

УДК 577.3

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРИПСИН-ПОДОБНЫХ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ. 2. ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА У ВАРИАНТОВ МИНИПЛАЗМИНОГЕНА С ИЗМЕНЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

© 2019 г. Т.И. Белянко, Е.С. Феоктистова, Н.А. Скрыпина, А.В. Скамров, Я.Г. Гурский, Н.М. Руткевич, Н.И. Добрынина, Р.Ш. Бибилашвили, Л.П. Савочкина

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: Robert.Bibilashvili@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 28.02.2019 г.

Принята к публикации 04.03.2019 г.

Для исследования описанного ранее изменения флуоресценции триптофана при активации плазминогена урокиназой получены варианты миниплазминогена с измененной первичной структурой. Протестированы варианты с заменами Trp141, Trp215 и Leu217 (номер аминокислотного остатка указан по химотрипсиновой номенклатуре). Активация вариантов с одиночными заменами триптофана сопровождается изменением спектра, тогда как при двойной замене сдвиг спектра не наблюдается, т.е. оба триптофана (Trp141 и Trp215) вносят вклад в изменение спектра флуоресценции. Как предполагалось ранее, наиболее существенное влияние на сдвиг оказывает изменение микроокружения Trp215. Замены Trp141, Trp215 и Leu217 в mPlg не влияют на скорость активации плазминогена урокиназой. Показано, что замена консервативного у сериновых протеаз Trp215 приводит к значительному снижению, но не к потере ферментативной активности плазмина.

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

DOI: 10.1134/S0006302919030037

Сериновая протеаза плазмин циркулирует в крови в виде неактивного профермента плазминогена. Активация плазминогена — ключевой этап процесса растворения тромбов и сгустков крови (фибринолиза). Кроме того, как плазмин, так и плазминоген участвуют в ряде других физиологических и патологических процессов в организме — деградация внеклеточного матрикса, ангиогенезе, воспалении, миграции опухолевых клеток [1–6].

Плазмин образуется активаторами плазминогена (урокиназным или тканевым) при гидролизе пептидной связи между аминокислотными остатками Arg и Val с координатами 15–16 (здесь и далее координаты приводятся по химотрипсиновой

номенклатуре; обсуждаемые в тексте Trp141 и Trp215 при использовании Glu–Plg-нумерации имеют координаты 685 и 761 соответственно), что приводит к реорганизации пространственной структуры протеазного домена белка.

Как было показано в нашей предыдущей работе, активация плазминогена урокиназой сопровождается значительными изменениями спектра флуоресценции активируемого белка — спектр и, как следствие, максимум флуоресценции триптофана для мини-плазмина (mPln) сдвигается на 6 нм в длинноволновую область по сравнению с мини-плазминогеном (mPlg), а интенсивность флуоресценции повышается. Кривая, описывающая изменения спектра флуоресценции триптофана от времени в процессе активации, хорошо коррелирует с кинетическими кривыми активации, полученными как по результатам измерения амидолитической активности образующегося

Сокращения: mPln — мини-плазмин, mPlg — мини-плазминоген, sc_uPA — одноцепочечная проформа активатора плазминогена урокиназного типа, tc_uPA — двухцепочечная активированная форма активатора плазминогена урокиназного типа.

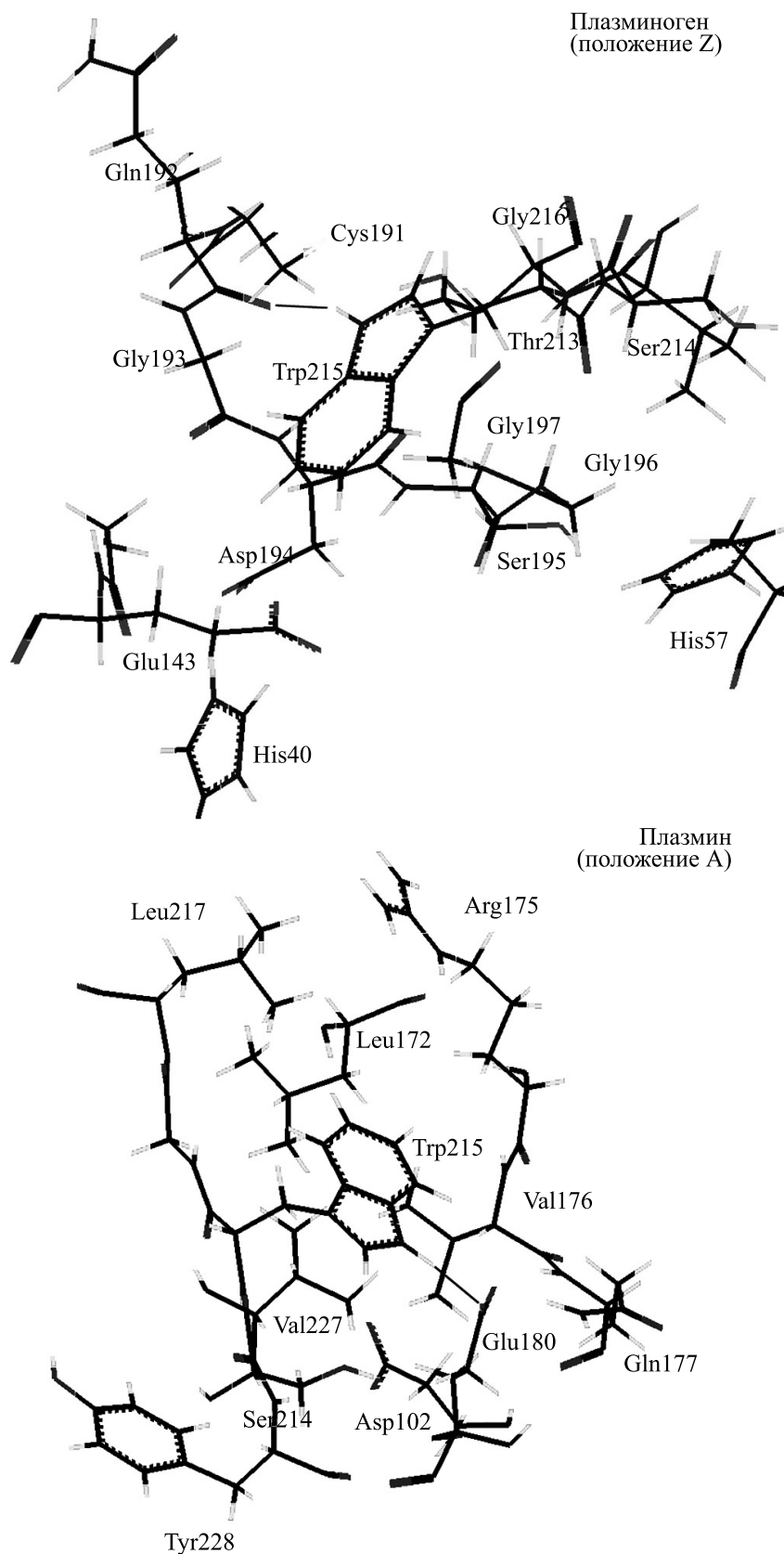


Рис. 1. Микроокружение Trp215 в плазминогене и плазмине.

плазмина, так и по результатам анализа продуктов расщепления плазминогена [7].

Сравнение третичных структур плазмينا и плазминогена позволило выделить два триптофана (Trp215 и Trp141), микроокружение которых существенно изменяется при активации, что может послужить причиной отличия спектров флуоресценции у зимогена и активного фермента (плазмина и плазминогена).

Ранее нами было высказано предположение, что Trp215 ответственен за наблюдаемую разницу спектров из-за радикального изменения микроокружения при превращении плазминогена в плазмин [7]. При активации происходит поворот Trp215 вокруг оси, проходящей через С-альфа 214 и С-альфа 216. У плазминогена триптофан 215 располагается в «субстрат-узнающем участке» и полностью перекрывает доступ боковой цепи Arg субстрата в эту зону (положение Z, рис. 1а). При повороте индольное кольцо покидает «субстрат-узнающий участок» (положение Z) и перемещается в положение А, которое находится между петлей 170–175 и бета-цепями F2 (226–231) и С2 (179–184). При этом бензольное кольцо изменяет полярное окружение от отрицательно заряженных аминокислотных остатков (Asp194 и Glu143) к положительно заряженному Arg175 и гидрофобному Leu217.

На разницу в спектрах флуоресценции зимогена и активного фермента может влиять и изменение микроокружения Trp141. Сам Trp141 не меняет своего положения, однако дрейф Asp194 и Val16 при активации плазминогена (рис. 2) может влиять на флуоресценцию этого триптофана. Из рис. 2 видно, что разрыв связи Arg15–Val16 приводит к радикальному изменению положения Lys156, Glu143 и Asp194 по отношению к Trp141.

С целью выяснения вклада вышеупомянутых триптофанов и их окружения в флуоресценцию mPIn и mPlg нами сконструированы варианты миниплазминогена с измененной первичной структурой. Внесенные мутации затрагивали как сами триптофаны 141 и 215, так и соседние аминокислотные остатки. Настоящая работа посвящена изучению свойств полученных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. В работе использовали реагенты фирмы Sigma (США) и хромогенный субстрат S-2251 фирмы Chromogenix (Италия).

Рекомбинантные белки. В качестве исходного материала для внесения мутаций использовали сконструированный нами продуцент мини-плазминогена человека. Рекомбинантный мини-

плазминоген представляет собой укороченный вариант (каталитический и один (пятый) крингл домены) природного плазминогена. Структура белка и продуцента описаны в работах [8–10]. Мутации вносили стандартными методами генетической инженерии и верифицировали секвенированием. Полученные рекомбинантные белки очищали, как описано ранее [7].

Продуцент урокиназы – модифицированный активатор плазминогена урокиназного типа (одноцепочечная проформа – sc_uPA) – также сконструирован в нашей лаборатории. Двухцепочечную активированную форму (tc_uPA) получали путем инкубации одноцепочечной проформы sc_uPA с плазмином [11].

Чистоту ферментов определяли электрофоретически, используя для оцифровки полученных электрофореграмм программные пакеты TotalLab или GelAnalyzer2010a. Чистота tc_uPA и вариантов mPlg составила 80% и 95% соответственно.

Измерение спектров флуоресценции при активации мини-плазминогена и его вариантов. Измерения проводили на флуориметре Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent, 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 – с оптическим разрешением 5 нм, скорость сканирования – 100 нм/мин. В качестве относительной величины флуоресценции было принято отношение интенсивности флуоресценции при 320 нм к интенсивности при 360 нм при длине волны возбуждения 279 нм (I_{320}/I_{360}) [12]. Регистрировали спектры флуоресценции mPlg, затем добавляли tc_uPA к раствору mPlg, перемешивали и начинали запись флуоресценции во времени при длинах волн 320 и 360 нм. Запись данных проводили с момента добавления tc_uPA в раствор mPlg до выхода кривой интенсивности флуоресценции на плато. По завершении реакции регистрировали спектр флуоресценции образовавшегося продукта.

В предварительном опыте определяли молярное соотношение mPlg и tc_uPA, при котором активация mPlg W141W215 происходит медленно (с выходом на плато за 20–30 мин). Для дальнейших исследований было выбраны следующие условия: концентрация вариантов mPlg – 1000 нМ, концентрация tc_uPA – 25 нМ.

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

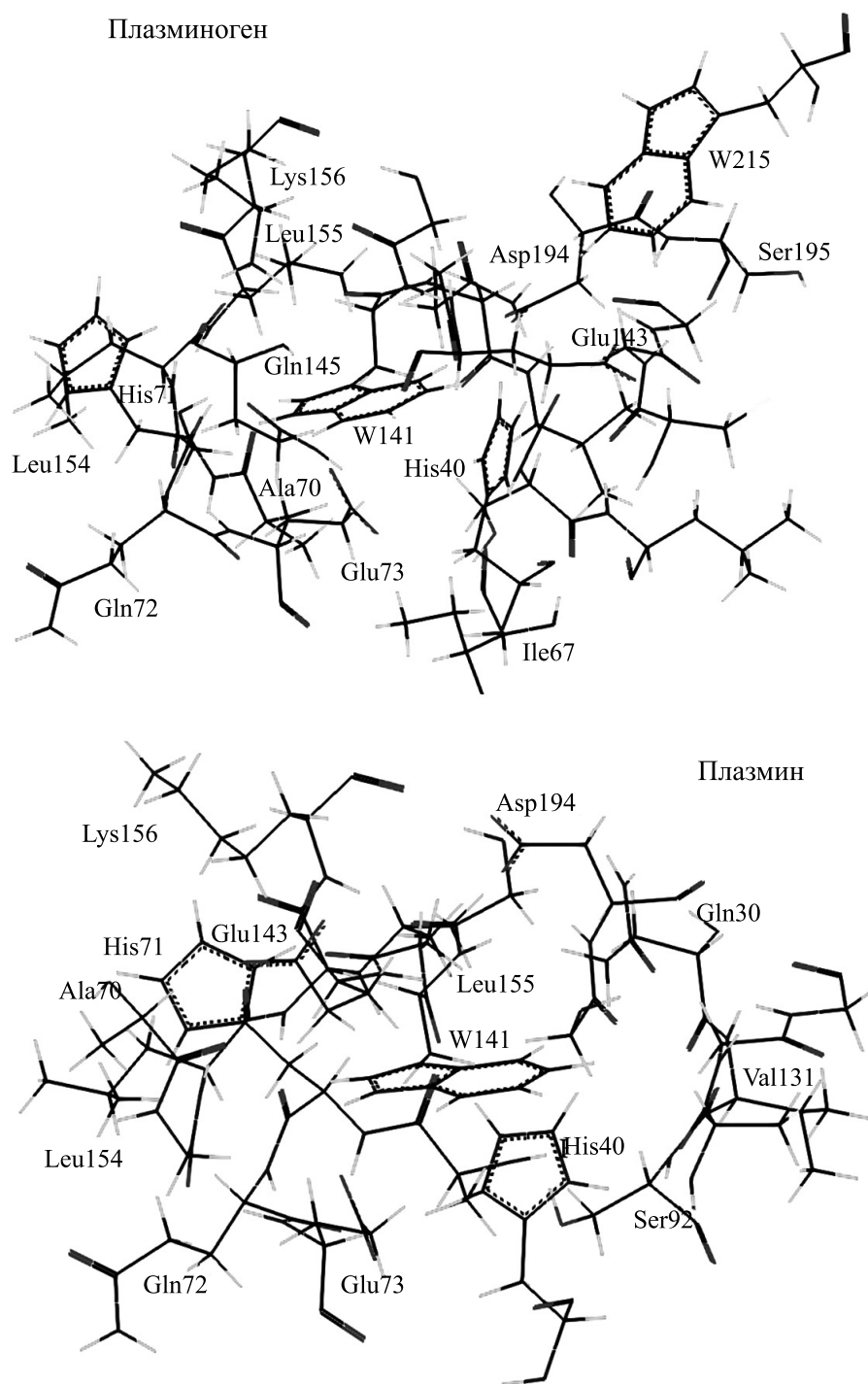


Рис. 2. Микроокружение Trp141 в плазминогене и плазмине.

Обработку результатов проводили в программных пакетах MS Office 2003 и Cary Eclipse.

Ферментативную активность мини-плазминогена и его вариантов в отношении хромогенного субстрата S-2251 определяли описанным ранее методом [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мини-плазминоген, использованный в данной работе в качестве исходного варианта для внесения мутаций, подробно описан ранее [8–10]. Он представляет собой укороченный вариант (каталитический домен и один (пятый) крингл-

217R	W			W R
217E	W			W E
W141A215	W			A
W141Y215	W			Y
W141F215	W			F
F141W215	F			W
F141F215	F			F
W141W215	TGWGETQGTF----	GAGL	...	DSCQGDSSGGPLVCFE--KDKYILQGVTSWGLGCARPNKPG
	141			190
	685			740
Плазминоген	TGWGETQGTF----	GAGL	...	DSCQGDSSGGPLVCFE--KDKYILQGVTSWGLGCARPNKPG
Трипсиноген	SGWGNTASS-----	GADY	...	DSCQGDSSGGPVVCNG--Q-----LQGVVSWGDGCAQKNKPG
Тромбин	TGWGNLKETWTANVGKQ		...	DACEGDSGGPFVVKSPFNRRWYQMGIVSWGEGCDRDGKYG
Урокиназа	TGFGKENST-----	DYLY	...	DSCQGDSSGGPLVCSL--QGRMTLTGIVSWGRCALKDKPG
	:*:*: :	.		*:*.*****.* : *:.*** ** .* *
	Автолизная петля			Петля, стабилизирующая оксианионную область
				s1 - Петля

Рис. 3. Варианты мини-плазминогена. Замены аминокислотных остатков в исследованных вариантах мини-плазминогена показаны в верхней части рисунка. Обозначения вариантов показаны слева (W141W215 (плазминоген) — исходный вариант). В нижней части — выравнивание первичных структур фрагментов каталитического домена плазминогена (P00747), трипсиногена (P07477), тромбина (P00734) и урокиназы (P00749) человека. Координаты аминокислотных остатков приведены по химотрипсиновой номенклатуре (верхняя строка) и Glu-Plg (нижняя строка).

домен) природного плазминогена человека. Мутации в кодирующую часть белка вносили с использованием методов генетической инженерии. Список проанализированных в настоящей работе вариантов mPlg приведен на рис. 3.

Спектры флуоресценции вариантов mPlg с заменами Trp141 и Trp215 до и после активации приведены на рис. 4. Как видно из рисунка, активация вариантов с одиночными заменами сопровождается покраснением максимума спектра, тогда как при двойной замене изменения спектра при активации mPlg не наблюдается. Следовательно, оба триптофана (141 и 215) вносят вклад в сдвиг спектра. Наиболее существенное влияние на сдвиг оказывает изменение микроокружения Trp215 (ср. рис. 4б и 4в). Примечательно, что изменение интенсивности сигнала в максимуме флуоресценции при активации у вариантов mPlg с одиночными заменами триптофанов имеет разный знак: флуоресценция активной формы варианта с заменой Trp215 меньше, а Trp141 — больше, чем у соответствующего зимогена.

На рис. 5 приведены кривые изменения интенсивностей флуоресценции при длинах волн 320 и 360 нм, а также сдвигов (I_{360}/I_{320}) при активации зимогенов урокиназой. В процессе активации урокиназой варианта mPlg с отсутствующим W141 интенсивность флуоресценции при длине волны 320 нм не изменяется, тогда как при 360 нм — значительно возрастает (рис. 4б и 5а). При активации вариантов mPlg с Trp215, замененным на

другую аминокислоту (Ala, Tyr, Phe), наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции в коротковолновой (320 нм) и отсутствие изменений в длинноволновой области (360 нм) спектра (рис. 4в, 5б и 6).

Кинетические кривые для mPlg F141W215 могут быть аппроксимированы экспонентой (или гиперболой) с характерным временем $t_{1/2} = 12$ мин (рис. 5а, таблица). Активация вариантов с заменой триптофана в положении 215 происходит со схожими характерными временами, при этом кинетические кривые совпадают для вариантов W141F215 и W141Y215, а при замене W141A215 наблюдается более выраженный сдвиг флуоресценции (рис. 6, таблица).

Из анализа третичной структуры сериновых протеаз следует, что в состоянии активного фермента Trp215 тесно контактирует с аминокислотным остатком, находящимся в положении 217 (пример — на рис. 1). Нами проведен анализ вариантов mPlg с заменами лейцина (L) в этом положении на глутаминовую кислоту (E) или аргинин (R). Выбор аминокислотных остатков для замены обусловлен тем, что глутаминовая кислота находится в аналогичном положении у урокиназы, а аргинин — у тромбина (см. рис. 3). Как и ожидалось, изменение микроокружения W215 в активном ферменте (ср. рис. 1 и 2) привело к изменению кинетических кривых (рис. 7).

В нашей предыдущей работе были исследованы зависимости спектров флуоресценции mPlg и

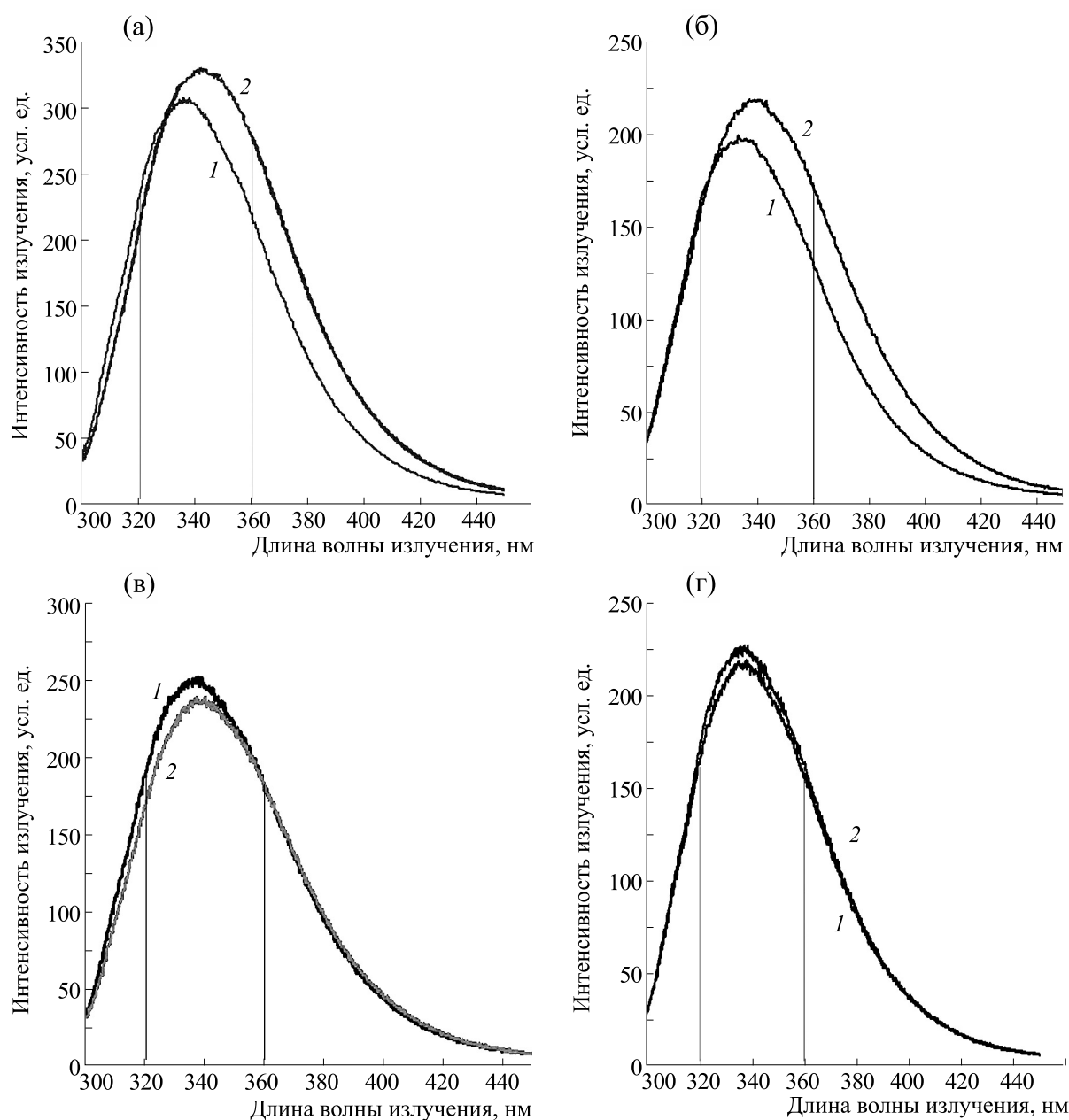


Рис. 4. Спектры флуоресценции вариантов mPlg до и после активации урокиназой: (а) – W141W215, (б) – F141W215, (в) – W141Y215, (г) – F141F215; 1 – спектр до активации, 2 – спектр после активации.

mPln от температуры и рН [7]. Для всех проанализированных в настоящей работе мутантов как температурная, так и рН-зависимость не отличались от таковых для белка дикого типа как в состоянии профермента, так и для активированного фермента (данные не приводятся).

Ферментативная активность. Амидолитические активности вариантов mPln представлены в таблице. Следует подчеркнуть, что ни один из исследованных вариантов не обладал детектируемой ферментативной активностью до активации

урокиназой. Из приведенных данных видно, что, за исключением L217E, внесенные мутации приводили к уменьшению активности. Примечательно, что при всей консервативности триптофана в положении 215 у сериновых протеаз [13,14] (рис. 3) его замена приводит к значительному снижению, но не к полной потере ферментативной активности mPln.

Интересно отметить, что для всех сериновых протеаз гемостаза, не требующих для проявления ферментативной активности дополнительных

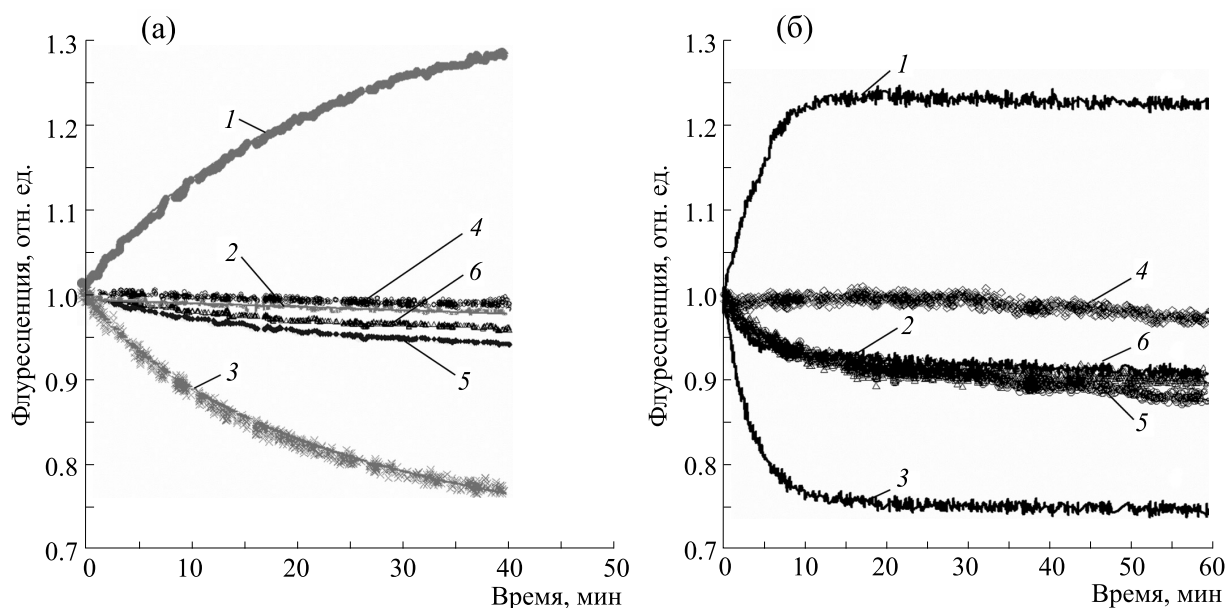


Рис. 5. Кинетика изменения флуоресценции при активации урокиназой вариантов mPlg: (а) – варианты F141W215 (1 – I_{360} , 2 – I_{320} , 3 – I_{320}/I_{360}) и F141F215 (4 – I_{360} , 5 – I_{320} , 6 – I_{320}/I_{360}); (б) – варианты W141W215 (1 – I_{360} , 2 – I_{320} , 3 – I_{320}/I_{360}) и W141F215 (4 – I_{360} , 5 – I_{320} , 6 – I_{320}/I_{360}).

факторов, а также и для трипсина рассчитанная проекция вектора электрической индукции на вектор, проведенный от центра бензольного кольца к центру пирольного кольца индола Trp215, имеет величину, близкую к описанной для плазмина [7] (для расчета использованы структуры 11mw (для tсuPA), 1rtf (tPA), 1bui (плазмин), 1eb1 (альфа тромбин), 4cr9 (фактор FXIa)). Это поле создается в основном отрицательно заряженным аминокислотным остатком Asp102, локализованным вблизи пирольного кольца Trp215, и положительно заряженными аминокислотными остатками петли 170–175 (или Arg217 для tсuPA), расположенными вблизи бензольного кольца индола Trp215 (см. рис. 1).

Факторам свертывания крови FVIIa, FIXa и FXa для перехода в активное состояние кроме расщепления пептидной связи между аминокислотными остатками 15 и 16 требуется связывание с активаторными факторами TF (тканевый фактор), FVIIIa и FVa соответственно [15]. Кофакторы при связывании стабилизируют (делают менее подвижной) как позицию индольного кольца Trp215, так и позицию петли 170–175. Петля 170–175 (подобно автолизной) часто оказывается столь подвижной, что становится невидимой при рентгеноструктурном анализе [16,17].

Примечательно, что замена петли 170 у фактора FVIIa на сокращенный по длине фрагмент (аналогичный трипсиновому участку 170) делает

Амидолитическая активность вариантов мини-плазмина

Вариант	Амидолитическая активность	Относительная скорость активации mPlg tсu_PA
W141W215	100%	100%
F141W215	40%	80%
F14115F	10%	80%
W141A215	14%	100%
W141Y215	20%	100%
W141F215	9%	90%
217E	140%	100%
217R	40%	100%

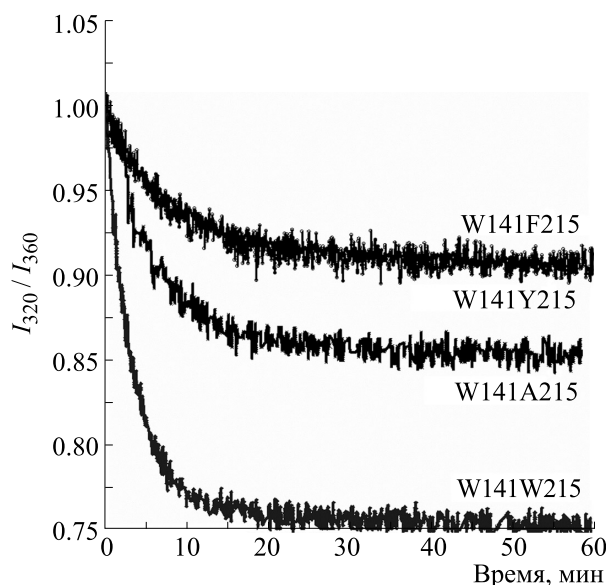


Рис. 6. Зависимость сдвига флуоресценции от времени при активации урокиназой вариантов mPlg с заменами W215.

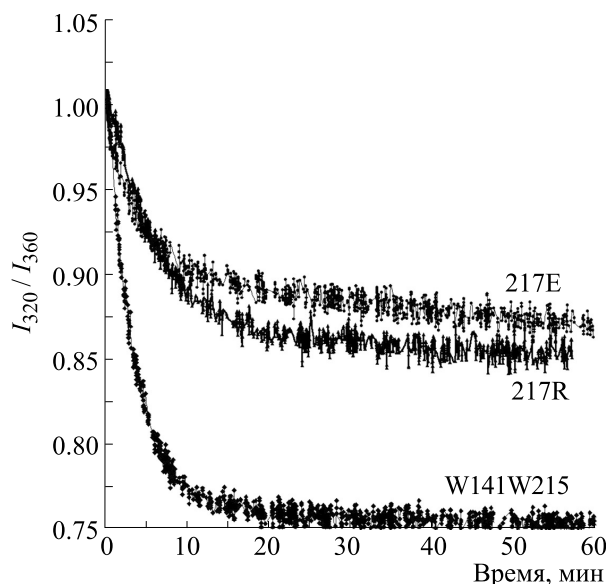


Рис. 7. Зависимость сдвига флуоресценции от времени при активации урокиназой вариантов mPlg с заменами в положении 217 плазминогена. W141W215 – исходный вариант плазминогена (с Leu в положении 217).

активность FVIIa практически не зависящей от связывания тканевого фактора [18].

Нам представляется, что любое ослабление ван-дер-ваальсовых контактов индольного кольца Trp215 или замена самого триптофана (приводящая к подвижности аминокислотного остатка 215) должны приводить к заметному снижению

активности фермента из-за дезориентации карбонила пептидной связи между серином 214 и аминокислотой 215. Поляризация индольного кольца Trp215, вызванная полем положительно заряженных аминокислот вблизи бензольного кольца Trp215, по-видимому, не только играет важную роль в спектре флуоресценции триптофана, но и (из-за уменьшения парциального электронного заряда на пироле) усиливает способность протона при Nε1 пирола служить донором при образовании водородной связи с ближайшим карбоксилатом (как в плазмине), карбонилатом или с молекулой воды, как описано в работах [19,20].

Расчеты структуры окружения аминокислоты 215, выходящие за пределы данной публикации, показывают, что в плазминогене Trp215 может быть заменен без существенной потери активности только на His.

Следует упомянуть, что мы не исследовали возможные изменения субстратной специфичности у мутантных вариантов mPln. В случае тромбина замена Trp215 на другую аминокислоту приводит к значительным изменениям скоростей гидролиза для разных субстратов [21].

ВЫВОДЫ

В настоящей работе показано, что:

1. Изменение спектра флуоресценции при активации плазминогена урокиназой вызвано изменением микроокружения Trp141 и Trp215.
2. Замены Trp141, Trp215 и Leu217 в mPlg не влияют на скорость активации плазминогена двухцепочечной урокиназой.
3. Замена консервативного у сериновых протеаз Trp в положении 215 не приводит к полному исчезновению амидолитической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. Б. Айсина и Л. И. Мухаметова, *Биоорганическая химия* **40**, 642 (2014).
2. J. C. Chapin and K. A. Hajjar, *Blood Rev.* **29**, 17 (2015).
3. D. A. Ayón-Núñez, G. Frago, R. J. Bobes, and J. P. Laclette, *Biosci. Rep.* **38**, BSR20180705 (2018).
4. Е. В. Кугаевская, Т. А. Гуреева, О. С. Тимошенко и Н. И. Соловьева, *Биомед. химия* **64**, 472 (2018).
5. E. I. Deryugina and J. P. Quigley, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 564259 (2012).
6. C. Oh, J. Hoover-Plow, and E. F. Plow, *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1683 (2003).
7. Т. И. Белянко, Я. Г. Гурский, Н. И. Добрынина и др., *Биофизика* **63**, 859 (2018).
8. Р. Ш. Бибилашвили, А. А. Белогуров, Я. Г. Гурский и др., Патент на изобретение RUS 2432396 24.11.2009 (2009).

9. Р. Ш. Бибилашвили, А. А. Белогуров, Я. Г. Гурский и др., Патент на изобретение RUS 2432397 24.11.2009 (2009).
10. Я. Г. Гурский, М. М. Минашкин, Е. С. Феоктистова и др., Биотехнология **1**, 25 (2010); Ya. G. Gurskii, M. M. Minashkin, E. S. Feoktistova, et al., Appl. Biochem. Microbiol. **46**, 776 (2010).
11. А. Я. Шевелев, Т. Н. Баршевская, А. А. Белогуров и др., Молекуляр. биология **20**, 778 (1986).
12. Е. А. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, Photochem. Photobiol. **18**, 263 (1973).
13. G. M. Yousef, M. B. Elliott, A. D. Kopolovic, et al., Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics **1698**, 77 (2004).
14. A. Jendroszek, J. B. Madsen, A. Chana-Muñoz, et al., J. Biol. Chem. **294** (10), 3794 (2019).
15. H. H. Versteeg, J. W. M. Heemskerk, M. Levi, and P. H. Reitsma, Physiol. Rev. **93**, 327 (2013).
16. R. B. Peacock, J. R. Davis, P. R. L. Markwick, and E. A. Komives, Biochemistry **57**, 2694 (2018).
17. J. J. Madsen, E. Persson, and O. H. Olsen, J. Thromb. Haemost. **13**, 262 (2015).
18. A. B. Sorensen, J. J. Madsen, L. A. Svensson, et al., J. Biol. Chem. **291**, 4671 (2016).
19. L. J. Juszcak and A. S. Eisenberg, J. Am. Chem. Soc. **139**, 8302 (2017).
20. A. S. Eisenberg, M. Nathan, and L. J. Juszcak, J. Mol. Struct. **1118**, 56 (2016).
21. D. Arosio, Y. M. Ayala, and E. Di Cera, Biochemistry **39**, 8095 (2000).

The Study of the Structure of Trypsin-Like Serine Proteases.

2. The Study of Tryptophan Fluorescence in Variants of Miniplasminogen with the Altered Primary Structure

T.I. Belyanko, E.S. Feoktistova, N.A. Skrypina, A.V. Skamrov, Ya.G. Gurskii, N.M. Rutkevich, N.I. Dobrynina, R.Sh. Bibilashvili, and L.P. Savochnikina

Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Health of Russian Federation, 121552, Moscow, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a

Variants of miniplasminogen with altered primary structure were constructed to study previously described changes in tryptophan fluorescence upon activation of plasminogen by urokinase. Miniplasminogens with Trp141, Trp215 and Leu217 substitutions (amino acid residue position by Chymotrypsin numbering) were tested. Activation of mutants with a single tryptophan substitution induced fluorescence spectrum change, no changes in the fluorescence spectrum were observed in case of miniplasminogen with a double tryptophan substitution. This indicates that both Trp141 and Trp215 contribute to the fluorescence spectrum shift. It has been suggested earlier, that changes in the Trp215 microenvironment mostly cause a shift in the spectrum. The amino acid substitutions, Trp141, Trp215 and Leu217, in miniplasminogen had no effect on the rate of plasminogen activation by urokinase. It has been shown that the replacement of the conservative Trp215 in serine proteases led to significant reduction but not losing the amidolytic activity of plasmin.

Keywords: plasminogen, tryptophan fluorescence, activation of enzyme, catalytic domain, relationship between structure and enzymatic activity, mutations