НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В.Палладіна

На правах рукопису

ЗОЛОТАРЬОВА Ела Миколаївна

ВИВЧЕННЯ РОЛІ ЛІЗИН- ТА АРГІНІЛ-ЗВ"ЯЗУЮЧИХ ДІЛЯНОК ПЛАЗМІНУ НА ОКРЕМИХ ЕТАПАХ ГІДРОЛІЗУ ФІБРИНОГЕНУ

03.00.04 - біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ 1995

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі хімії
Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна
наук України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук,
професор КУДІНОВ С.О.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор БОРИСЕНКО С.М.,
кандидат біологічних наук
РИБАЧУК В.М.

Провідна організація - Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України

Захист відбудеться "30" жовтня 1995 р. о 14⁰⁰ год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в
Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України за адресою:
252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії НАН України.

Автореферат розісланий "30" вересня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради О.В.Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Плазмін, що є одним з головних компонентів фібринолітичної системи, являє собою високоефективну серинову протеіназу. У плазмі він знаходиться у вигляді неактивного зимогену - плазміногену, що запобігає передчасному розщепленню білків крові. Активація плазміногену тканинним активатором відбувається після утворення фібрину, безпосередньо на його поверхні. Гідролітичну функцію фермент здійснює у зв'язаному із субстратом стані. Таким чином, для розпізнавання свого субстрату і швидкої активації, а отже, ефективного руйнування згустка, неабияке значення мають ділянки проферменту, що забезпечують його сорбцію на фібрині. Після реакції десорбований плазмін швидко інактивується α_2-антиплазміном. Значна роль у цьому процесі також належить зв'язуючим ділянкам.

Якщо значення окремих ділянок плазмін(оген)у для процесів його активації і інактивації не викликає сумнівів, то роль цих структур у виконанні безпосередньо гідролітичної функції залишається нез'ясованою. Зв'язуючі ділянки плазміну розташовані у кринглових доменах важкого ланцюга і в області легкого ланцюга. Вони відрізняються ступенем спорідненості до лізину, аргініну і до їх хімічних аналогів. Деякий час вважалося, що ділянки кринглів 1-4 безпосередньо не беруть участі у гідролізі специфічного субстрату (Morris et al. 1981, Ney, Pizzo, 1982). Але вивчення комплексоутворення плазміногену з деякими проміжними продуктами фібрин(оген)олізу показало, що розщеплення фібриногену може бути спрямованим процесом, на кожному етапі якого взаємодія фермента із субстратом відбувається за рахунок різних ділянок ферменту і комплементарних їм центрів з боку субстрату, оскільки з фібрин(оген)ом і X-фрагменетами плазміноген взаємодіяв лізин-зв'язуючими ділянками, з Y-фрагментами - як лізин-, так і аргініл-зв'язуючими, з Dh-фрагментом - виключно аргініл-зв'язуючими ділянками (Гриненко и др.,1987, Кудинов,Лежен 1984). Згодом було виявлено, що для швидкого руйнування фібринового згустка важливе значення має присутність у молекулі ферменту кринглів 4 і 5 (Андрианов и др.,1992), але не було конкретизовано, на яких стадіях гідролізу мали місце такі взаємодії.

Глибоке розуміння процесів, що відбуваються внаслідок дії плазміну на фібрин, має не тільки науковий, але і практичний інтерес, у зв'язку із актуальною задачею створення ефективних тромболітиків. Дослідження механізму фібрин(оген)олізу є складовою частиною тематики відділу хімії і біохімії ферментів Інституту біохімії НАН Украї-

ни, яким керує д. б. н., професор С.О. Кудінов. Дана робота являє собою логічне продовження цих досліджень.

МЕТА РОБОТИ ТА ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи було вивчення ролі лізин- та аргініл-зв'язуючих ділянок плазміну на окремих етапах гідролізу фібриногену. Для досягнення цієї мети було потрібно:

1. Одержати фібриноген і його фрагменти: X2, Y, Dh, TSD, а також плазмін і мініплазмін. Охарактеризувати ці препарати, а також препарати мікроплазміна і К4 плазміногена.
2. Вивчити вплив 6-АГК і L-аргініну на активність плазміну та його частково деградованих форм, а також ефект деяких білків, що мають спорідненість до окремих ділянок ферменту чи субстрату (TSD, Dh, К4).
3. Провести хімічну модифікацію залишків аргініну фібриногену і його Dh-фрагменту і відновлення аргініну після такої модифікації, охарактеризувати одержані препарати. Вивчити вплив хімічної модифікації і наступної демодифікації на швидкість гідролізу цих субстратів плазміном.
4. Вивчити вплив 6-АГК і L-аргініну на швидкості розщеплення фрагментів фібриногену плазміном.

НАУКОВА НОВИЗНА. Наші дані відносно ролі ділянок К4 і К5 у гідролізі специфічного субстрату узгоджуються із даними інших авторів. Але, якщо у попередніх дослідженнях важливе значення цих ділянок було виявлене лише при руйнуванні фібрину, у зв'язку із чим було зроблене припущення про їх безпосередню участь у руйнуванні полімерної структури, у нашій роботі показано, що К4 і К5 плазміна беруть участь у фібриногенолізі, тобто здійснюють свою функцію на рівні однієї молекули. Виявлено, що роль К5 реалізується на початковому етапі реакції, при розщепленні нативної молекули, а К4 - на наступних етапах, при руйнуванні Х- фрагментів. Вперше показано участь у гідролізі структур, що розташовані у К1 а також аргініл-зв'язуючих ділянок легкого ланцюга плазміну. Показано, що високоспецифічні ділянки плазміну беруть участь на початкових, а ділянки із меншею специфічністю - на кінцевих етапах гідролізу. Доведено важливість центрів фібриногену, що вміщують залишки аргініну, для першого етапу його розщеплення плазміном.

ПРАКТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ. Одержані результати допомагають глибше зрозуміти механізм окремих етапів фібриногенолізу, що може мати значення для створення ефективних тромболітичних препаратів. Так, при застосуванні аргініну та аргініл-

подібних речовин можна блокувати ті чи інші ділянки молекули плазмін(оген)у. Цей ліганд у низьких концентраціях, очевидно, може насичати ділянки К1-3, тобто ту область молекули, де відбувається первинне зв'язування α_2-антиплазміну. Як показано у роботі, блокування аргініном цих ділянок не призводить до значного гальмування реакції. В той же час, присутність аргініну не впливала на процес розщеплення Х-фрагменту, який знаходиться під контролем нечутливої до аргініну ділянки К4. Оскільки ця стадія може бути лімітуючою для руйнування згустка, ми вважаємо доцільним використання аргініну як агента, що мало впливає на швидкість гідролізу фібриногену і фібрину, але може запобігати передчасній інактивації плазміну α_2-антиплазміном.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Результати дисертації викладені на спільному семінарі відділів хімії та біохімії ферментів і молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992) та на спільному семінарі відділів хімії та біохімії ферментів, структури і функції білка і молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

ПУБЛІКАЦІЇ. За матеріалами дослідження опубліковано 4 роботи.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертаційну роботу викладено на 106 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, чотирьох глав, списку літератури, що містить 207 посилань на роботи відчизняних та зарубіжних авторів, 28 малюнків.

КОНКРЕТНИЙ ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА. Експериментальна частина роботи виконана дисертантом особисто.

МЕТОДОЛОГІЯ, МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Плазміноген виділяли з плазми донорської крові афіннохроматографічним методом (Deutch, Merts, 1970). Ізольований домен плазміногену К4, а також Val442-плазміноген були люб'язно надані с. н. с. Т.В.Гриненко. Lys77-плазмін (плазмін) і Val442-плазмін (мініплазмін) було одержано активацією відповідних форм проферментів у присутності стрептокінази (Robbins, Summaria, 1979). Lys530-плазмін (мікроплазмін) був люб'язно наданий н. с. С.І.Андріановим.

Протеолітичну активність ферментів визначали за гідролізом казеїну (Robbins, Summaria, 1979).

Фібриноген (Fg) виділяли з цитратної плазми бика шляхом фракційного висолювання сульфатом натрію (Варецька, 1960). Фрагменти Х2 та Y одержували з плазмінових гідролізатів фібриногену з наступною хроматографією на біогелі Р-300.

Dh-фрагмент було одержано з плазмінового гідролізату фібриногену: препарат хроматографували через сефадекс G-200, після чого доочищали хроматографією на колонці з КМ-сефадексом С-50. TSD-фрагмент одержували з пептичних гідролізатів D-фрагментів фібриногену з наступним доочищенням від домішок гельфільтрацією на сефадексі G-50 (Медведь, Угарова, 1982).

^{125}I-фібриноген одержували з фібриногену, внаслідок обробки Na^{125}I у присутності хлораміну Т (Mc Conachey, Dixon, 1980).

Оборотну модифікацію залишків аргініну у препаратах фібриногену і Dh-фрагменту проводили 1,2-циклогександіоном (ЦГДО), згодом модифікований аргінін відновлювали за допомогою гідроксиламіну (Patthy, Smith, 1975).

Імобілізацію TSD-фрагменту проводили на BrCN-активованій сефарозі 4В.

Гідроліз фібриногену і його фрагментів проводили при 37°С. До складу реакційного середовища входив з буфер (Na-фосфатний, боратний чи вероналовий), pH 7,4, з 0,15 М NaCl. Концентрація субстратів дорівнювала 2,9 або 29 мкМ. При вивченні процесу гідролізу Dh-фрагменту концентрація субстрату була удвічи більшою, а до складу реакційної суміші було введено 10 мМ ЕДТО. Гідроліз починали додаванням до суміші плазміну чи його частково-деградованих форм до кінцевого утримання 0,02-0,4 к.о./мл, реакцію зупиняли додаванням рівного об'єму 10 М сечовини із 2% ДС-Na.

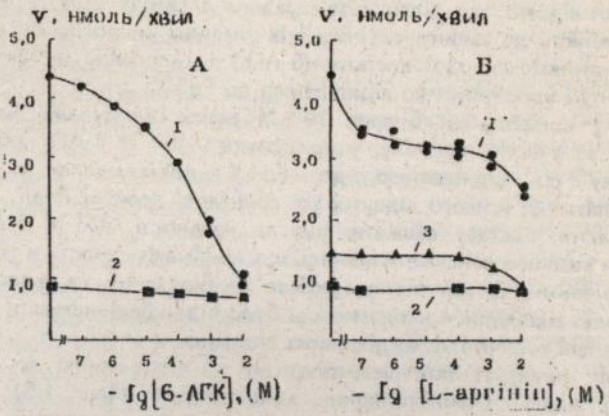
Розділення продуктів гідролізу проводили за допомогою електрофорезу в 5% ПААГ з ДС-Na (Fainbraks et al., 1971). Кількісне визначення продуктів робили при застосуванні I-мічених субстратів, в окремих випадках - денситометрії гелів.

Швидкості реакції визначали за тангенсами кутів нахилу відповідних кінетичних кривих.

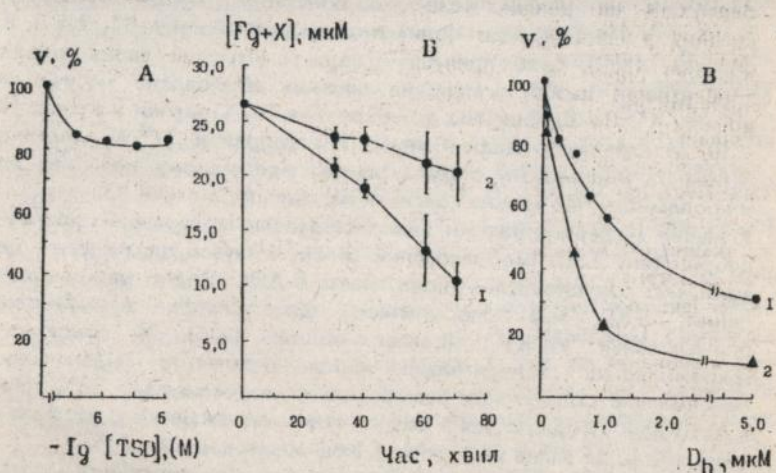
ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМІНУ І ЙОГО ФОРМ.

Перша частина нашої роботи була присвячена вивченню ефектів низькомолекулярних лігандів, що впливають на різні ділянки плазміну, а також ефектів деяких білків, що мають специфічну спорідненість до окремих ділянок ферменту чи субстрату. При цьому визначали швидкість зникнення сумарної фракції фібриногену і Х-фрагментів (Fg+X). Цей показник відображає дві перші, найбільш швидкі стадії реакції (Eisele, Michalyi 1975, Michalyi,1983), на яких, згідно нашому припущенню, можуть реалізовуватися найбільш специфічні взаємодії ферменту і субстрату.



Мал. 1. Вплив 6-АГК (А) і L-аргініну (Б) на швидкості зникнення фракції Fg+X під дією 1 к.о. плазміну (1), мікроплазміну (2) і мініплазміну (3).



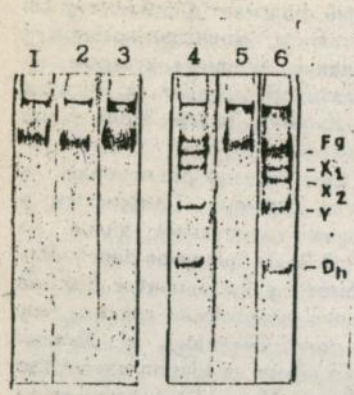
Мал. 2. Вплив високомолекулярних інгибіторів на швидкості зникнення фракції Fg+X: А - вплив TSD на активність плазміну; Б - кінетика руйнування Fg+X плазміном за відсутністю (1) і в присутності 270 мкМ К4 (2); В - вплив Dh на активність плазміну (1) і мікроплазміну (2).

Оскільки відомо, що ділянки зв'язування плазміну можуть виявляти спорідненість до лізину, аргініну і їх хімічних аналогів, ми вивчали влив 6-аміногексанової кислоти (6-АГК) і L-аргініну на активність ферменту і його форм по відношенню до Fg+X.
6-АГК у концентрації більше 10^{-5} М різко гальмувала швидкість реакції за участю плазміну; у присутності 10^{-2} М 6-АГК активність плазміну по відношенню до Fg+X дорівнювала активності мікроплазміну, у якого відсутні усі кринглові домени (Мал. 1,А). Ці дані дають підставу вважати, що за наявності 10^{-2} М 6-АГК усі ділянки важкого ланцюга плазміну, що приймають участь у гідролізі, є насиченими. В той же час крива інгібірування не мала чітких перегинів, внаслідок чого не можна було віддиферинціювати ефекти, обумовлені тою чи іншою ділянкою плазміну.
L-аргінін знижував активність плазміну по відношенню до Fg+X у області мікро- і мілімолярних концентрацій (Мал. 1,Б). У цих експериментах також порівнювали дію L-аргініну на плазмін та його частково деградовані форми. Мініплазмін, позбавлений К1-4, інгібірувався за наявності тільки мілімолярних концентрацій ліганда. Зважуючи на раніше визначені константи комплексоутворення аргініну з ізольованими фрагментами плазміногену К1, К4 і К5 (Мацука, 1989), було припущено, що гальмуючий вплив низьких концентрацій цього ліганда на плазмін обумовлено насиченням ділянки К1. По відношенню до мікроплазміну L-аргінін у межах 10^{-5} - 10^{-2} М виявлявся неефективним. У середовищі 10^{-2} М L-аргініну активність мініплазміну ставала рівною відповідному значенню для мікроплазміну, що можна пояснити насиченням ділянки К5.
У наших експериментах ми використовували ізольований фрагмент фібриногену TSD. Імобілізований білок зв'язував плазміноген, цей комплекс порушувався у присутності 6-АГК. Згідно літературним даним, TSD мав спорідненість до ділянок плазміногену, розташованих у К1-3 (Lezhen et al, 1986). У присутності мікромолярних концентрацій цього фрагмента відзначалось максимальне гальмування реакції, що не перевищувало 20% (Мал. 2,А) Ці дані узгоджуються з результатами, одержаними у дослідах із L-аргініном, де вплив на ділянку К1 оцінювався нами у 20%.
Наші досліди показали, що додавання до реакційної суміші ізольованого домену плазміногену К4 до кінцевої його концентрації 2.7×10^{-4} М на 60% знижувало швидкість зникнення сумарнії фракції Fg+X (Мал. 2,Б). Цей ефект можна пояснити блокуванням центрів субстрату, які є комплементарними до відповідної ділянки плазміну.

Літературні дані свідчать, що ізольований фрагмент фібриногену Dh міг утворювати комплекси з плазміногеном, мініплазміногеном і легким ланцюгом плазміну з заблокованим активним центром, ця взаємодія порушувалась лише за наявності аргініну у високих концентраціях (Гриненко и др. 1987, Кудинов,Лежен 1984). Саме тому нам здавалося доцільним використати цей білок для блокування аргініл-зв'язуючих ділянок плазміну, що розташовані, як ми вважали, у легкому ланцюзі молекули ферменту. Dh-фрагмент у мікромолярній концентрації здійснював гальмуючий вплив на протеоліз Fg+X під дією плазміну (Мал. 2,В), за цих умов залежність швидкості реакції від концетрації інгібітора у координатах Діксона була прямою, що свідчить про існування на плазміні одного типу ділянок зв'язування із цим фрагментом. Очевидно, ці ділянки розташовані у легкому ланцюзі, оскільки ефект на мікроплазміні, що не має крінглових доменів, був аналогічним (Мал. 2,В). Експерименти із Dh-фрагментом дають підставу припустити, що ранні етапи фібриногенолізу можуть відбуватися за участю не тільки ділянок важкого, але і легкого ланцюга плазміну. З іншого боку, стверджувати це остаточно не можна, оскільки розміри молекул плазміна і Dh-фрагмента є близькими і не виключено екранування цим фрагментом безпосередньо активного центра фермента.

Таким чином, вивчення впливу низькомолекулярних і білкових інгібіторів на ранні, найбільш швидкі етапи фібриногенолізу показало, що у реакції мають брати участь ділянки К1, К5, К4 і, можливо, відмінні від активного центру ділянки легкого ланцюга. Було визначено умови, за яких блокуються окремі ділянки плазміну.

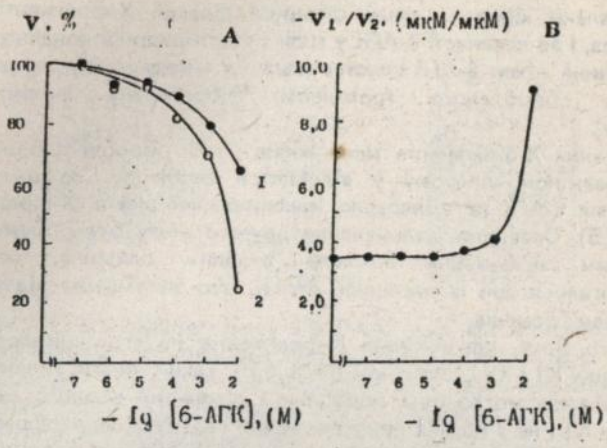
ВИВЧЕННЯ РОЛІ ЗВ'ЯЗУЮЧИХ ДІЛЯНОК ПЛАЗМІНУ НА ОКРЕМИХ ЕТАПАХ ГІДРОЛІЗУ ФІБРИН(ОГЕН)У. Наші досліди показали, що за умов насичення усіх ділянок важкого ланцюга плазміну, у присутності 10^{-2} М 6-АГК, а також при насиченні ділянок К1 і К5 10^{-2}М L-аргініном відбувалося однакове гальмування першого етапу гідролізу: швидкість зникнення фракції Fg відповідно становила 65% і 63% від контрольного варіанта. У той же час вплив цих речовин навіть у сантімолярних концентраціях на активність мікроплазміну по відношенню до Fg практично не виявлявся. Таким чином, можна припустити, що у першому етапі гідролізу беруть участь зв'язуючи ділянки важкого ланцюга, що є однаково чутливими до 6-АГК і L-аргініну. Згідно з раніше визначеними константами (Мацука, 1989), такі ділянки можуть бути присутніми у К1 і К5.



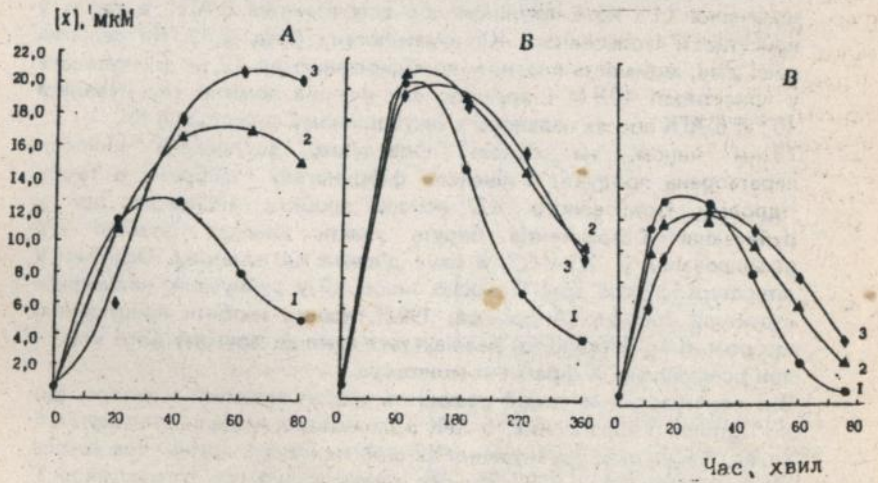
Мал. 3. Електрофореграми у 5% ПААГ з ДС-Na препаратів фібриногену (А) і їх 60-хвилинних плазмінових гідролізатів (Б): 1 - вихідний Fg, 2 - Fg з модифікованими на 35% залишками аргініну, 3 - Fg з відновленим аргініном.

З попередніх досліджень відомо, що ділянки цих доменів, а також зв'язуючи ділянки легкого ланцюга можуть виявляти спорідненість до аргініну і його аналогів (Patthy, Smith, 1975, Веревка и др., 1985, Мацука, 1989). Імовірність розщеплення зв'язків, утворених аргініном, на початковому етапі гідролізу є низькою (Hessel, 1975, Henshen, 1986). Нами показано, що модифікація ЦГДО 35% залишків аргініну в молекулі фібриногену призводила до різкого гальмування його гідролізу плазміном. Оскільки на електрофореграмах не виявлялися навіть перші пощеплені форми, можна стверджувати, що реакція гальмувалась на першій стадії. Зменшення швидкості гідролізу не було наслідком денатурації білка, оскільки після відновлення залишків аргініну швидкість руйнування фібриногену збільшувалась майже до вихідного рівня (Мал. 3). Ці дані можуть свідчити про важливе значення центрів нативного фібриногену, що містять аргінільні залишки, у фібриногенолізі.

На мал. 4 представлені залежності швидкостей руйнування Fg і утворення Y-фрагменту, що відображають відповідно перший і другий етапи гідролізу (А), а також відношення цих показників (Б) від концентрації 6-АГК у реакційному середовищі. Очевидно, що швидкість другого етапу була більш чутливою до 6-АГК, ніж на першому етапі. Співвідношення цих швидкостей різко змінювалося у присутності мілімолярних концентрацій інгибітора, що дозволяє виключити роль високоафінної ділянки у гальмуванні другого етапу. Інгибіруючий ефект 6-АГК на плазмін чітко виявлявся у накопиченні Х-фрагментів, як форми Х1, так і форми Х2. На мал. 5,А



Мал. 4. Вплив 6-АГК на швидкості руйнування Fg (1) і утворення Y (2) (А), а також на відношення цих швидкостей (Б).



Мал. 5. Кінетика утворення і руйнування Х-фрагментів під дією плазміну у присутності 6-АГК (А), мікроплазміну у присутності 6-АГК (Б) і плазміну у присутності L-аргініну (В). 1 - контрольний варіант, 2 - 10^{-3} М інгібітор, 3 - 10^{-2} М інгібітор.

представлено кінетичні криві сумарної фракції Х-фрагментів без інгібітора, і за наявності 6-АГК у мілі- і сантімолярній концентраціях. Аналогічний ефект 6-АГК спостерігався і у випадку, коли проводили гідроліз обробленого тромбіном фібриногену (полімерного фібрину).

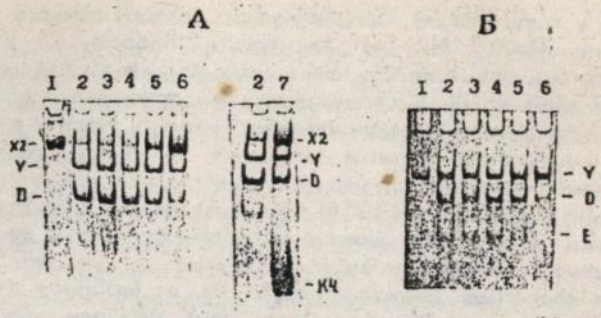
Накопичення Х-фрагментів мало місце і при обробці фібриногену мікроплазміном, причому у відсутності інгібітора. За цих умов додавання 6-АГК не змінювало максимальний рівень Х-фрагментів (Мал. 5,Б). Очевидно, гальмування другого етапу було обумовлене ділянками зв'язування важкого ланцюга плазміну, оскільки спостерігалося при їх насиченні 6-АГК, або за умовою відсутності кринглових доменів.

З іншого боку, накопичення Х-фрагментів не спостерігалося при блокуванні К1 і К5 L-аргініном (Мал. 5,В). Таким чином, гальмування другого етапу могло бути пов'язане з ділянками важкого ланцюга, але не з К1 і не з К5. Ми припустили, що гальмування першого етапу гідролізу відбувається внаслідок впливу 6-АГК чи L-аргініну на ділянки К1 і К5, а на другому - під впливом 6-АГК на К4.

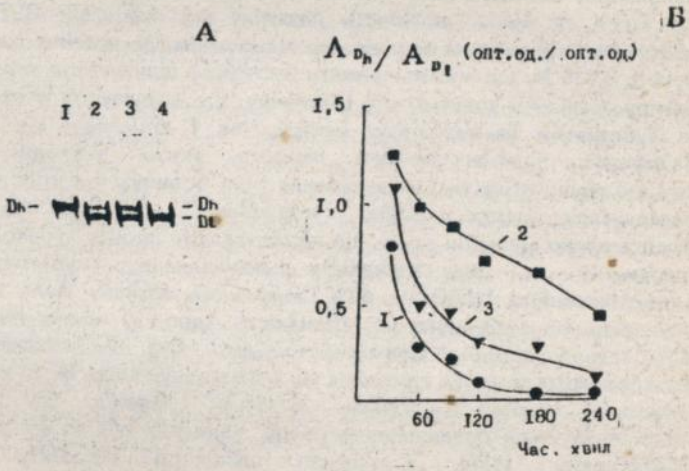
Для того, щоб перевірити наше припущення, ми проводили гідроліз ізольованого Х2-фрагмента фібриногену плазміном в умовах насичення К1 і К5 L-аргініном або всіх кринглів 6-АГК, а також у присутності ізольованого К4 плазміногену (Мал. 6,А). Як свідчать наші дані, активність плазміну по відношенню до Х2 не знижувалась у присутності 10^{-2} М L-аргініну, але реакція помітно гальмувалася 10^{-2}М 6-АГК або за наявності в інкубаційному середовищі К4.

Таким чином, на основі проведених досліджень кінетики перетворень продуктів І-міченого фібриногену і фібрину а також гідролізу ізольованого Х2 можна зробити висновок, що у руйнуванні Х-фрагментів беруть участь ділянки, відмінні від розташованих у К1 і К5, а саме ділянка К4 плазміну. Оскільки у літературі існують дані відносно участі К4 у руйнуванні полімерної структури фібрину (Андріанов, 1992), можна зробити припущення, що роль К4 у фібрінолізі реалізується саме на другому його етапі - при розщепленні Х-фрагмент-мономера.

Вивчення наступних стадій реакції за участю плазміну показало, що на гідроліз Y-фрагментів, 6-АГК здійснювала меньший гальмуючий вплив, ніж на стадії руйнування Х2-фрагмента, а L-аргінін був зовсім неефективним (Мал. 6,Б). З цього випливає, що при розщепленні Y ділянки К1 і К5 не відіграють значної ролі, а значення К4, можливо, менше, ніж на попередньому етапі.



Мал. 6. Електрофореграми у 5% ПААГ з ДС-Na вихідних препаратів і 15-хвилинних плазмінових гідролізатів X2 (А) і Y (Б). 1 - вихідні препарати, 2 - варіант без інгібіторів, 3 - гідролізат, одержаний за наявністю 10^{-3} М L-аргініну, 4 - 10^{-2} М L-аргініну, 5 - 10^{-3} М 6-АГК, 6 - 10^{-2} М 6-АГК. 7 - 180 мкМ К4.



Мал. 7. А: Електрофореграми у 5% ПААГ з ДС-Na Dh-фрагменту (1) і його 60-хвилинних плазмінових гідролізатів, одержаних без інгібіторів (2) і у присутності 10^{-1} М L-аргініну (3) і $2x10^{-2}$ М 6-АГК.
Б: Кінетика перетворення Dh у DI під дією плазміну на вихідний Dh (1), на Dh з модифікованими на 40% залишками аргініну (2) і на Dh з відновленим аргініном (3). На осі ординат - відношення Dh до DI (за даними денситометрії).

6-АГК, у концентраціях, що насичують ділянки важкого ланцюга плазміну ($2x10^{-2}$ М), не гальмувала гідроліз Dh-фрагмента фібриногена, спостерігалось навіть деяке збільшення швидкості його перетворення на DI. У цьому зв'язку ми припустили, що ділянки зв'язування важкого ланцюгу плазміна не беруть участі у руйнуванні цього фрагмента. Помітне зниження активності плазміна (і мікроплазміна) по відношенню до Dh відбувалося лише за наявності L-аргініну в концентрації 10^{-1} М (Мал. 7,А). Як вже згадувалося, цей фрагмент фібриногену виявляв спорідненість лише до аргініл-зв'язуючих ділянок плазміну (Гриненко и др.,1987,Кудинов, Лежен,1984). Наші досліди стосовно Dh, як інгібітора плазміна і мікроплазміна по відношенню до Fg+X свідчили про те, що взаємодія плазміну із цим фрагментом відбувається за рахунок одного типу ділянок, розташованих у легкому ланцюзі. Звісно, що в цій області знаходяться центри, чутливі лише до високих концентрацій бензамідіну чи аргініну (Patthy, Smith,1975, Веревка и др. 1985). З іншого боку, у присутності 10^{-1} М L-аргініну майже наполовину зменшувалась активність мікроплазміну по відношенню до Fg+X, а також активність плазміну до субстрату S2251, а константа інгібірування плазміна по відношенню до казеіну складала 0,14 ± 0,016 М, що можна вважати наслідком пригнічення активного центру. Оскільки концентрації L-аргініну, що порушують взаємодію із субстратом як активного центру, так і відмінних від нього зв'язуючих ділянок легкого ланцюга, могли знаходитися у децимолярній області, для виявлення ролі останніх у протеолізі ми застосували метод хімічної модифікації. На малюнку 7,Б представлено кінетичні криві, що відображають процес переходу Dh-фрагменту в DI. Швидкість розщеплення субстрату з модифікованими ЦГДО на 40% залишками аргініну була значно меншою, ніж вихідного Dh. Швидкість гідролізу препарата після відновлення аргініну (демодифікованого Dh) наближалася до контрольного варіанта, тому фактор денатурації білків після хімічної обробки можна виключити. Оскільки перехід Dh в DI супроводжується розщепленням лише лізильних пептидних зв'язків (Литвинович, 1988), зменшення швидкості гідролізу після модифікації не може бути обумовлене активним центром, а є наслідком неспроможності аргініл-зв'язуючих ділянок впізнавати комплементарні центри субстрату. Таким чином, ділянки, що безпосередньо беруть участь у гідролізі Dh-фрагменту розташовані у легкому ланцюзі плазміну.

ВИСНОВКИ.

1. Центри субстрату, що вміщують аргінін, є важливими для гідролізу нативного фібриногену.
2. В початковому етапі розщеплення фібриногену беруть участь ділянки К1 і К5 плазміну. Подальші етапи гідролізу відбуваються без участі цих структур.
3. У фібриногенолізі важливу роль відіграє ділянка К4 плазміну. Участь її у реакції реалізується на етапі розщеплення Х-фрагментів.
4. Враховуючи подібний характер ефектів 6-АГК на другому етапі фібрінолізу і фібриногенолізу, а також дані інших авторів відносно важливої ролі К4 у руйнуванні фібринового згустка, можна зробити висновок, що участь К4 у фібринолізі реалізується на етапі розщеплення Х-мономеру.
5. Протеоліз Dh-фрагменту відбувається без участі ділянок важкого ланцюга плазміну. У руйнуванні цього фрагменту безпосередню роль відіграють відмінні від активного центра аргініл-зв'язуючи ділянки легкого ланцюга плазміну.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Золотарева Э.Н., Гриненко Т.В., Скоморовская Е.В., Кудинов С.А. Влияние аргинина на гидролиз фибриногена плазмином и миниплазмином // Укр. биохим. журн. - 1992. - 64, N 1. - С. 3-9.
2. Золотарева Э.Н., Гриненко Т.В., Скоморовская Е.В., Кудинов С.А. Влияние химической модификации остатков аргинина фибриногена и его Dh-фрагмента на скорость гидролиза этих белков плазмином // Укр. биохим. журн. - 1994. - 66, N 2. - С. 79-85.
3. Золотарева Э.Н. Изучение роли лизин- и аргинил-связывающих участков плазмина на начальных этапах гидролиза фибриногена. // Биополимеры и клетка. - 1995. - 11, N 3-4. - С. 96-103.
4. Гриненко Т.В., Скоморовська О.В., Золотарьова Е.М. Вплив появи Х-фрагменту на фібрин-зв'язуючі властивості Глу-плазміногену // VI Укр. біохім. з'їзд. К: Вид-во УСГА, 1992. - С. 125.

Золотарева Э.Н. Изучение роли лизин- и аргинил-связывающих участков плазмина на отдельных этапах гидролиза фибриногена. Рукопись.
Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.00.04. - биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 1995.
Представленая работа содержит исследование роли связывающих участков плазмина в процессе гидролиза фибриногена. Установлено, что участки, находящиеся в крингловых структурах 1 и 5 вовлечены в начальный этап гидролиза. Для взаимодействия с ферментом на начальном этапе важное значение имеют аргинил-содержащие центры субстрата. Участок крингла 4 плазмина играет существенную роль на этапе расщепления Х-фрагментов фибрин(оген)а. Роль крингловых структур фермента на последующих этапах гидролиза не является значительной. Показано, что в расщепление Dh-фрагмента вовлечены отличные от активного центра участки легкой цепи плазмина.

Zolotariova E.N. Estimating the Role of Plasmin Lysin- and Arginil Sites on Separate Stages of Fibrinogen Hydrolysis. Manuscript.
The Dissertation Thesis for Obtaining a Scientific Degree of Phylosophy Doctor (Biology) in the Speciality 03.00.04 - Biochemistry. A.V.Palladin Institute of Ukraine National Academy of Science. Kiev. Ukraine.
The work presented contains some researches on the role of plasmin binding sites at the process of fibringen hydrolysis. The sites of the 1-st and 5-th cringle structures have been found to be involved into the hydrolysis initial stage. For interacting with the enzyme on the initial stage a significant role is played by arginil-containing substrate centres. The 4-th site of plasmin cringle plays an essential role on the stage of fibrin(ogen)e X-fragments splitting. The role of cringle structures on the hydrolysis further stages isn't conciderable. Dh-fragment splitting has been shown to include some differing from the active center plasmin light chain sites.

Ключові слова: плазмін, мініплазмін, мікроплазмін, фібриноген, Х-, Y-, Dh-фрагменти.

Підписано до друку 10.07.95.

Підп. до друку 10.07.95 Формат 60×84/16 Папір тип. Друк. офс.
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 0,9 Обл.-вид. арк. 0,6 Тир. 100
Зам. 5-2670

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Б. Хмельницького, 19.