



УДК 577.152.342*17.02

ИНАКТИВАЦИЯ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УРОКИНАЗЫ *in vitro*

© 1998 г. Р. Б. Айсина[#], Л. И. Мухаметова, И. Ю. Сазонова, С. Д. ВарфоломеевМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 22.12.97 г. Принята к печати 30.01.98 г.

Урокиназа человека при инкубации (37°C, pH 7.4) теряет фибринолитическую активность (плазминоген-активаторную, измеряемую по времени лизиса фибринового сгустка), в то время как ее амидазная активность в этих условиях полностью сохраняется. Скорость падения фибринолитической активности зависит от концентрации урокиназы и при значениях выше 1.5 мкМ подчиняется уравнению реакции второго порядка, что свидетельствует об автолизе фермента ($k_{\text{авт}} 3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$). В процессе инкубации урокиназа ($M 54 \text{ кДа}$) превращается в низкомолекулярную форму ($M 33 \text{ кДа}$) и продукты деградации А-цепи. Амидазная активность урокиназы не является индикатором ее фибринолитической активности в тех случаях, когда происходит локальное разворачивание или частичная деградация молекулы. Подобрана оптимальная смесь агентов, способствующая сохранению фибринолитической активности урокиназы.

Ключевые слова: урокиназа, амидазная и фибринолитическая активности; кинетика инактивации, автолиз, стабилизация.

Урокиназа человека как эффективный активатор плазминогена широко используется в тромболитической терапии. Выделены две активные формы урокиназы с молекулярными массами 50–55 (HMW-Uk) и 31–36 кДа (LMW-Uk) [1–3]. HMW-Uk состоит из легкой А-цепи (Ser¹-Phe¹⁵⁷) и тяжелой В-цепи (Ile¹⁵⁹-Leu⁴¹¹), соединенных одной дисульфидной связью [1, 2]. Активный центр фермента (остатки Asp²⁵⁵, His²⁰⁴ и Ser³⁵⁶) локализован в В-цепи [4]. LMW-Uk идентична HMW-Uk, за исключением того, что ее А-цепь лишена N-терминальной последовательности Ser¹-Lys¹³⁵ [1, 4].

Фермент теряет активность в процессе выделения, очистки, лиофилизации, тепловой обработки (при дезактивации вирусов) и длительной инкубации разбавленных растворов при комнатной температуре [5]. Хорошо изучены pH- и термостабильность обеих форм фермента [6–11]. HMW-Uk и LMW-Uk наиболее стабильны в pH-области 8.2–9.0 и 5.0–7.0 соответственно [8]. При pH 6.8–9.2 и повышенных температурах ($\geq 60^\circ\text{C}$) LMW-Uk обладает большей стабильностью, чем HMW-Uk. Сведения о стабильности HMW-Uk при температурах ниже 50°C расходятся. Так, авторы работ [3, 10] с помощью электро-

фореза в геле показали, что инкубация HMW-Uk при 37°C (pH 7.0–7.2) приводит к автолитической деградации легкой А-цепи фермента, и отметили сохранение или незначительное падение его плазминоген-активаторной активности. По данным других авторов, HMW-Uk даже при низких концентрациях при 27°C быстро теряет плазминоген-активаторную активность [5], а при 45°C – и амидазную (по гидролизу субстрата S-2444) [9].

Противоречивость данных о стабильности HMW-Uk при температуре ниже 50°C, вероятно, связана с вариациями специфических условий инкубации фермента (pH, ионной силы, концентрации белка и др.) и различиями в методах оценки ферментативной активности (по скорости лизиса фибриновых трубок, по площади зон лизиса фибриновых пленок через 16–18 ч или по гидролизу S-2444). Выяснение условий сохранения HMW-урокиназой ее фибринолитической активности при 37°C (температура, при которой фермент действует *in vivo* и исследуются его свойства *in vitro*) представляет особый интерес.

Данная работа посвящена сравнительному исследованию изменения амидазной (по гидролизу S-2444) и фибринолитической (измеренной по времени лизиса фибринового сгустка) активностей урокиназы человека (HMW-Uk, далее – урокиназа) при ее инкубации (37°C, pH 7.4) с параллельным контролем образцов с помощью SDS-электрофореза в ПААГ, а также поиску агентов, стабилизирующих фермент от автолиза.

Сокращения: S-2444 – Gln-Glu-Gly-Arg, *n*-нитроанилид; Uk – урокиназа.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 939-09-97, e-mail: arb@enzyme.chem.msu.su).

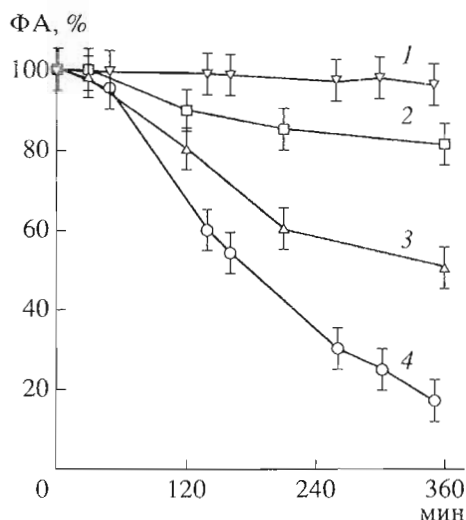


Рис. 1. Зависимость скорости падения фибринолитической активности (ФА) урокиназы при ее инкубации в буфере А при 37°C от начальной концентрации фермента. $[E]_0$, мкМ: 0.009 (1), 0.05 (2), 0.09 (3), 1 (4).

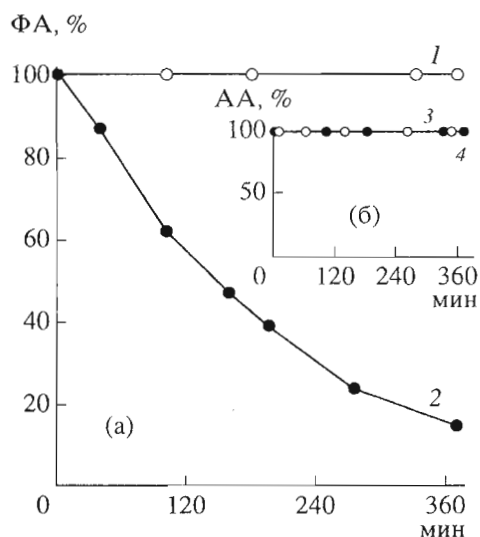


Рис. 2. Изменение фибринолитической (а) и амидазной (АА) активностей (б) 2 мкМ урокиназы в ходе инкубации в буфере А при 4 (1, 3) и 37°C (2, 4)

Урокиназа теряет фибринолитическую активность во время инкубации в растворе при pH 7.4 и 37°C, и скорость инактивации увеличивается с ростом концентрации фермента (рис. 1). В области концентраций фермента 0.05–1 мкМ наблюдаются сигмоидальные зависимости падения фибринолитической активности, которые не подчиняются уравнениям реакции первого или второго порядка. Наблюдаемый ход кривых инактивации может быть обусловлен разворачиванием определенных доменов и частичной денатурацией молекул при 37°C, а также протеолитической деградацией урокиназы, скорость которой растет с увеличением концентрации фермента.

Проведено сравнение стабильности урокиназы по ее амидазной и фибринолитической активностям (рис. 2). Найдено, что обе активности фермента остаются неизменными в течение 6 ч при 4°C (кривые 1 и 3), в то время как при 37°C урокиназа, быстро теряя фибринолитическую активность (кривая 2), полностью сохраняет способность гидролизовать S-2444 (кривая 4). Кривая 2 линеаризуется в координатах реакции второго порядка, что свидетельствует об автолитическом характере падения фибринолитической активности фермента. Значение константы автолиза урокиназы найдено равным $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ (pH 7.4; 37°C).

По данным электрофореза в невосстанавливающих условиях видно, что инактивация урокиназы сопровождается появлением двух полос с молекулярными массами 33 и 16 кДа, интенсивность которых растет с увеличением времени инкубации, в то время как интенсивность полосы нативной урокиназы (M 54 кДа) уменьшается (рис. 3а).

Через 24 ч инкубации обнаруживается и 12-кДа продукт деградации. Чтобы проверить, какая цепь фермента подвергается расщеплению, был проведен электрофорез в восстанавливающих условиях нативной и инкубированной в течение 48 ч (при 37°C и pH 7.4) урокиназы. Из рис. 3б видно, что деградирует легкая А-цепь урокиназы, а ее тяжелая В-цепь не меняется в результате автолиза. Сохранение амидазной активности урокиназы, вероятно, обусловлено стабильностью ее протеиназного домена. Полученные результаты (рис. 3) и аналогичные литературные данные [3, 8, 10] указывают на то, что НМВ-Ук (M 54 кДа) превращается в ЛМВ-Ук (M 33 кДа) в результате автолитической деградации ее легкой А-цепи.

Из сопоставления данных рис. 2 и 3 видно, что процессы превращения НМВ-Ук в ЛМВ-Ук и падения фибринолитической активности не синхронны. Кроме того, известно, что ЛМВ-Ук является также одной из активных форм урокиназы [1–3]. Тогда высокая степень падения фибринолитической активности НМВ-Ук (85% за 6 ч инкубации при 37°C, рис. 2) может быть объяснена тем, что в протеиназном домене происходит локальное разворачивание отдельных участков полипептидной цепи, ответственных за белок-белковые взаимодействия и не существенных для гидролиза низкомолекулярного субстрата. Так, Porter с соав. [11] показали, что при инкубации при 60°C и оптимальных значениях pH (5.0–7.0) ЛМВ-Ук максимально сохраняет ферментативную активность, в то время как при pH 7.5 (вне области максимальной pH-стабильности) фермент быстро теряет активность из-за разворачивания отдельных доменов молекулы, приводящего к

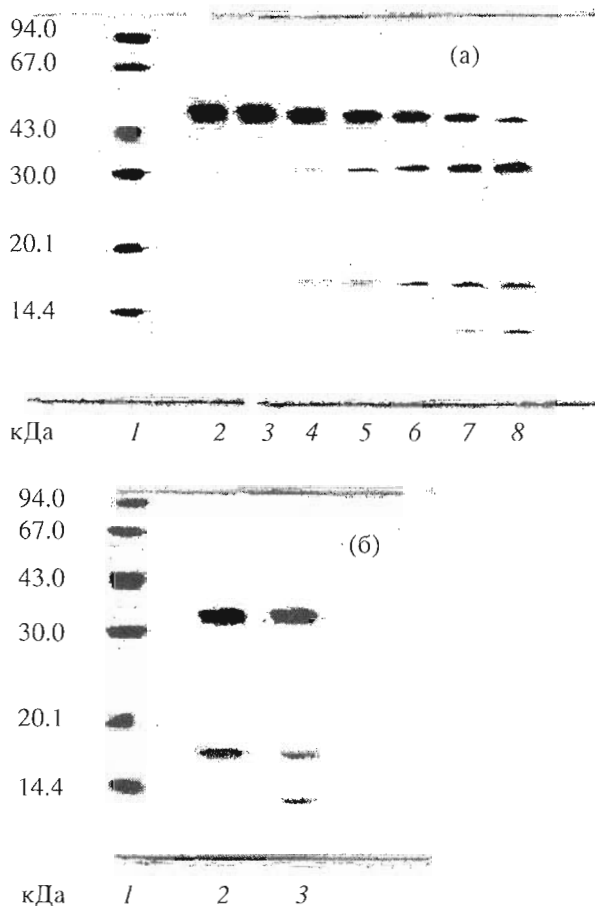


Рис. 3. SDS-электрофорез в 12% полиакриламидном геле в невосстанавливающих (а) и восстанавливающих условиях (б) урокиназы после инкубации при 37°C (рН 7.4). Время инкубации, ч: (а) – 0 (2), 1 (3), 2 (4), 3 (5), 5 (6), 24 (7), 48 (8); (б) – 0 (2) и 48 (3). Дорожки 1 – маркеры молекулярных масс LMW Calibration Kit.

экспонированию гидрофобных групп. Вероятно, для фибринолитической активности НМВ-Ук, реализуемой через активацию плазминогена на фибрине, важна интактность и протеиназного домена, и легкой цепи молекулы. При этом амидазная активность является действительным индикатором плазминоген-активаторной активности для нативной урокиназы, однако для локально развернутой или частично деградированной молекулы активатора сохранение (или потеря) амидазной активности может не соответствовать его плазминоген-активирующей способности.

Причиной того, что другие авторы [3, 8, 10] не наблюдали значительной инактивации фибринолитической активности НМВ-Ук при 37°C, может быть отмеченный эффект агрегации молекул урокиназы при повышенных температурах в условиях инкубирования высоких концентраций фермента (5.5–18.5 мкМ) [8, 11] и использование длительного метода оценки активности, когда лизис преформированных фибриновых пластин под

действием нанесенной урокиназы измерялся через 16–18 ч [3, 10] – время, в течение которого агрегаты могут распадаться, создавая ложный эффект стабилизации. В настоящей работе концентрация НМВ-Ук не превышала 2 мкМ, а для оценки фибринолитической активности использовался быстрый метод измерения лизиса фибринового сгустка, сформированного в присутствии плазминогена и урокиназы. Последняя предварительно разбавлялась так, чтобы время лизиса варьировало в пределах 1–5 мин (т.е. в пределах достоверного интервала калибровочной кривой). Подтверждением того, что длительность метода определения активности может снижать эффект инактивации, служат результаты, полученные при контрольном измерении активности методом фибриновых пластин в ходе инкубации 2 мкМ НМВ-Ук при 37°C: степень инактивации составила только 42% через 6 ч (ср. рис. 2) и 62% через 24 ч.

Чтобы выбрать условия сохранения НМВ-урокиназой ее фибринолитической активности при 37°C, проверяли действие на фермент различных агентов, потенциально способных стабилизировать протеиназы.

Добавление в инкубируемый раствор НМВ-Ук 20% глицерина, который за счет увеличения вязкости среды может снижать автолиз протеиназ, не привело к стабилизации фермента при его концентрации 2 мкМ (рис. 4а). Незначительный эффект стабилизации наблюдался при более низких концентрациях фермента.

Было изучено также стабилизирующее действие *L*-лизина, который является конкурентным ингибитором трипсиноподобных протеиназ, в частности плазмина [12], а также связывается с крингдоменами плазмина (плазминогена), НМВ-Ук и тканевого активатора плазминогена [13, 14]. Предварительно было исследовано ингибирующее действие *L*-лизина на гидролиз S-2444 урокиназой (амидазная активность фермента) и определена константа ингибирования. Найденное значение K_i (150 мМ) указывает на то, что *L*-лизин – слабый конкурентный ингибитор урокиназы. В то же время было обнаружено, что присутствие *L*-лизина в сгустке в концентрации выше 2.2 мМ снижает фибринолитическую активность фермента, вероятно, в результате ингибирования как реакции активации плазминогена урокиназой, так и лизиса фибрина образующимся плазмином [12]. Поэтому концентрация *L*-лизина в инкубируемом растворе урокиназы не превышала 25 мМ. Как видно из рис. 4б, *L*-лизин в такой концентрации, так же как глицерин, проявляет незначительный стабилизирующий эффект.

Подобный же эффект стабилизации наблюдался и в присутствии 0.5% альбумина, который, как известно, образуя комплекс с НМВ-Ук, частично препятствует ее инактивации при лиофилизации [5] (рис. 4в).

Использование маннитола, парных комбинаций вышеперечисленных агентов, а также варьирование их концентраций не способствовали сохранению фибринолитической активности фермента при 37°C (данные не приведены).

Значительный стабилизирующий эффект для урокиназы в микромолярных концентрациях был получен лишь при совместном использовании всех агентов (рис. 4г). Наблюдаемое явление может быть связано с тем, что каждый агент вносит свой вклад в общий эффект стабилизации фермента, т.е. защищает его от термоинактивации и автолиза, либо обратимо блокируя активный центр и чувствительные к протеолизу пептидные связи молекулы фермента, либо способствуя сохранению гидрофобных и водородных связей полипептидной цепи, т.е. интактности нативной конформации белковой глобулы.

Таким образом, HMW-Uk теряет фибринолитическую активность в ходе инкубации при pH 7.4 и 37°C, в то время как ее амидазная активность полностью сохраняется. В процессе инактивации HMW-Uk (M 54 кДа) превращается в LMW-Uk (M 33 кДа) с отщеплением 16-кДа фрагмента легкой цепи. Из анализа экспериментальных и литературных данных следует, что инактивация фибринолитической активности HMW-Uk – сложный процесс, включающий как локальное разворачивание и частичную денатурацию отдельных доменов глобулы при 37°C, так и автолитическую деградацию легкой цепи фермента ($k_{\text{авт}} 3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$). В результате исследования стабилизирующего действия различных агентов найден оптимальный состав, который максимально стабилизирует фибринолитическую активность микромолярных концентраций фермента. Полученные данные показывают, что амидазная активность не всегда является индикатором эффективности тромболитических агентов, в частности HMW-Uk.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы двухцепочечная урокиназа из мочи человека со специфической активностью 100000 МЕ/мг фермента (HMW-Uk, M 54 кДа, Green Cross, Корея); фибриноген человека, содержащий 52% свертываемого белка, Lys-форма плазминогена человека и тромбин человека (Предприятие диагностических и лекарственных препаратов, Беларусь); бычий фибриноген, содержащий 64% свертываемого белка (Каунасское предприятие бакпрепаратов, Литва); сывороточный альбумин человека (95% электрофоретически чистого белка) и реагенты для электрофореза (Reanal, Венгрия); *L*-лизин, *D*-маннитол и *n*-нитроанилид Glp-Gly-Arg, S-2444 (Sigma, США); набор низкомолекулярных белковых маркеров, LMW Calibration Kit (Pharmacia, Швеция).

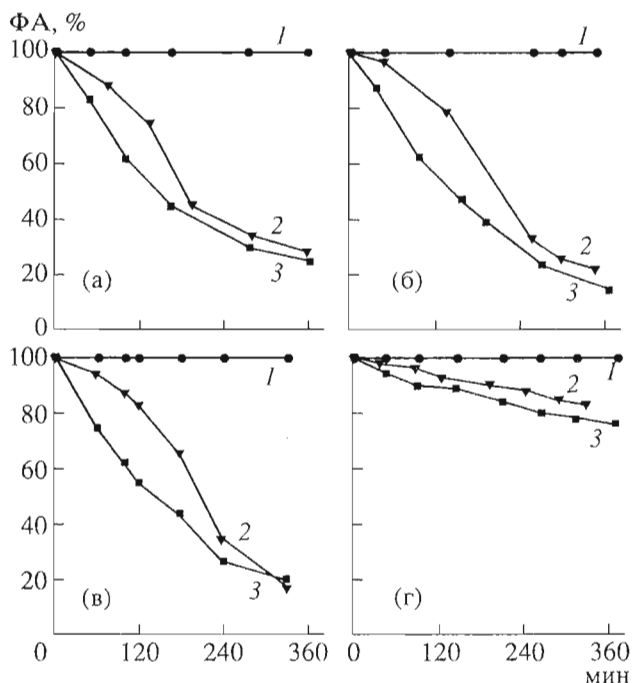


Рис. 4. Стабильность фибринолитической активности урокиназы при 37°C в буфере А, содержащем 20% глицерин (а), 0,025 М *L*-лизин (б), 0,5% альбумин (в) и смесь этих агентов с 1% *D*-маннитолом (г). Концентрация урокиназы (мкМ): 0,009 (1), 1 (2) и 2 (3).

Остальные реактивы были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Инактивацию урокиназы изучали, инкубируя различные концентрации фермента (9 нМ – 2 мкМ) в 0.1 М фосфатном буфере, содержащем 0.15 М NaCl, pH 7.4 (буфер А) при 4 и 37°C. В ходе инкубации отбирали пробы, измеряли их амидазную и фибринолитическую активности и параллельно подвергали SDS-электрофорезу в 12% ПААГ. В экспериментах по стабилизации фибринолитической активности урокиназы буфер А содержал: 1) 20% глицерин, 25 мМ *L*-лизин или 0.5% альбумин по отдельности; 2) парные комбинации этих агентов и 3) смесь этих агентов с 1% *D*-маннитолом. Каждый эксперимент по инактивации фермента повторяли 3 раза.

Амидазную активность урокиназы измеряли по начальной скорости гидролиза 0.4 мМ раствора S-2444 в буфере А при 405 нм на спектрофотометре Philips (Англия). Конечная концентрация фермента составляла 1–100 нМ, объем реакционной смеси 1 мл. При определении константы ингибирования амидазной активности урокиназы *L*-лизинном концентрацию последнего варьировали в интервале 0–0.9 М, концентрация фермента была 100 нМ.

Фибринолитическую активность урокиназы определяли по времени полного лизиса фибринового сгустка, содержащего плазминоген и уроки-

назу (модифицированный метод Кристенсена [15]). Для этого в стандартную пробирку (d 10 мм) последовательно вносили 0.1 мл исследуемого раствора урокиназы, 0.4 мл раствора фибриногена человека (4 мг/мл по коагулируемому белку), 0.1 мл раствора плазминогена (1 мг/мл) и 0.1 мл раствора тромбина (30 МЕ/мл) в 0.05 М фосфатном буфере, pH 7.4 (буфер Б). Содержимое пробирки быстро перемешивали, помещали в термостат при 37°C и регистрировали время лизиса образовавшегося сгустка. Фибринолитическую активность испытуемого раствора фермента рассчитывали по калибровочной кривой, полученной для растворов стандартной урокиназы с активностью 25–400 МЕ/мл, для которых время лизиса составляет 1–5 мин. Для этого пробы, отобранные в ходе инактивации урокиназы (50–12 000 МЕ/мл), предварительно разбавляли в 2–50 раз и в формирующийся сгусток вносили 0.1 мл разбавленной пробы. В контрольном эксперименте было установлено, что присутствие стабилизирующих добавок в сгустке в конечных концентрациях 2.2 мМ (*L*-лизин), 0.1% (*D*-маннитол), 2% (глицерин) и 0.05% (альбумин) и ниже не влияет на определение фибринолитической активности урокиназы. Измерение активности каждой пробы дублировали.

Метод лизиса фибриновых пластин стандартной толщины [16] был также использован для контроля фибринолитической активности в ходе инкубации 2 мкМ раствора урокиназы в буфере А (без стабилизирующих добавок) при 37°C. Для этого на пластины, полученные смешением 1 мл раствора бычьего фибриногена (3 мг/мл по коагулируемому белку) и 0.25 мл раствора тромбина (20 МЕ/мл) в буфере Б, наносили 10 мкл разбавленных в 120 раз проб фермента. Через 16 ч инкубации при 37°C определяли площади зон лизиса и фибринолитическую активность проб выражали в процентах от активности исходного раствора. Измерение каждой пробы дублировали.

SDS-электрофорез в 12% полиакриламидном геле проводили в аппарате Mini-Protean II (Bio-

Rad, США) [17]. Электродный буфер содержал 100 мМ Трис-HCl, 100 мМ Трицин и 0.1% SDS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-48588).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lijnen H.R., Stump D.S., Collen D.S. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1987. V. 13. P. 152–159.
2. Soberano M.E., Ong E.B., Johnson A.J., Levy M., Schoellmann G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. V. 445. P. 763–773.
3. Nobuhara M., Sakamaki M., Ohnishi H., Suzuki Y. // *J. Biochem.* 1981. V. 90. P. 225–232.
4. Munk G.A.W., Rijken D.S. // *Fibrinolysis.* 1990. V. 4. P. 1–9.
5. Shimizu K., Nakahara T., Kinoshita T. // *Plasminogen Activator Derivatives.* USA Patent. № 4495285. 1985.
6. Celander D.R., Langlinais R.P., Guest M.M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1955. V. 55. P. 286–287.
7. Ploug J., Kjeldgaard N.O. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1957. V. 24. P. 278–282.
8. Miwa N., Obata Y., Suzuki A. // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. P. 472–475.
9. Yabushita Y. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1988. V. 10. P. 294–300.
10. Kajihara J., Shibata K., Kato K. // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997. V. 61. P. 197–198.
11. Porter W.R., Staack H., Brandt K., Manning M.C. // *Thromb. Res.* 1993. V. 71. P. 265–279.
12. Айсина Р.Б., Гайсарян Е.С., Снитко Я.Э., Варфоломеев С.Д. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 182–189.
13. Thorsen S., Mullerts S. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1974. V. 34. P. 167–176.
14. Kelley R.F., Cleary S. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 4047–4054.
15. Christensen L.R. // *Proc. Soc. Biol. Med.* 1941. V. 46. P. 674–679.
16. Astrup T., Mullerts S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V. 40. P. 346–351.
17. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–373.

In vitro Inactivation and Stabilization of Fibrinolytic Activity of Urokinase

R. B. Aisina[#], L. I. Mukhametova, I. Yu. Sazonova, and S. D. Varfolomeev

Lomonosov State University, Moscow, Faculty of Chemistry, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

When incubated at 30°C and pH 7.4, urokinase lost fibrinolytic activity (i.e., the plasminogen-activating activity measured by the time of fibrin clot lysis) but completely retained amidase activity. The enzyme inactivation rate depended on the urokinase concentration and, at concentrations of more than 1.5 μ M, was described by a second order equation, which indicated that the enzyme underwent autolytic degradation ($k_{\text{aut}} = 3.8 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). During incubation, urokinase (54 kDa) was converted into its low-molecular-mass form (33 kDa) and products of the A-chain degradation. The amidase activity did not correlate with the fibrinolytic activity in the cases when the enzyme molecule underwent local unfolding or partial degradation. The optimum mixture of agents for stabilizing the fibrinolytic activity of urokinase was found.

Key words: urokinase, amidase and fibrinolytic activities, inactivation kinetics, autolysis, stabilization

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 939-0997; e-mail: arb@enzyme.chem.msu.su.