

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРИПСИНО-ПОДОБНЫХ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ. 1. ИЗУЧЕНИЕ АКТИВАЦИИ МИНИПЛАЗМИНОГЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА

© 2018 г. Т.И. Белянко, Я.Г. Гурский, Н.И. Добрынина, А.В. Орлова, Н.М. Руткевич, Л.П. Савочкина, А.В. Скамров, Н.А. Скрыпина, Р.Ш. Бибилашвили  
 Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: Robert.Bibilashvili@gmail.com

Поступила в редакцию 02.08.18 г.

Показано, что кривая зависимости изменения флуоресценции триптофана от времени при активации плазминогена урокиназой хорошо коррелирует с кинетическими кривыми активации, полученными как по результатам измерения амидолитической активности образующегося плазмина, так и по результатам анализа продуктов расщепления плазминогена. Взаимная корреляция трех кривых наблюдается в широком диапазоне изменения pH и температуры. Выдвинута гипотеза, что изменение флуоресценции вызвано разворотом Trp215 плазмина (номер аминокислотного остатка по химотрипсиновой номенклатуре), который происходит после расщепления плазминогена в процессе активации. При повороте триптофана его бензольное кольцо изменяет полярное окружение от отрицательно заряженных аминокислот (Asp194 и Glu143) к положительно заряженной зоне (Arg175), чем и обусловлен длинноволновый сдвиг спектра излучения. Показано, что поворот Trp215 реализуется в отсутствие ингибитора или субстрата, вытесняющего индольное кольцо из субстратузнающего кармана. Также показано, что конформация плазминогена (по крайней мере, связанная с положением Trp215 в субстратузнающем кармане) нечувствительна к изменению pH и температуры, тогда как плазмин демонстрирует изменения спектра флуоресценции, коррелирующие с амидолитической активностью.

*Ключевые слова:* Плазминоген, флуоресценция триптофана, активация фермента, каталитический домен, взаимосвязь структуры и ферментативной активности.

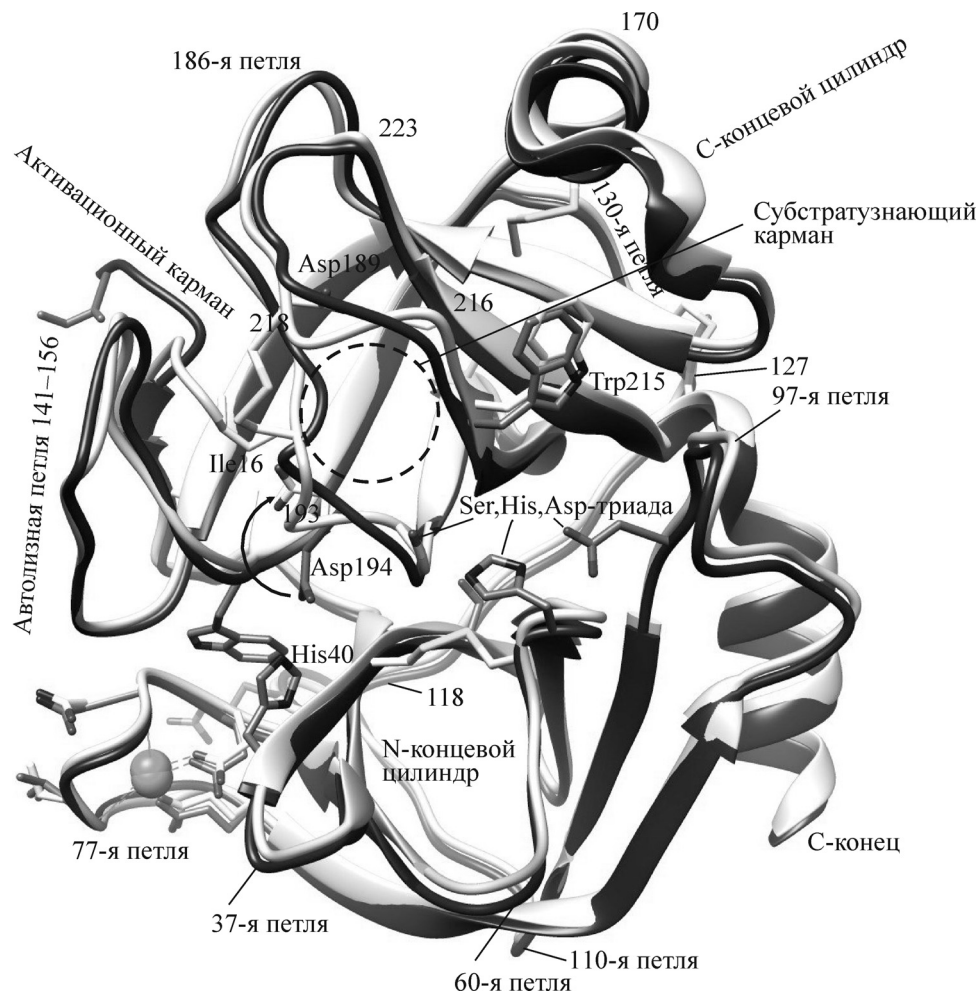
DOI: 10.1134/S0006302918050046

Сериновые протеиназы (гомологичные химотрипсину, класс S1A1 по классификации MEROPS [1]) играют ключевую роль во множестве биологических процессов: пищеварении, активации гормонов, регуляции гемостаза, реакции комплемента и др. Это самое обширное семейство изученных пептидаз [1]. Активность сериновых протеиназ регулируется на уровне транскрипции, посттрансляционной модификации, а также множеством эндогенных и экзогенных факторов (ингибиторов и активаторов) [2–4]. Ферменты, как правило, производятся в форме зимогенов – неактивных предшественников, ста-

бильных и устойчивых в этой форме к эндогенным ингибиторам [2–4].

При огромном разнообразии функций пространственная организация сериновых протеиназ весьма консервативна. Схожие участки пространственной структуры проиллюстрированы (рис. 1) на примере трипсина и трипсиногена [5]. Основой структуры являются два скрещенных под почти прямым углом открытых цилиндра, образованных антипараллельными бета-листами. Прилежащий к С-концу цилиндр прошит несколькими S–S-связями и создает достаточно прочный каркас. Цилиндры соединены между собой длинной и очень гибкой петлей (аминокислотные остатки 118–127), проходящей наискось через всю проекцию молекулы. В формировании связи между цилиндрами участвуют «автолизная» петля (вариабельная как по первичной, так и по пространственной структуре) и большая альфа-спираль на С-конце молекулы (рис. 1).

Сокращения: Plg – плазминоген, Pln – плазмин, mPlg – миниплазминоген, mPln – миниплазмин, uPA – активатор плазминогена урокиназного типа, sc\_uPA – однопочечная проформа uPA, tc\_uPA – двухпочечная активированная форма uPA; числа при аминокислоте в скобках обозначают порядковый номер аминокислотного остатка в структуре молекулы, без скобок – номер аминокислотного остатка по химотрипсиновой номенклатуре.



**Рис. 1.** Пространственная структура трипсина и трипсиногена. Показано положение аминокислот, обсуждаемых в тексте. N-концевой бета-цилиндр расположен перпендикулярно плоскости рисунка в его нижней части. С-концевой бета-цилиндр расположен в верхней части рисунка. Его ось находится в плоскости проекции рисунка под углом примерно  $45^\circ$  к горизонтали. Плоскость, в которой расположены аминокислоты активного центра, перпендикулярна плоскости рисунка и проходит по его середине. Субстратная борозда проходит почти параллельно оси С-концевого цилиндра. Показано положение петель обычно удлиненных в других протеиназах трипсинового семейства. Поворот Asp194 при активации фермента обозначен стрелкой. (Рисунок построен на основании координат атомов трипсина и трипсиногена, депонированных в базе данных RCSB PDB [6] (PDB ID: 2TGT и 3PTN [5]) с использованием программы UCSF Chimera 1.10 [7].) Нумерация аминокислотных остатков приведена по химотрипсиновой номенклатуре [2].

При удивительной консервативности пространственной структуры первичные структуры этих пептидаз, в том числе участков, образующих каркас молекулы, весьма разнообразны. Отличия в электростатических потенциалах и гидрофобности отдельных участков очень велики. В целом структура молекул весьма гибкая, чем и обеспечена способность пептидаз к аллостерической регуляции [8] множеством факторов как эндогенных, так и экзогенных [3,4,9]. Из экзогенных регуляторов наиболее известны стрептокиназа и стафилокиназа [9], аллостерически активирующие плазминоген (Plg). Из эндогенных пар наиболее изучены: тромбомодулин – тромбин, фактор Va – фактор Ха, фак-

тор VIIa – фактор IXa [10], тромбоспондин – фактор VIIa [11] и тромбоспондин – фактор X. Сериновые протеиназы – факторы VIIa, IXa и Ха, «активированные» в результате расщепления пептидной связи между 15 и 16 аминокислотными остатками, практически лишены ферментативной активности, если не связаны со своими аллостерическими активаторами. Связывание увеличивает их ферментативную активность на несколько порядков величин [12–16].

Функциональная вариабельность сериновых пептидаз, кроме изменчивости первичной структуры остова, обеспечивается вариациями раз-

меров выходящих на периферию петель (вблизи аминокислот 37, 60, 77, 97, 110, 130, 170, 186, 223 и в автолизной петле (рис. 1)).

Структура зимогенов рыхлая [2] и, видимо, метастабильная, в отличие от активированной формы, которая компактна и стабильна [3,4].

Активация зимогенов происходит в основном при расщеплении пептидной связи между аминокислотными остатками 15 и 16 (по химотрипсиновой номенклатуре). В трипсиновом подсемействе аминокислотные остатки 16 и 17 гидрофобные и алифатические (Ile, Val, Leu), за ними следуют гибкие Gly 18 и 19. После расщепления новый N-конец белка втягивается в гидрофобный «активационный» карман. При этом образуется солевой мостик между положительно заряженным N-концом 16-го аминокислотного остатка и Asp194. Аминокислотный остаток Asp194, ориентированный в зимогене на His40 (рис. 1), разворачивается примерно на 120°, формируя петлю вокруг Gly193 (стабилизирующая оксианионная петля). Две внутренние, очень подвижные «неупорядоченные» цепи (random coil) между аминокислотными остатками 185–195 и 215–223 формируют «карман», в котором при реакции расщепления пептидной связи пептидазой помещается боковая цепь аминокислотного остатка субстрата (Lys или Arg для трипсин-подобных пептидаз). Расщепление происходит за этим аминокислотным остатком. Карман обычно называют «активационным» или «субстратузнающим» участком [2,3].

Кроме участка вокруг оксианионной петли, заметные изменения в структуре происходят в зоне между Gly216 и Gly218. Триада Ser195, His57, Asp102, составляющая активный центр, расположена в отдельных субдоменах пептидаз на разных сторонах ложбины, в которую укладывается расщепляемая цепь субстрата. В ложбину помещается восемь аминокислотных остатков субстрата. Для них используется номенклатура P4P3P2P1/P1'P2'P3'P4'. P4 размещается вблизи Trp215, P1 возле Ser195, а ее протяженная положительно заряженная боковая цепь образует солевой мостик с Asp189, занимая все пространство между упомянутыми «неупорядоченными» цепями субстратузнающего участка. Отщепляемая C-концевая часть субстрата располагается над N-концевым бета-цилиндром, выходя к 37-й петле. Размещение субстрата в активном центре фермента проиллюстрировано на примере фрагмента антитромбина III и тромбина на рис. 2 [17]. Субстрат (HeAlaGlyArg[SerLeuAsnPro]) с восемью аминокислотами заполняет весь субстратный желобок.

Два основных исполнительных фермента гемостаза – тромбин и плазмин (Pln) – при активации изменяют структуру участка, заключенного между аминокислотными остатками 185–195 и 215–223 («субстратузнающий» участок, описанный выше), более радикально, чем показано на рис. 1. У Plg [18,19] и протромбина [20,21] триптофан 215 развернут так, что он располагается в «субстратузнающем» участке и полностью перекрывает доступ боковой цепи Arg субстрата в эту зону (рис. 3). У протромбина (и претромбина) кроме Trp215 в этом процессе участвуют также Trp60D и Trp148 [20,21]. Оба этих фермента, так же как и проурокиназа, практически неактивны в проформе, тогда как некоторые пептидазы трипсиновой группы, такие как, например, тканевой активатор плазминогена (tPA), в проформе практически так же активны, как и в активированной форме. Нам представляется, что именно размещение Trp215 в «субстратузнающем» кармане профермента определяет высокую степень его «зимогенности».

Таким образом, можно предположить, что необходимым условием активации Plg и протромбина является не только расщепление пептидной связи между Arg15 и Val16, но и изменение конформации молекулы, приводящее к повороту Trp215 [18–24]. При повороте Trp215 вокруг оси, проходящей через C-альфа 214 и C-альфа 216, изменяется окружение триптофана. Разворот индольного кольца Trp215 приводит к тому, что бензольное кольцо этого триптофана в Plg находится в тесном соседстве с отрицательно заряженными аминокислотами (окрашены красным цветом), тогда как в плазмине это кольцо соседствует с положительно заряженной аминокислотой Arg175 и гидрофобным Leu217 (рис. 3). Если принять во внимание влияние окружения на спектр флуоресценции триптофана, то можно ожидать, что изменение конформации плазминогена при активации может приводить к значительному изменению спектра флуоресценции [25,26]. Необходимо также отметить, что разворот триптофана обнажает карбонил пептидной связи Ser214–Trp215 для взаимодействия с His57, требующегося наряду с оксианионной петлей для реакции ацилирования и деацилирования субстрата Ser195.

В данной работе мы анализировали изменение флуоресценции триптофана при активации миниплазминогена (mPlg) микроколичествами урокиназы с образованием миниплазмينا. Полученную кривую зависимости изменения флуоресценции триптофана от времени при активации сравнили с кинетическими кривыми



**Рис. 2.** Пространственная структура комплекса каталитического домена тромбина с фрагментом антитромбина III в субстратной борозде тромбина. Ленточная структура на заднем плане – малая некаталитическая субъединица альфа-тромбина. Аминокислоты тромбина обозначены в однобуквенной нотации, а субстрата – в трехбуквенной нотации (PDB ID: 1TB6 [17]).

активации, полученными как по результатам измерения amidолитической активности образующегося миниплазмина, так и по результатам анализа продуктов расщепления миниплазминогена.

Здесь кажется уместным отметить, что все структурные данные, приведенные на рис. 3, соответствуют активированным формам плазмина 1bui и 1bml [22,24] и относятся к комплексам плазмина со стрептокиназой и стафилокиназой. Структурных данных для свободного активного фермента в литературе не имеется. Наше исследование выполнено со свободным плазмином, не ингибированным и не инактивированным мутагенезом в активном центре.

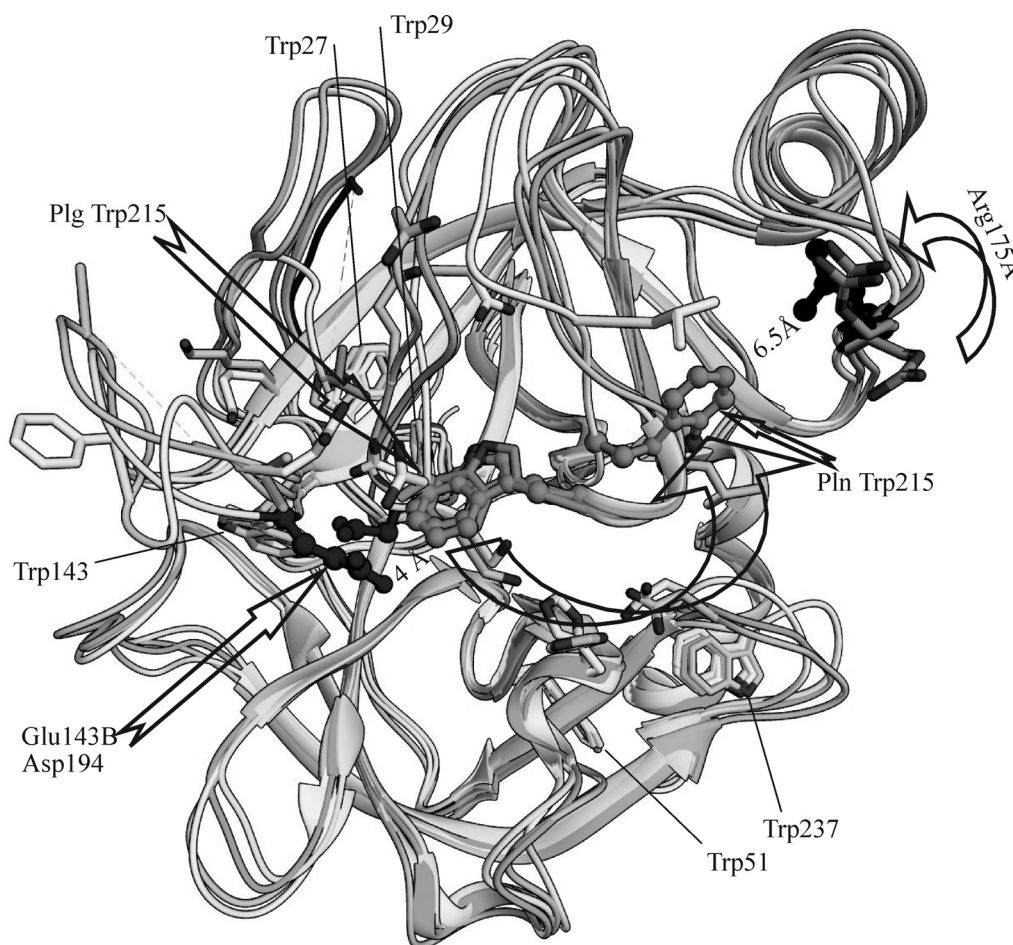
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реагенты.** В работе использовали реагенты аналитической чистоты фирмы Sigma (США),

и хромогенный субстрат S-2251 фирмы Chromogenix (Италия).

**Моноклональные антитела Н4**, обладающие сродством к активационной петле mPlg и блокирующие его активацию под действием активаторов плазминогена – урокиназного (uPA) и тканевого (tPA), – описаны в работе [27].

**Рекомбинантные белки.** Использовали сконструированный нами рекомбинантный миниплазминоген, состоящий из пятого крингл-домена и протеиназного домена. mPlg продуцируется в клетках *E. coli* в виде телец включения (составляет более 50% нерастворимого белка) и после ренатурации и хроматографической очистки способен активироваться и проявлять высокую фибринолитическую активность, специфичную для плазминогена человека в фибринолитической системе, а также гидролизовать синтетический хромогенный субстрат S-2251. Структура белка и продуцента описаны в ра-



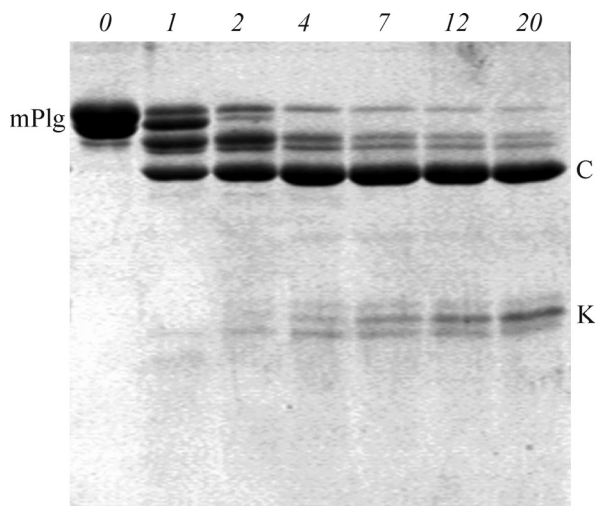
**Рис. 3.** Пространственная структура каталитического домена плазима и пламиногена. На рисунке показаны все Trp каталитического домена Pln и Plg в скелетной форме. Видно, что все триптофаны, кроме Trp215, сохраняют свое положение и окружение при активации. Большая овальная прозрачная стрелка показывает направление перемещения Trp215 при активации Plg. Показаны структуры с PDB ID 1qzr и 1bml [18,24]. Аналогичная пара с PDB ID 1BU1 и 4DUU показывает такую же картину [22,23]. Отмечены положения аминокислотных остатков, обсуждаемых в тексте. Показано расстояние от бензольного кольца Trp215 до ближайших заряженных аминокислот: 4 Å до Asp194 и Glu143 в Plg и 6 Å до Arg175 в Pln. Отмечен Arg175 в Pln и кислые аминокислоты Asp194 и Glu143 в обеих молекулах. Нумерация аминокислот приведена в химотрипсиновой нотации.

ботах [28–30]. Урокиназа – модифицированный активатор пламиногена урокиназного типа sc\_uPA также сконструирован, синтезирован и очищен в нашей лаборатории. Двухцепочечную активированную форму (tc\_uPA) получали путем инкубации одноцепочечной проформы sc\_uPA с плазином [31].

Чистоту ферментов и кинетику расщепления mPlg измеряли электрофоретически, используя для оцифровки полученных электрофореграмм программные пакеты TotalLab или GelAnalyzer2010a. Чистота tc\_uPA и mPlg составила 80 и 95% соответственно.

**Очистка минипламиногена.** Препараты mPlg, очищенные по методике, описанной в работе [28], были практически электрофоретически и хроматографически гомогенны, но об-

ладали после активации воздействием tc\_uPA амидолитической активностью в два–три раза более низкой, чем препараты полноразмерного природного пламиногена. При этом взаимодействие с поликлональными антителами к Plg показывало, что как сам mPlg, так и все фрагменты, получаемые при его активации, являются частями Plg. Мы предположили, что в препарате mPlg часть белка представляет собой неправильно уложенный минипламиноген. Для избавления от mPlg с неправильной укладкой препарат дополнительно очищали с использованием аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными моноклональными антителами H4. Раствор mPlg (2 мг) в 20 мМ фосфатном буфере, 150 мМ NaCl, pH 7,5 (1 мл) наносили на колонку с моноклональными ан-



**Рис. 4.** Расщепление миниплазминогена урокиназой. Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия свежеочищенного mPlg (36,3 кДа) и продуктов его расщепления при активации: каталитический домен (С, 25,2 кДа) и крингл-домен (К, 11,3 кДа). Инкубация mPlg с tc-uPA от 0 до 20 мин.

тителами Н4 (2 мл), уравновешенную 10 мМ трис, 150 мМ NaCl, pH 7,5. Сорбент последовательно промывали исходным буфером, 1 М NaCl в том же буфере и mPlg элюировали 0,1 М глицином, pH 2,5. Чистота очищенного mPlg (по данным электрофоретического анализа в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) составила 97% (рис. 4, дорожка 1). В результате амидолитическая активность миниплазмина (mPln), полученного активацией свежеочищенного mPlg под действием tc-uPA, возрастала в три–пять раз.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, считая поглощение раствора белка с концентрацией 1 мг/мл при длине волны 280 нм и оптическом пути 1 см ( $A_{280}$ ) равным 1,55. К элюированному белку добавляли буферный раствор, необходимый для достижения заданного значения pH, и свежеприготовленный раствор mPlg использовали в опытах по активации.

**Кинетику активации миниплазминогена** анализировали следующими методами: 1) флуоресцентным анализом процесса активации mPlg и превращения его в mPln; 2) по амидолитической активности образовавшегося mPln в отношении хромогенного субстрата S-2251; 3) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по появлению полосы, соответствующей каталитическому домену mPln.

**Реакцию активации миниплазминогена** проводили с использованием tc-uPA. В предварительном опыте определяли молярное соотношение mPlg и tc-uPA, при котором активация происходит сравнительно медленно (с выходом на плато за 20–30 мин). Были выбраны два соотношения mPlg/tc-uPA для проведения дальнейших исследований: концентрация mPlg в большей части опытов составляла 1000 нМ при концентрации uPA 25 нМ, часть экспериментов выполнена при концентрации mPlg 300 нМ и uPA – 3,2 нМ.

Опыт по индивидуальной оценке  $k_{cat}$  и  $K_M$  проводили при концентрации tc-uPA 3,2 нМ и начальных концентрациях mPlg, изменяющихся в диапазоне от 250 до 2500 нМ

**Измерение спектров флуоресценции при активации миниплазминогена.** Измерения проводили на флуориметре Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, США) при 24°C. Использовали стандартные кюветы с длиной оптического пути 1 см. Время накопления сигнала при кинетических измерениях составляло 0,2–0,5 с, обе щели имели оптическое разрешение 5 нм. Скорость сканирования – 100 нм/мин. В качестве относительной величины флуоресценции было принято отношение интенсивности флуоресценции при 320 нм к интенсивности флуоресценции при 360 нм при длине волны возбуждения 279 нм ( $I_{320}/I_{360}$ ) [32]. Измеряли спектры флуоресценции mPlg, затем к раствору mPlg добавляли tc-uPA, перемешивали и начинали запись флуоресценции в зависимости от времени при 320 и 360 нм. Регистрацию данных проводили с момента добавления tc-uPA в раствор mPlg до выхода кривой интенсивности флуоресценции на плато. По завершении реакции прописывали спектр флуоресценции образовавшегося продукта.

В предварительных опытах было показано, что запись флуоресценции для препарата mPlg без добавления tc-uPA за времена, характерные для проведения опытов по активации, не приводила к изменению спектра флуоресценции.

При выбранных концентрациях поглощение раствора белков при 280 нм равно 0,06 опт. ед., что не потребовало введения коррекции на поглощение при измерениях флуоресценции.

Обработку результатов проводили в программных пакетах MS Office 2003 и Cary Eclipse. Оптимизацию кинетических параметров  $k_{cat}$  и  $K_M$  при минимизации среднеквадратичного отклонения экспериментальных и расчетных значений величин относительной интенсивности флуоресценции и концентрации образовавшегося mPln проводили с помощью утилиты Solver

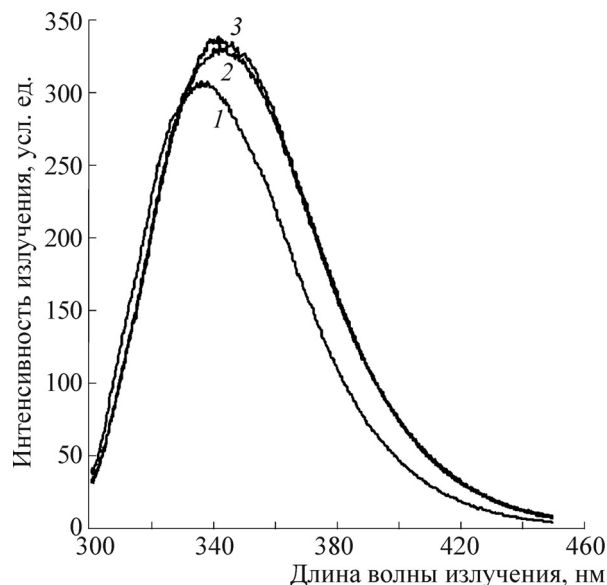
с поочередной и одновременной оптимизацией кинетических параметров.

Оценки  $R^2$  и стандартных отклонений приведены для каждого эксперимента в отдельности и тем самым не учитывают ошибки, например, в пипетировании  $\alpha$ РА, за исключением экспериментов по определению  $K_M$  и  $k_{cat}$  по Лайнуиверу–Берку, где смеси для анализа каждой точки на кривой готовили заново.

**Ферментативную активность миниплазминогена** в отношении хромогенного субстрата S-2251 определяли следующим образом. Белки переводили в буфер, содержащий 20 мМ К-фосфата, 150 мМ NaCl, 0,01% бычьего сыровоточного альбумина, pH 7,5. К mPlg (конечная концентрация 300 нМ) добавляли  $\alpha$ РА до концентрации 3,2 нМ при 24°C. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты по 40 мкл, добавляли 40 мкл 1,2 мкМ моноклональных антител Н4 (молярное соотношение Н4 : mPlg составило 4 : 1), чтобы остановить активацию, и доводили объем проб до 200 мкл буфером, содержащим 20 мМ К-фосфата, 150 мМ NaCl, 0,01% бычьего сыровоточного альбумина, pH 7,5. Затем пробы помещали в термостат и при 37°C добавляли по 40 мкл 10 мМ S-2251. Через 2, 4, 6, 8 и 10 мин отбирали по 40 мкл полученной смеси в пробирки с 200 мкл 5%-й  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , после чего на спектрофотометре у образцов определяли  $A_{405}$ . При расчетах молярный коэффициент экстинкции для пара-нитроанилина, отщепляемого от S-225, принимали равным  $9595 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

В предварительных опытах были определены кинетические константы ( $K_M = 0,51 \pm 0,02 \text{ мМ}$ ,  $k_{cat} = 18 \pm 2 \text{ с}^{-1}$ ) для использованных нами препаратов S-2251, буферов и стандартных образцов Plg (Sigma, США), активированных  $\alpha$ РА или стрептокиназой, а также Plg из нормализованной плазмы человека. Полученные величины хорошо согласуются с данными других авторов [33,34]. Удельная скорость расщепления S-2251 плазмином при таких константах и концентрации S-2251, равной 1,66 мМ, составляет 812 нМ/мин на 1 нМ Pln. Однако свежееочищенные препараты mPlg при активации урокиназой показывали скорость гидролиза S-2251 в 1,2–1,5 раза выше этих значений. Для корректных расчетов удельную скорость расщепления S-2251 mPln (при начальной концентрации S-2251 1,66 мМ) измеряли одновременно с получением кинетической кривой активации для исследуемого препарата mPlg.

**Анализ продуктов расщепления плазминогена** проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Реакцию активации



**Рис. 5.** Спектры флуоресценции mPlg и mPln при длине волны возбуждения 279 нм: 1 – mPlg в концентрации 1000 нМ, 24°C, pH 7,0; 2 – тот же препарат, инкубированный в флюориметре при 24°C в присутствии 25 нМ  $\alpha$ РА, 120 мин; 3 – mPln, приготовленный отдельно в концентрации 10000 нМ с 250 нМ  $\alpha$ РА при 24°C, pH 7,0 и разбавленный в 10 раз перед измерением спектра.

останавливали добавлением денатурирующей смеси с лаурил сульфатом или холодным ацетоном при низкой концентрации белка. За расщеплением mPlg следили по появлению полосы, соответствующей каталитическому домену mPln (рис. 4, фрагмент С25.2).

Дополнительные полосы на электрофореграмме, появляющиеся выше полосы каталитического домена и вокруг полосы крингл-домена (при проведении реакции с pH выше pH 7,0) соответствуют по подвижности фрагментам, возникающим при автолизе Plg [35,36] (рис. 4, дорожки 1, 2, 4, 7, 12, 20).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Изменение спектра флуоресценции плазминогена при его активации микроколичествами урокиназы.** mPlg, использованный в данной работе, представляет собой укороченный вариант (каталитический и один (пятый) крингл домены) природного плазминогена человека и подробно описан в работах [28–30].

На рис. 5 приведены спектры флуоресценции mPlg и mPln. Экспериментально полученные характеристические величины излучения для mPln и mPlg представлены в табл. 1. Эти значения далее использованы для анализа кинетики активации mPlg. Видно, что спектр и,

**Таблица 1.** Относительная интенсивность излучения mPlg и mPln при pH 7,0 и 24°C

	mPlg	mPln
$I_{320}$	$1,000 \pm 5\%$	$0,910 \pm 5\%$
$I_{335}$	$1,304 \pm 5\%$	$1,432 \pm 5\%$
$I_{360}$	$0,933 \pm 6\%$	$1,206 \pm 6\%$
$I_{320}/I_{360}$	1,072	0,754

как следствие, максимум флуоресценции триптофана для mPlg сдвинуты на 6 нм в коротковолновую область по сравнению с mPln, а интенсивность флуоресценции понижена. Такие изменения в спектре белка свидетельствуют о значительных изменениях в микроокружении по крайней мере одного из триптофанов при активации Plg.

Как отмечалось во введении, единственным триптофаном, микроокружение которого изменяется радикально при активации, является Trp215. Отрицательно заряженные Asp194(740) и Glu143(687), расположенные на расстоянии 4,5 Å от бензольного кольца Trp215 в плазмине (рис. 3), в результате поворота меняются на положительно заряженный Arg175(719) (расстояние 6 Å) в плазмине. Другие заслуживающие внимания изменения связаны с Nε1 индольного кольца Trp215, образующего водородную связь с карбонилем пептидной связи Gln192(738) – Gly193 (2,7 Å) в Plg и карбоксилем Glu180(723) в Pln (2,8 Å от Nε1 Trp215 до обоих кислородов Cδ Glu180). При этом геометрия Nε1 Trp215 и карбоксила Glu180 подобна геометрии Nε1 His57 и обоих кислородов Cγ Asp102 активного центра сериновых протеиназ. Нужно также отметить, что если геометрия карбонила пептидной связи аминокислотных остатков 192–193 всех трипсиноподобных сериновых пептидаз неизбежно консервативна (как и всего окружения активного центра), то ни Arg175, ни Glu180 не являются консервативными элементами этих пептидаз.

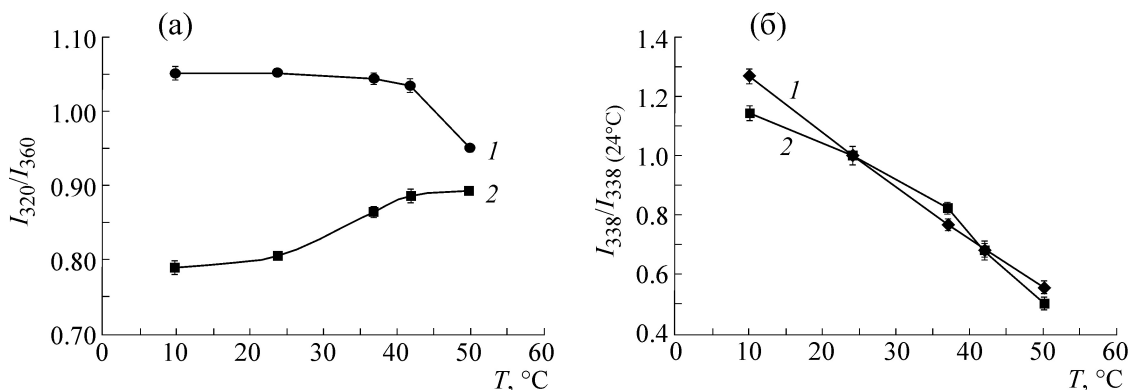
Оценку величины электрической индукции поля, создаваемого атомами белкового окружения Trp215 в плазмине и плазмине и отстоящими от атомов индольного кольца менее чем на 15 Å, выполняли с использованием уравнения Кулона. Расчеты проводили без учета растворителя для структур 1QRZ и 1BUI [19,22]. Относительную диэлектрическую постоянную внутри белка принимали равной двум. Использовали заряды атомов для «силового поля» amber94 [37] без учета реполяризации локальных зарядов индольного кольца. Вычисленная величина электрической индукции

поля, создаваемого атомами белкового окружения Trp215, оказалась равной +9,9 В/нм для Plg и –42,7 В/нм – для Pln. Приведенные числа относятся к проекции вектора электрической индукции на вектор, проведенный от центра бензольного кольца к центру пирольного кольца индола Trp215. Полученные значения являются оценочными, но дают представление о том, как сильно изменяется окружение Trp215 при развороте. Реальные величины могут быть меньше из-за реполяризации зарядов атомов индольного кольца и близрасположенных заряженных атомов под действием окружающего поля. Как следует из проведенных ранее исследований зависимости флуоресценции триптофана от условий среды [22,23,32], результатом описанного изменения индукции должен стать длинноволновый сдвиг в спектре флуоресценции Trp215. Поскольку, как отмечалось ранее, значительных изменений в микроокружении остальных триптофанов mPlg при активации не происходит, мы полагаем, что разворот и связанная с ним смена микроокружения Trp215 ответственны за наблюдаемый длинноволновый сдвиг в спектре флуоресценции всего белка.

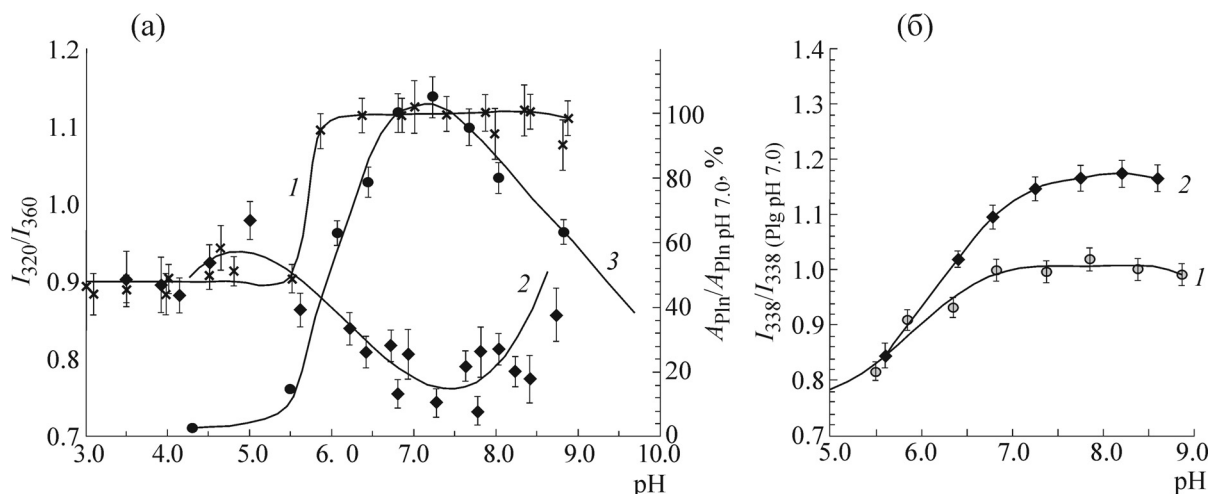
На рис. 6 и 7 показано влияние температуры и pH на спектры флуоресценции mPln и mPlg. На рис. 6а и 7а приведены зависимости отношений  $I_{320}/I_{360}$  от температуры и pH соответственно, на рис. 6б – зависимость интенсивности излучения при 338 нм от температуры, приведенная к интенсивности излучения при 24°C, а на рис. 7б – зависимость отношения интенсивности излучения при 338 нм от pH к интенсивности излучения mPlg при pH 7,0. Интересно отметить, что отношение интенсивностей излучения  $I_{320}/I_{360}$  у mPln и mPlg изменяется в зависимости от температуры в противоположных направлениях, приближаясь с разных сторон к одной и той же величине при температуре выше 50°C. Обе кривые ассоциируются с конформационными переходами при 32°C для mPln и 46°C для mPlg. По результатам приведенных опытов невозможно определить, в каких частях молекулы реализуются конформационные переходы и как эти изменения связаны (если связаны) с подвижностью Trp215. Исследование модифицированных вариантов белков, лишенных Trp215 и/или Trp141, могут дать ответ на поставленный вопрос.

Абсолютные значения интенсивности флуоресценции в максимуме пика (338 нм) одинаково снижаются по мере роста температуры у mPln и mPlg (рис. 6б), отражая очевидное увеличение подвижности молекул с увеличением температуры.





**Рис. 6.** Влияние температуры на флуоресценцию mPlg (1) и mPln (2): (а) – зависимость отношения интенсивности излучения  $I_{320}/I_{360}$  от температуры, (б) – зависимость отношения интенсивности излучения при 338 нм от температуры в интервале 10–50°C к интенсивности излучения при 24°C.



**Рис. 7.** Влияние pH среды на флуоресценцию mPlg (1) и mPln (2): (а) – зависимость отношения интенсивности излучения  $I_{320}/I_{360}$  от pH, зависимость амидолитической активности плазмينا от pH (шкала активности справа) – 3; (б) – зависимость отношения интенсивности излучения в максимуме пика (338 нм) от pH, нормированная к интенсивности флуоресценции плазминогена при pH 7,0.

Особого внимания заслуживают изменения  $I_{320}/I_{360}$  и интенсивности в максимуме излучения триптофана от pH в сравнении с амидолитической активностью фермента. Отношение  $I_{320}/I_{360}$  у mPlg в интервале значений pH от 6,0 до 9,0 изменяется незначительно (рис. 7а, кривая 1). Активность mPln в этом интервале поднимается от нуля, достигает максимального значения при pH 7,2–7,4 и снижается до нуля к pH 10. Почти скачкообразный коротковолновый сдвиг флуоресценции mPlg в интервале pH между 5,4 и 6,0 вряд ли может быть обусловлен депротонированием His40 или His57, так как по данным ЯМР  $pK_a$  этих аминокислотных остатков лежит в области между pH 6,0 и 8,0 [38]. Поляризация связи между карбонилем пептидной связи Gln192 и HNe1 Trp215 также

вряд ли чувствительна к pH среды из-за недоступности этой зоны для растворителя. Столь резкое изменение флуоресценции триптофана из-за протонирования какого-либо соседа не представляется вероятным, ибо полное титрование индивидуальной группы обычно требует изменения минимум на одну–две единицы pH. Такой резкий эффект больше соответствует фазовому структурному переходу. Следует, однако, отметить, что структуры каталитического домена плазминогена в кристаллах, полученных при разных pH в диапазоне от 5,6 до 7,5, почти идентичны (PDB ID: 1QRZ, 4A5T, 4DUU, 4DUR), но граница структурного перехода может быть различна для молекул в растворе и в кристалле.

Отчетливая корреляция наблюдается между длинноволновым сдвигом для mPIn при увеличении pH в интервале от 5,0 до 9,0 (рис. 7а, кривая 2) и изменением ферментативной активности mPIn (рис. 7а, кривая 3). Если принять, что уровень  $I_{320}/I_{360} = 0,9$  соответствует неактивному состоянию фермента, а  $I_{320}/I_{360} = 0,74$  – максимально активному, то коэффициент корреляции между этими кривыми  $R^2 = 0,948$ . Длинноволновый сдвиг в спектре плазмина и параллельное увеличение активности фермента между pH 5,6 и 7,0 легко объясняется депротонированием His57 и формированием его комплекса с Asp102, необходимого для переноса протона с Ser195 на комплекс His57–Asp102 для реакции ацилирования субстрата. При этом карбонил Ser214 пептидной связи между Ser214 и Trp215 непосредственно координирует His57 [39]. Также необходимо отметить, что интенсивность флуоресценции Trp в максимуме излучения значительно меняется в зависимости от pH среды (рис. 7б). Резкий подъем интенсивности флуоресценции (рис. 7б, кривая 2) для mPIn в интервале между pH 5,6 и 6,6 ассоциирован с активизацией ферментативной активности плазмина в интервале pH 5,6–7,0. Малая полуширина перехода может быть обусловлена депротонированием единственной аминокислоты вблизи активного центра фермента, вероятнее всего His57. Многочисленные исследования, в том числе прямые измерения протонного резонанса His57 комплексированного с депротонированным Asp102, для различных форм сериновых протеиназ показывают, что  $pK_a$  His57 лежит в этой области значений pH [40,41]. Сравнение кривых на рис. 7б показывает, что в этой области pH интенсивность флуоресценции триптофана и у плазминогена и у плазмина растут координировано.

Снижение активности в щелочном диапазоне pH обычно приписывается депротонированию и соответственно потере заряда N-концевой алифатической аминокислотой, образующей солевой мостик с Asp194 [42,43]. Это, как следствие, приводит к разрушению оксианионной петли, целостность которой лежит в основе всех теорий катализа сериновых протеиназ. При этих значениях pH His40, обеспечивающий при pH 5,0–6,0 ориентацию карбоксила Asp194, полностью депротонирован и не может обеспечить разрушение оксианионной петли. Расчеты электрической индукции в районе карбоксила Asp194 показали, что в отсутствие заряда на His40 (и всех остальных гистидинах) и N-конце Val16 вектор электростатической силы, действующей на карбоксил Asp194 при pH 6,5–8,5, направлен в сторону Val16, хотя абсолютная

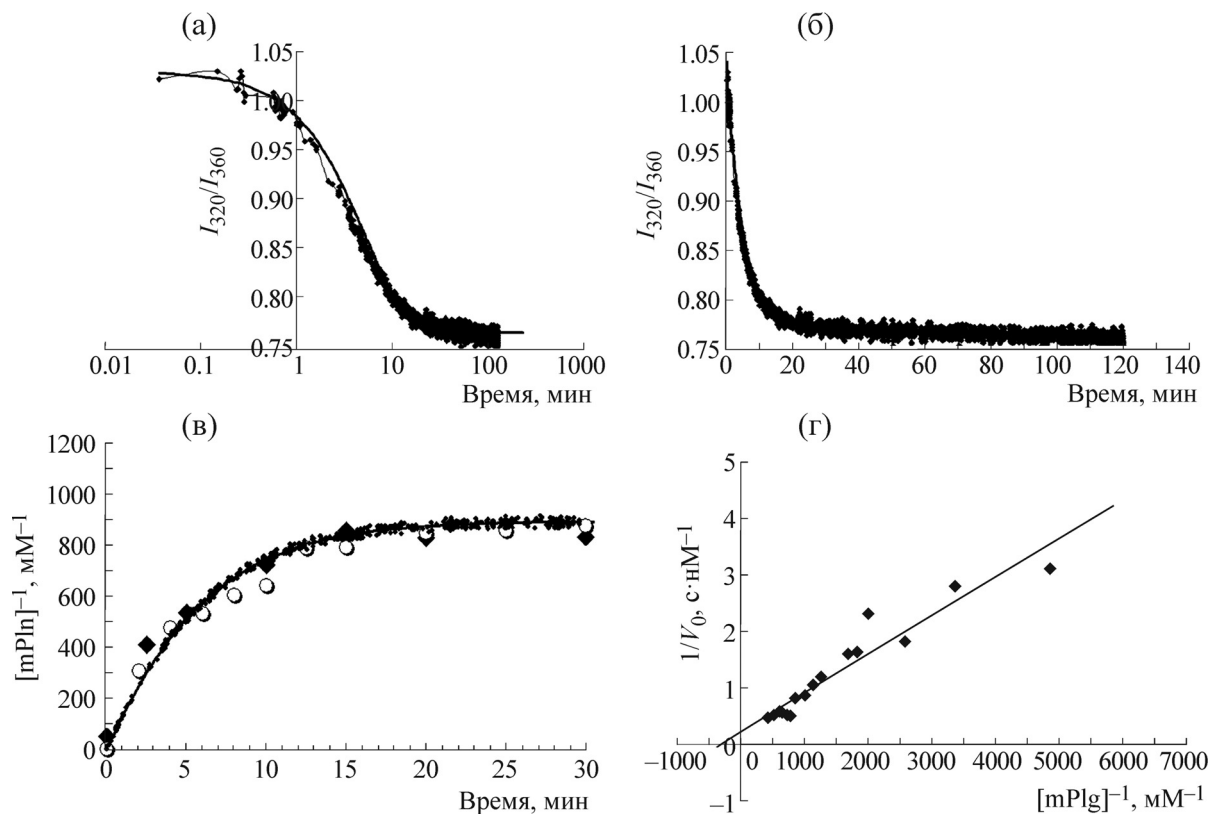
его величина при депротонировании N-конца уменьшается в три раза. Ориентация Trp215 не оказывает существенного влияния на направление вектора. При этом предполагалось, что все пары His–Asp, His–Glu, Lys–Asp, Lys–Glu сохраняют электронейтральность при pH между 6,0 и 8,0.

На примере трипсина крысы хорошо известно, что положение Ile16–Val17 в активационном кармане в основном обусловлено гидрофобными связями [44]. Ориентация карбоксильной группы Asp194 и соответственно формирование оксианионной петли может быть обусловлено полем, создаваемым зарядами, расположенными на периферии молекулы [43,45]. При этом гидролиз пептидной связи между Lys15 и Ile16 не требуется для активности протеазы, и кроме того, ферментативная активность не подавляется при щелочных значениях pH.

Электростатическое поле плазмина радикально отличается от поля анионного трипсина крысы. Центральная зона вокруг активного центра плазмина в среднем отрицательно заряжена, а периферия, расположенная дистально к гибкой автолизной петле, заряжена положительно и насыщена аргининами, нечувствительными к изменениям pH до 12.

Расчет электростатической силы, действующей на карбоксил Asp194 в PIn, показывает, что вектор электростатической силы, действующий на карбоксил Asp194, меняет свое направление на противоположное при условии, что большая часть остатков лизина, расположенных в кислой зоне белка, депротонируется наряду с N-концевым амином Val16. При этом можно ожидать перемещения этой группы в участок, занимаемый Trp215 в плазминогене. При депротонировании лизинов в кислых областях молекулы, при pH > 9,0 Asp189 также подвержен силе, выталкивающей карбоксил Asp189 в направлении спирали 170 (рис. 1). Деформация Asp194 и Asp189 представляется наиболее вероятной причиной потери активности плазмина при повышении pH выше 8,5. Возникает вопрос, может ли Trp215 при повышении pH до значений, приводящих к снижению активности фермента, приводить к возврату в участок, занимаемый им в плазминогене. Сравнение кривых 1 и 2 на рис. 7а свидетельствует против этого предположения.

**Кинетика активации миниплазминогена.** В процессе активации Plg происходят несколько событий: гидролиз пептидной связи, формирование активного центра, поворот Trp215. Согласно высказанному предположению, сдвиг максимума излучения в спектре флуоресценции mPlg является отражением одного из событий,



**Рис. 8.** Кинетика активации mPlg урокиназой. Кинетическая кривая активации mPlg, измеренная с помощью флуоресценции, в линейных (а) и полулогарифмических (б) координатах. Точки – экспериментальные данные, линия – аппроксимирующая теоретическая кривая, рассчитанная в соответствии с моделью Михаэлиса–Ментен. Начальная концентрация mPlg – 1000 нМ, 24°C, рН 6,9. (в) – Кинетика активации mPlg, выраженная в нМ образовавшегося mPln и измеренная либо с помощью флуоресценции при рН 7,0, 24°C (квадраты), либо измерением амидолитической активности, рН 6,9, 24°C (ромбы), либо электрофоретически, рН 7,0, 24°C (кружки); кривая, аппроксимирующая все экспериментальные данные, показана сплошной линией. (г) – Зависимость начальной скорости активации mPlg (сек/нМ) от его концентрации при рН 7,7, 28°C, концентрация uPA – 3,2 нМ. Результат представлен в двойных обратных координатах Лайнуивера–Берка. Для аппроксимирующей прямой  $R^2 = 0,905$ ,  $K_M = 2670 \pm 360$  нМ,  $k_{cat} = 76 \pm 6$  нМ/мин,  $V_{max}$  при 3,2 нМ uPA –  $4,06 \pm 0,6$  нМ/сек.

происходящих при активации плазминогена. Нам представлялось небезынтересным сравнить кривую зависимости сдвига флуоресценции от времени с кинетическими кривыми активации, полученными как прямым измерением амидолитической активности образующегося mPln, так и на основе анализа продуктов расщепления mPlg (первый этап процесса активации).

Зависимость сдвига флуоресценции (выраженного как  $I_{320}/I_{360}$ ) от времени показана на рис. 8. Полученная кривая близка к гиперболе с начальным значением  $I_{320}/I_{360}$ , равным соответствующему значению для mPlg, а асимптота – для mPln (табл. 1).

Приведены кривые с линейной (рис. 8а) и логарифмической (рис. 8б) шкалой по горизонтальной оси, чтобы проиллюстрировать зависимость как в начальной области, так и за большие времена реакции. Никакой лаг-фазы или заметной нелинейности начальной скорости

изменения флуоресценции, которая могла бы проявляться, если вращение триптофана лимитировало реакцию, мы не наблюдали.

Аппроксимирующая теоретическая кривая рассчитана в соответствии с моделью Михаэлиса–Ментен:

$$d[Plg]/dt = k_{cat} \times [tc\_uPA] \times [Plg] / (K_M + [Plg]),$$

где [tc\_uPA] и [Plg] – концентрации tc\_uPA и Plg соответственно.

Константы  $K_M$  и  $k_{cat}$  вычисляли минимизацией среднеквадратичного отклонения между теоретической кривой (построенной на основе уравнения Михаэлиса–Ментен в интегральной форме) и экспериментальными данными. При расчетах использовали значения для начальной концентрации  $[mPlg] = 1000$  нМ и концентрации  $[tc\_uPA] = 25$  нМ (раздел ММ). Текущее отношение  $I_{320}/I_{360}$  рассчитывали как  $(I_{320\ mPlg} \times [mPlg] + I_{320\ mPln} \times [mPln]) / (I_{360\ mPlg} \times [mPlg] +$

**Таблица 2.** Кинетические характеристики реакции активации разных типов плазминогена урокиназой, приведенные в литературе

	Glu1-, Lys77-, Val442-Plg	Glu1-Plg	Glu1-Plg	Glu1-Plg	microPlg	p-ser uPA
$t^{\circ}\text{C}$	37	37	37	37	37	25
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,0	7,5
$k_{\text{cat}}$ , мин <sup>-1</sup>	63	60	300	108	570	720
$K_{\text{M}}$ , нМ	2600	50000	40000	20000	17000	1000
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ , мин <sup>-1</sup> нМ <sup>-1</sup>	0,0242	0,0012	0,0075	0,0054	0,0335	0,7200
Источник	[46]	[47]	[48]	[49]	[50,51]	[52]

$I_{360 \text{ mPln}} \times [\text{mPln}]$ ). Константы  $I_{320}$  и  $I_{360}$  взяты из табл. 1. Для показанного на рис. 8 опыта  $R^2$  аппроксимации равен 0,999951. В серии опытов для кинетических констант получены значения:  $K_{\text{M}} = 2800 \pm 400$  нМ,  $k_{\text{cat}} = 28,5 \pm 4$  мин<sup>-1</sup>.

Кривую зависимости сдвига флуоресценции от времени сравнили с кинетическими кривыми активации, полученными как измерением амидолитической активности образующегося mPln, так и на основе электрофоретического анализа продуктов расщепления mPlg при различных значениях pH в диапазоне 5,5–7,5. Измерения проводили параллельно, как описано в разделе «Материалы и методы». На рис. 8в показан пример такого сравнения для pH 7,0. Видно, что кривые расщепления белка, активации ферментативной активности mPlg и изменения флуоресценции совпадают. Аппроксимирующую кривую вычисляли аналогично кривой на рис 8б. Показанная сплошная линия отвечает константам  $k_{\text{cat}} = 28$  мин<sup>-1</sup>,  $K_{\text{M}} = 2800$  нМ, с  $R^2$ , равным 0,9991, 0,93 и 0,91 для флуоресцент-

ных, амидолитических и электрофоретических экспериментальных данных соответственно.

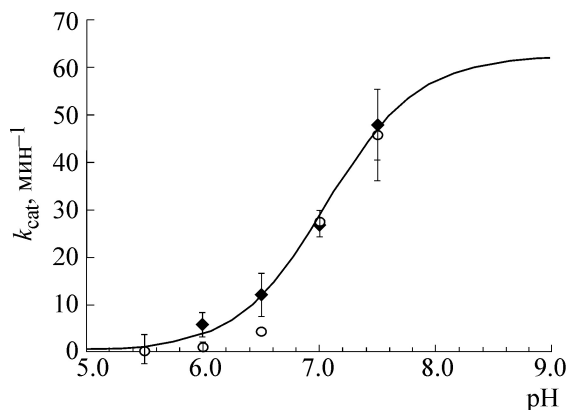
Для определения константы Михаэлиса проводили измерение начальной скорости реакции в зависимости от концентрации mPlg в диапазоне от 250 до 2500 нМ при концентрации tc-uPA 3,2 нМ. Построение кривой в координатах Лайнуивера–Берка позволило определить  $K_{\text{M}}$  и  $k_{\text{cat}}$  (рис. 8г). Результаты флуоресцентной спектроскопии хорошо отражают процесс активации mPlg, а измеренные значения кинетических констант ( $K_{\text{M}} = 2670 \pm 360$  нМ,  $k_{\text{cat}} = 76 \pm 6$  нМ/мин,  $V_{\text{max}} = 4,06 \pm 0,6$  нМ/с при 3,2 нМ uPA) близки к константам процесса активации mPlg, приведенным в литературе [46]:  $K_{\text{M}} = 3000$  нМ,  $k_{\text{cat}} = 25,6$  мин<sup>-1</sup> (при 8 нМ uPA, pH 7,0 и 37°C). Однако необходимо отметить, что данные разных авторов по кинетическим характеристикам реакции активации mPlg урокиназой не отличаются единообразием (суммированы в табл. 2).

Влияние pH на константы  $k_{\text{cat}}$  и  $K_{\text{M}}$  анализировали с использованием кинетических кривых активации плазминогена, полученных по сдвигу флуоресценции и амидолитической активности. Оказалось, что  $K_{\text{M}}$  практически не зависит от pH, а зависимость  $k_{\text{cat}}$  от pH среды приведена на рис. 9.

Зависимость каталитической константы от pH хорошо ( $R^2 = 0,9547$ ) описывается уравнением:

$$k_{\text{cat}} = 62,3 \times \exp(2,55 \times (\text{pH} - 7,065)) / (1 + \exp(2,55 \times (\text{pH} - 7,065))).$$

Изучение реакции с помощью флуоресценции показывает замедление реакции (недостовверное, но систематическое) по сравнению с другими методами при значениях pH ниже 7,0, что дает возможность разделить процессы, обусловленные расщеплением пептидной связи между Arg15 и Val16 и поворотом Trp215, но для

**Рис. 9.** Зависимость  $k_{\text{cat}}$  реакции активации Plg урокиназой от pH среды по данным амидолитической реакции (ромбы) и флуоресценции (кружки).

этого понадобится внести изменения в структуру mPlg, предотвращающие автолиз молекулы, сильно затрудняющий количественные измерения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе показано, что активация плазминогена сопровождается значительным длинноволновым сдвигом флуоресценции триптофана, обусловленным поворотом Trp215 вокруг оси, проходящей через С-альфа 214 и С-альфа 216. Показано, что такой поворот реализуется в отсутствие ингибитора или субстрата, вытесняющего индольное кольцо из субстратузнающего кармана. Показано, что конформация плазминогена (по крайней мере, связанная с положением Trp215 в субстратузнающем кармане) нечувствительна к изменению рН и температуры, тогда как плазмин демонстрирует изменения спектра флуоресценции, коррелирующие с амидолитической активностью.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, and A. Bateman, *Nucl. Acids Res.* **42**, D503 (2014).
2. R. Huber and W. Bode, *Acc. Chem. Res.* **11**, 114 (1978).
3. H. Neurath, *Science* **224**, 350 (1984).
4. L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **102**, 4501 (2002).
5. J. Walter, W. Steigemann, T. P. Singh, et al., *Acta Crystallographica* **B38**, 1462 (1982).
6. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, et al., *Nucl. Acids Res.* **28**, 235 (2000).
7. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, et al., *J. Comput. Chem.* **25**, 1605 (2004).
8. D.W. Gohara, and E. Di Cera *Trends Biotechnol.* **29**, 577 (2011).
9. A. Banerjee, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **22**, 287 (2004).
10. M. H. A. Bos and R. M. Camire, *J. Coagul. Disord.* **2**, 19 (2010).
11. M. Dockal, R. Hartmann, M. Fries, et al., *J. Biol. Chem.* **289**, 1732 (2014).
12. E. Persson, M. Kjalke, and O. H. Olsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13583 (2001).
13. Y. Z. Ohkubo, J. H. Morrissey, and E. Tajkhorshid, *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1044 (2010).
14. G. van Dieijen, G. Tans, J. Rosing, and H.C. Hemker, *J. Biol. Chem.* **256**, 3433 (1981).
15. E. J. Duffy and P. Lollar *J. Biol. Chem.* **267**, 7821 (1992). PMID: 1560014.
16. J. Rosing, G. Tans, J. Govers-Riemslog, et al., *J. Biol. Chem.* **255**, 274 (1980).
17. W. Li, D. J. Johnson, C. T. Esmon, and J. A. Huntington, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 857 (2004).
18. Y. Xue, C. Bodin, and K. Olsson, *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1385 (2012). DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04765.x.
19. E. Peisach, J. Wang, T. de los Santos, et al., *Biochemistry* **38**, 11180.
20. N. Pozzi, Z. Chen, F. Zapata, et al., (2011) *Biochemistry* **50**, 10195 (1999).
21. J. Vijayalakshmi, K. P. Padmanabhan, K. G. Mann, and A. Tulinsky *Prot. Sci.* **3**, 2254 (1994).
22. M. A. Parry, C. Fernandez-Catalan, A. Bergner, et al., *Nat. Struct. Biol.* **5**, 917 (1998).
23. R. H. P. Law, T. Caradoc-Davies, N. Cowieson, et al., *Cell Reports* **1**, 185 (2012).
24. X. Wang, X. Lin, J. A. Loy, et al., *Science* **281**, 1662 (1998).
25. M. Möller and A. Denicola, *Biochem. Mol. Biol. Education* **30**, 175 (2002).
26. J. T. Vivian and P. R. Callis, *Biophys. J.* **80**, 2093 (2001).
27. Н. М. Руткевич, Т. И. Белянко, Я. Г. Гурский и др., *Биотехнология* **3**, 41 (2014).
28. Я. Г. Гурский, М. М. Минашкин, Е. С. Феоктистова и др., *Биотехнология* **1**, 25 (2010).
29. Р. Ш. Бибилашвили, А. А. Белогуров, Я. Г. Гурский и др., Патент РФ № 2432396 (2009).
30. Р. Ш. Бибилашвили, А. А. Белогуров, Я. Г. Гурский и др., Патент РФ № 2432397 (2009).
31. А. Я. Шевелев, Т. Н. Баршевская, А. А. Белогуров и др., *Молекуляр. биология* **20**, 778 (1986).
32. E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, *J. Photochem. Photobiol.* **18**, 263 (1973).
33. K. C. Robbins, L. Summaria, and R. C. Wohl, *Methods Enzymol.* **80**, 379 (1981).
34. P. D. Boxrud, W. P. Fay, and P. E. Bock, *J. Biol. Chem.* **275**, 14579 (2000).
35. X. Lin, Y. Wang, Y. Zhang, et al., *Thrombosis J.* **11**, 2 (2013).
36. B. Noppen, L. Fonteyn, F. Aerts, et al., *Prot. Engineer., Design and Selection* **27**, 215 (2014).
37. W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179 (1995).
38. A. L. Hansen and L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E1705 (2014).
39. K. C. Haddad, H. Sudmeier, D. A. Bachovchin, and W. W. Bachovchin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1006 (2005).
40. N. E. Mackenzie, J. P. Malthouse, and A. I. Scott, *Science* **225**, 883 (1984). DOI: 10.1126/science.6433481.
41. W. W. Bachovchin, R. Kaiser, J. H. Richards, and J. D. Roberts *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7323 (1981).
42. A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **64**, 497 (1972).
43. A. Pasternak, D. Ringe, and L. Hedstrom, *Prot. Sci.* **8**, 253 (1999).

44. L. Hedstrom, T. Y. Lin, and W. Fast, *Biochemistry* **35**, 4515 (1996).
45. A. Pasternak, X. Liu, T. Y. Lin, and L. Hedstrom, *Biochemistry* **37**, 16201 (1998).
46. R. C. Wohl, L. Summaria, and K. C. Robbins, *J. Biol. Chem.* **255**, 2005 (1980).
47. D. Collen, C. H. Zamarron, R. Lijnen, and M. Hoylaerts, *J. Biol. Chem.* **261**, 1259 (1986).
48. H. R. Lijnen, B. Van Hoef, and D. Collen, *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 402 (1986).
49. V. Ellis and K. Dan, *J. Biol. Chem.* **268**, 4806 (1993).
50. J. Wang and E. Reich, *Prot. Sci.* **4**, 1768 (1995).
51. J. Wang, B. Brdar, and E. Reich, *Prot. Sci.* **4**, 1758 (1995).
52. P. Franco, M. R. Mastronicola, D. De Cesare, et al., *J. Biol. Chem.* **267**, 9369 (1992).

## Study of the Structure of Trypsin-Like Serine Proteinases.

### 1. Study of Mini-Plasminogen Activation Using Tryptophan Fluorescence

**T.I. Belyanko, Ya.G. Gursky, N.I. Dobrynina, A.V. Orlova, N.M. Rutkevich, L.P. Savochkina, A.V. Skamrov, N.A. Skrypina, and R.Sh. Bibilashvili**

*National Medical Research Center of Cardiology, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

It has been shown that the curve of the time dependence of tryptophan fluorescence intensity during plasminogen activation by urokinase well correlated with kinetic curves of activation which were plotted both by direct measurements of amidolytic activity of the forming plasmin and by the results of the analysis of the plasminogen cleavage products. Three curves represent intercorrelation within a wide range of pH and temperature change. We have hypothesized that the fluorescence shift is caused by changes in Trp215 (Chymotrypsin numbering) side chain environment of activated plasmin. Plasmin activation via proteolytic cleavage of plasminogen induces rotation of Trp215 side chain with subsequent translocation of benzol part of Trp215 indol ring from negatively charged (Asp194 and Glu143) to positively charged (Arg175) neighborhood. Our findings show that this rotation is not caused by indol ring displacement from the substrate recognition pocket provoked by inhibitor or substrate binding. It has also been demonstrated that conformation of plasminogen (at least relevant to Trp215 in substrate recognition pocket) is not sensitive to pH or temperature changes, while changes in fluorescence spectrum of plasmin correlate with its amidolytic activity.

*Keywords: plasminogen, tryptophan fluorescence, enzyme activation, catalytic domain, structure- activity relationships of enzyme*