



УДК 577.152.232 \* 13.02

© 1994 И. П. Баскова,  
Л. Л. Завалова \*, Е. В. Кузина \*

ЭНДО-ε-(γ-Glu)Lys-ИЗОПЕПТИДОЛИЗ КАК  
ПРОЯВЛЕНИЕ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТЕОЛИЗА

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет;

\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: дестабилаза, изопептидаза, протеолиз, транслгутаминазы, фактор XIIIa, фибринолиз.

Исследована каталитическая активность дестабилазы в реакциях гидролиза ряда синтетических и природных субстратов. Показана высокая специфичность фермента в отношении гидролиза эндо-ε-(γ-Glu)Lys-изопептидных связей.

ε-(γ-Glu)Lys-изопептидные связи образуются в результате посттрансляционной модификации белков. Известны два механизма их образования: ферментативный, обусловленный транслгутаминазами (КФ 2.3.2.13) (рис. 1а) и неферментативный, как результат непосредственной нуклеофильной атаки ε-аминогруппы лизина одного белка на реактивный внутренний (рис. 1б) γ-глутамил-цистеин-S-ил-тиоэфир («bait»-область) другого белка [1—3].

Неферментативный механизм имеет место при взаимодействии α<sub>2</sub>-макрглобулина с сериновыми протеолитическими ферментами [3]. Ферментативный механизм благодаря разнообразию внутри- и внеклеточных транслгутаминаз является определяющим в образовании эндо-ε-(γ-Glu)Lys-изопептидных связей в гомо- и гетерополимерных структурах биологических систем.

Наиболее изучены изопептидные связи, или поперечные сшивки («cross-links»), образование которых катализируется транслгутаминазой плазмы и тромбоцитов, фактором XIIIa (фибринстабилизирующим фактором) в присутствии ионов кальция [2]. Эти связи «сшивают» γ-γ- и α-α-цепи соседних молекул фибрина и формируют мультимерную пространственную структуру стабилизированного фибринового сгустка [4], составляющего основу тромба, обеспечивая его механическую прочность и резистентность по отношению к ферменту плазмину. Посредством такого рода «сшивок» связываются фибрин с α<sub>2</sub>-антиплазмином [5], фибронектином [6] и тромбоспондином [7]; коллаген с фибронектином [3] и с фактором Виллебранда [9], а также обеспечивается образование полимеров факторов V [10]. Такие связи найдены в структурных белках [11] и в мембранных белках тромбоцитов [12] и эритроцитов [13]. ε-(γ-Glu)Lys-Изопептидные связи обнаружены в белках при ряде патологических состояний организма. Так, при

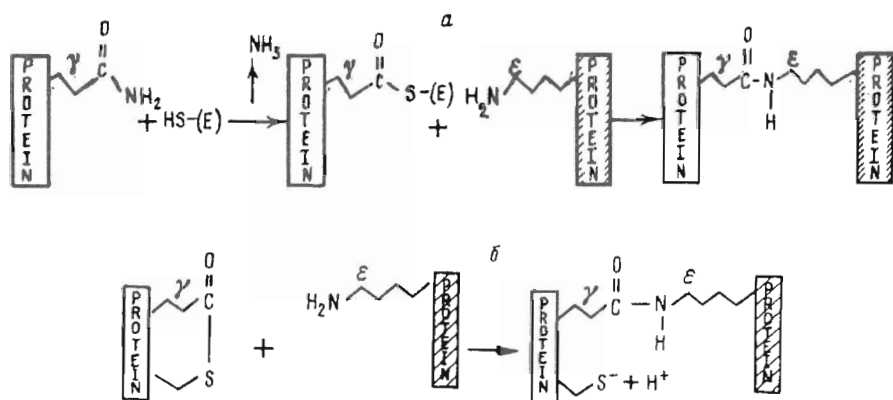


Рис. 1. Пути образования  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-изопептидных связей в белках: *a* — ферментативный, обусловленный трансглутаминазами (SH — (E)); *b* — неферментативный, как результат участия в реакции внутреннего  $\gamma$ -глутамил-цистеин-S-ил-тиоэфира

катаракте хрусталика обнаружено кросс-линкирование молекул  $\beta$ -кристаллина [14, 15], поперечные сшивки между белками мембран эритроцитов выявлены при некоторых заболеваниях крови [16]. Показано, что образование изопептидных связей сопровождается старением клеток [13]. В последние годы экспериментально установлено, что имеет место экспрессия тканевых трансглутаминаз печени, простаты и тимуса при физиологической смерти клеток (апоптозисе). Предполагается, что причина апоптозиса — образование резистентных к действию протеолитических ферментов изопептидных связей, формирующих белковые полимеры, а это препятствует удалению внутриклеточных макромолекул и агентов воспаления во внеклеточное пространство [17].

Образование  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-изопептидных связей можно замедлить или полностью заблокировать внесением соответствующих ингибиторов трансглутаминаз [18]. Но разрушить уже образовавшиеся изопептидные связи не представляется возможным, поскольку они не гидролизуются известными протеолитическими ферментами. Прочность этих связей определяет их биологическую значимость для физиологических процессов, таких, как свертывание крови, фибринолиз, заживление ран и др.

В течение многих лет делаются попытки обнаружить специфическую эндопептидазу, способную разрушать изопептидные связи. Такой фермент мог бы иметь важное терапевтическое значение, а также быть использованным для идентификации цепей в белковых полимерах, образованных при участии трансглутаминаз. Именно такой фермент ( $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-изопептидаза) был обнаружен в секрете слюнных желез медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* и назван дестабилазой [19]. Присутствие ее среди серпинов (гирудины, бделлины, эглины), определяющих высокий ингибиторный потенциал секрета *H. medicinalis* [20], подчеркивает значимость дестабилазы как единственного агента, способного обеспечить растворение фибрина в кишечном канале пиявки, куда он попадает в составе секрета слюнных желез вместе с насосанной пиявкой кровью и где эта кровь может сохраняться продолжительное время (до двух лет) [21]. Тромболитические свойства секрета пиявок при гирудотерапии тромбозов [22] также в значительной степени определяются дестабилазой — изопептидазой.

Дестабилаза была обнаружена при сравнении эффективности действия секрета слюнных желез пиявки на фибрин стабилизированный и нестабилизированный. Оказалось, что, чем выше степень стабилизации фибрина, выражающаяся в количестве фибрина, способного растворяться в 2% уксусной кислоте, тем больше скорость растворения его дестабилазой [19] (рис. 2).

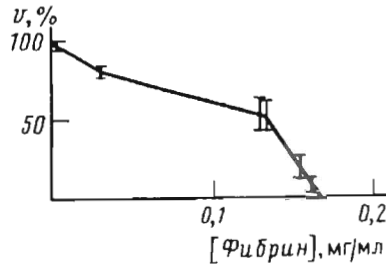
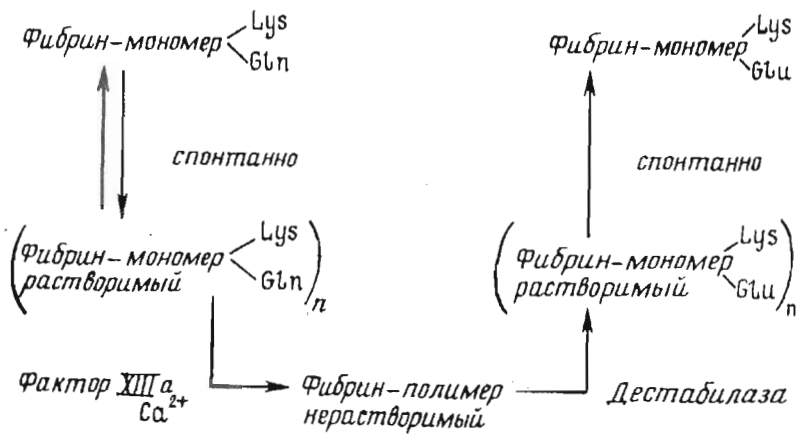


Рис. 2. Зависимость уровня деполимеризации фибрина от степени его стабилизации при инкубации с 0,1 мл секрета слюнной железы (37° С, 25 ч). Степень стабилизации выражена количеством фибрина, способного растворяться в 2% уксусной кислоте

На основании полученных экспериментальных данных было высказано предположение о последовательности событий при действии дестабилазы на фибрин. Фермент катализирует гидролиз изопептидных связей, соединяющих  $\gamma$ - $\gamma$  и  $\alpha$ - $\alpha$ -цепи в стабилизированном фибрине, которые образованы остатками Gln и Lys, расположенными в областях молекул фибрин-мономеров, обеспечивающих его спонтанную полимеризацию — остатки 373—410 в С-концевой области  $\gamma$ -цепей [23]. В результате гидролиза дестабилазой возникают остатки Glu вместо исходных Gln. Появление избыточного отрицательного заряда в области полимеризации фибрина и его аккумуляция в процессе изопептидолиза, очевидно, вызывает изменение конформации фибрина, что стимулирует спонтанную деполимеризацию дестабилизированного фибрина (схема) [19].



Образование нерастворимого фибрин-полимера и его дестабилизация и деполимеризация под действием дестабилазы [19]

Для доказательства высказанного предположения на первом этапе были исследованы потенциальные низкомолекулярные субстраты дестабилазы, такие, как Glu(pNA), Gln, диизопептид  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys,  $\gamma$ -Glu-дансилкадаверин, и показано, что все они гидролизуются дестабилазой [19, 24]. В качестве специфического высокомолекулярного субстрата был выбран D-D-димер, продукт ограниченного протеолиза стабилизированного фибрина плазмином или трипсином [25], состоящий из крайних D-доменов соседних молекул фибрина. D-D-Димер характеризуется высоким содержанием изопептидных связей, соединяющих фрагменты  $\gamma$ - $\gamma$  и  $\alpha$ - $\alpha$ -цепей фибрина. Методом гель-электрофореза удалось показать мономеризацию D-D-димера до D-мономера в результате инкубации с дестабилазой

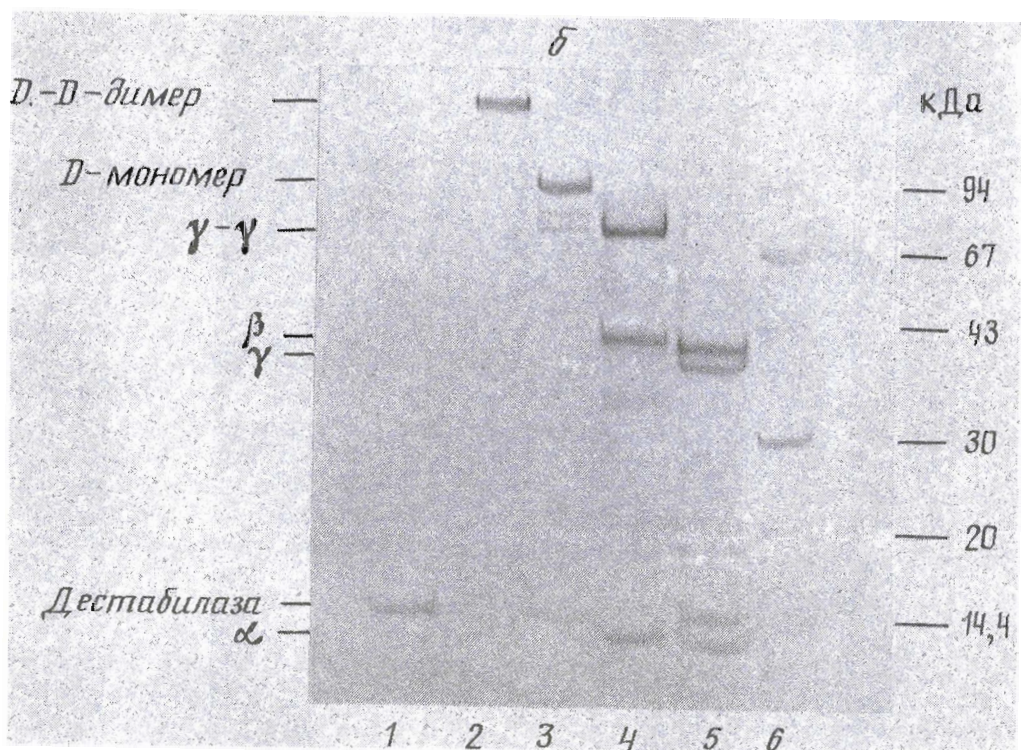
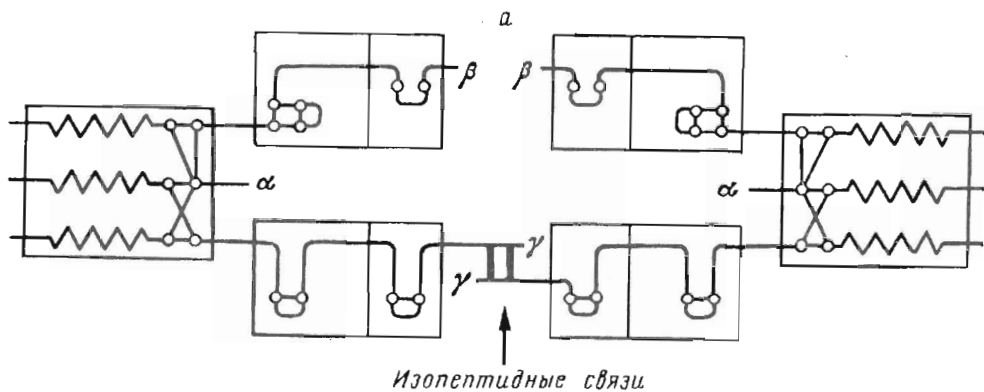


Рис. 3. Схематическое представление доменной структуры D-D-димера (а) и гель-электрофорез продуктов его гидролиза дестабилазой (б).  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  — аминокислотные цепи в фибрине

(рис. 3) [26]. Анализ N-концевых аминокислотных остатков  $\gamma$ -цепей D-D-димера и D-мономера показывает наличие только одной аминокислоты — серина. Аминокислотные последовательности N-концевых фрагментов  $\gamma$ -цепи D-D-димера, продукта его мономеризации дестабилазой и фрагмента фибрина быка [27] совпадают (рис. 4). Полученные предварительные результаты по C-концевому анализу остатков  $\gamma$ -цепей D-D-димера и соответствующего D-мономера также свидетельствуют об их полной идентичности.

Следовательно, дестабилаза катализирует гидролиз только исопептидных  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-связей. Приведенные результаты однозначно характеризуют специфичность фермента. Кроме того, они доказывают, что дестабилаза является

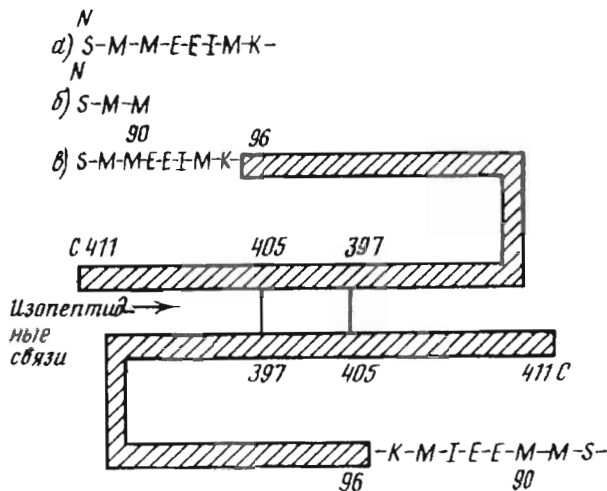


Рис. 4. N-Концевые аминокислотные последовательности  $\gamma$ - $\gamma$ -цепей D-D-димера (а),  $\gamma$ -цепи D-мономер (б) и фрагмента  $\gamma$ - $\gamma$ -цепи бычьего фибрина (в). Показаны участки фрагментов 96—411  $\gamma$ -цепей, объединенных в результате стабилизации двумя симметричными изопептидными связями между  $\text{Glu}^{397}$  и  $\text{Lys}^{405}$ , N и C — N- и C-концы  $\gamma$ -цепей

не просто экзоглутаминазой-изопептидазой. Она первая известная эндо- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-изопептидаза. Специфичность дестабилазы открывает перспективы для изучения предложенного в работе [19] принципиально нового механизма фибринолиза-изопептидолиза. Это тем более важно, что в экспериментах *in vivo* продемонстрировано тромболитическое действие этого фермента [24].

Следует особо отметить, что процессы изопептидолиза протекают с низкими скоростями. Так, активность дестабилазы по отношению к синтетическому субстрату  $\text{Glu}(\text{pNA})$  составляет  $10^{-7} - 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $K_m$   $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $k_{кат}$   $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  при  $37^\circ \text{C}$ , pH 8,0 [28]. Эта отличительная черта дестабилазы обуславливает низкую скорость процессов тромболитизиса при однократном введении экспериментальным животным. Он продолжается в течение нескольких дней [24]. Однако биологическая целесообразность такого медленно протекающего процесса очевидна, поскольку это время сопоставимо с временем медленно протекающих репаративных процессов поврежденного участка тромбированной сосудистой стенки [29]. Эта особенность изопептидолиза сближает его с медленно протекающим процессом физиологического фибринолиза, сопровождающим свертывание крови и ограниченным рамками регуляции со стороны ингибиторов и активаторов фибринолиза и ингибиторов самого плазмина [30]. Известно, что срочный фибринолиз, стимулируемый внутривенным введением активаторов плазминогена, в 25% случаев сопровождается ретромбозами по причине отмеченного выше несоответствия между высокой скоростью тромболитизиса и низкой скоростью репарации сосудистой стенки.

На основе анализа фибринолитического действия дестабилазы можно заключить, что изопептидолиз не случайный процесс в регуляции жизненно важных функций организма. Появление дестабилазы в составе секрета слюнных желез медицинской пиявки обусловлено сложившейся в процессе эволюции ее адаптации к питанию кровью теплокровных. Предмет будущих исследований — выяснение детальных механизмов изопептидолиза и изучение новых высокомолекулярных природных субстратов дестабилазы.

Работа выполнена частично за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lorand L.//Membranes and Transport. V. 2/Ed. Martonosi A. I.: Plenum Publishing Corp., 1982. P. 473—478.
2. Lorand L., Losowsky M. S., Miloszewski K. J. M.//Progress in Hemostasis and Thrombosis. V. 5/Ed. Spaet T. H.: Grune and Stratton, 1980 P. 245—290.

3. Sottrup-Jensen L., Hansen H. F., Pedersen H. S., Kristensen L.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 17727—17737.
4. Doolittle R. T.//Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 195—229.
5. Sakata Y., Aoki N.//J. Clin. Invest. 1980. V. 65. P. 280—296.
6. Tamaki T., Aoki N.//Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 661. P. 280—285.
7. Bale M. D., Moster D. F.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5667—5673.
8. Mosher D., Schad P., Keinman H.//J. Clin. Invest. 1979. V. 64. P. 781—787.
9. Bockenstedt P., McDonagh G., Handin R. T.//J. Clin. Invest. 1986. V. 78. P. 551—556.
10. Francis R. T., McDonagh G., Mann K. G.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 9787—9792.
11. Kahn D. R., Cohen I.//Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 668. P. 490—498.
12. Cohen I., Blankenberg T. A., Borden D., Kahn D. R., Veis A.//Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 625. P. 365—375.
13. Lorand L., Siefring G. F., Lowie-Krentz L.//J. Supermol. Struct. 1978. V. 9. P. 427—440.
14. Lorand L., Paramesvaran K. N., Velasco P. T.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 82—83.
15. Lorand L., Hsu L. K. H., Seitring G. E., Raffery N. S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 1356—1360.
16. Lorand L., Michalska M., Murthy S. N. P., Shonet S. B., Wilson J.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 147. P. 602—607.
17. Fesus L.//2-nd International Conference «Transglutaminases and Protein Cross-linking Reaction»/ France. 1990. P. 6.
18. Paramesvaran K. N., Velasco P. T., Wilson J., Lorand L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8472—8475.
19. Баскова И. П., Никонов Г. И.//Биохимия. 1985. Т. 50. С. 424—431.
20. Baskova I. P., Nikonov G. I., Cherkesova D. U.//Folia Haematol. 1984. V. 111. P. 831—837.
21. Sawyer R.//Leech Biology and Behaviour./Charendon Press, Oxford. 1986.
22. Зайцев Г. П. Тромбофлебиты. Медгиз, 1947. С. 78.
23. Olexa S. A., Budzynski A. Z.//J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 2544—2549.
24. Baskova I. P., Nikonov G. I.//Blood Coagulation and Fibrinolysis. 1990. V. 2. P. 167—172.
25. Gaffney P. J., Creighton L. J., Perry M. J., Callus M.//Brit. J. Haematol. 1988. V. 68. P. 83—90.
26. Завалова Л. Л., Никонов Г. И., Кузина Е. В., Попова Г. Ю., Баскова И. П.//Биохимия. 1991. Т. 56. С. 115—124.
27. Завалова Л. Л., Кузина Е. В., Левина Н. Б., Баскова И. П.//Биохимия. 1992. Т. 57. С. 468—472.
28. Баскова И. П., Никонов Г. И., Завалова Л. Л., Ларионова Н. Б.//Биохимия. 1990. Т. 55. С. 674—679.
29. Clowes A. W.//Thromb. Haemost. 1991. V. 66. P. 62—66.
30. Hekman C. M., Loskutoff D. J.//Seminars in Thromb. and Hemost. 1987. V. 13. P. 514—527.

Поступила в редакцию  
13.XII.1993

*I. P. Baskova, L. L. Zavalova\*, E. V. Kuzina \**

## ENDO- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys-ISOPEPTIDOLYSIS AS A CASE OF HIGH SPECIFIC PROTEOLYSIS

*Biological Faculty of M. V. Lomonosov Moscow State University,*

*\* M. M. Shemyakin and Yu. A. Oxchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Catalytic activity of destabilase has been studied in hydrolyses of synthetic and natural substrates. High specificity of the enzyme is shown in hydrolysis of endo- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys isopeptide bonds.