



УДК 577.152.342'17.02

СВОЙСТВА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ФЕНИЛГЛИОКСАЛЕМ

© 2002 г. Л. И. Мухаметова*, Р. Б. Айсина**, Г. Ю. Ломакина**, С. Д. Варфоломеев*

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы;

** Институт экспериментальной кардиологии РКНПК МЗ РФ, Москва

Поступила в редакцию 10.07.2001 г. Принята к печати 23.10.2001 г.

Химической модификацией молекулы одноцепочечного активатора плазминогена урокиназного типа (scu-PA) фенилглиоксалеом в мягких условиях получены производные активатора с различным числом модифицированных остатков аргинина и изучены их свойства. Показано, что модификация 4–12 остатков аргинина в молекуле scu-PA не вызывает потери ее активаторной, фибринолитической и потенциальной амидазной активностей. Найдено, что производное scu-PA, в котором модифицировано четыре остатка аргинина, значительно более стабильно в плазме крови человека и вызывает более эффективный лизис плазменных сгустков, чем немодифицированный активатор. Предполагается, что три из четырех модифицированных остатков аргинина входят в состав кластера $^{178}\text{RRHRGGG}^{184}$, локализованного на поверхностной петле глобулы scu-PA и взаимодействующего с комплементарным рядом отрицательно заряженных остатков в молекуле основного плазменного ингибитора PAI-1. Нейтрализация положительно заряженных остатков аргинина в этом кластере уменьшает сродство scu-PA и двухцепочечного активатора плазминогена урокиназного типа (tscu-PA) к PAI-1, в результате чего увеличивается стабильность в плазме и фибринолитическая эффективность активатора.

Ключевые слова: одноцепочечный активатор плазминогена урокиназного типа; модификация; стабильность в плазме; фибринолитическая эффективность; фенилглиоксаль.

ВВЕДЕНИЕ

Активатор плазминогена урокиназного типа секретируется клетками как одноцепочечный белок (scu-PA, 54 кДа), который имеет низкую плазминогенактиваторную активность в растворе [1, 2], но проявляет заметную активность, будучи связанным со своим специфическим рецептором на поверхности клеток [3, 4] или в условиях, при которых плазминоген связан с С-терминальными остатками лизина α -цепи частично деградированного фибрина [5]. Плазмин, образовавшийся в небольших локальных концентрациях при расщеплении плазминогена, в свою очередь вызывает расщепление связи $\text{Lys}^{158}\text{--Pe}^{159}$ в молекуле scu-PA, в результате чего образуется двухцепочечный активатор урокиназного типа (tscu-PA, 54 кДа) [6, 7], который активирует плазминоген в 100 раз более эффективно, чем его одноцепочечный предшест-

венник [8, 9]. Этим объясняется типичная лаг-фаза на кривых тромболиза, наблюдаемая при действии scu-PA.

Каталитическая активность активаторов плазминогена урокиназного и тканевого типов (соответственно tscu-PA и t-PA) регулируется, по крайней мере, четырьмя представителями надсемейства ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов), известными как ингибиторы активаторов плазминогена (PAI-1, -2 и -3 и протеазный нексин 1) [10, 11]. PAI-1 (52 кДа) – основной ингибитор активаторов плазминогена в плазме крови человека. Он быстро инактивирует tscu-PA и t-PA с константой скорости второго порядка k_1 $(1\text{--}2) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [12, 13]. Инактивация обоих активаторов плазминогена ингибитором PAI-1 приводит к образованию стабильных эквимольных PA–PAI-1-комплексов, в которых активные центры tscu-PA и t-PA связываются с P_1 -остатком (Arg^{346}) реактивного центра PAI-1 [14, 15]. Эти стабильные PA–PAI-1-комплексы быстро выводятся из циркуляции клетками паренхимы печени и деградируют в них [16, 17], чем обусловлено короткое время жизни активаторов плазминогена, вводимых в кровотоки при тромболитической терапии.

Сокращения: PA – активатор плазминогена; scu-PA и tscu-PA – одно- и двухцепочечный активаторы плазминогена урокиназного типа; modscu-PA и modtscu-PA – модифицированные фенилглиоксалеом молекулы scu-PA и tscu-PA; t-PA – тканевый активатор плазминогена; PAI-1, -2 и -3 – ингибиторы активатора плазминогена типа 1, 2 и 3; VR1 – вариабельная область 1.

Автор для переписки (факс: (095) 939-54-17; эл. почта: arb@enzyme.chem.msu.ru).

В связывании активаторов плазминогена с PAI-1 решающую роль играет образование солевых мостиков между рядом положительно заряженных остатков, расположенных в поверхностной петле (вариабельной области 1, VR1) протеазного домена tscu-PA (и scu-PA) человека (остатки $^{178}\text{RRHRGGS}^{184}$) или t-PA (остатки $^{296}\text{KHRRSPG}^{302}$), и комплементарным рядом отрицательно заряженных остатков $^{350}\text{EEIIMD}^{355}$ молекулы PAI-1 [14, 18, 19]. Полученные путем мутагенеза варианты tscu-PA и t-PA, в которых VR1 полностью удален или составляющие эту область положительно заряженные аминокислоты заменены на нейтральные или отрицательно заряженные аминокислоты, не ингибируются PAI-1 [18–20]. В отличие от tscu-PA человека куриный tscu-PA, который не имеет положительно заряженных остатков в соответствующей VR1, сопротивляется ингибированию PAI-1 человека ($k_1 4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Однако замена остатков $^{192}\text{QNIM}^{195}$ в VR1 куриного tscu-PA на последовательность RRHR, обнаруживаемую в VR1 tscu-PA человека, приводит к увеличению константы скорости ингибирования мутантного куриного фермента в 700 раз ($k_1 3.02 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) и возникновению способности образовывать SDS-стабильный tscu-PA–PAI-1-комплекс [21, 22].

В последние годы появились доказательства взаимодействия scu-PA в плазме [23] и в растворе с ингибиторами PAI-2 [24] и PAI-1 [25]. При полном ингибировании всей измеряемой активности scu-PA образует с PAI-2 только обратимый нековалентный комплекс [24], в то время как небольшая часть молекул scu-PA образует с PAI-1 (при 10-кратном избытке последнего) 92 кДа-комплекс, SDS-стабильный при электрофорезе в восстанавливающих условиях [25]. Показано, что образование стабильного комплекса scu-PA–PAI-1 не является результатом генерации tscu-PA, который затем образует комплекс с PAI-1, так как молекулярная масса SDS-стабильного комплекса tscu-PA–PAI-1, определенная электрофорезом в этих условиях, равна 75 кДа (в результате ухода легкой цепи). По аналогии с образованием стабильных комплексов tscu-PA–PAI-1 и t-PA–PAI-1 можно полагать, что в образование комплекса scu-PA–PAI-1 вовлекается серин активного центра scu-PA, и это указывает на наличие у зимогена ферментподобных свойств. На основании этого предполагается, что scu-PA, подобно одноцепочечному t-PA, способен активировать плазминоген [26]. Возможно, что взаимодействие scu-PA с PAI-1 играет определенную роль в регулировании запуска активации плазминогена под действием tscu-PA *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

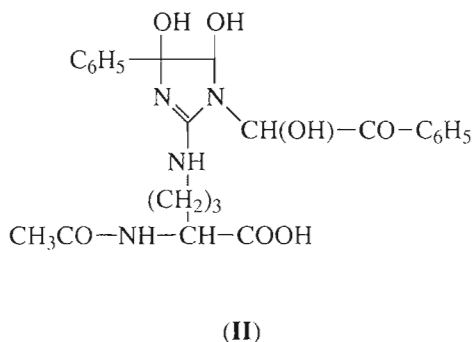
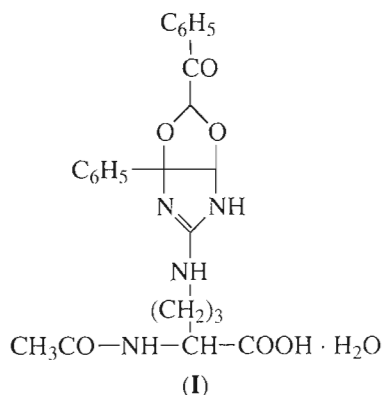
В данной работе мы использовали селективную химическую модификацию положительно

заряженных остатков аргинина в молекуле scu-PA с целью снижения его способности к связыванию с PAI-1. Наши результаты показывают, что модификация четырех остатков аргинина в молекуле scu-PA приводит к повышению его стабильности в плазме и соответственно к повышению фибринолитической эффективности.

Высокоактивный tscu-PA быстро теряет свою активность в растворе в результате протеолитической дегградации и термической денатурации [27]. Чтобы предотвратить потерю ферментативной активности в ходе химической реакции, мы проводили модификацию одноцепочечного зимогена (scu-PA). Поскольку в ходе активации плазминогена, присутствующего в плазме и в плазменном сгустке, scu-PA превращается в tscu-PA [6, 7], то модификация остатков аргинина в молекуле scu-PA должна влиять на связывание с PAI-1 и самого зимогена, и образующейся из него двуцепочечной формы tscu-PA.

В качестве реагента для модификации остатков аргинина в scu-PA нами был выбран фенолглиоксаль, который быстро и селективно реагирует с гуанидиновой группой остатка аргинина в мягких условиях (pH 7–8, 25°C) с образованием производного, достаточно стабильного в слабых кислых средах [28]. Хотя химическая структура этого производного точно не установлена, элементным анализом показано, что две молекулы фенолглиоксаля конденсируются с одной молекулой аргинина. На основании данных о взаимодействии фенолглиоксаля с амидами [29, 30] полагается, что первая молекула фенолглиоксаля связывается с гуанидиновой группой с образованием имидазольного кольца, которое затем быстро реагирует со второй молекулой фенолглиоксаля с образованием конечного продукта. Возможно также, что с гуанидиновой группой реагирует потенциально присутствующий в реакционной смеси димер фенолглиоксаля [27]. Из двух возможных структур продукта (I и II) более вероятной считается структура (I) [25].

Для снижения скорости модификации и во избежание возможной денатурации scu-PA, обработку раствора активатора различными избыточными количествами фенолглиоксаля проводили при 4°C. За степенью модификации в ходе реакции следили методом отбора проб и определением остаточного числа немодифицированных остатков аргинина с помощью цветной реакции Сакагуши [30], применяя калибровочную зависимость оптического поглощения аргинина (A_{450}) от его концентрации. На основании этих данных было найдено, что оптимальной скорости модификации соответствует отношение общей концентрации остатков аргинина белка к концентрации фенолглиоксаля в реакционной смеси равное 1 : 100 (моль/моль). При расчете этого соотноше-



ния использовались литературные данные, свидетельствующие о наличии 22 остатков аргинина в молекуле tscu-PA [7, 31].

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что независимо от скорости реакции максимальное число остатков аргинина, доступное в молекуле scu-PA для модификации фенилглиоксалем, равно 13 (60% от 22). Для проверки общего числа остатков аргинина в молекуле scu-PA нами был получен активный двуцепочечный фермент из одноцепочечного зимогена. Анализ tscu-PA методом Сакагуши показал наличие 22 остатков аргинина на молекулу [7, 31]. Следовательно 9 из 22 остатков аргинина в молекуле зимогена “спрятаны” внутри белковой глобулы и становятся доступными только после расщепления активационной связи Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹, в результате чего происходят конформационные изменения белковой глобулы и формирование активного центра tscu-PA.

Скорость реакции модификации scu-PA при pH 7.0 ниже, чем при pH 8.3 (рис. 1). Варьируя

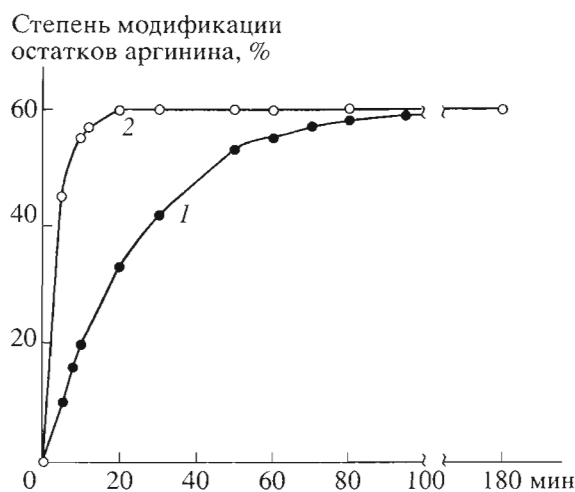


Рис. 1. Зависимость степени модификации остатков аргинина в молекуле scu-PA (9 мкМ) при 4°C от времени инкубации с 20 мМ фенилглиоксалем при pH 7.0 (1) и 8.3 (2).

время реакции scu-PA с фенилглиоксалем при pH 7.0, мы получили ряд производных зимогена, в которых было модифицировано 4, 7, 9, 10 или 12 остатков аргинина (modscu-PA-*n*, где *n* – число модифицированных остатков). Полученные препараты modscu-PA-*n* были очищены гель-фильтрацией. Установлено, что модификация остатков аргинина не приводит к потере активности scu-PA, так как удельные активаторная, фибринолитическая и амидазная активности, модифицированных препаратов scu-PA были идентичны соответствующим активностям нативного активатора.

Из рис. 2 следует, что стабильность в плазме крови человека модифицированных производных scu-PA превосходит стабильность нативного scu-PA. При этом чем ниже степень модификации остатков аргинина, тем выше стабильность modscu-PA: времена полужизни белков в плазме 100, 120, 150 и 220 мин для scu-PA, modscu-PA-12, -9 и -4 соответственно. Таким образом, наиболее стабильным в плазме является производное modscu-PA-4.

Как было отмечено выше, scu-PA, так же как tscu-PA, способен связываться с PAI-1 [25]. Следовательно, положительно заряженный кластер ¹⁷⁸RRHRGGS¹⁸⁴ молекулы scu-PA, необходимый для его связывания с этим ингибитором, должен быть расположен в поверхностной петле глобулы зимогена. Поэтому представляется наиболее вероятным, что три остатка аргинина, входящие в этот кластер, модифицируются фенилглиоксалем в первую очередь. Таким образом, можно полагать, что в производном modscu-PA-4 модифицированы именно остатки аргинина, локализованные в PAI-1-связывающем участке. Нейтрализация трех остатков аргинина этого положительно заряженного участка приводит к ухудшению связывания modscu-PA-4 с PAI-1, присутствующим в плазме, что приводит к повышению стабильности активатора в плазме. Четвертым остатком аргинина, который модифицирован в modscu-PA-4, возможно, является Arg¹⁵⁶, так как связь Arg¹⁵⁶-Phe¹⁵⁷ в молекуле нативного scu-PA весьма чувствительна к действию тромбина, и разрыв этой связи приводит к образованию неактивного tscu-PA [32]. Ве-

роятно, в связи с легкой доступностью Arg¹⁵⁶ нам не удалось получить производное scu-PA, в котором модифицировано только три остатка аргинина в VR1. Большую стабильность в плазме modscu-PA-9 и modscu-PA-12 по сравнению с нативным scu-PA можно объяснить теми же причинами, что и в случае modscu-PA-4. Однако пониженная стабильность двух первых производных по сравнению с modscu-PA-4 в плазме может быть обусловлена тем, что модификация дополнительного числа остатков аргинина (т.е. более четырех) приводит к разрушению солевых мостиков, в которых они принимали участие, поддерживая конформацию белковой глобулы. Хотя модификация остатков аргинина в молекуле scu-PA ухудшает его связывание с PAI-1 и повышает стабильность в плазме, все эти производные scu-PA при длительной инкубации в плазме медленно теряют фибринолитическую активность. Объяснением этому может служить тот факт, что в инактивацию и нативного, и модифицированных производных scu-PA помимо основного ингибитора PAI-1 вносят вклад термическая денатурация и взаимодействие с другими ингибиторами плазмы, такими, как PAI-2, PAI-3, протеазный нексин 1, α_1 -ингибитор трипсина и C₁-ингибитор. Для трех последних неспецифических ингибиторов участок ¹⁷⁸RRHRGGS¹⁸⁴ в молекуле scu-PA (или tscu-PA) человека не является связывающим центром, поскольку введение последовательности RRHR в VR1 куриного tscu-PA, в котором такой участок отсутствует, резко повышало скорость его ингибирования PAI-1 и PAI-2 человека, но не влияло на его взаимодействие с тремя вышеназванными ингибиторами плазмы [22]. Поэтому модификация остатков аргинина в PAI-1-связывающем кластере scu-PA человека не должна влиять на ингибирование полученных modscu-PA этими неспецифическими ингибиторами, то есть их вклад в общий процесс инактивации активатора в плазме остается неизменным.

Рисунок 3 иллюстрирует лизис плазменных сгустков в плазме под действием эквимоллярных концентраций нативного scu-PA и его модифицированных форм. В этой системе и твердая, и жидкая фазы содержат плазминоген и плазменные ингибиторы. Как видно, скорость лизиса под действием нативного scu-PA со временем снижается, в то время как под действием модифицированных производных scu-PA происходит более глубокий фибринолиз. Наибольшая скорость лизиса плазменного сгустка наблюдается для modscu-PA-4, который проявлял максимальную стабильность в плазме (см. рис. 2). При действии нативного активатора и его модифицированных форм на плазминоген, связанный с фибрином сгустка, образуется плазмин, который растворяет фибрин и одновременно превращает одноцепочечный активатор в двуцепочечный. Следовательно, большая фибринолитическая эффективность modscu-PA-4, на-

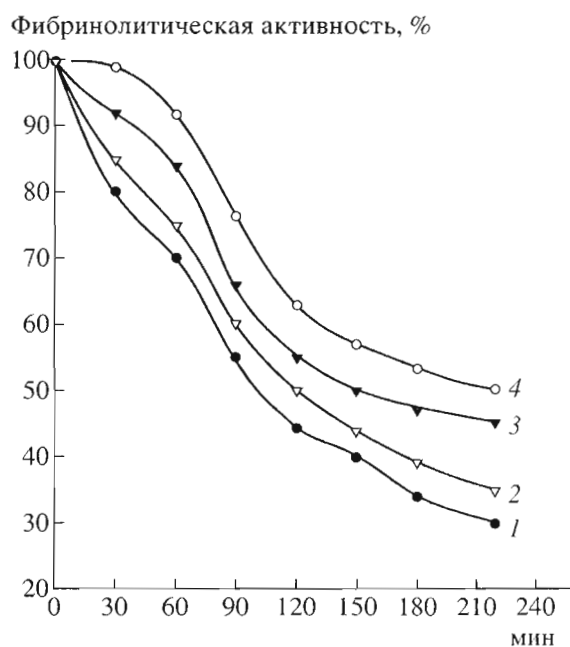


Рис. 2. Стабильность нативного scu-PA (1) и его модифицированных производных (9 нМ), содержащих 12 (2), 9 (3) и 4 (4) модифицированных остатка аргинина, при инкубации в плазме крови человека при 37°C.

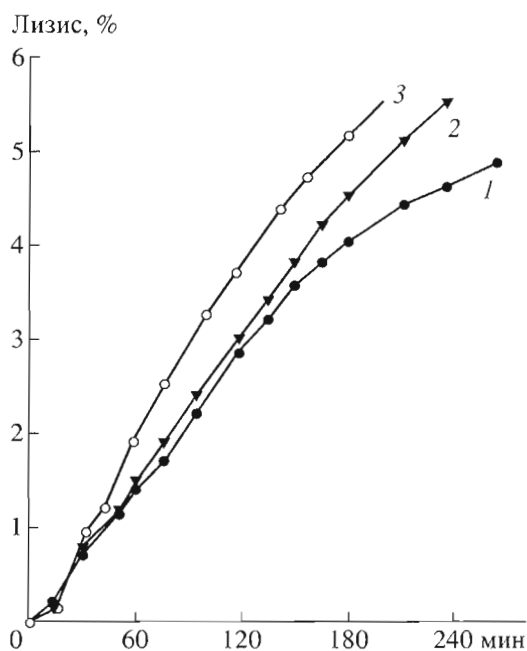


Рис. 3. Кинетика лизиса плазменных сгустков, погруженных в плазму, под действием 90 нМ scu-PA (1) и modscu-PA с 9–12 (2) или четырьмя модифицированными остатками аргинина (3) при 37°C.

блюдаемая в системе, по сравнению с нативным scu-PA связана с ухудшением взаимодействия PAI-1 как с modscu-PA-4, так и с образующимся более активным modtscu-PA-4.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что модификацией scu-PA фенилглиоксальем в мягких условиях получены производные активатора с различным числом модифицированных остатков аргинина на молекулу. Показано, что при модификации четырех остатков аргинина в молекуле scu-PA образуется наиболее стабильное в плазме производное активатора, которое обладает повышенной тромболитической эффективностью, по сравнению с немодифицированным активатором. На основании полученных результатов и анализа литературных данных предполагается, что три из четырех модифицированных остатков аргинина входят в состав положительно заряженного кластера, расположенного в варибельной области I молекулы scu-PA и участвующего в связывании PAI-1. Нейтрализация положительно заряженных остатков аргинина в этом кластере повышает сопротивляемость молекулы scu-PA и образующегося из него в ходе фибринолиза tscu-PA к действию PAI-1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы высокомолекулярный рекомбинантный scu-PA (54 кДа) со специфической активностью 100000 МЕ/мг белка [33]; бычий фибриноген, содержащий 64% свертываемого белка, и бычий тромбин (Каунасское предприятие бакпрепаратов, Литва); пул свежезамороженной цитратной плазмы крови человека (Гематологический научный центр МЗ России, Москва); *n*-нитроанилид Glp-Gly-Arg (S-2444) и *n*-нитроанилид *N*-D-Val-Leu-Lys (S-2251) (Sigma, США); гидрохлорид *L*-аргинина (Reanal). Остальные реактивы отечественного производства марки "ос. ч." или "х. ч."

Lys-плазминоген выделяли из плазмы крови человека с помощью аффинной хроматографии на Lys-сефарозе 4В [34].

Фенилглиоксаль был получен окислением ацетофенона в присутствии оксида селена (IV) в диоксане по методике, описанной в работе [35]. Полученный фенилглиоксаль перегоняли в вакууме и собирали фракции при 95–97°C/25 мм рт. ст.

Определение аргининовых остатков в белках методом Сакагуши. Метод основан на реакции монопроизводных гуанидина, дающих ярко красное окрашивание в щелочной среде при взаимодействии с α -нафтолом и гипобромидом натрия. Метод, описанный в работе [30], был модифицирован нами для определения остатков аргинина в 96-луночном полистирольном планшете. К 50 мкл 9 мкМ раствора испытуемого белка в каждой лунке добавляли 50 мкл 0.1% α -нафтола в 50% этаноле, 50 мкл 10% гидроксида калия, 50 мкл 5% мочевины и 100 мкл 5% гипобромиды калия (последний получали непосредственно перед употреблением путем смешения 5 мл 5% КОН с 32 мкл брома). Че-

рез 20 мин инкубации измеряли поглощение реакционных смесей при 490 нм на кинетическом фотометре для микропланшет "Molecular Devices" (США). Содержание аргинина в пробе вычисляли по калибровочной зависимости, полученной для стандартного *L*-аргинина (0.12–0.75 мМ).

Модификация scu-PA фенилглиоксальем. а) Изучение степени модификации остатков аргинина в scu-PA. К раствору 9 мкМ scu-PA в 50 мМ фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.1 мМ EDTA, или в 30 мМ вероналовом буфере pH 8.3, содержащем 0.1 мМ EDTA, добавляли рассчитанное количество свежеприготовленного 0.75 М раствора фенилглиоксаля в абсолютном этаноле до конечных концентраций 0.2, 2 или 22 мМ в реакционной смеси. Реакцию модификации проводили при 4 или 25°C. Через определенные промежутки времени отбирали 50 мкл реакционной смеси и анализировали степень модификации остатков аргинина в молекуле активатора методом Сакагуши [30].

б) Получение производных scu-PA с различным числом модифицированных остатков аргинина. К раствору 5 мкМ scu-PA в 50 мМ фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.1 мМ EDTA, добавляли рассчитанное количество свежеприготовленного 0.75 М раствора фенилглиоксаля в абсолютном этаноле до конечной концентрации 22 мМ в реакционной смеси. Реакцию модификации проводили при 4°C для максимального сохранения активности активатора. В ходе реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты по 100 мкл через 10, 20, 30, 40 и 50 мин и обессоливали их на колонке (*V* 1 мл) с сефадексом G-25 (Pharmacia, Швеция), белковые фракции объединяли и определяли содержание белка методом Бредфорд [36]. Все модифицированные производные были охарактеризованы по активаторной, фибринолитической и потенциальной амидазной активности.

Потенциальную амидазную активность scu-PA или modscu-PA определяли по разработанному нами методу по скорости гидролиза специфического хромогенного субстрата S-2444 после превращения зимогена в двухцепочечную форму под действием каталитических концентраций плазмينا. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 50 мкл 0.4 мкМ раствора scu-PA или modscu-PA, 100 мкл 2 нМ раствора Lys-плазмина в 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl и 0.01% Твин-80, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора S-2444 до конечной концентрации 0.4 мМ и фиксировали изменение оптического поглощения реакционных растворов при 405 нм через каждые 5–10 мин. Из тангенсов углов наклона кинетических кривых рассчитывали амидазную активность активаторов.

Активаторную активность scu-PA или modscu-PA определяли “сопряженным” методом, который заключается в измерении скорости гидролиза специфического субстрата S-2251 плазмином, образующимся в ходе активации Lys-плазминогена активаторами. Измерения проводили в 96-луночном планшете при 20°C. Каждая лунка содержала 50 мкл 0.1 нМ раствора scu-PA или modscu-PA, 100 мкл 1.2 мМ раствора S-2251 в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl и 0.01% Твин-80. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл Lys-плазминогена до конечной концентрации 0.1 мкМ. Через каждые 5–10 мин фиксировали изменение оптического поглощения реакционной смеси при 405 нМ. По тангенсам углов наклона кинетических кривых определяли активаторную активность активаторов.

Для изучения кинетики фибринолиза формировали столбы гелей из плазмы крови человека в стандартных пробирках Сали (*d* 9.5 мм) следующим образом: к 0.6 мл плазмы крови человека добавляли 20 мкл раствора тромбина до конечной концентрации 1 МЕ/мл, смесь встряхивали и оставляли в вертикальном положении при 25°C на 2 ч. Над образовавшимся плазменными сгустками помещали 0.45 мл плазмы и реакцию инициировали добавлением 50 мкл раствора scu-PA или его модифицированных производных до конечной концентрации 90 нМ. За кинетикой фибринолиза следили по уменьшению высоты столба геля (Δl) от времени инкубации при 37°C с помощью катетометра [37]. Каждый эксперимент повторяли три раза.

Стабильность scu-PA и modscu-PA в плазме крови человека. Scu-PA или его модифицированные производные (9 нМ) были инкубированы в человеческой плазме при 37°C в течение 4 ч. В ходе инкубации отбирали пробы плазмы (50 мкл), выделяли их эуглобулиновые фракции и определяли в них остаточную фибринолитическую активность активаторов на фибриновых пластинах [38].

Работа поддержана проектами № 00-04-48304, № 01-04-06102 Российского фонда фундаментальных исследований и Федеральной целевой научно-технической программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники гражданского назначения” (проект № 501-5(00)-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pannell R., Gurewich V. // *Blood*. 1987. V. 69. P. 22–26.
2. Gurewich V., Pannell R., Louie S., Kelley P., Suddith L., Greenlee R. // *J. Clin. Invest.* 1984. V. 73. P. 1731–1739.
3. Higazi A.A.-R., Cohen R., Henkin J., Schwartz B.S., Cines D. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 17375–17380.
4. Manchanda N., Schwartz B.S. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 14580–14584.
5. Liu J.-N., Gurewich V. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. P. 2012–2017.
6. Barlow G.H., Francis C.W., Marder V.J. // *Thromb. Res.* 1981. V. 23. P. 541–547.
7. Kasai S., Arimura H., Nishida M., Suyama T. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12382–12389.
8. Lukas M.A., Straight D.L., Fretto L.J., McKee P.A. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 12171–12177.
9. Lijnen H.R., Stump D.C., Collen D. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1987. V. 13. P. 152–159.
10. Kruithof E.K.O. // *Enzyme*. 1988. V. 40. P. 113–121.
11. Ellis V., Wun T.-C., Behrendt N., Ronne E., Dano K. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 9904–9908.
12. Kruithof E.K., Tran-Trang C., Ransijn A., Bachmann F. // *Blood*. 1984. V. 64. P. 907–913.
13. Thorsen S., Philips M., Selmer J., Lecander I., Astedt B. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 175. P. 33–39.
14. van Meijer M., Pannekoek H. // *Fibrinolysis*. 1995. V. 9. P. 263–276.
15. Sprengers E.D., Klufci C. // *Blood*. 1987. V. 69. P. 381–387.
16. Collucci M., Paramo J., Collen D. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 75. P. 818–824.
17. Cubellis M.V., Wun T.C., Blasi F. // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 1079–1085.
18. Adams D.S., Griffin L.A., Nachajko W.R., Reddy V.B., Wei C. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8476–8482.
19. Madison E.L., Goldsmith E.J., Gething M.J.H., Sambrook J.F., Bassel-Duby R.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 3530–3533.
20. Madison E.L., Goldsmith E.J., Gerard R.D., Gething M.J.H., Sambrook J.F. // *Nature (London)*. 1989. V. 339. P. 721–724.
21. Testa J.E., Stefansson S., Sioussat T., Quigley J.P. // *Fibrinolysis*. 1995. V. 9. P. 93–99.
22. Siple J.D., Alexander D.S., Testa J.E., Quigley J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 2933–2938.
23. Lijnen H.R., Zamarron C., Blaber M., Winkler M.E., Collen D. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 1253–1258.
24. Schwartz B.S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 8319–8323.
25. Manchanda N., Schwartz B.S. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 20032–20035.
26. Madison E.L., Kobe A., Gething M.J.H., Sambrook J.F., Goldsmith E.J. // *Science*. 1993. V. 262. P. 419–421.
27. Takahashi K. // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. P. 6171–6179.
28. Hofmann K. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Imidazole and its Derivatives, Part 1*. New York: Interscience Publishers, Inc., 1953. P. 93.
29. Shriner R.L., Newman F.W. // *Chem. Rev.* 1994. V. 35. P. 351–404.
30. Tomlinson G., Viswanata T. // *Anal. Biochem.* 1974. V. 60. P. 15–24.
31. Wun T.-C., Schleuning W.-D., Reich E. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 3276–3283.
32. Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 3486–3489.
33. Stepanova V., Bobik A., Bibilashvily R., Belogurov A., Rybalkin I., Domogatsky S., Little P.J., Concharova E., Tkachuk V. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 471–474.
34. Deutsch D.G., Mertz E.T. // *Science*. 1970. V. 170. P. 1095–1096.

35. Синтезы органических препаратов: Пер. с англ. М.: Гос. изд-во иностранной литературы, 1949. Т. 2. С. 507–509.
36. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
37. Попова Г. Ю., Еремеев Н. Л., Айсина Р. Б., Казанская Н. Ф. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 1989. Т. 5. С. 561.
38. Astrup T., Mullerts S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V. 40. P. 346–351.

Characterization of the Urokinase-Type Plasminogen Activator Modified with Phenylglyoxal

L. I. Mukhametova*, R. B. Aisina*#, G. Yu. Lomakina**, and S. D. Varfolomeev*

#Fax: +7 (095) 939-5417; e-mail: arb@enzyme.chem.msu.ru

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

**Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research Center, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

A chemical modification of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) with phenylglyoxal under mild conditions resulted in the scu-PA derivatives with various numbers of the modified Arg residues. The study of properties of the resulting derivatives demonstrated that the modification of 4–12 Arg residues did not cause any loss of the activator, fibrinolytic, and potential amidase activities of the activator. The scu-PA with four modified Arg residues was found to be the most stable derivative in human blood plasma; it causes a more efficient lysis of plasma clots than the native activator. Three of four modified Arg residues are supposed to be within the $^{178}\text{RRHRGGS}^{184}$ cluster, which was localized in the superficial loop of the scu-PA globule and was shown to interact with the complementary series of negatively charged residues in the molecule of the main plasma inhibitor PAI-1. The neutralization of positively charged Arg residues in this cluster decreases the affinity of scu-PA and the double chain urokinase-type plasminogen activator for PAI-1, which results in an enhancement of the stability in plasma and the fibrinolytic efficiency of the activator. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: phenylglyoxal; single-chain urokinase-type plasminogen activator, fibrinolytic efficiency, modification, stability in blood plasma