируя время полулизиса фибриновых сгустков. В термостатированную кювету спектрофотометра СФ-26 («ЛОМО», Россия) последовательно

вносили 0,02 М вероналовый буфер, содержащий 1 мМ CaCl₂, 0,13 М NaCl, рН 7,4, плазмин (3,5 нМ), Ск36 (3,5 нМ). Реакцию начинали, добавляя desAB-фибрин-мономер (580 нМ). Объем реакционной смеси — 1,0 мл, температура 37 °С. Процесс образования и растворения сгустка регистрировали по изменению мутности среды при 350 нм. Активность плазмينا определяли по времени от момента полимеризации сгустка до уменьшения его максимальной мутности в два раза. Скорость гидролиза оценивали как $1/t_{1/2}$.

Концентрацию протеинов в растворах устанавливали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 280 нм и вычитая значение поглощения при 320 нм. Для расчета концентраций использовали следующие значения коэффициентов экстинкции для 1% -х растворов протеинов и молекулярные массы: Glu-плазминоген — 17,0 и 92 кДа, плазмин — 17,0 и 84 кДа [22], мини-плазминоген — 14,0 и 38 кДа [17], стрептокиназа — 9,8 и 47 кДа [23], desAB-фибрин-мономер (в кислой среде) — 15,06 и 300 кДа [24], α_2 -антиплазмин — 6,7 и 70 кДа [25], 36 кДа-стрептокиназа — 6,0 и 36 кДа [26].

Математическую обработку результатов исследования выполняли с помощью пакета ORIGIN 8.6. В работу включены результаты экспериментов, допустимая погрешность которых не превышала 5% ($P < 0,05$). Кривые, представленные на рисунках, являются типичными для серии повторных исследований (не менее трех в каждой серии).

Результаты и обсуждение

Молекула стрептокиназы состоит из 414 аминокислотных остатков, Mr 47 кДа. N-концевая аминокислота — изолейцин, C-концевая — лизин [23, 27]. В результате ограниченного гидролиза нативной молекулы α -химотрипсином образуется ряд охарактеризованных по аминокислотным последовательностям фрагментов с молекулярной массой от 36 до 7 кДа, в той или иной степени сохраняющих родство к плазминогену. 36 кДа-фрагмент образуется при расщеплении пептидных связей Ск 63–64 и Ск 380–381 [13, 26, 28]. Он был выделен из химотрипсинового гидролизата стрептокиназы препаративным электрофорезом в 16% трисин-ПААГ с ДСН, как описано в разделе «Материалы и методы» (рис. 1).

Исследования плазминогенактиваторной активности низкомолекулярной стрептокиназы показали, что активация Glu-плазминогена 36 кДа-стрептокиназой, по



Рис. 1. Электрофореграмма 36 кДа (1) и 47 кДа (2) стрептокиназы в 10%-м ПААГ с ДС-На

сравнению с 47 кДа, происходит в 100 раз медленнее. Она начинается только через 1 ч от начала реакции при высокой (200 нМ) эквимольной концентрации протеинов (рис. 2). При более низких концентрациях реагирующих компонентов (20 и 45 нМ) развитие окраски, свидетельствующее о появлении амидазной активности в реакционной среде, не наблюдается в течение 2 ч. Эти результаты согласуются с данными, представленными в [29], где показано, что химическое модифицирование NH_2 -групп стрептокиназы тринитробензолсульфокислотой приводит к снижению скорости активации плазминогена более чем в 100 раз, а отщепление С-концевого лизина карбоксипептидазой В уменьшает ее активирующую активность в 3 раза. Молекула стрептокиназы состоит из трех доменов — α , β и γ (аминокислотные последовательности 12–150, 151–287, 288–372), объединенных двумя подвижными сегментами, а также N- и С-концевых неупорядоченных участков [30]. Каждый из этих доменов может связывать плазминоген, но не активирует его. Исследования с применением мутагенеза показали, что только кооперативное действие всех трех доменов обеспечивает формирование активного центра в молекуле плазминогена. Распознавание субстратного плазминогена осуществляется прежде всего α -доменом [30–32]. Результаты наших исследований и данные литературы позволяют сделать вывод, что для проявления активности активаторной активности стрептокиназы, т. е. индуцирования конформационных изменений в каталитическом домене, ведущих к образованию активного центра энзима, важна

целостность как N-, так и С-концевых пептидов стрептокиназы. Нарушение либо отсутствие этих участков молекулы вызывает снижение скорости процесса активации, что объясняет незначительную активирующую активность 36 кДа-стрептокиназы по отношению к свободному Glu-плазминогену.

Стрептокиназа образует комплексы с Glu- и Lys-формами плазминогена с ($K_D = 6,2 \cdot 10^{-7}$ М и $3,8 \cdot 10^{-8}$ М, соответственно) [33], а также с фрагментами плазминогена, в состав которых входит каталитический домен — мини-плазминогеном [34], микроплазминогеном (Lys-530-плазминоген) и легкой цепью плазмина [35, 36]. Однако исследования процесса активации Glu-, Lys-, мини- и микроплазминогена каталитическим количеством стрептокиназы показали, что скорость реакции зависит от наличия в молекуле проэнзима крингловых доменов, содержащих лизинсвязывающие участки, участвующие не только в процессах комплексообразования, но и в индукции каталитической активности в молекуле плазминогена, а также в последующем взаимодействии плазмин(оген)-стрептокиназного комплекса с субстратным плазминогеном [37]. Изучение кинетики активации Glu-, Lys- и мини-плазминогена 36 кДа-стрептокиназой при 50 нМ концентрации реагирующих протеинов выявило, что в случае Glu-плазминогена энзиматическая активность не регистрировалась в течение всего времени наблюдения, в то время как активность Lys- и мини-плазминогена появлялась через 30- и 10-минутные лаг-периоды, соответственно (рис. 3). При

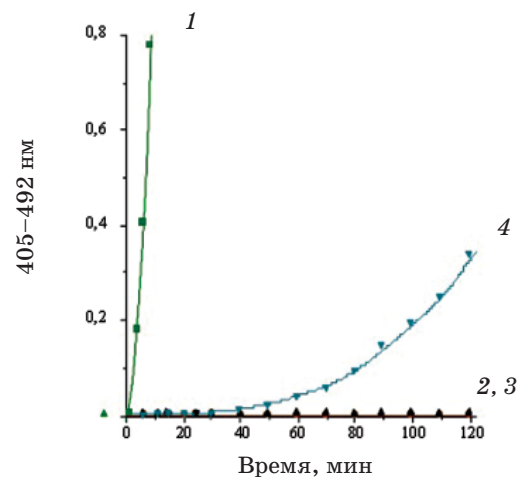


Рис. 2. Активация Glu-плазминогена эквимольными количествами стрептокиназы: 1 — 47 кДа-стрептокиназа (200 нМ); 2 — 36 кДа-стрептокиназа (20 нМ); 3 — 36 кДа-стрептокиназа (50 нМ); 4 — 36 кДа-стрептокиназа (200 нМ)

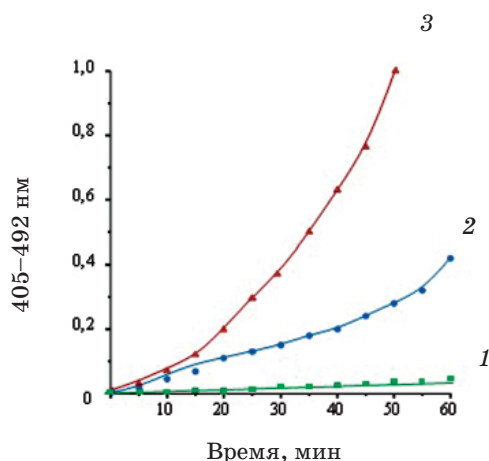


Рис. 3. Кинетика активации разных форм плазминогена эквимольным количеством 36 кДа стрептокиназы:

- 1 — Glu-плазминоген;
2 — Lys-плазминоген;
3 — мини-плазминоген

этом скорость активации мини-плазминогена была на порядок выше, чем Lys-плазминогена, — $4,3 \cdot 10^{-2}$ и $5,0 \cdot 10^{-3}$ оп. ед. мин^{-1} , соответственно. Следовательно, N- или C-концевой участок нативной стрептокиназы отвечает за те конформационные изменения в молекуле проэнзима, которые обеспечивают доступность центров связывания активатора с протеиназным доменом, что составляет необходимое условие формирования активного центра. Высокая скорость активации мини-плазминогена указывает на то, что такой сайт связывания стрептокиназы в его молекуле открыт и доступен для взаимодействия.

С целью выяснения влияния фибрина на процесс активации плазминогена 36 кДа стрептокиназой исследовали кинетику активации разных форм плазминогена (Glu-, Lys- и мини-плазминогена) эквимольным количеством низкомолекулярной стрептокиназы в присутствии desAB-фибрина. Экспериментальные данные представлены на рис. 4. Если в реакционную среду, содержащую эквимольные концентрации протеинов, добавляли фибрин-мономер, то после 20–30 мин лаг-периода фиксировали активацию Glu-плазминогена. Полученные результаты можно объяснить изменением конформации молекулы Glu-плазминогена на Lys-плазминогенподобную. В таком случае скорость активации Glu-плазминогена низкомолекулярной стрептокиназой в присутствии фибрина должна была бы достичь скорости активации Lys-плазминогена в растворе, однако она значительно превышала

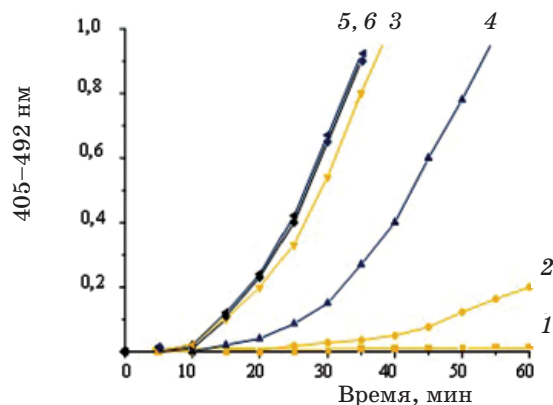


Рис. 4. Влияние фибрина на активацию разных форм плазминогена эквимольным количеством 36 кДа стрептокиназы:

- 1, 2, 3 — Glu-, Lys- и мини-плазминоген в отсутствие фибрина;
4, 5, 6 — Glu-, Lys- и мини-плазминоген в присутствии фибрина

ее. DesAB-фибрин на порядок увеличивает скорость активации Lys-формы плазминогена. Эти данные свидетельствуют о том, что на поверхности фибрина происходят конформационные изменения не только нативной, но и частично деградированной формы проэнзима. При этом изначально высокая скорость активации мини-плазминогена 36 кДа-стрептокиназой в присутствии desAB-фибрина увеличивалась незначительно. Эти результаты подтверждают наше предположение о том, что в молекуле мини-плазминогена сайт связывания активатора, необходимый для формирования активного центра, экспонирован и доступен для взаимодействия.

Существуют две гипотезы относительно механизма формирования активного центра в молекуле плазминогена, находящегося в комплексе со стрептокиназой. Согласно первой из них, N-концевой изолейцин стрептокиназы образует солевой мостик с остатком Asp740 плазминогена, расположенным рядом с Ser741 каталитической триады. Такое взаимодействие является пусковым механизмом формирования активного центра и S₁-субцентра [38]. Согласно второй, γ -домен стрептокиназы связывается с серинпротеиназным доменом плазминогена вблизи консервативного остатка Lys698, что приводит к изменениям конформации этого участка молекулы с образованием связи между Lys698 и Asp740 [30]. Поскольку рекомбинантная стрептокиназа, у которой отсутствуют 59 N-концевых аминокислот, проявляет очень низкую плазминогенактиваторную активность [15], логично предположить, что имен-

но N-концевой участок молекулы стрептокиназы является триггером конформационных изменений и инициации каталитической активности проэнзима. В случае активации плазминогена низкомолекулярной стрептокиназой на поверхности desAB-фибрина возможно, что определенный участок его молекулы выполняет функцию N-концевого пептида нативной стрептокиназы, индуцируя в проэнзиме конформационные изменения, необходимые для быстрого образования комплекса с 36 кДа-стрептокиназой и формирования активного центра проэнзима.

Известно, что 47 кДа-стрептокиназа изменяет специфичность плазмина по отношению к высоко- и низкомолекулярным субстратам, а также защищает энзим от ингибирования α_2 -антиплазмином. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что 36 кДа-стрептокиназа не модифицирует плазмин подобно нативной стрептокиназе. Эквивалентные количества низкомолекулярной стрептокиназы не влияют на амидазную активность плазмина. Энзим с одинаковой скоростью гидролизует хромогенный субстрат S-2251 как в присутствии, так и в отсутствие 36 кДа-стрептокиназы (рис. 5). Добавление в реакционную среду, содержащую эквивалентные количества плазмина и низкомолекулярной стрептокиназы, 100-кратного молярного избытка Glu-плазминогена не приводит к увеличению освобождающегося из хромогенного субстрата *n*-нитроанилина (рис. 6). Эти результаты показывают, что плазмин в комплексе с 36 кДа-фрагментом не проявляет плазминогенактиваторную активность. В отличие от нативной, низкомолекулярная стрептокина-

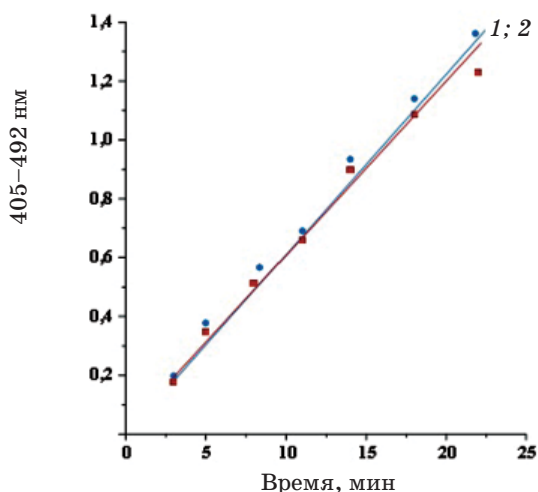


Рис. 5. Амидазная активность плазмина: без (1) и в присутствии (2) низкомолекулярной стрептокиназы

за практически не влияет на взаимодействие плазмина с α_2 -антиплазмином, поскольку амидазная активность энзима полностью ингибируется α_2 -антиплазмином в присутствии эквивалентного количества 36 кДа-фрагмента стрептокиназы (рис. 7). Не оказывает она влияния и на фибринолитическую активность энзима, так как скорость гидролиза полимерного фибрина плазмином в присутствии 36 кДа-стрептокиназы не отличается от таковой самого плазмина (рис. 8). Это может свидетельствовать о том, что модификация активного центра плазмина 47 кДа стрептокиназой осуществляется с участием 7 кДа N-концевого и/или 4 кДа C-концевого участков нативной молекулы.

Поскольку показано, что 36 кДа-стрептокиназа медленно активирует плазминоген в растворе и быстро — в присутствии фибрина, а комплекс плазмина с низкомолекулярной

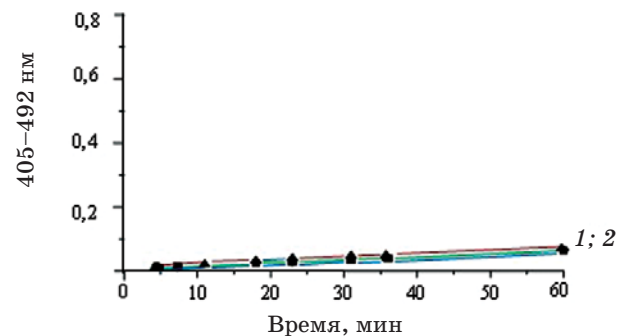


Рис. 6. Плазминоген-активаторная активность плазмина: без (1) и в присутствии (2) эквивалентного количества 36 кДа-стрептокиназы

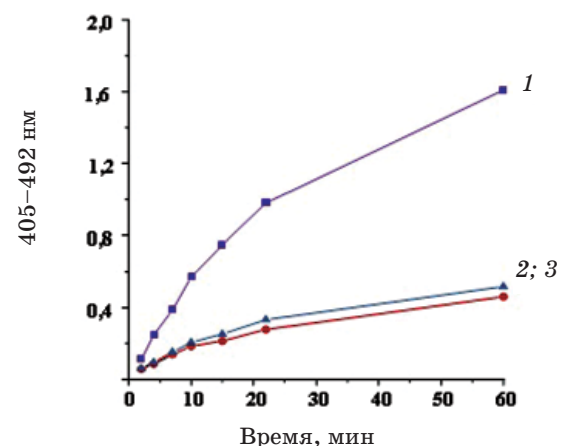


Рис. 7. Влияние 36 кДа-стрептокиназы на ингибирование плазмина α_2 -антиплазмином: 1 — плазмин; 2 — плазмин в присутствии α_2 -антиплазмина; 3 — плазмин в присутствии 36 кДа-стрептокиназы и α_2 -антиплазмина

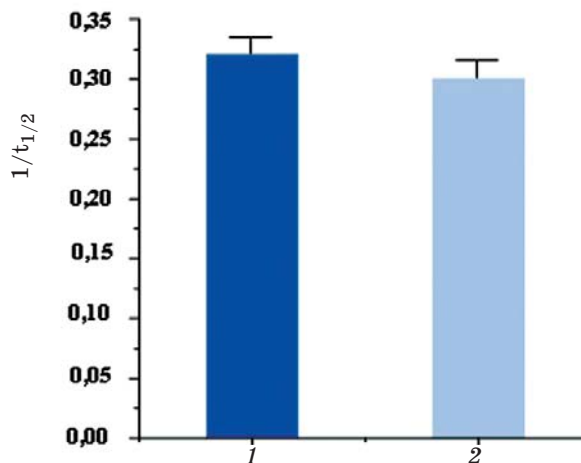


Рис. 8. Гидролиз полимерного фибрина: плазмином (1); плазмином в присутствии 36 кДа-стрептокиназы (2)

стрептокиназой не активирует свободный плазминоген и ингибируется α_2 -антиплазмином, можно предположить, что введение 36 кДа-стрептокиназы в кровоток обеспечит актива-

цию лишь сорбированного на фибрине плазминогена, тогда как неконтролируемый протеолиз протеинов плазмы происходить не будет.

REFERENCES

1. Collen D., Lijnen H. R. The fibrinolytic system in man. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1986, 4 (3), 249–301.
2. Wun T. C. Plasminogen activation: biochemistry, physiology and therapeutics. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1988, V. 8, P. 131–148.
3. Wang S., Reed G., Hedstrom L. Zymogen activation in the streptokinase-plasminogen complex. Ile1 is required for the formation of a functional active site. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267 (13), 3994–4001.
4. Ranby M., Bergsdorf N., Nilsson T. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thromb. Res.* 1982, 27 (2), 175–183.
5. Collen D., Lijnen H. R. Tissue-type plasminogen activator, mechanism of action and thrombolytic properties. *Haemostasis.* 1986, V. 16, P. 25–32.
6. Dev B. Baruah, Rajendra N. Dash, Chaudhari M. R., Kadam S. S. Plasminogen activators: a comparison. *Vasc. Pharmacol.* 2006, V. 44, P. 1–9.
7. Reddy K. N. N. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. *Fibrinolysis.* Kline G., Reddy K. N. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Ration. 1980, P. 71–94.
8. Torr S. R., Nachowiak D. A., Fujii S., Sobel B. E. Plasminogen steal and clot lysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992, 19 (5), 1085–1090.
9. Hoffmeister H. M., Ruf M., Wendel H. P., Heller W., Seipel L. Streptokinase-induced activation of the kallikrein-kinin system and of the contact phase in patients with acute myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998, 31 (5), 764–772.
10. Reddy K., Markus G. Esterase activities in the zymogen moiety of the streptokinase-plasminogen complex. *J. Biol. Chem.* 1974, 249 (15), 4851–4857.
11. Cederholm-Williams S. A., De Cock F., Lijnen H. R., Collen D. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and alpha 2-antiplasmin. *Eur. J. Biochem.* 1979, 100 (1), 125–132.
12. Siefiring G., Castellino F. Interaction of streptokinase with plasminogen. Isolation and characterization of a streptokinase degradation product. *J. Biol. Chem.* 1976, 251 (13), 3913–3920.
13. Parrado J., Conejero-Lara F., Smith R., Marshall J., Ponting C., Dobson C. The domain organization of streptokinase: nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments. *Prot. Sci.* 1996, 5 (4), 693–704.
14. Grinenko T. V., Makogonenko E. M., Jusova O. I., Sederhol'm-Vil'jams S. A. Degradation of streptokinase and catalytic properties of plasmin-streptokinase complex. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2002, 74 (2), 50–57. (In Russian).
15. Reed G. L., Houng A. K., Liu L., Parhami-Seren B., Matsueda L. H., Wang S., Hedstrom L. A catalytic switch and the conversion

- of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999, 96 (3), 8879–8883.
16. *Deutsch D. G., Mertz E. T.* Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*. 1970, 170 (3962), 1095–1096.
17. *Sottrup-Jensen L., Claeys H., Zajdel M., Petersen T. E., Magnusson S.* The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragment and one “mini-plasminogen” (M. W. 38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*. Davidson V.F., Rowan R.H., Samama M.M., Desnoyers D.C. (Ed.). N.-Y.: Raven Press. 1978, P. 191–209.
18. *Grinenko T.V., Makogonenko E.M., Jusova E.I., Zadorozhnaja M. B., Volkov G. L.* Sposob vydelenija vysokoochishhennogo α_2 -antiplazmina iz plazmy krovi cheloveka. *Pat. Ukr. № 53146 S2*, Institut biochemistry NAS Ukrainy. Applied. 22.03.2002; Published. 15.01.2003, Bull. N 1.
19. *March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 1974, 60 (1), 149–152.
20. *Castellino F. J., Sodetz J. M., Brockway W. J., Siefring G. E.* Streptokinase. *Meth. Enzimol.* 1976, V. 45, P. 244–257.
21. *Korol'chuk V. I., Makogonenko E. M., Sederhol'm-Vil'jams S. A.* Zv'jazuvannja plazminogenu z dekaeptidnimi ta polipeptidnimi fragmentami streptokinazi. *Ukr. Biokhim. Zh.* 1999, 71 (5), 51–58. (In Russian).
22. *Violand B. N., Castellino F. J.* Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. *J. Biol. Chem.* 1976, 251 (13), 3906–3912.
23. *Brockway W. J., Castellino F. J.* A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry*. 1974, V. 13, P. 2063–2070.
24. *Posdnjakova T. M., Musjalkovskaja A. A., Ugarova T. B.* On the properties of fibrin monomer prepared from fibrin clot with acetic acid. *Thromb. Res.* 1979, 16 (1–2), 283–288.
25. *Wiman B., Collen D.* Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *Eur. J. Biochem.* 1977, 78 (1), 19–26.
26. *Korol'chuk V. I., Makogonenko E. M., Sederhol'm-Vil'jams S. A.* Sajazyvanie plazminogena s dekaeptidnymi i polipeptidnymi fragmentami streptokinazy. *Ukr. Biokhim. Zh.* 1999, 71 (5), 51–58. (In Russian).
27. *Jackson K. W., Tang J.* Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine protease. *Biochemistry*. 1982, 21 (26), 6620–6625.
28. *Shi G. Y., Chang B. I., Chen Sh. M., Wu H. L.* Function of streptokinase fragments in plasminogen activation. *Biochem. J.* 1994, 304 (1), 235–241.
29. *Sokolovskaja L. I., Makogonenko E. M., Grinenko T. V., Sederhol'm-Vil'jams S. A.* The role of lysine-binding sites in the activation of plasminogen streptokinase. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2003, 75 (2), 25–32. (In Russian).
30. *Wang X., Lin X., Loy J. A., Tang J., Zhang X. C.* Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science*. 1998, 11 (281) (5383), 1662–1665.
31. *Loy J., Lin X., Schenone M., Castellino F., Zhang X., Tang J.* Domain interactions between streptokinase and human plasminogen. *Biochemistry*. 2001, V. 40, P. 14686–14695.
32. *Arabi R., Roohvand F., Norouzi D., Sardari S., Aghasadeghi M. R.* A comparative study on the activity and antigenicity of truncated and full-length forms of streptokinase. *Pol. J. Microbiol.* 2011, 60 (3), 243–251.
33. *Boxrud P. D., Bock P. E.* Streptokinase binds preferentially to the extended conformation of plasminogen through lysine binding site and catalytic domain interaction. *Biochemistry*. 2000, 39 (45), 13974–13981.
34. *Lin L.-F., Houng A., Reed G. L.* Epsilon amino caproic acid inhibits streptokinase-plasminogen activator complex formation and substrate binding through kringle-dependent mechanism. *Biochemistry*. 2000, 39 (16), 4740–4745.
35. *Shi G. Y., Wu H. L.* Isolation and characterization of microplasminogen: low molecular weight form of plasminogen. *J. Biol. Chem.* 1988, 263 (32), 17071–17075.
36. *Summaria L., Robbins K. C.* Isolation of a human plasminogen-derived, functionally active light (B) chain capable of forming with streptokinase an equimolar light (B) chain-streptokinase complex with plasminogen activator activity. *J. Biol. Chem.* 1976, 251 (18), 5810–5813.
37. *Grinenko T. V.* Reguljacija fibrinolizu nekatalitichnimi diljankami molekul plazminogena/plazminu. Manuscript. Ph.D. dissertation in biology, specialty 03.00.04. *Biochemistry. Kyiv*. 2007, 42 p. (In Ukrainian).
38. *Wang S., Reed G., Hedstrom L.* Deletion of Ile1 changes the mechanism of streptokinase: evidence for the molecular sexuality hypothesis. *Biochemistry*. 1999, V. 38, P. 5232–5240.

**АКТИВАЦІЯ ПЛАЗМІНОГЕНУ
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЮ
СТРЕПТОКІНАЗОЮ ТА ЕФЕКТ ФІБРИНУ**

Є. І. Юсова

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

E-mail: yusova07@mail.ru

Метою роботи було вивчення плазміноген-активаторної активності 36 кДа-фрагмента стрептокінази, впливу на цей процес desAB-фібрину, а також низькомолекулярної стрептокінази на каталітичні властивості плазміну. Фрагмент стрептокінази з молекулярною масою 36 кДа, у якого відсутні 63 N- і 34 C-кінцеві амінокислотні залишки, отримували із хімотрипсинового гідролізату нативної стрептокінази препаративним електрофорезом. Показано, що цей фрагмент активує Glu-плазміноген у розчині тільки за високих концентрацій реагуючих компонентів ($2 \cdot 10^{-7}$ М). Процес активації розпочинається після тривалого лаг-періоду і відбувається у 100 разів повільніше порівняно з нативною стрептокіназою. На відміну від нативної Glu-форми, активація частково деградованої Lys-форми проензиму та міні-плазміногену (Val442-плазміноген) відбувається за значно нижчої концентрації протеїнів ($5 \cdot 10^{-8}$ М), при цьому швидкість реакції з міні-плазміногеном є на порядок вищою, ніж із Lys-плазміногеном, і дорівнює $4,3 \cdot 10^{-2}$ і $5,0 \cdot 10^{-3}$ оп. од. \cdot хв⁻¹ відповідно. DesAB-фібрин ефективно збільшує швидкість активації Glu- та Lys-плазміногену 36 кДа-стрептокіназою і практично не впливає на швидкість активації міні-плазміногену. Низькомолекулярна стрептокіназа, на відміну від нативної, не впливає на амідазну та фібринолітичну активність плазміну і не захищає ензим від інгібування α_2 -антиплазміном. Плазмін за присутності цього фрагменту стрептокінази не виявляє активаторної активності стосовно плазміногену. Із результатів цих досліджень випливає, що за активації плазміногену низькомолекулярною стрептокіназою за присутності desAB-фібрину певна ділянка молекули фібрину виконує функцію N-кінцевого пептиду нативної стрептокінази, індукуючи в проензимі конформаційні зміни, необхідні для швидкого утворення комплексу з 36 кДа-стрептокіназою і формування активного центра в молекулі проензиму цією формою стрептокінази.

Ключові слова: стрептокіназа, 36 кДа-фрагмент стрептокінази, плазміноген, фібрин.

**PLASMINOGEN ACTIVATION
BY LOW MOLECULAR WEIGHT
STREPTOKINASE AND FIBRIN EFFECT**

E. I. Yusova

Palladian Biochemistry Institute of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: yusova07@mail.ru

The purpose is to study the plasminogen-activating activity of 36 kDa-streptokinase fragment, influences of desAB-fibrin on this process and low molecular weight streptokinase on plasmin catalytic properties as well.

The 36 kDa-fragment lacking the 63 N- and 34 C-terminal amino acid residues was obtained by preparative electrophoresis from chymotrypsin hydrolyzate of the native streptokinase. It was shown that 36 kDa streptokinase activates Glu-plasminogen in solution only at high concentrations of reacting components ($2 \cdot 10^{-7}$ M). Activation process begins after a long lag-period and is 100 times slower compared with the native streptokinase. Lys-plasminogen, mini-plasminogen (Val442-plasminogen) but not its Glu-form are activated at definitely lower protein concentrations ($5 \cdot 10^{-8}$ M), while the reaction rate with mini-plasminogen is order of magnitude greater as compared with Lys-plasminogen and is equal to $4,3 \cdot 10^{-2}$ and $5 \cdot 10^{-3}$ o.u./min respectively. DesAB-fibrin increases efficiently the rate of Glu- and Lys- plasminogen activation by 36 kDa-streptokinase and practically has no effect on the rate of mini-plasminogen activation. Low molecular weight streptokinase has no influence on amidase and fibrinolytic activity of plasmin and does not protect the enzyme from inhibitory effect of α_2 -antiplasmin. In the presence of the streptokinase fragment, plasmin showed no its activator activity towards plasminogen.

A conclusion is made, that during plasminogen activation by low molecular weight streptokinase in the presence of desAB fibrin, a certain site of the fibrin molecule acts as N-terminal peptide of the native streptokinase, inducing conformational changes in proenzyme. These changes are necessary for quick complex formation with 36-kDa streptokinase and formation of the active centre in proenzyme molecule by this form of streptokinase.

Key word: streptokinase, 36 kDa-streptokinase fragment, plasminogen, fibrin.