

УДК 577.112.853

Мадис МЕТСИС

ВЫЯВЛЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ТРАНСГЛУТАМИНИРОВАНИЯ В МОЛЕКУЛЕ ФИБРОНЕКТИНА ПРОТЕАЗАМИ

Специальная группа ферментов, катализирующая образование пептидной связи между γ -карбоксамидной группой глутамина и ϵ -аминогруппы лизина получила название эндо- γ -глутамин: ϵ -лизин трансфераза или трансглутаминаза. Реакция трансглутаминарования зависит от присутствия ионов кальция (Curtis, 1974).

Белковые субстраты для трансглутаминазы весьма ограничены. Трансглутаминаза клеток катализирует лормирование связей в кератине волос, шерсти и фибрине (Folk, Chung, 1973). Фактор 13а (плазменная форма трансглутаминазы) взаимодействует лишь с фибрином, α_2 -макроглобулином, α_2 -плазминовым ингибитором и фибронектином (Folk, Chung, 1973; Mosher, 1975). На фибронектине имеются два участка для трансглутаминарования фактором 13а. Один из них расположен очень близко к N-концу, другой — в С-концевой части полипептидной цепи (Mosher, Proctor, 1980; Högtmann и др., 1982). Фибронектин является субстратом также для клеточной формы трансглутаминазы.

Практически все работы по изучению взаимодействия трансглутаминазы и фибронектина проводились с использованием фактора 13а и к настоящему времени практически ничего не известно о том, как взаимодействует с фибронектином клеточная форма трансглутаминазы. Клеточная и плазменная формы трансглутаминазы отличаются друг от друга структурно и представляют собой различные белки (Henriksson, McDonagh, 1982).

В настоящей работе проведено изучение взаимодействия клеточной формы трансглутаминазы с фибронектином.

Материал и методика

Клеточная форма трансглутаминазы из печени морской свинки, представленная венгерским доктором Л. Фесусом (Дебреценская медицинская школа), получена согласно (Chung, 1972), донором аминокрупп служил ^{14}C -путресцин («Amersham», Англия) активностью 53,9 мКи/мм.

Стимулируемое трансглутаминазой включение ^{14}C -путресцина в фибронектин и его фрагменты, получено как описано ранее (Venyamínov и др., 1983), проводили при 37 °С в течение 2 ч в буфере, содержащем 0,05 М трис-НСl, 0,01 М NaCl, рН 7,0. В каждую пробу добавляли 0,075 мг/мл трансглутаминазы, 0,015 М CaCl₂ и 1 мкМ ^{14}C -путресцина. По окончании реакции смесь разводили в трех (объемах) буфера с альбумином (мг/мл) и 0,02 М ЭДТА. Белки осаждали 10% трихлоруксусной кислотой и несвязанный ^{14}C -путресцин удаляли фильтрованием на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе ЖСК-8 на счетчике «Rackbeta» (Швеция).



глутаминироваться (Mosher и др., 1980). Изолированный же фрагмент под действием транглутаминазы способен образовывать связь с путресцином — по одной молекуле путресцина на фрагмент. 60 кД центральная часть, который в нативном белке не транглутаминируется с фактором 13а, в изолированном виде под действием клеточной формы ферментов включает 3 молекулы путресцина.

Таким образом, изолированные фрагменты, во-первых, содержат дополнительные участки для клеточной транглутаминазы, и, во-вторых, клеточная форма фермента имеет большее число участков для взаимодействия с фибронектиновыми фрагментами, чем фактор 13а. Все экспериментальные данные по взаимодействию плазменной формы транглутаминазы с фибронектином суммированы на рисунке. На основании имеющихся экспериментальных данных представляется возможным сделать два основных вывода: 1) взаимодействие клеточной формы транглутаминазы с фибронектином менее специфично, чем с фактором 13а; 2) изолированные фрагменты фибронектина имеют дополнительные участки для транглутаминирования по сравнению с интактным белком. В составе экстрацеллюлярного матрикса клеточная форма транглутаминазы, возможно, сшивает различные участки полипептидной цепи фибронектина с коллагенами, и, тем самым, существенно стабилизирует структуру экстрацеллюлярного матрикса. Тот факт, что в изолированных фрагментах фибронектина появляются дополнительные участки для транглутаминирования, имеет важное значение для понимания принципа структурной организации молекулы фибронектина. Так как транглутаминазы являются чрезвычайно специфическими ферментами, то их способность модифицировать белок можно рассматривать как тест на структуру молекулы фибронектина. Действительно, в интактном белке имеется всего два участка, взаимодействующих с фактором 13а и четыре, взаимодействующих с клеточной формой транглутаминазы (из расчета на мономер фибронектина). Изолированные фрагменты фибронектина, сохраняющие функциональные свойства белка и практически полностью перекрывающие всю полипептидную цепь молекулы фибронектина, имеют в сумме четыре дополнительных участка для взаимодействия с клеточной формой транглутаминазы.

Особенно интересно, что у большого фрагмента (180 кД) фибронектина выявляются дополнительно 3—4 модифицируемых участка, не подверженных действию фермента в интактном белке. Представляется вероятным, что постулированная «бусеничная» структура фибронектина (Alexander и др., 1979) в составе интактного фибронектина, состоящем из двух полипептидных цепей, значительно компактнее. После разделения двух цепей и нарушения равновесия между положительно и отрицательно заряженными доменами супертретичная структура фибронектина разворачивается. Этот вывод хорошо согласуется с результатами изучения структурной организации фибронектина методами скоростной седиментации и ЯМР (Koteliansky и др., 1983; Metcис и др., 1984).

ЛИТЕРАТУРА

- Metcис М., Сепетов Н., Бушцев В., Котелянский В. Изучение структурной организации фибронектина. — Тез. докл. 16 конф. федерации европейских биохимических обществ. М., 1984, 331.
- Alexander, S. S., Colonna, G., Edelhoeh, H. The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin. — J. Biol. Chem., 1979, N 254, 1501—1504.
- Chung, S. I. Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1972, N 202, 240—260.
- Curtis, C. G. Dependent unmasking of active center cysteine during activation of fibrin stabilizing factor. — Biochemistry, 1974, N 13, 3774—3779.
- Folk, I. E., Chung, S. I. Molecular and catalytic properties of transglutaminases. — Adv. Enzymol., 1973, N 38, 109—191.

- Henriksson, P., McDonagh, J. Factor XIII activation and interactions. — In: Factor XIII and Fibronectin. Stuttgart, 1982, 1—15.
- Hörmann, H., Jilek, F., Seidl, M., Richter, H. Location of transamidase sensitive sites and fibrin binding regions within the domain structure of fibronectin. — In: Factor XIII and Fibronectin. Stuttgart, 1982, 175—180.
- Iwanu, V. The use of liver transglutaminase for protein labeling. — Eur. J. Biochem., 1977, N 80, 359—368.
- Koteliansky, V., Metsis, M., Sepetov, N., Bushuev, V., Venyaminov, S. Studies of the plasma fibronectin structure. — J. Cell. Biol., 1983, N 97, 332.
- McDonagh, R. P., McDonagh, J., Petersen, T. E., Thogersen, H. C., Skorstengaard, K., Sottrup-Jensen, L., Magnusson, S. Amino acid sequence of the factor XIII acceptor site in bovine plasma fibronectin. — FEBS Lett., 1981, N 127, 174—178.
- Mosher, D. F. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. — J. Biol. Chem., 1975, N 250, 6614—6621.
- Mosher, D. F., Schad, P. E., Vann, J. M. Cross-linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa, localization of participating glutaminy residues to a tryptic fragment of fibronectin. — J. Biol. Chem., 1980, N 255, 1181—1188.
- Mosher, D. F., Proctor, R. A. Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27 kilodalton fragment to Staphylococcus aureus. — Science, 1980, N 209, 927—929.
- Venyaminov, S., Metsis, M., Chernousov, M., Koteliansky, V. Distribution of secondary structure along the fibronectin molecule. — Eur. J. Biochem., N 135, 485—489.

Тартуский государственный
университет

Поступила в редакцию
24/XII 1984

Madis METSIS

TÄIENDAVATE TRANSGLUTAMINEERIMISKOHTADE ILMNEMINE FIBRONEKTIINI MOLEKULIS PROTEAASIDE TOIMEL

Fibronektiin on terve molekulina rakusisese transglutaminaasi substraat ja tal on 4 kohta transglutamineerimiseks monomeeris. Suures proteolüütilises fragmendis (180kD) ilmneb veel 4 modifitseerimiskoha olemasolu. Edasisel analüüsimisel selgus, et terve fibronektiini monomeeri neljast transglutamineerimiskohast kaks asuvad 27kD hepariinsiduvast fragmendis. 70kD kollageensiduv fragment sisaldab 1 täiendavatest kohtadest, 60kD tsentraalne fragment sisaldab 1 esialgse ja 2 uut modifitseerimiskohta ja 60kD hepariinsiduv fragment 1 esialgse ja 1 täiendava modifitseerimiskoha.

Täiendavate modifitseerimiskohtade ilmnest 180kD fragmendis vaadeldakse kui tertsiaalse struktuuri muutumise tagajärge.

Madis METSIS

GENERATION OF ADDITIONAL TRANSGLUTAMINATION SITES IN FIBRONECTIN BY PROTEASES

Intact fibronectin is a substrate for tissue transglutaminase. There are 4 sites of transglutamination in the monomer of fibronectin. The largest proteolytic fragment of fibronectin (180 kD) has 4 additional sites of transglutamination. It was shown that 2 modification sites in the intact molecule (original sites) are localized in the 27 kD heparin-binding fragment of the fibronectin molecule. The 70 kD collagen-binding fragment contains 1 additional site, the 60 kD "central" fragment contains 1 original site and 2 additional sites, and the 60 kD heparin-binding fragment contains 1 original and 1 additional site.

The appearance of additional sites of transglutamination in the 180 kD fragment of fibronectin is assumed to be the result of a changed tertiary structure of the fragment.