

УДК 577.151.4

## РЕГУЛЯЦІЯ $\alpha$ -2-АНТИПЛАЗМІНОМ ПРОЦЕСУ АКТИВАЦІЇ Glu-ПЛАЗМІНОГЕНУ ТКАНИННИМ АКТИВАТОРОМ НА ФІБРИНІ

Т. В. ГРИНЕНКО, М. Б. ЗАДОРЖНА, О. І. ЮСОВА

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: zadorozhnaya\_mar@mail.ru

Для з'ясування механізму інгібування процесу активації Glu-плазміногену  $\alpha$ -2-антиплазміном досліджували його вплив на зв'язування тканинного активатора з фібрином, а також взаємодію активатора з інгібітором. Встановлено, що у присутності  $\alpha$ -2-антиплазміну показник зв'язування тканинного активатора з фібрином зменшується приблизно на 20%. Інгібітор утворює комплекс із тканинним активатором плазміногену з  $K_d$ , що дорівнює 78,2 нМ, і не впливає на його амідолітичну активність. Величина зв'язування  $\alpha$ -2-антиплазміну з тканинним активатором зменшується на 20–35% у присутності різних концентрацій 6-аміногексанової кислоти, що свідчить про участь у процесі комплексоутворення з інгібітором не тільки крингла 2, але й інших доменів молекули тканинного активатора.

Запропоновано дві моделі, які пояснюють інгібувальний ефект  $\alpha$ -2-антиплазміну на процес активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині. По-перше, зв'язування інгібітора з фібрином у місцях локалізації активаторного комплексу може створювати стеричні перешкоди для взаємодії проферменту з його активатором. По-друге, утворення комплексу  $\alpha$ -2-антиплазміну із тканинним активатором може спричинити в молекулі останнього конформаційні зміни, які призводять до зниження його функціональної активності.

*Ключові слова:*  $\alpha$ -2-антиплазмін, тканинний активатор, фібрин, інгібування процесу активації.

**А**ктивація плазміногену тканинним активатором відбувається фібринзалежним шляхом. Завдяки наявності високоафінних взаємодій між білками має місце сорбція плазміногену та тканинного активатора на поверхні фібрину, що прискорює процес активації приблизно в 1000 разів [1]. Під час гідролізу фібринового згустка плазміну, який вивільняється у кровотік, інактивується природними інгібіторами —  $\alpha$ -2-антиплазміном ( $\alpha$ -2-АР) та  $\alpha$ -2-макроглобуліном.

Дослідження активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині, DDE-комплексі та D-димері у присутності  $\alpha$ -2-АР показало, що він є потужним інгібітором цього процесу [2]. Такий ефект можна було б пояснити впливом інгібітора на плазмін, що утворився за активації, або на взаємодію плазміногену чи тканинного активатора з фібрином. Проте відомо, що зв'язаний з фібрином фермент інактивується на три порядки повільніше, ніж у розчині: час напівжиття плазміну складає 10 та 0,1 с відповідно [3]. Із використанням очищених білків показано, що зв'язування Glu-плазміногену з фібрином у присутності  $\alpha$ -2-АР знижується з 9,6 до 7,2% [4]. Інгібітор не призводить до звільнення проферменту з

комплексу плазміноген–фібрин [5]. Раніше нами встановлено, що  $\alpha$ -2-АР зв'язується з фібрином у місцях локалізації активаторного комплексу — в D-доміні молекули фібрину, в зоні D-D-контакту [6]. Можна припустити, що інгібітор конкурує з тканинним активатором за сайти зв'язування або перешкоджає взаємодії останнього з фібрином. Відомості щодо цього питання в літературі відсутні.

З метою з'ясування механізму інгібувального впливу  $\alpha$ -2-АР на процес утворення плазміну досліджували зв'язування тканинного активатора з фібрином у присутності та за відсутності інгібітора, а також вивчали особливості взаємодії тканинного активатора з  $\alpha$ -2-АР.

### Матеріали і методи

Антиплазмін  $\alpha$ -2-АР одержували з цитратної донорської плазми за допомогою послідовної хроматографії на Lys-сефарозі, крингл 1–3 (I форма)-сефарозі та крингл 1–3 (II форма)-сефарозі [7]. Інгібіторна активність, яку визначали як описано в роботі [8], становила 80–85%.

Фібриноген виділяли з оксалатної плазми бика [9]. ДезААВВфібрин, вільний від плазмі-

ногену, одержували активацією фібриногену тромбіном [10] у присутності 0,05 М 6-аміногексанової кислоти (6-АГК). Для інактивації активованого фактора XIII до реакційного середовища додавали 0,09 М *n*-ХМБ. Одержаний препарат зберігали при 0–4 °С.

Тканинний активатор плазміногену та  $\alpha$ -2-АР біотинілювали за методикою [11].

Зв'язування тканинного активатора з фібриновими плівками, утвореними із дезААВВ-фібрину, досліджували за допомогою авідинбіотинової реакції, використовуючи принцип імуноферментного аналізу. Для утворення фібринових плівок у лунки планшетів для імуноферментного аналізу вносили по 0,05 мл розчину, що містив 5 мкг фібринмономера, 0,02 М вероналовий буфер, 0,13 М NaCl та 1 мМ CaCl<sub>2</sub> (рН 7,4). Розчин висушували протягом 5 год при 37 °С. Фібринові плівки промивали 0,05 М трис-НСІ-буфером, що містив 0,13 М NaCl, 0,1%-й твін-20, рН 7,4 (робочий буфер), після чого додавали 0,1 мл 2%-го розчину альбуміну бичачої сироватки. Мікропланшети інкубували протягом 60 хв при 37 °С та відмивали робочим буфером. Далі в лунки вносили по 0,05 мл міченого біотином тканинного активатора в концентрації 1–50 мкг/мл. Після інкубації протягом 20 год при 4 °С, для видалення білка, що не зв'язався, та відмивки лунок в кожному з них додавали 0,05 мл авідин-фосфатази («Sigma», США), розведеної в 30 000 разів. За 60 хв авідин-фосфатазу видаляли та після відмивки робочим буфером вносили по 0,05 мл субстрату лужної фосфатази – *n*-нітрофенілфосфату (1 мг/мл 10%-го діетаноламіну, рН 9,8). Мікропланшети інкубували протягом 2 год при 37 °С. Величину зв'язування мічених біотином білків визначали за поглинанням *n*-нітрофенолу при довжині хвилі 405 нм, використовуючи мікроридер Titertek Multiskan MC (Фінляндія).

Вивчення взаємодії міченого біотином  $\alpha$ -2-АР із тканинним активатором, іммобілізованим на полістирольній поверхні планшетів для імуноферментного аналізу, проводили як описано раніше [12].

Для розрахунку  $K_d$  взаємодії тканинного активатора з фібрином та  $\alpha$ -2-АР були визначені концентраційні залежності зв'язування біотинільованого ліганду з досліджуваними білками.  $K_d$  розраховували за рівнянням [13]:

$$A = \frac{A_{\max}}{1 + K_d / [L]}$$

де А – поглинання *n*-нітрофенолу, яке пропорційне кількості зв'язаного біотинільова-

ного ліганду на лінійному відрізку кривої;  $A_{\max}$  – поглинання за насичуючих концентрацій біотинільованих білків; [L] – молярна концентрація біотинільованого білка в точці А;  $K_d$  – константа дисоціації.

Амідолітичну активність тканинного активатора визначали за відсутності та у присутності  $\alpha$ -2-АР. У лунки планшетів для імуноферментного аналізу вносили по 10–20 МО/мл тканинного активатора, 20 мкл 4 мМ розчину хромогенного субстрату Chromozym t-РА (N-метилсульфоніл-D-Phe-Gly-Arg-*n*-нітроанілід) та 0,1 М трис-НСІ-буфер, рН 8,5, що містив 0,15% твін-80, у разі необхідності додавали  $\alpha$ -2-АР (2,5 мкг/мл). Об'єм реакційної суміші складав 0,22 мл. Інкубацію проводили протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 10%-ї лимонної кислоти. Поглинання *n*-нітроаніліну, що звільнився з хромогенного субстрату, реєстрували при 405 нм.

Чистоту одержаних білкових препаратів контролювали за допомогою DS-Na-електрофорезу в ПААГ [14].

Концентрацію білків визначали спектрофотометрично, вимірюючи різницю величин оптичного поглинання за довжини хвилі 280 та 320 нм. Для розрахунку концентрацій використовували відповідні значення коефіцієнтів адсорбції (1%, 1 см) і молекулярної маси досліджуваних білків:  $\alpha$ -2-АР – 6,7 і 70 кДа; фібрин(оген) – 15,06 (рН 7,4) і 340 кДа, тканинний активатор плазміногену – 20,0 і 70 кДа.

Представлені на рисунках криві є типовими для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

### Результати та обговорення

Для перевірки припущення щодо конкуренції  $\alpha$ -2-АР із тканинним активатором за місця зв'язування на фібрині або можливість перешкоджати взаємодії активатора з фібрином, досліджували зв'язування біотинільованого тканинного активатора з фібрином за відсутності та у присутності інгібітора. Показано, що тканинний активатор адсорбується на фібринових плівках, утворених із дезААВВ-фібрину (рис. 1). Процес залежить від концентрації активатора,  $K_d$  складає  $140,8 \pm 4,0$  нМ. Аналогічні величини було одержано при вивченні зв'язування тканинного активатора із бромціановим фрагментом фібриногену Но1-DSK за допомогою імуноферментного аналізу [15] та з фібриновими плівками при дослідженні кінетики активації Пг дволанцюговим тканинним активатором [1].

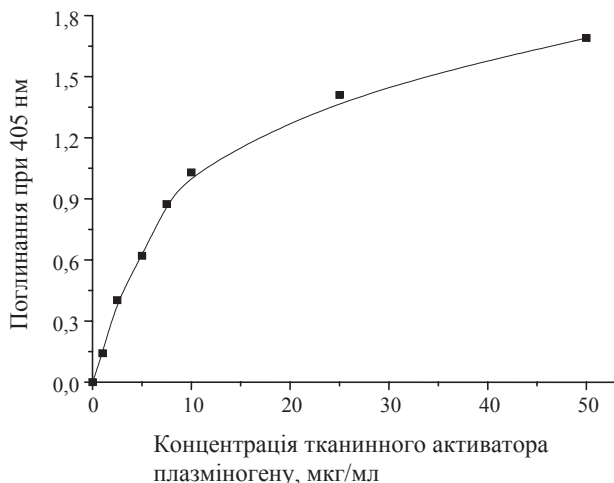


Рис. 1. Зв'язування міченого біотином тканинного активатора з дезААВВфібриновими плівками.

Далі проводили дві серії експериментів, в яких досліджували взаємодію тканинного активатора з фібрином у присутності  $\alpha$ -2-АР. У лунках планшетів для імуноферментного аналізу утворювали фібринові плівки як описано в розділі “Матеріали і методи”. В першій серії дослідів мічений біотином тканинний активатор (25 мкг/мл) витримували 15 хв при 25 °С та додавали в лунки планшетів із фібриновими плівками. Із даних, наведених на рис. 2, А, видно, що інгібітор при всіх використаних концентраціях не впливає на взаємодію тканинного активатора з фібрином. Навіть у разі 10-разового молярного надлишку по відношенню до активатора  $\alpha$ -2-АР зменшує величину зв'язування не більше ніж на 20%.

В іншій серії експериментів інгібітор додавали до фібринових плівок у кількості, за якої, як було встановлено раніше [6], відбувається насичення ділянок зв'язування інгібітора на фібрині. Після інкубації протягом 2 год при 37 °С та видалення білка, що не зв'язався, в лунки додавали біотинільований тканинний активатор. Вплив інгібітора подібний до встановленого в попередньому експерименті (рис. 2, Б): зв'язування тканинного активатора з фібрином зменшується на 20% за еквімолярного співвідношення  $\alpha$ -2-АР до тканинного активатора і залишається на цьому рівні в разі збільшення концентрації інгібітора. Отже,  $\alpha$ -2-АР виявляє слабкий ефект на взаємодію тканинного активатора з фібрином. Враховуючи те, що концентрація інгібітора у плазмі крові набагато перевищує концентрацію тканинного активатора, а спорідненість останнього до фібрину вдвічі нижча, ніж така  $\alpha$ -2-АР [6], можна зробити висновок, що інгібітор і активатор мають різні ділянки зв'язування на фібрині.

Таким чином, встановлений гальмівний ефект  $\alpha$ -2-АР на процес активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині не можна пояснити впливом інгібітора на зв'язування проферменту або активатора з фібрином.

$\alpha$ -2-АР належить до родини серпінів – інгібіторів серинових протеїназ і крім плазміну може взаємодіяти з трипсином, хімотрипсином, урокіназою [16], калікреїном, фактором Ха, тромбіном [17] та тканинним активатором плазміногену [18]. За допомогою гель-фільтрації на Ultrogel Ac A 34 встановлено, що мічений

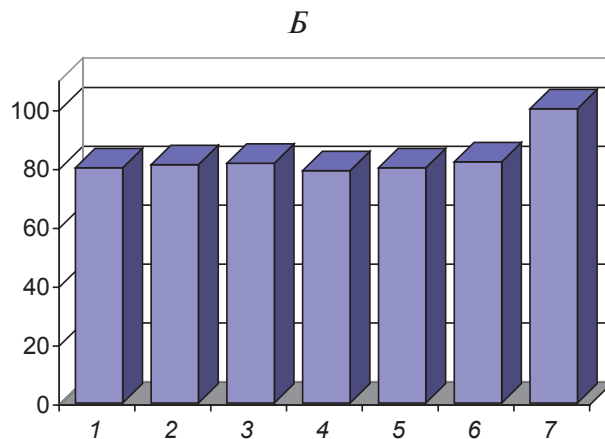
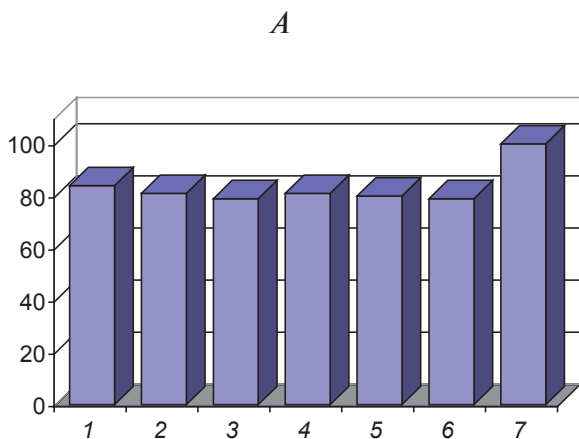


Рис. 2. Вплив різних концентрацій  $\alpha$ -2-антиплазміну на зв'язування тканинного активатора з фібрином.  $\alpha$ -2-Антиплазмін та тканинний активатор додавали до реакційного середовища одночасно (А) та послідовно (Б) (1 – 6: відповідно 12,5; 25,0; 50,0; 75,0; 125,0; 250,0 мкг/мл  $\alpha$ -2-антиплазміну; 7 – контроль, без  $\alpha$ -2-антиплазміну).

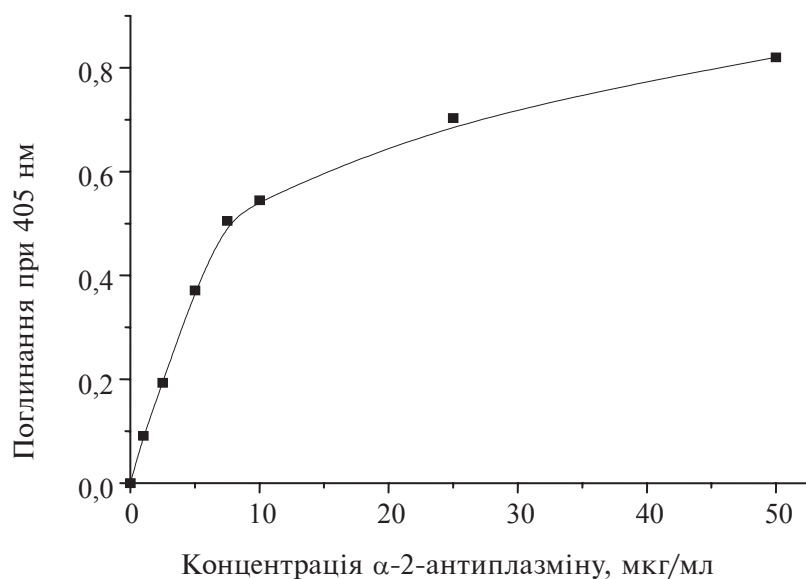


Рис. 3. Зв'язування міченого біотином α-2-антиплазміну із тканинним активатором плазміногену.

$^{125}\text{I}$  тканинний активатор, який попередньо інкубували із плазмою крові людини при  $37^\circ\text{C}$ , утворював комплекс із молекулярною масою 150 кДа. Останній реагував з антитілами проти α-2-АР, але не інших серинових протеїназ. Кількість комплексу значно знижувалася за використання активатора із заблокованим активним центром або плазми, виснаженої на α-2-АР [18].

Механізм реакції α-2-АР з плазміном, описаний Б. Віманом та співав. [19], запропоновано як загальну модель взаємодії серпінів із сериновими протеїназами. Реакція відбувається у дві стадії: на першій утворюється оборотний комплекс фермент–інгібітор, на другій відбувається утворення ковалентного зв'язку між серином активного центру ферменту та відповідною амінокислотою реактивного центру інгібітора. Механізм реакції α-2-АР із тканинним активатором детально не досліджувався.

З використанням авідин–біотинової реакції ми показали, що інгібітор взаємодіє з тканинним активатором. Залежність зв'язування міченого біотином α-2-АР від його концентрації з тканинним активатором представлено на рис. 3. Як видно, α-2-АР виявляє високу спорідненість до активатора:  $K_d$  дорівнює  $78,2 \pm 5,2$  нМ. У досліджуваних концентраціях α-2-АР не впливає на амідолітичну активність тканинного активатора плазміногену: швидкість звільнення *n*-нітроаналіну зі специфічного хромогенного субстрату Chromozym-t-PA не змінюється (рис. 4). Отже, α-2-АР здатний

утворювати комплекс із тканинним активатором без блокування активного центру останнього.

Структура тканинного активатора представлена декількома модулями: фінгер-доменом, EGF (epidermal growth factor)-доменом, двома крингловими та серин-протеїназним доменами. Фінгер- та другий крингловий домени опосередковують зв'язування тканинного активатора з нативним та частково гідролізованим фібрином відповідно. EGF-домен виконує

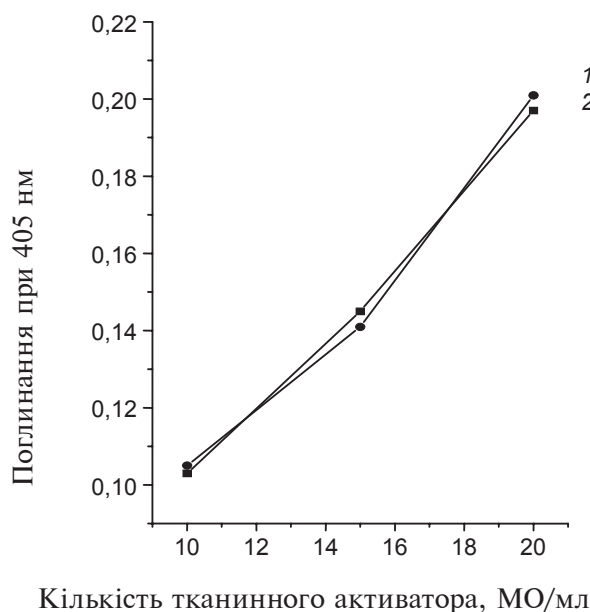


Рис. 4. Амідолітична активність тканинного активатора плазміногену за відсутності (крива 1) та у присутності (крива 2) α-2-антиплазміну.

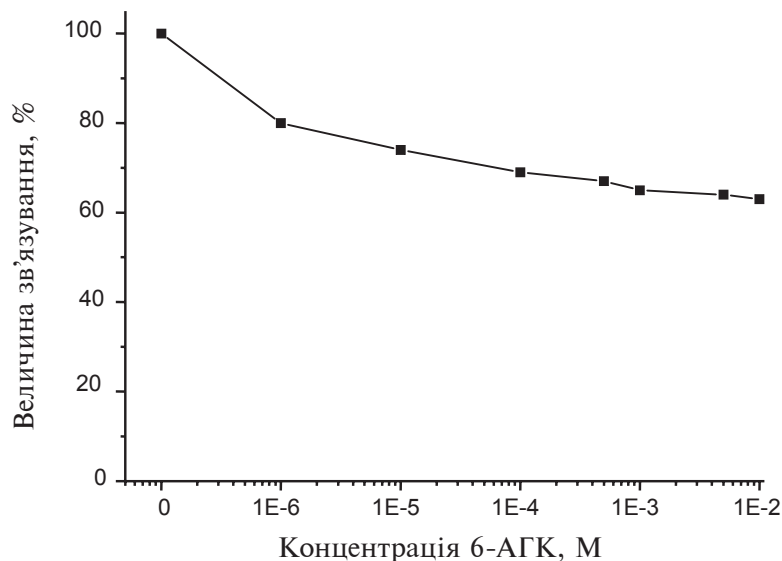


Рис. 5. Вплив 6-аміногексанової кислоти на взаємодію  $\alpha$ -2-антиплазміну із тканинним активатором плазміногену.

роль спейсера між окремими модулями, що підтримує їхню специфічну взаємну орієнтацію і забезпечує функціонування молекули. Він також відповідає за рецептор-опосередковані взаємодії, необхідні для росту та диференціації клітин.

Відомо, що лізинзв'язувальні ділянки кринглових доменів плазміногену беруть участь у взаємодії з фібрином та  $\alpha$ -2-АР. Ці взаємодії порушуються у присутності 6-АГК. Крингл 2 молекули тканинного активатора опосередковує лізинзалежне зв'язування з фібрином, яке інгібується 6-АГК ( $K_i$  123 мкМ) [20].

Нами встановлено, що величина зв'язування міченого біотином  $\alpha$ -2-АР із тканинним активатором зменшується на 20–35% у присутності  $10^{-6}$ – $10^{-2}$  М 6-аміногексанової кислоти (рис. 5). Одержані результати свідчать, що взаємодія з інгібітором лише частково опосередкована лізинзв'язувальною ділянкою крингла 2 молекули тканинного активатора. Саме цим можна пояснити наведені вище дані щодо зниження на 20% величини зв'язування тканинного активатора з фібрином у присутності  $\alpha$ -2-АР.

Відомо, що делеція EGF-модуля знижує спорідненість тканинного активатора до фібрину і потенційну фібринолітичну активність [21]. Можна припустити, що взаємодія  $\alpha$ -2-АР з EGF-доменом змінює конформацію тканинного активатора і внаслідок цього його здатність активувати плазміноген.

Таким чином, нами встановлено, що  $\alpha$ -2-антиплазмін, крім своєї основної функції — швидкої інактивації вільного плазміну — регулює фібринолітичний процес шляхом інгібування активації Glu-плазміногену тканинним активатором на фібрині. Можна запропонувати дві моделі пояснення гальмівної дії  $\alpha$ -2-антиплазміну. По-перше, інгібітор зв'язується з фібрином у місцях локалізації активаторного комплексу і може створювати стеричні перешкоди для взаємодії плазміногену та тканинного активатора. По-друге, утворення комплексу  $\alpha$ -2-антиплазміну з тканинним активатором може спричинити в молекулі останнього конформаційні зміни, які призводять до зниження його функціональної активності.

**РЕГУЛЯЦИЯ  $\alpha$ -2-АНТИПЛАЗМИНОМ  
ПРОЦЕССА АКТИВАЦИИ  
Glu-ПЛАЗМИНОГЕНА ТКАНЕВЫМ  
АКТИВАТОРОМ НА ФИБРИНЕ**

Т. В. Гриненко, М. Б. Задорожна,  
Е. И. Юсова

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: zadorozhnaya\_mar@mail.ru

Для выяснения механизма ингибирования процесса активации Glu-плазминогена  $\alpha$ -2-антиплазмином исследовали его влияние на связывание тканевого активатора с фибрином, а также взаимодействие активатора с ингибитором. Установлено, что в присутствии  $\alpha$ -2-антиплазмина величина связывания тканевого активатора с фибрином снижается приблизительно на 20%. Ингибитор образует комплекс с тканевым активатором плазминогена с  $K_d$ , равной 78,2 нМ, и не влияет на его амидолитическую активность. Величина связывания  $\alpha$ -2-антиплазмина с тканевым активатором снижается на 20–35% в присутствии различных концентраций 6-аминогексановой кислоты, что свидетельствует об участии в комплексообразовании с ингибитором не только крингла 2, но и других доменов молекулы тканевого активатора.

Предложено две модели, объясняющие ингибирующий эффект  $\alpha$ -2-антиплазмина на процесс активации Glu-плазминогена тканевым активатором на фибрине. Во-первых, связывание ингибитора с фибрином в местах локализации активаторного комплекса может создавать стерические препятствия для взаимодействия профермента с его активатором. Во-вторых, образование комплекса  $\alpha$ -2-антиплазмина с тканевым активатором может вызывать в молекуле последнего конформационные изменения, приводящие к снижению его функциональной активности.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -2-антиплазмин, тканевой активатор, фибрин, ингибирование процесса активации.

**REGULATION WITH  $\alpha$ -2-ANTIPLASMIN  
OF Glu-PLASMINOGEN ACTIVATION  
BY TISSUE ACTIVATOR ON FIBRIN**

T. V. Grinenko, M. B. Zadorozhna,  
O. I. Yusova

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: zadorozhnaya\_mar@mail.ru

**S u m m a r y**

Interaction of tissue plasminogen activator with  $\alpha$ -2-antiplasmin and its influence on tissue activator binding to fibrin was studied.  $\alpha$ -2-Antiplasmin decreases the binding of tissue activator to fibrin by 20%. The inhibitor formed a complex with tissue plasminogen activator ( $K_d$  78.2 nM) and had no effect on amidolytic activity of the activator. The tissue activator binding to  $\alpha$ -2-antiplasmin decreases by 20–35% in the presence of 6-aminohexanoic acid. It indicates that not only kringle 2 of the tissue activator molecule takes part in complex formation with  $\alpha$ -2-antiplasmin, but also other activator domains. Two models were proposed to explain the  $\alpha$ -2-antiplasmin effect on the Glu-plasminogen activation by tissue activator on fibrin. In the first place, the inhibitor binds to fibrin in the site where the activator complex is localized. It can create steric hindrances for the proenzyme interaction with its activator on fibrin. In the second place,  $\alpha$ -2-antiplasmin in a complex with tissue plasminogen activator can bring to a change in the activator conformation and a decrease of its functional activity.

**Key words:**  $\alpha$ -2-antiplasmin, fibrin, tissue activator, inhibition of activation.

1. Hoylaerts M., Rijken D. C., Lijnen H. R., Collen D. // J. Biol. Chem. — 1982. — **257**, N 6. — P. 2912–2919.
2. Гриненко Т. В., Задорожна М. Б., Платонова Т. М., Волков Г. Л. // Укр. біохім. журн. — 2005. — **75**, № 5. — С. 45–51.
3. Collen D. // Thromb. Haemost. — 1980. — **43**, N 2. — P. 77–89

4. *Ichinose A, Mimuro J, Koide T, Aoki N.* // *Thromb. Res.* – 1984. – **33**, N 4. – P. 401–407.
5. *Rakoczy I, Wiman B., Collen D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – **540**, N 2. – P. 295–300.
6. *Задорожна М. Б., Гриненко Т. В., Юсова О. І., Волков Г. Л.* // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 5. – С. 71–77.
7. *Задорожная М. Б., Гриненко Т. В., Волков Г. Л.* // *Буковинський мед. вісн.* – 2005. – **9**, № 2. – С. 99–100.
8. *Teger-Nilsson A. C., Friberger P., Gyzander E.* // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1977. – **37**, N 5. – P. 403–409.
9. *Варецька Т. В., Лосєва А. Л., Яценко В. Н.* // *Укр. біохім. журн.* – 1961. – **33**, № 5. – С. 657–666.
10. *Posdnjakova T. M., Musjalkovskaja A. A., Ugarova T. B. et al.* // *Thromb. Res.* – 1979. – **16**, N 1/2. – P. 283–288.
11. *Gelting G., Bayer E. A., Wilchek M.* // *Biochem. J.* – 1987. – **242**, N 3. – P. 923–926.
12. *Гриненко Т. В., Юсова О. І., Задорожна М. Б., Макогоненко Є. М.* // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 6. – С. 83–90.
13. *Tsurupa G., Ho-Tin-Noes B., Angles-Cano E., Medved L.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 39. – P. 37154–37159.
14. *Laemmli U. K.* // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
15. *Bosma P. J., Rijken D. C., Nieuwenhuizen W.* // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – **172**, N 2. – P. 399–404.
16. *Holmberg L., Lecander I., Astedt B.* // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1980. – **40**, N 8. – P. 743–747.
17. *Saito H., Goldsmith G. H., Moroi M., Aoki N.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1979. – **76**, N 4. – P. 2013–2017.
18. *Korninger C., Collen D.* // *Thromb. Haemost.* – 1981. – **46**, N 3. – P. 662–665.
19. *Wiman B., Boman L., Collen D.* // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – **87**, N 1. – P. 143–146.
20. *Grailhe P., Nieuwenhuizen W., Angles-Cano E.* // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – **219**, N 3. – P. 961–967.
21. *Larsen G. R., Henson K., Blue Y.* // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**, N 2. – P. 1023–1029.

Отримано 12.05.2006