



УДК 577.152.844(344)

ГИДРОЛИЗ $\text{Glu}(\gamma \rightarrow \epsilon)\text{Lys}$ -АМИДНЫХ СВЯЗЕЙ В D-ДИМЕРЕ, ФРАГМЕНТЕ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ФИБРИНА, ДЕСТАБИЛАЗОЙ ИЗ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

© 1999 г. И. П. Баскова*#, Л. Л. Завалова***, А. В. Басанова*, О. В. Григорьева**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,***биологический, **химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы;*****Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 20.12.98 г. Принята к печати 15.02.99 г.

Исследована зависимость скорости $\text{Glu}(\gamma \rightarrow \epsilon)\text{Lys}$ -изопептидолиза дестабилазой из медицинской пиявки от концентрации ее высокомолекулярного субстрата, D-димера, продукта ограниченного протеолиза стабилизированного фибрина плазмином. Образование продукта реакции оценивали электрофоретически по нарастаю количеству образующегося D-мономера. Показано, что эта зависимость имеет нелинейный характер.

Ключевые слова: дестабилаза; изопептидолиз; катализ; фибрин; D-димер; медицинская пиявка.

Ковалентные связи между боковыми цепями остатков Glu и Lys в белковых молекулах – изопептидные связи – образуются под действием специфических Ca^{2+} -зависимых трансглутаминаз, которые катализируют посттрансляционную модификацию белков [1]. Такие связи широко представлены в белках, участвующих в регуляции жизненно важных функций организма [2]. Формирование изопептидных связей сопровождается полимеризацией белковых молекул. Особенность этих связей – их резистентность к протеолитическим ферментам, химическим и механическим воздействиям [3]. Наиболее изученной трансглутаминазой является фактор XIIIa или фибринстабилизирующий фактор плазмы крови, который обеспечивает образование изопептидных связей между двумя γ - и двумя α -цепями отдельных мономеров фибрина, входящих в состав полимерного белка, на последней стадии свертывания крови (рис. 1). Таким образом, фактор XIIIa участвует в формировании нерастворимого в 6 М мочевины и относительно резистентного к протеолизу стабилизированного фибрина, представляющего основу прочного гемостатического тромба [3]. В процессе фибринолиза под действием плазмина гидролизуются междоменные пептидные связи, а соединенные через γ -цепи изопептидными связями D-домены остаются в виде димеров (D-ди-

меры) как конечные продукты фибринолиза или тромболитического при тромболитической терапии (рис. 1).

Дестабилаза – эндо- $\text{Glu}(\gamma \rightarrow \epsilon)\text{Lys}$ -изопептидаза, продуцируемая слюнными железами медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*), – первый и пока единственный известный фермент, способный катализировать гидролиз эндоизопептидных связей в белках. Она обеспечивает растворение стабилизированного фибрина [4, 5] и гидролиз (мономеризацию) D-димера, продукта протеолитической деградации стабилизированного фибрина плазмином [6, 7]. Определенная методом SDS-ПААГ-электрофореза молекулярная масса дестабилазы составляет 12.3 кДа [8]. D-димер – белок с молекулярной массой 190 кДа, в составе которого присутствуют фрагменты всех трех цепей фибриногена – α , β и γ . Момеры в D-димере прочно соединены двумя изопептидными связями, образованными остатками Lys405 и Gln397 близко расположенных γ -цепей двух молекул фибрин-мономера [3].

Изопептидолиз под действием дестабилазы был продемонстрирован на примере гидролиза диизопептида $\text{Glu}(\gamma \rightarrow \epsilon)\text{Lys}$ [9]. Прямым доказательством эндоизопептидолиза полимерного субстрата высокоочищенным препаратом дестабилазы явилась идентичность N-концевых аминокислотных последовательностей γ -цепи D-димера и γ -цепей D-мономеров (рис. 1), образующихся в результате гидролиза изопептидных связей [10]. Эксперименты на животных однозначно подтвердили тромболитическое действие полученного препарата дестабилазы [5].

Сокращения: изопептидные связи – $[\text{Glu}(\gamma \rightarrow \epsilon)\text{Lys}]$ -амидные связи, образованные γ -карбоксилами Glu и ϵ -аминогруппами Lys-остатков.

Автор для переписки (факс: (095) 330-65-38; e-mail: leech@humgen.siobc.ras.ru).

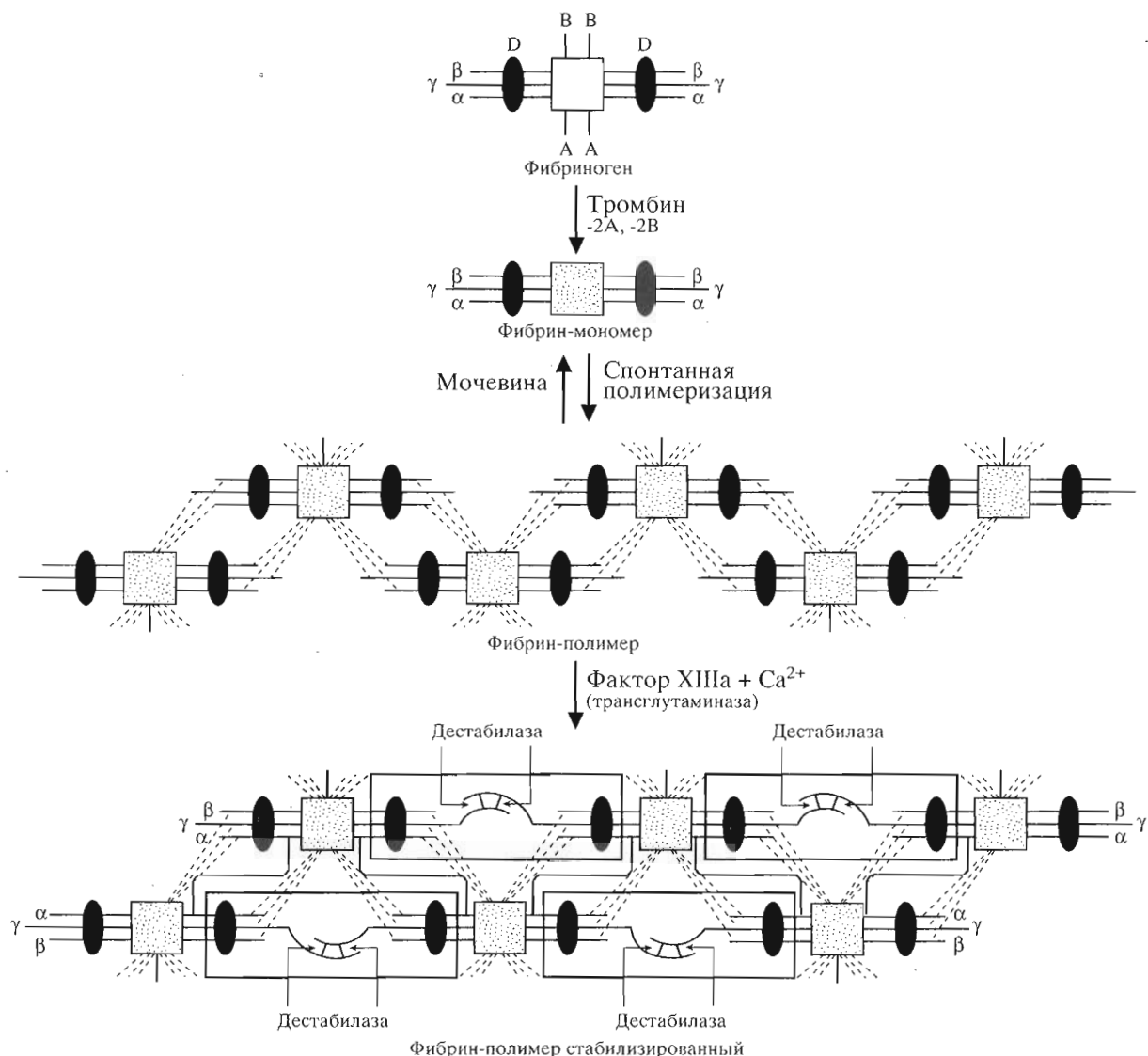


Рис. 1. Схема образования стабилизированного фибрина с обозначением изопептидных связей, гидролизуемых дестабилазой. Квадраты – центральные E-домены фибриногена и фибрин-мономера, образующегося после отщепления под действием тромбина фибринопептидов А и В; черные эллипсы – крайние D-домены. Штриховые линии показывают водородные связи, обеспечивающие спонтанную полимеризацию мономеров фибрина в полимерную сеть, способную растворяться в мочеvine. В нижней части рисунка – стабилизированный фибрин, образующийся под действием трансклутаминазы: короткие отрезки между γ -цепями и изогнутые линии между α -цепями – Glu($\gamma \rightarrow \epsilon$)Lys-изопептидные связи, блоками выделены D-димеры, стрелками отмечены места атаки изопептидных связей дестабилазой.

В настоящей работе приводятся результаты изучения зависимости скорости изопептидолиза дестабилазой D-димера от его концентрации. Препарат дестабилазы, гомогенный по данным электрофореза, обладал удельной D-димер-мономерирующей активностью 3.6×10^{-4} мкмоль $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$. Степень мономеризации D-димера оценивали электрофоретически по нарастанию количества образующегося D-мономера (рис. 2). Скорость реакции определяли по количеству продукта реакции, D-мономера, после 20 ч инкубации с дестабилазой. Эксперименты повторялись не менее трех раз.

Зависимость скорости реакции мономеризации D-димера от концентрации субстрата имеет нелинейный характер (рис. 3). Показано, что при концентрациях субстрата 1.5–2.0 мкМ реакция развивается с постоянной скоростью в течение 46 ч. Такого рода зависимости могут иметь место, если фермент имеет более двух центров связывания субстрата [11]. Однако это кажется маловероятным для дестабилазы, молекулярная масса которой составляет всего 12.3 кДа [8]. Хотя можно предположить, что в условиях проведения ферментативной реакции фермент находится в виде димера или в состоянии более высокой степени олиго-

меризации. Основанием для этого служат факты выявления в отдельных экспериментах ди- и тетрамеров дестабилазы (неопубликованные данные). Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

О степени сродства фермента к субстрату судили по концентрации субстрата, необходимой для достижения половины максимального эффекта. Эта величина, рассматриваемая как характеристика связывания дестабилазы с D-димером, составляет примерно 2.0 мкМ. Эффективность связывания D-димера дестабилазой в реакции изопептидолиза коррелирует с низкой скоростью тромболиза, который наблюдали при введении полочищенных препаратов дестабилазы крысам с преобразованными тромбами в яремной вене. Так, полный лизис тромбов при внутривенном введении фермента отмечается не ранее, чем через 78 ч после его введения. Такие низкие скорости сопоставимы со скоростью репарации сосудистой стенки в месте повреждения, которое обычно провоцирует процессы, приводящие к тромбообразованию. Клиническая практика показывает, что высокая скорость разрушения тромбов так называемыми "срочными" тромболитиками в 30% случаев приводит к ретромбозам, поскольку скорость лизиса намного опережает скорость репаративных процессов в сосудистой стенке [12]. Однако тромболизис, стимулированный дестабилазой, естественно превышает скорость физиологического тромболиза, обусловленного активацией фибринолитической системы организма в ответ на тромбообразование [5]. В связи с вышесказанным дестабилаза несомненно может претендовать на место эффективного "несрочного" тромболитического препарата, который по механизму своего действия принципиально отличается от известных в настоящее время других тромболитических ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дестабилазу выделяли из экстрактов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) и очищали в соответствии с методом [13]. Использовали фибриноген, содержащий примеси фактора XIII и плазминогена, и бычий тромбин Каунасского предприятия бакпрепаратов (Литва). Урокиназа фирмы СНОАУ (Франция). D-Димер фибрина получали в результате протеолиза бычьего фибрина плазмином. 0.3% раствор фибриногена в цитратно-солевом буфере, содержащий примеси фактора XIII и плазминогена (что обусловлено качеством исходного коммерческого препарата фибриногена), превращали в стабилизированный фибрин после добавления к нему раствора тромбина (10 мг в 1 мл физиологического раствора). После инкубации в течение 30 мин на поверхность сгустка наносили урокиназу в количестве, соответствующем 20 МЕ в физиологическом рас-

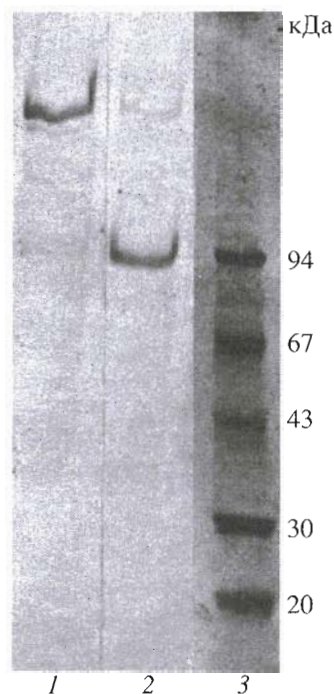


Рис. 2. Изопептидолиз D-димера дестабилазой. SDS-ПААГ-электрофореграмма D-димера (1), продуктов 46-часовой инкубации D-димера (2.8 мкМ) с дестабилазой (0.54 мкМ) (2) и белков-маркеров с обозначенными справа значениями их молекулярных масс (3).

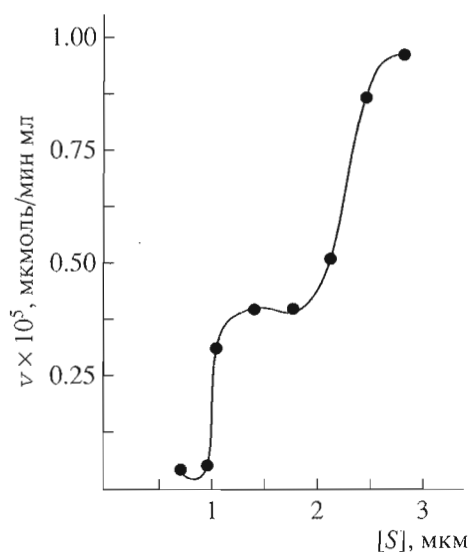


Рис. 3. Зависимость скорости мономеризации D-димера дестабилазой от концентрации субстрата. Условия см. в "Эксперимент. части".

творе на каждые 10 мл исходного раствора фибриногена. Из реакционной смеси D-димер выделяли как описано в работе [14].

Мономеризацию D-димера изучали, используя концентрации субстрата от 0.8 до 2.8 мкМ. Исходная концентрация фермента составляла 0.02 мг/мл

(1.63 мкМ) в 0.02 М Трис-НСI-буфере, рН 7.2. Инкубируемая смесь содержала 10 мкл раствора дестабилазы и 20 мкл раствора нужной концентрации D-димера в том же буфере, инкубация продолжалась 20 ч при 37°C. Соотношение концентраций субстрата и фермента составляло 1.5/1, 3.3/1, 4/1 и 5.6/1 при концентрациях D-димера 0.8, 1.7, 2.0 и 2.8 мкМ соответственно.

Изопептидолиз оценивали методом SDS-электрофореза в градиенте концентраций (4–16%) полиакриламидного геля по количеству образовавшегося D-мономера. Денситометрию окрашенных электрофореграмм проводили с использованием лазерного денситометра 2202 "Ultrascan" фирмы ЛКВ (Швеция) при длине волны 632.8 нм.

В заключение выражаем благодарность заведующему лабораторией структуры и функции генов человека Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН академику Свердлову Евгению Давидовичу за всемерную поддержку работ по исследованию дестабилазы.

Работа выполнена за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 96-04-49294.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Folk J.E., Finlayson J.E. // *Adv. Prot. Chem.* 1977. V. 31. P. 1–133.
2. Aeschlimann D., Paulsson M. // *Thrombosis Haemostasis*. 1994. V. 71. P. 402–415.
3. Doolittle R.T. // *Ann. Rev. Biochem.* 1984. V. 53. P. 195–229.
4. Баскова И.П., Никонов Г.И. // *Биохимия*. 1985. Т. 50. С. 424–431.
5. Baskova I.P., Nikonov G.I. // *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 1990. V. 2. P. 167–172.
6. Завалова Л.Л., Никонов Г.И., Кузина Е.В., Попова Г.Ю., Баскова И.П. // *Биохимия*. 1991. Т. 56. С. 115–124.
7. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Кузина Е.В. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 492–497.
8. Баскова И.П., Никонов Г.И., Завалова Л.Л., Ларионова Н.И. // *Биохимия*. 1990. Т. 55. С. 674–679.
9. Баскова И.П., Тимохина Е.А., Никонов Г.И., Степанов В.М. // *Биохимия*. 1990. Т. 55. С. 771–775.
10. Zavalova L.L., Kuzina E.V., Levina N.B., Baskova I.P. // *Thrombosis Research*. 1993. V. 71. P. 241–244.
11. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 2. М.: Мир, 1992.
12. Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе / Ред. Е.И. Чазов, В.Н. Смирнов. М.: Медгиз, 1983.
13. Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Snezhkov E., Bereznoy S., Bogdanova E., Barsova E., Sverdlov E. // *Mol. Gen. Genet.* 1996. V. 253. P. 20–25.
14. Мусяковская А.О., Ходорова Э.Л., Позднякова Т.М. // *Укр. биохим. ж.* 1976. Т. 46. С. 139–143.

Destabilase from the Medicinal Leech: The Hydrolysis of Isopeptide Bonds in D-Dimer, a Fragment of Stabilized Fibrin

I. P. Baskova*#, L. L. Zavalova***, A. V. Basanova*, and O. V. Grigor'eva**

*Biological Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 117234 Russia

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

A study was made of the dependence of the hydrolysis rate of isopeptide bonds in the D-dimer, the product of limited proteolysis of the stabilized fibrin by plasmin, on the high-molecular substrate concentration catalyzed by destabilase from the medicinal leech. The formation of the reaction product was electrophoretically measured by the increase in the quantity of D-monomer. This dependence was shown to be nonlinear.

Key words: destabilase, isopeptidase, catalysis, fibrin, D-dimer, medicinal leech

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7029; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: leech@humgen.siobc.ras.ru.