

Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1

Д. Д. Жерносеков, Э. Н. Золотарева, А. С. Кондратюк

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, Украина, 01601

chemikdd@mail.ru

ПАИ-1, важный компонент системы гемостаза, является специфическим ингибитором активаторов плазминогена тканевого (ТПА) и урокиназного (УПА) типов. ПАИ-1 относится к семейству серпинов. Взаимодействие с соматомединоподобным доменом витронектина стабилизирует активную форму ингибитора. Переход ПАИ-1 в латентное состояние сопряжен с конформационными изменениями в области петли реактивного центра. Механизм ингибиторного действия ПАИ-1 соответствует классической схеме ингибирования серпинами. ПАИ-1 блокирует адгезию, опосредованную рецептором УПА и интегринами, выполняя при этом важную роль в адгезивных процессах и ангиогенезе. Изменения уровня ПАИ-1 рассматривают как важный прогностический признак при заболеваниях сердечно-сосудистой системы (инфаркт миокарда, инсульт), фиброзе почек, диабете, канцерогенезе.

Ключевые слова: ПАИ-1, фибринолиз, миграция клеток.

ПАИ-1 принадлежит к семейству серпинов (ингибиторов сериновых протеиназ) и является природным специфическим ингибитором активаторов плазминогена урокиназного (УПА) и тканевого (ТПА) типов. Среди компонентов гемостаза ингибитор активатора плазминогена ПАИ-1 занимает особое место благодаря своим уникальным структурно-функциональным особенностям. За последнее десятилетие получены убедительные доказательства участия этого белка в процессе фибринолиза, а также его способности выполнять функции модулятора клеточной адгезии. Повышение концентрации ПАИ-1 наблюдается в условиях опухолевого роста и при других патологических процессах в организме человека. Дефицит ПАИ-1 в плазме может приводить к кровотечениям, а возрастание уровня ПАИ-1 пропорционально риску возникновения сердечно-сосудистых заболеваний (таких

как инфаркт миокарда, артериосклероз, тромбоз глубоких вен) [1, 2]. При заболеваниях почек уровень ПАИ в почечной ткани значительно увеличивается, что нередко вызывает фибротические осложнения [3]. При ожирении синтез ингибитора начинается происходить непосредственно в адипоцитах [4, 5]. ПАИ-1 также играет важную роль при хронических воспалениях легких [6]. В работах, посвященных изучению роли ПАИ-1 в патологических процессах, указывается, что его высокий уровень является неблагоприятным прогностическим признаком при онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях [1, 3–8].

Кроме ПАИ-1, в организме присутствуют два других ингибитора активатора плазминогена, обозначаемые как ПАИ-2 и ПАИ-3 [9–11]. Они различаются по молекулярной массе, содержанию в плазме и обладают меньшей специфичностью по отношению к активаторам плазминогена (таблица). Считают, что ПАИ-3 выполняет специфическую

Характеристика белков группы ПАИ

Название	Концентрация в плазме	Молекулярная масса, кДа	Константа скорости ингибирования ($M^{-1}c^{-1}$) по отношению к	
			УПА	ТПА
ПАИ-1	В среднем 24 нг/мл	52	10^6	10^7
ПАИ-2	В норме незначительна. При беременности 100–300 нг/мл	60	$9 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
ПАИ-3	2–5 мкг/мл	57	$8 \cdot 10^3$	10^3

10	20	30	40	50	60
<u>MQMSPALTCL</u>	<u>VLGLALVFGE</u>	<u>GSAVHNPPSY</u>	<u>VAHLASDFGV</u>	<u>RVFQQVAQAS</u>	<u>KDRNVVFS</u>
70	80	90	100	110	120
GVASVLA ^M LQ	LTTGG ^E TQQQ	IQAAM ^G GFKID	DKGMA ^P ALRH	LYKELM ^G PWN	KDEIST ^T DAI
130	140	150	160	170	180
FVQRDLKLVQ	<u>GFM^HFFRLFR</u>	<u>RSTVKQVDFS</u>	<u>EVERARFIIN</u>	<u>DWVKTHTKGM</u>	<u>ISNLLGKGA</u>
190	200	210	220	230	240
DQLTRLVLVN	ALYFNG ^O QKT	FPD ^S STHRR	LFHKS ^D GSTV	SVP ^M MAQ ^T NK	FNYTE ^F TPD
250	260	270	280	290	300
GHYYDILELP	YHGD ^T LSMFI	AAPY ^E KEVPL	SAL ^T NILSAQ	LISH ^W KG ^N MT	RLP ^R LLVLPK
310	320	330	340	350	360
FSLETEVDLR	KPLEN ^L G ^M TD	MFR ^Q FQADFT	SLSD ^Q E ^P LHV	AQAL ^Q K ^V KIE	VNES ^G TVASS
370	380	390	400		
STAVIVSAR*MI	<u>AREEII^MMDRP</u>	FLFV ^V RHNPT	GTVLF ^M GQVM	EP	

Рис. 1. Первичная структура ПАИ-1 из организма человека (все номера аминокислотных остатков в таблице и в тексте соответствуют таковым у нерасщепленной преактивационной формы). N – гликозилированный аспарагин [25]; MQMSPALTCL VLGLALVFGE G(SA) – преактивационный пептид [23, 24]; MP^HFFRLFR и EVERARFIIN DWVKTHTK – сайты связывания витронектина [35, 36]; F, M, L, Q – аминокислотные остатки, важные для связывания витронектина [37]; R*M – пептидная связь, атакуемая ТПА или УПА; РЕЕИМДР – сайт связывания ТПА или УПА

функцию ингибитора белка С (одного из основных компонентов противосвертывающей системы). Биологическая функция ПАИ-2 окончательно не установлена. Среди всех белков группы ПАИ наибольший интерес представляет ПАИ-1, который благодаря своим структурным особенностям взаимодействует с компонентами внеклеточного матрикса и, таким образом, несет более сложную функциональную нагрузку [12, 13].

Концентрация ПАИ-1 в плазме составляет в среднем 24 нг/мл с разбросом значений от 6 до 85 нг/мл. Содержание этого белка в артериальной крови может быть в 2–3 раза выше, чем в венозной [14, 15]. Более того, концентрация ПАИ-1 колеблется в течение суток: в первой половине дня она выше, чем во второй [11]. Согласно современным представлениям, пул ПАИ-1 плазмы формируется из нескольких источников: из тромбоцитов, эндотелиальных клеток, макрофагов, гепатоцитов и адипоцитов [16]. Около 90 % ПАИ-1 находится в тромбоцитах.

Структурные особенности белка ПАИ-1. Ген ПАИ-1 человека локализован на седьмой хромосоме в участке q21.3-q22 [17]. У высших приматов наблюдаются два разных транскрипта матричной РНК ПАИ-1: 2,4 и 3,2 тыс. нуклеотидов, при этом продуктом обоих транскриптов являются белки одинаковой длины [18]. Транскрипция и трансляция тромбоцитарного ПАИ-1 проходят на стадии мегакариоцитов. Однако тромбоциты содержат большое количество мРНК ПАИ-1, биосинтез которого продолжается на стадии тромбоцитов [19]. Транскрипция гена ПАИ-1 регулируется действием гормонов, цитокинов и факторов роста [16, 20, 21]. Особый интерес представляет тот факт, что синтез ПАИ-1 может быть индуцирован глюкокортикоидными гормонами, что, в частности, наблюдалось под влиянием дексаметазона [22].

Белок ПАИ-1 синтезируется в виде неактивного предшественника, содержащего 402 аминокислотных остатка (рис. 1). При формировании белковой глобулы под действием пептидазы происходит отщепление N-концевого сигнального пептида из 21 или 23 аминокислотных остатков. Таким образом, сформированная цепь включает 379 или 381 остаток [23, 24]. ПАИ-1 содержит три потенциальных центра гликозилирования по остаткам аспарагина 232, 288 и 352 [25]. Степень гликозилирования ПАИ-1 зависит от его происхождения в организме. Оказалось, что ПАИ-1, выделенный из тромбоцитов и плазмы здоровых доноров, не содержит углеводных остатков, в то время как ПАИ-1 эндотелиального и адипоцитарного происхождения гликозилированы. Эти данные позволили сделать вывод о том, что для здоровых людей главным источником ПАИ-1 является не эндотелий, а тромбоциты [26]. Насколько важно гликозилирование для функциональной активности ПАИ-1 показано также недав-

но проведенными исследованиями. Оказалось, что гликозилированная форма белка ПАИ-1 обладает более высокой ингибиторной активностью [27].

Взаимодействие ПАИ-1 с витронектином. Существенное значение для функционирования ПАИ-1 имеет его связывание с витронектином [13, 28]. Витронектин обнаруживается в плазме в концентрации 2–4 мкМ в основном в виде мономера, однако в составе внеклеточного матрикса он имеет мультимерную конформацию [29]. В тромбоцитах ПАИ-1 находится в альфа-гранулах в комплексе с витронектином [30–32]. С использованием электронной микроскопии [33] и ФИТЦ-меченных белков методом проточной цитометрии [34] показано, что после активации тромбоцитов и выброса содержимого альфа-гранул наружу происходит посадка этого комплекса на мембрану тромбоцита. В первичной структуре ПАИ-1 определены участки связывания с витронектином [35, 36] (рис. 1).

Методами направленного мутагенеза показано, что наиболее важными аминокислотными остатками, отвечающими за контакты с витронектином в молекуле ПАИ-1, являются Phe132, Met133, Leu139 и Gln146 [37]. С другой стороны, рассматривая структуру витронектина, обычно выделяют N-концевой соматомедин-B-подобный домен (SMB), состоящий из 44 аминокислотных остатков и содержащий сайт связывания ПАИ-1 [34]. За ним следует участок, включающий последовательность Arg-Gly-Asp, известную как сайт связывания интегринов. Установлено, что витронектин может связываться с C-концевым участком одного из интегральных белков – виментин, экспонируемом на мембране активированных тромбоцитов [34]. В опытах с иммобилизованными белками выявлено, что константа связывания иммобилизованного витронектина с ПАИ-1 составляет $1,9 \cdot 10^{-7}$ М. Если иммобилизовали ПАИ-1, то константа его связывания с витронектином составляла $5,5 \cdot 10^{-8}$ М. На основании этого сделано предположение, что в витронектине существуют как минимум два сайта связывания с ПАИ-1, один из которых, участок высокого сродства, становится закрытым после иммобилизации [38, 39]. Высокоаффинный сайт связывания ПАИ-1 с витронектином, по-видимому, отличен от такового интегринов Arg-Gly-Asp, однако взаимо-

действие ПАИ-1 в области SMB ингибирует интегрин-обусловленную клеточную адгезию, возможно, создавая стерические препятствия [40, 41].

Переход ПАИ-1 в латентное состояние. ПАИ-1 может находиться в активной (S-stressed) или неактивной (R-relaxed) формах [42]. Известно, что синтезируется этот белок в активном состоянии, но может спонтанно переходить в термодинамически более стабильную латентную форму [43]. Время полужизни S-формы ПАИ-1 составляет приблизительно 1–2 ч при температуре 37 °С и pH 7,4. Однако это время может уменьшаться в условиях более низкой температуры и pH [44, 45]. В плазме активная форма ПАИ-1 стабилизируется связыванием с витронектином. Причем, если для S-формы K_d составляет 80 нМ, то для R-формы, имеющей более низкое сродство к витронектину, это значение в 200 раз больше [46]. Показано, что ПАИ-1 можно реактивировать в условиях *in vitro*, используя денатурирующие агенты: гуанидин-хлорид, мочевины и додецил-сульфата натрия (SDS) [43]. Исходя из этого сделано предположение о том, что в условиях *in vivo* ПАИ-1 может быть реактивирован под влиянием отрицательно заряженных фосфолипидов, экспонируемых на поверхности активированных тромбоцитов [47]. При изучении перехода ПАИ-1 в латентное состояние выявлено, что этот процесс сопряжен с изменениями пространственной структуры белка. Считают, что такой переход является самой значительной структурной перестройкой белковой молекулы, претерпевшей стадию фолдинга. Следует учесть, что при S–R-переходе ковалентная структура белка остается без изменений. Обнаружено, что некоторые мутации могут приводить к существенному замедлению перехода [48]. Поэтому методы направленного мутагенеза с успехом используют для изучения конформационных переходов ПАИ-1.

Для рассмотрения механизма латентного перехода ПАИ-1 необходимо остановиться на особенностях вторичной и третичной структуры этого белка. В молекуле ПАИ-1 выделяют девять участков с α -спиральной (*helix*) конформацией, обозначаемых обычно hA–hI, а участки с β -складчатой структурой формируют три листа A, B и C. Как видно из рис. 2, лист A формируют шесть тяжей

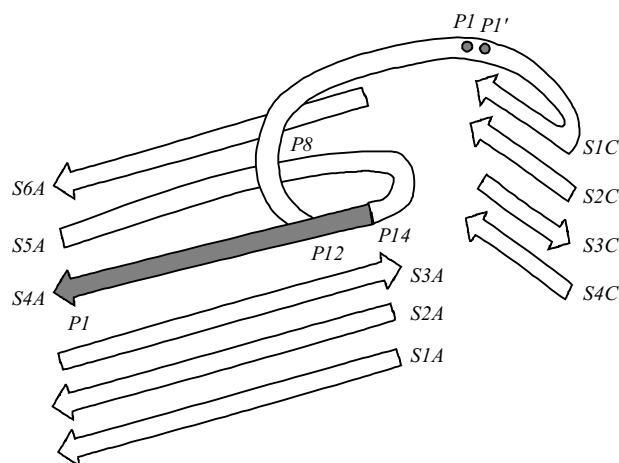


Рис. 2. Схематическое изображение β -листов А и С в структуре серпинов [49]

β -складчатой (*strand*) структуры (s1A–s6A), лист С образуется из четырех участков (s1C–s4C). Между листами А и С располагается подвижный участок полипептидной цепи, состоящий из 17 аминокислотных остатков. Это сайт взаимодействия с сериновыми протеиназами – петля реактивного центра (ПРЦ). В структуре ПРЦ имеется привлекающий участок (P_1 – P_1'), непосредственно подвергающийся протеазной атаке. Для ПАИ-1 – это пептидная связь Arg369–Met370 [49]. При переходе в латентное состояние N-концевая часть ПРЦ внедряется в плоскость А как s4A (рис. 2, черная стрелка), а С-концевое продолжение ПРЦ, формирующее s1C, вытягивается вдоль поверхности молекулы. Поскольку связь P_1 – P_1' не расщепляется во время латентного перехода, интактная петля реактивного центра должна быть вытянута и полностью удалена из плоскости А и при этом пройти узкий промежуток между s3C и s4C. В результате образуется полностью сформированная структура s4A [50]. Как следствие, сделано предположение о том, что скорость перехода S–R для белка ПАИ-1 определяется скоростью прохождения ПРЦ через вышеуказанный узкий промежуток. Это предположение находится в соответствии с данными, полученными при замене основных аминокислотных остатков в петле s3C/s4C на кислые. Такая замена приводит к ускорению латентного перехода [51].

Аминокислотные остатки в структуре тяжа s1C также являются важными для перехода ПАИ-1 в латентное состояние. Показано, что мутации, ослаб-

ляющие взаимодействие в структуре этого участка, облегчают конформационный переход в латентную форму и изменяют общую структурную стабильность ПАИ-1 [52]. Присутствие анионов галогенов существенно влияет на это превращение. Кристаллографический анализ стабильной мутантной формы белка позволил обнаружить наличие анион-связывающего сайта между основной β -складчатой структурой, в которую встраивается ПРЦ, и небольшим поверхностным доменом. Встраивание аниона стабилизирует активную форму ПАИ-1, причем стабилизирующая активность галоген-анионов уменьшается в ряду $F^- > Cl^- > Br^- \gg I^-$.

Важным моментом при рассмотрении S–R-перехода является стабилизирующий эффект витронектина. Время полужизни активной формы ПАИ-1 увеличивается многократно [13, 28]. Некоторыми авторами сделано предположение о том, что витронектин вызывает конформационные изменения в ПРЦ [54, 55]. Позднее, исследуя трехмерную структуру комплекса ПАИ-1–соматомедин В, авторы работы [56] пришли к заключению, что витронектин создает стерическое препятствие для перемещения участков β -складчатой структуры s2A и s3A по направлению к спирали hE и, таким образом, задерживает раскрытие плоскости А для внедрения ПРЦ. Известно, что внедрение ПРЦ в виде s4A, наблюдаемое при переходе ПАИ-1 в латентное состояние, сопровождается перемещениями s1A, s2A, s3A, hF и петли, связывающей hF и s3A, относительно остальной части молекулы. Отмечают также структурные изменения в гибком соединительном участке, примыкающем к спиральям hE и hD. Однако полученные данные по замене лизинового остатка (Lys346) в тяже s5A предполагают более сложный механизм действия витронектина. Установлено, что замена Lys 346 на остаток аланина в отсутствие витронектина обуславливает замедление латентного перехода и стабилизацию структуры ПАИ-1, а в случае присутствия витронектина такая замена способствует ускорению перехода ПАИ-1 в R-форму [57]. Очевидно, витронектин может не только создавать стерический эффект, но и приводить к конформационным изменениям в структуре ПАИ-1. Это находится в соответствии с данными авторов [58], показавшими, что значи-

тельное ускорение перехода ПАИ-1 в латентное состояние, вызванное точечными мутациями в структуре s1A и hF, не наблюдается в присутствии витронектина.

В работе [59] предложен свой механизм перехода ПАИ-1 в латентное состояние и определена возможная роль витронектина при таком переходе. Согласно описанной там модели, существует несколько конформационных состояний ПАИ-1 (I–IV), определяемых взаимным расположением тяжей s3A и s5A в листе А. В состоянии I s3A и s5A располагаются в непосредственной близости друг от друга по всей их длине. В этом положении ПРЦ не может внедриться в плоскость А. Для состояния II характерно расхождение тяжей s3A и s5A вблизи ПРЦ, при этом сама петля может быть внедрена в плоскость А на небольшое расстояние. В состоянии III ПРЦ погружена в лист А вплоть до остатка R11. В состоянии IV (латентное состояние) происходит полное погружение ПРЦ. Это состояние практически необратимо в физиологических условиях. Авторы считают, что в присутствии витронектина равновесие между состояниями II и III смещается в сторону состояния II, что, в свою очередь, задерживает переход ПАИ-1 в латентное состояние.

Механизм ингибиторного действия ПАИ-1. Механизм ингибиторного действия серпинов довольно подробно освещен в современной литературе, хотя некоторые детали этого процесса еще требуют выяснения [60]. Основные этапы ингибирования изучены благодаря использованию современных биофизических и биохимических методов, включая рентгеноструктурный анализ. Постулируемый механизм предполагает: 1) формирование обратимого комплекса Михаэлиса, в котором пептидная связь привлекающего участка связывается с активным центром сериновой протеиназы; 2) разрыв пептидной связи P_1-P_1' и формирование промежуточного ацил-ферментного комплекса, в котором серин активного центра протеиназы прикрепляется эфирной связью к карбонильной группе остатка аргинина, локализованного в P1 серпина; 3) встраивание N-концевого участка ПРЦ в плоскость А, приводящее к переносу протеиназы к противоположному концу серпиновой молекулы; 4) деформация активного центра сериновой протеиназы, что дела-

ет невозможным завершение каталитического цикла [9, 61, 62].

В ПАИ-1 УПА и ТПА атакуют связь Arg369-Met370 [63–66]. Замена этих аминокислотных остатков методом направленного мутагенеза показала важность такой пептидной связи в отношении специфичности активного центра ТПА. После ее расщепления между Arg369 и серином активного центра протеиназы образуется эфирная связь; ее наличие непосредственно продемонстрировано прямыми методами белковой химии [67]. Для осуществления реакции значительную роль в молекуле ПАИ-1 играют аминокислотные остатки Glu373 и Glu374, комплементарные участкам в 37-й петле молекул УПА и ТПА (Arg179-Arg182 и Lys296-Arg304 соответственно) [68, 69]. Константы скорости реакции второго порядка ПАИ-1 с ТПА и УПА составляют соответственно 10^7 и 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ [70].

По-видимому, в зависимости от условий некоторые стадии реакции сериновых протеиназ с ПАИ-1 могут иметь обратимый характер. Так, ковалентный комплекс между ПАИ-1 и ТПА (молекулярная масса 110 кДа), достаточно прочный в физиологических условиях, может быть разрушен *in vitro* в присутствии гидроокиси аммония [71] или SDS [72]. В циркулирующей плазме ПАИ-1 может находиться в нескольких формах: в активном состоянии в комплексе с витронектином, в неактивном состоянии в комплексе ПАИ-1–витронектин–ТПА и в неактивном состоянии вне комплекса [73–75]. Последняя форма называется также субстратной или расщепленной. Согласно предложенному механизму, реакция может пойти по одному из двух путей: 1) формирование комплекса серпин–протеиназы или 2) распад промежуточного комплекса с образованием серпина с расщепленной реактивной связью и освобожденного активного фермента. Равновесие этих процессов может смещаться в зависимости от температуры, ионной силы и присутствия поверхностно активных соединений [76–78]. В физиологических условиях комплекс ПАИ-1–протеиназа, очевидно, циркулирует до того момента, пока не будет связан так называемыми рецепторами липопротеинов низкой плотности 1В (LRP1В) гепатоцитов. После связывания комплекса ПАИ-1–ТПА с этим рецептором на поверхности клетки

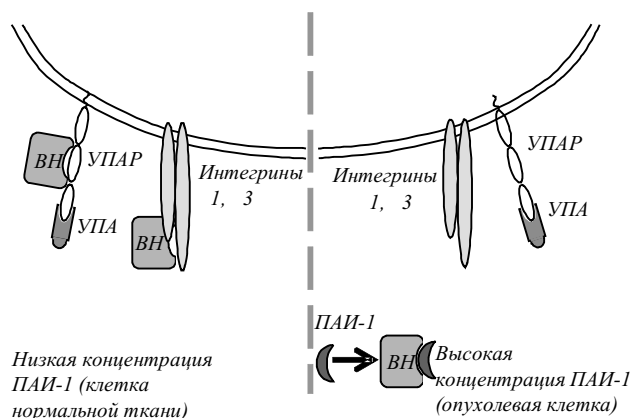


Рис. 3. Схема возможного влияния ПАИ-1 на процесс клеточной адгезии. Обозначения: УПА – урокиназа; УПАР – урокиназный рецептор; ВН – витронектин

комплекс вследствие фагоцитоза попадает внутрь клетки, где подвергается внутриклеточной деградации [79]. Будучи ингибитором сериновых протеиназ, ПАИ-1 проявляет ингибирующее действие не только в отношении ТПА и УПА, но и способен связывать активированный протеин С и тромбин, хотя для этих ферментов в плазме имеются специфические ингибиторы (ингибитор белка С и анти-тромбин III). Считают, что активированный белок С, связываясь с ПАИ-1, проявляет профибринолитическую активность. В работах [80, 81] определена константа скорости второго порядка реакции активированного белка С со свободным активным ПАИ-1, равная $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В присутствии витронектина скорость увеличивается в 300 раз и составляет $1,810^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [82]. Следует отметить, что в аналогичных условиях скорость реакции ПАИ-1 с ТПА была на два порядка выше и, таким образом, заметно влияет на процесс активации ТПА белка С он должен только при значительном концентрационном избытке [70, 82]. Активированный белок С образует стабильные комплексы с ПАИ-1, которые затем выводятся из плазмы. Важную роль в этом процессе играют эндотелиальные клетки [43].

ПАИ-1 как модулятор клеточной адгезии в условиях опухолевого роста. В митогенных, хемотактических, адгезивных и миграционных процессах клеток вместе с плазминогеном участвуют ПАИ-1, урокиназа и ее специфический рецептор (УПАР). Эти компоненты фибринолитической системы играют важную роль в неоваскуляризации и

метастазировании опухолей [83]. Неудивительно, что ткани опухолей усиленно экспрессируют урокиназу и ее специфический рецептор, поскольку эти молекулы обеспечивают клетки опухоли необходимой для инвазии протеолитической активностью [84, 85]. УПАР состоит из трех структурных доменов: D1, D2 и D3. N-концевой домен D1 содержит последовательность, отвечающую за связывание с урокиназой, тогда как D2 участвует во взаимодействии с витронектином [85]. В молекуле витронектина сайт связывания УПАР находится в SMB-домене [85]. Связывание урокиназы с ее специфическим рецептором увеличивает аффинность УПАР к витронектину, приводит к формированию стабильного комплекса УПАР с некоторыми интегринными (например, с 1- и 3-интегринными [86]) и индуцирует активацию сигнальных молекул, необходимых для клеточной миграции [84, 85]. Интересно, что наряду с повышением уровня урокиназы возрастает и концентрация ПАИ-1. Это явление наблюдается во многих типах опухолей.

Из литературы известно, что ПАИ-1 блокирует адгезию ряда клеток, опосредованную как УПАР, так и интегринными [84, 85, 87]. Так, ингибирование ПАИ-1 адгезии наблюдалось для клеток U937, осуществляющих адгезию за счет связывания УПАР с витронектином, клеток MCF7, связывающихся с витронектином через интегрины, и для клеток HT-1080 и HeLa, использующих оба рецептора адгезии [85]. Сайты связывания ПАИ-1, УПАР и интегринов на N-конце молекулы витронектина расположены очень близко, из-за чего возникает возможность конкурентного ингибирования ПАИ-1 взаимодействия УПАР и интегринов клеток с белком адгезии внеклеточного матрикса, витронектином [36, 85]. Показано, что процесс ингибирования адгезии непосредственно зависит от связывания ингибитора с SMB-доменом витронектина [88]. Таким образом, ПАИ-1 обретает способность нарушать адгезивные контакты, обусловленные действием интегринов, и способствует клеточной миграции. Вышеописанный процесс представлен в виде схемы на рис. 3. Кроме того, компоненты фибринолитической системы участвуют в неоваскуляризации опухолевых тканей. Процесс ангиогенеза нуждается в урокиназе и плазмине для деградации

компонентов внеклеточного матрикса и для миграции эндотелиальных клеток. В то же время плазминовый протеолиз должен контролироваться физиологическими ингибиторами, такими как ПАИ-1, для стабилизации матрикса и группирования эндотелиоцитов при формировании сосудов [85]. Ангиогенный эффект ПАИ-1 зависит от его концентрации, типа опухоли и стадии развития рака. Так, недостаток ПАИ-1 не влияет на развитие саркомы, метастазирование меланомы, рост первичной опухоли и ее распространение в модели аденокарциномы молочной железы [2]. Дефицит экспрессии ПАИ-1 предотвращает инвазию и васкуляризацию опухолей. В случае восполнения дефицита и возобновления экспрессии ПАИ-1 инвазия и ангиогенез восстанавливаются. Эти данные указывают на необходимость ПАИ-1 для процессов инвазии и васкуляризации раковых тканей, как и показано в работе [88]. Недавние исследования продемонстрировали, что роль ПАИ-1 в процессе клеточной миграции неоднозначна и зависит от его связи с витронектином. Обнаружено, что если ПАИ-1 находится в комплексе с витронектином, то наблюдается супрессия сигналинга и клеточной миграции [89]. С этим согласуются данные, подтверждающие, что ПАИ-1 блокирует вызванную УПАР клеточную миграцию [90]. С другой стороны, как изложено выше, ПАИ-1, конкурируя за место связывание с витронектином на поверхности клетки, препятствует клеточной адгезии, обусловленной интегринами белками, и открывает возможность для клеточной миграции. По-видимому, клеточная миграция будет определяться не только концентрацией ПАИ-1, но и тем, какая из форм этого белка (связанная или не связанная с витронектином) окажется активной.

Перспективы исследований, посвященных ПАИ-1. Ингибиторы серпиновых протеиназ представляют особый интерес для исследователей, поскольку имеют чрезвычайно широкое распространение в живой природе. Они обнаружены во всех живых системах, за исключением бактерий [9]. В большинстве случаев серпины контролируют протеолитическую деградацию, но, как это показано на примере ПАИ-1, их биологическая функция намного сложнее. Одним из перспективных подходов

применения серпинов может быть синтез соединений, не уступающих по эффективности природным ингибиторам, у которых ЦРП будет находиться в постоянно активной конформации. Такие соединения можно использовать для специфического взаимодействия с протеиназами патогенных микроорганизмов.

При регуляции количества или активности ПАИ-1 клетки приобретают способность контролировать свою адгезивность и подвижность, что может иметь терапевтическое значение [83]. Некоторые авторы рассматривают ПАИ как возможную терапевтическую мишень при лечении онкологических заболеваний [54, 55]. В настоящее время ведется направленный поиск агентов, инактивирующих действие упомянутого ингибитора. Это могут быть пептиды или моноклональные антитела. Такие агенты направленного действия будут вначале опробованы на животных моделях, а в перспективе смогут послужить основой для создания лекарственных препаратов.

D. D. Zhernossekov, E. N. Zolotareva, A. S. Kondratuk

Structural and functional peculiarities of plasminogen activator inhibitor PAI-1

Summary

PAI-1, an important component of the hemostasis system, is a specific inhibitor of both urokinase type and tissue type plasminogen activators. PAI-1 belongs to the serpin family. The interaction between somatomedin-like domain of vitronectin and PAI-1 leads to stabilization of the latter. PAI-1 latency transition is related to the conformational changes in the reactive central loop. The inhibitory mechanism of PAI-1 is in accordance with the classic scheme of serpin action. PAI-1 blocks the adhesion mediated by UPA and integrins, so this inhibitor plays an important role in adhesion process and angiogenesis. An altered PAI-1 level is associated with the development of cardiovascular diseases, kidney fibrosis, diabetes, cancerogenesis.

Keywords: PAI-1, fibrinolysis, cell migration.

Д. Д. Жерносков, Е. М. Золотарьова, А. С. Кондратюк

Структурно-функціональні особливості інгібітора активатора плазміногену ПАИ-1

Резюме

ПАИ-1, важливий компонент системи гемостазу, є специфічним інгібітором активаторів плазміногену тканинного (ТПА) та урокіназного типів. ПАИ-1 належить до серпінової родини. Взаємодія з соматоподібним доменом вітронектину стабілізує активну форму інгібітора. Перехід ПАИ-1 до латентного стану пов'язаний з конформаційними змінами у ділянці петлі реактивного центра. Механізм інгібіторної дії ПАИ-1 відпо-

відає класичній схемі серпінкового інгібування. ПАІ-1 блокує адгезію опосередковану рецептором УПА та інтегринами, виконуючи при цьому важливу роль в адгезивних процесах та ангіогенезі. Зміни рівня ПАІ-1 розглядають як істотну прогностичну ознаку при захворюваннях серцево-судинної системи, фіброзі нирок, діабеті, канцерогенезі.

Ключові слова: ПАІ-1, фібриноліз, міграція клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ha H., Oh E. Y., Lee H. B. The role of plasminogen activator inhibitor-1 in renal and cardiovascular diseases // *Nat. Rev. Nephrol.*—2009.—5, N 4.—P. 203–211.
2. Diebold I., Kraicum D., Bonsello S., Gorlach A. The «PAI-1 paradox» in vascular remodeling // *Thromb. Haemost.*—2008.—100, N 6.—P. 984–991.
3. Ma L. J., Fogo A. B. Plasminogen activator inhibitor-1 and kidney fibrosis // *Front Biosci.*—2009.—1, N 14.—P. 2028–2041.
4. Matsuzawa Y. The role of fat topology in the risk of disease // *Int. J. Obes. (Lond).*—2008.—32, N 7.—P. 83–89
5. Juhan-Vague I., Alessi M. C., Morange P. E. Hypofibrinolysis and increased plasminogen activator inhibitor-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity // *Ann. Med.*—2000.—32, N 1.—P. 78–84.
6. Binder B. R., Christ G., Gruber F., Grubic N., Hufnagl P., Krebs M., Mihaly J., Pager G. W. Plasminogen activator inhibitor-1: physiological and pathophysiological roles // *News Physiol. Sci.*—2002.—17.—P. 56–61.
7. Mc Mahon B., Kwaan H. C. The plasminogen activator system and cancer // *Pathophys. Haemost. Tromb.*—2008.—36, N 3–4.—P. 184–194.
8. Ulisse S., Baldini E., Sorrenti S., D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anticancer therapy // *Curr. Cancer Drug Targets.*—2009.—9, N 1.—P. 32–71.
9. Dupont D. M., Madsen J. B., Kristensen T., Bodker J. S., Blouse G. E., Wind T., Andreasen P. A. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1 // *Front. Biosci.*—2009.—14.—P. 1337–1361.
10. Volkov G. L., Platunova T. N., Savchuk A. N., Gornitskaya O. V., Chernyshenko T. M., Krasnobryzhaya E. N. Modern conceptions of hemostasis system.—Kyiv: Naukova Dumka, 2005.—296 p.
11. Zubairov D. M. Molecular basis of coagulation and thromb formation.—Kazan: FEN, 2000.—364 p.
12. Declerck P. J., De Mol M., Alessi M. C., Baudner S., Paques E. P., Preissner K. T., Muller-Berghaus G., Collen D. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin) // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, N 30.—P. 15454–15461.
13. Wiman B., Almquist A., Sigurdadottir O., Lindahl T. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma // *FEBS Lett.*—1988.—242, N 1.—P. 125–128.
14. Booth N. A., Robbie L. A., Croll A. M., Bennett B. Lysis of platelet-rich thrombi: the role of PAI-1 // *Ann. Nat. New York Acad. Sci.*—1992.—667.—P. 70–80.
15. Robbie L. A., Bennett B., Croll A. M., Brown P. A., Booth N. A. Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi // *Thromb. Haemost.*—1996.—75, N 1.—P. 127–133.
16. Dellas C., Loskutoff D. J. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease // *Thromb. Haemost.*—2005.—93, N 4.—P. 631–640.
17. Klinger K. W., Wingqvist R., Riccio A., Andreasen P. A., Sartorio R., Nielsen L. S., Stuart N., Stanislovitis P., Watkins P., Douglas R. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 23.—P. 8548–8552.
18. Cicila G. T., O'Connell T. M., Hahn W. C., Rheinwald J. G. Cloned cDNA sequence for the human mesothelial protein «mesosecrin» discloses its identity as a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) and a recent evolutionary change in transcript processing // *J. Cell Sci.*—1989.—94, N 1.—P. 1–10.
19. Brogren H., Karlsson L., Andersson M., Wang L., Erlinge D., Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1 // *Blood.*—2004.—104, N 13.—P. 3943–3948.
20. Andreasen P. A., Georg B., Lund L. R., Riccio A., Stacey S. N. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins // *Mol. Cell. Endocrinol.*—1990.—68, N 1.—P. 1–19.
21. De Taeye B., Smith L. H., Vaughan D. E. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease // *Curr. Opin. Pharmacol.*—2005.—5.—P. 149–215.
22. Seifert S. C., Gelehrter T. D. Mechanism of dexamethasone inhibition of plasminogen activator in rat hepatoma cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75, N 12.—P. 6130–6133.
23. Andersen P. A., Riccio A., Welinder K. G., Douglas R., Sartorio R., Nielsen L. S., Oppenheimer C., Blasi F., Dano K. Plasminogen activator inhibitor type-1 reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing // *FEBS Lett.*—1986.—209, N 2.—P. 213–218.
24. Rheinwald J. G., Jorgensen J. L., Hahn W. C., Terpstra A. J., O'Connell T. M., Plummer K. K. Mesosecrin: a secreted glycoprotein produced in abundance by human mesothelial, endothelial, and kidney epithelial cells in culture // *J. Cell. Biol.*—1987.—104, N 2.—P. 263–275.
25. Gils A., Pedersen F., Skottrup P., Christensen A., Naessens D., Deinum J., Enghild J. J., Declerck P. J., Andreasen P. A. Biochemical importance of glycosylation of plasminogen activator inhibitor-1 // *Thromb. Haemost.*—2003.—90, N 2.—P. 206–217.
26. Brogren H., Sahlbom C., Wallmark K., Lonn M., Deinum J., Karlsson L., Jern S. Heterogeneous glycosylation patterns of human PAI-1 may reveal its cellular origin // *Thromb. Res.*—2008.—122, N 2.—P. 271–278.
27. Serrano R., Barrenetxe J., Orbe J., Rodriguez J. A., Gallardo N., Martinez C., Andres A., Paramo J. A. Tissue-specific PAI-1 gene expression and glycosylation pattern in insulin-resistant old rats // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*—2009.—297, N 5.—P. R1563–R1569.
28. Mimuro J., Loskutoff D. J. Purification of a protein from bovine plasma that binds to type 1 plasminogen activator inhibitor and prevents its interaction with extracellular matrix. Evidence that the protein is vitronectin // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 2.—P. 936–939.
29. Preissner K. T., Seiffert D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling // *Thromb. Res.*—1998.—89, N 1.—P. 1–21.
30. Preissner K. T., Holzhuter S., Justus C., Muller-Berghaus G. Identification of and partial characterization of platelet vitronectin: evidence for complex formation with platelet-derived plasminogen activator inhibitor-1 // *Blood.*—1989.—74, N 6.—P. 1989–1996.
31. Lang I. M., Schleef R. R. Calcium-dependent stabilization of type I plasminogen activator inhibitor within platelet alpha-granules // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 5.—P. 2754–2761.

32. *Seiffert D., Schleef R. R.* Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules // *Blood*.—1996.—**88**, N 2.—P. 552–560.
33. *Parker C. J., Stone O. L., White V. F., Bernshaw N. J.* Vitronectin (S protein) is associated with platelets // *Br. J. Haematol.*—1989.—**71**, N 2.—P. 245–252.
34. *Podor T. J., Singh D., Chindemi P., Foulon D. M., McKelvie R., Weitz J. I., Austin R., Boudreau G., Davies R.* Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 9.—P. 7529–7539.
35. *Lawrence D. A., Berkenpas M. B., Palaniappan S., Ginsburg D.* Localization of vitronectin binding domain in plasminogen activator inhibitor-1 // *J. Biol. Chem.*—1994.—**269**, N 21.—P. 15223–15228.
36. *De Prada N. A., Schroeck F., Sinner E. K., Muehlenweg B., Twellmeyer J., Sperl S., Wilhelm O. G., Schmitt M., Magdolen V.* Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin // *Eur. J. Biochem.*—2002.—**269**, N 1.—P. 184–192.
37. *Mayasundari A., Whitemore N. A., Serpersu E. H., Peterson C. B.* The solution structure of the N-terminal domain of human vitronectin // *J. Biol. Chem.*—2004.—**279**, N 28.—P. 29359–29366.
38. *Sigurdardottir O., Wiman B.* Complex formation between plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin in purified systems and in plasma // *Biochim. Biophys. Acta.*—1990.—**1035**, N 1.—P. 56–61.
39. *Seiffert D., Loskutoff D. J.* Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin // *J. Biol. Chem.*—1991.—**266**, N 5.—P. 2824–2830.
40. *Okumura Y., Kamikubo Y., Curriden S. A., Wang J., Kiwada T., Futaki S., Kitagawa K., Loskutoff D. J.* Kinetic analysis of the interaction between vitronectin and the urokinase receptor // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 11.—P. 9395–9404.
41. *Stefansson S., Lawrence D. A.* The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin // *Nature*.—1996.—**383**, N 6599.—P. 441–443.
42. *Sancho E., Declerck P. J., Price N. C., Kelly S. M., Booth N. A.* Conformational studies on plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in active, latent, substrate, and cleaved forms // *Biochemistry*.—1995.—**34**, N 3.—P. 1064–1069.
43. *Hekman C. M., Loskutoff D. J.* Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants // *J. Biol. Chem.*—1985.—**260**, N 21.—P. 11581–11587.
44. *Levin E. G., Santell L.* Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells // *Blood*.—1987.—**70**, N 4.—P. 1090–1098.
45. *Loskutoff D. J., Sawdey M., Mimuro J.* Type 1 plasminogen activator inhibitor // *Prog. Hemost. Thromb.*—1989.—**9**.—P. 87–115.
46. *Lawrence A., Palaniappan S., Stefansson S., Olson S. T., Francis-Chmura A. M., Shore J. D., Ginsburg D.* Characterization of the binding of different conformational forms of plasminogen activator inhibitor-1 to vitronectin. Implications for the regulation of pericellular proteolysis // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**, N 12.—P. 7676–7680.
47. *Lambers J. W., Cammenga M., Konig B. W., Mertens K., Pannekoek H., van Mourik J. A.* Activation of human endothelial cell-type plasminogen activator inhibitor (PAI-1) by negatively charged phospholipids // *J. Biol. Chem.*—1987.—**262**, N 36.—P. 17492–17496.
48. *Stoop A. A., Eldering E., Dafforn T. R., Read R. J., Pannekoek H.* Different structural requirements for plasminogen activator inhibitor 1 during latency transition and proteinase inhibition as evidenced by phage-displayed hypermutated PAI-1 libraries // *J. Mol. Biol.*—2001.—**305**, N 4.—P. 773–783.
49. *Bode W., Huber R.* Proteinase-protein inhibitor interactions // *Fibrinolysis*.—1994.—**8**, N 1.—P. 161–171.
50. *Kruger P., Verheyden S., Declerck P. J., Engelborghs Y.* Extending the capabilities of targeted molecular dynamics: simulation of a large conformational transition in plasminogen activator inhibitor 1 // *Protein Sci.*—2001.—**10**, N 4.—P. 798–808.
51. *Gils A., Lu J., Aertgeerts K., Knockaert I., Declerck P. J.* Identification of positively charged residues contributing to the stability of plasminogen activator inhibitor 1 // *FEBS Lett.*—1997.—**415**, N 2.—P. 192–195.
52. *Na Y. R., Im H.* Specific interactions of serpins in their native forms attenuate their conformational transitions // *Protein Sci.*—2007.—**16**, N 8.—P. 1659–1666.
53. *Stout T. J., Graham H., Buckley D. I., Matthews D. J.* Structures of active and latent PAI-1: a possible stabilizing role for chloride ions // *Biochemistry*.—2000.—**39**, N 29.—P. 8460–8469.
54. *Fa M., Karolin J., Aleshkov S., Strandberg L., Johansson L. B., Ny T.* Time-resolved polarized fluorescence spectroscopy studies of plasminogen activator inhibitor type 1: conformational changes of the reactive center upon interactions with target proteases, vitronectin and heparin // *Biochemistry*.—1995.—**34**, N 42.—P. 13833–13840.
55. *Gibson A., Baburaj K., Day D. E., Verhamme I., Shore J. D., Peterson C. B.* The use of fluorescent probes to characterize conformational changes in the interaction between vitronectin and plasminogen activator inhibitor-1 // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**, N 8.—P. 5112–5121.
56. *Zhou A., Huntington J. A., Pannu N. S., Carrell R. W., Read R. J.* How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration // *Nat. Struct. Biol.*—2003.—**10**, N 7.—P. 541–544.
57. *Hansen M., Busse M. N., Andreasen P. A.* Importance of the amino-acid composition of the shutter region of plasminogen activator inhibitor-1 for its transition to latent and substrate forms // *Eur. J. Biochem.*—2001.—**268**, N 23.—P. 6274–6283.
58. *Sui G. S., Wiman B.* Stability of plasminogen activator inhibitor-1: role of tyrosine 221 // *FEBS Lett.*—1998.—**423**, N 3.—P. 319–323.
59. *Li S-H., Gorlatova N. V., Lawrence D. A., Schwartz B. S.* Structural differences between active forms of plasminogen activator inhibitor type 1 revealed by conformationally sensitive ligands // *J. Biol. Chem.*—2008.—**283**, N 26.—P. 18147–18157.
60. *Silverman G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church F. C., Coughlin P. B., Gettins P. G. W., Irving J. A., Ljmas D. A., Luke C. J., Moyer R. W., Pemberton P. A., Remold-O'donnell E., Salversen G. S., Travis J., Whisstock J. C.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 36.—P. 33293–33296.
61. *Ye S., E. J. Goldsmith E. J.* Serpins and other covalent protease inhibitors // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2001.—**11**, N 6.—P. 740–745.
62. *Wind T., Hansen M., Jensen J. K., Andreasen P. A.* The molecular basis for anti-proteolytic and non-proteolytic functions of plasminogen activator inhibitor type-1: roles of the reactive centre loop, the shutter region, the flexible joint region and the small serpin fragment // *J. Biol. Chem.*—2002.—**383**, N 1.—P. 21–36.

63. Lawrence D. A., Strandberg L., Ericson J., Ny T. Structure-function studies of the SERPIN plasminogen activator inhibitor type 1. Analysis of chimeric strained loop mutants // *J. Biol. Chem.*—1990.—**265**, N 33.—P. 20293–20301.
64. Sherman P. M., Lawrence D. A., Yang A. Y., Vandenberg E. T., Paielli D., Olson S. T., Shore J. D., Ginsburg D. Saturation mutagenesis of the plasminogen activator inhibitor-1 reactive center // *J. Biol. Chem.*—1992.—**267**, N 11.—P. 7588–7595.
65. Sherman P. M., Lawrence D. A., Paielli V. D., Shore J. D., Ginsburg D. Identification of tissue-type plasminogen activator-specific plasminogen activator inhibitor-1 mutants. Evidence that second sites of interaction contribute to target specificity // *J. Biol. Chem.*—1995.—**270**, N 16.—P. 9301–9306.
66. York J. D., Li P., Gardell S. J. Combinatorial mutagenesis of the reactive site region in plasminogen activator inhibitor I // *J. Biol. Chem.*—1991.—**266**, N 16.—P. 8495–8500.
67. Egelund R., Rodenburg K. W., Andreasen P. A., Rasmussen M. S., Guldberg R. E., Petersen T. E. An ester bond linking a fragment of a serine proteinase to its serpin inhibitor // *Biochemistry.*—1998.—**37**, N 18.—P. 6375–6379.
68. Ibarra C. A., Blouse G. E., Christian T. D., Shore J. D. The contribution of the exosite residues of plasminogen activator inhibitor-1 to proteinase inhibition // *J. Biol. Chem.*—2004.—**279**, N 5.—P. 3643–3650.
69. Tucker H. M., Gerard R. D. Sequence requirements in the reactive-center loop of plasminogen-activator inhibitor-1 for recognition of plasminogen activators // *Eur. J. Biochem.*—1996.—**237**, N 1.—P. 180–187.
70. Krisnamurti Ch., Alving B. Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemistry and evidence for modulation of fibrinolysis *in vivo* // *Semin. Thromb. and Hemost.*—1992.—**18**, N 1.—P. 67–80.
71. Lindahl T. L., Ohlsson P. I., Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator // *Biochem. J.*—1990.—**265**, N 1.—P. 109–113.
72. Gaussem P., Graihle P., Angles-Cano E. Sodium dodecyl sulfate-induced dissociation of complexes between human tissue plasminogen activator and its specific inhibitor // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 16.—P. 12150–12155.
73. Stefansson S., Haudenschild C., Lawrence D. Beyond fibrinolysis: the role of plasminogen activator inhibitor and vitronectin in vascular wound healing // *Trends Cardiovascul. Med.*—1998.—**8**, N 4.—P. 175–180.
74. Debrock S., Declerck P. J. Neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitory properties: identification of two different mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.*—1997.—**1337**, N 2.—P. 257–266.
75. Alessi M. C., Juhan-Vague J., Declerck P. J., Collen D. Molecular forms of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human plasma // *Thromb. Res.*—1991.—**62**, N 4.—P. 275–285.
76. Kjoller L., Martensen P. M., Sottrup-Jensen L., Justesen J., Rodenburg K. W., Andreasen P. A. Conformational changes of the reactive-centre loop and α -strand 5 A accompany temperature-dependent inhibitor-substrate transition of plasminogen-activator inhibitor 1 // *Eur. J. Biochem.*—1996.—**241**, N 1.—P. 38–46.
77. Calugaru S. V., Swanson R., Olson S. T. The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 35.—P. 32446–32455.
78. Gettins P. G. The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism // *FEBS Lett.*—2002.—**523**, N 1–3.—P. 2–6.
79. Liu C. X., Li Y., Obermoeller-McCormick L. M., Schwartz A. L., Bu G. The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 31.—P. 28889–28896.
80. Sakata Y., Loskutoff D. J., Gladson C. L. Mechanism of protein C dependent clot lysis role of plasminogen activator inhibitor // *Blood.*—1986.—**68**, N 6.—P. 1218–1223.
81. Sakata Y., Curriden S., Lawrence D. Activated protein C stimulated the fibrinolytic activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—**82**, N 4.—P. 1121–1125.
82. Rezaie A. R. Vitronectin function as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator-inhibitor-1. Implication for the mechanisms of profibrinolytic action of protein C // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 19.—P. 15567–15570.
83. Sawaya R. Fibrinolysis and the central nervous system.—Philadelphia: Hanley and Belfus Inc., 1990.—306 p.
84. Deng G., Curriden S. A., Wang S., Rosenberg S., Loskutoff D. J. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? // *J. Cell Biol.*—1996.—**134**, N 6.—P. 1563–1571.
85. Czekay R. P., Loskutoff D. J. Unexpected role of plasminogen activator inhibitor-1 in cell adhesion and detachment // *Exp. Biol. Med.*—2004.—**229**, N 11.—P. 1090–1096.
86. Noel A., Maillard C., Rocks N., Jost M., Chabottau V., Sounni N. E., Maquoi E., Cataldo D., Foidart J. M. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis // *J. Clin. Pathol.*—2004.—**57**, N 6.—P. 577–584.
87. Bajou K., Noel A., Gerard R. D., Masson V., Brunner N., Hols-Hansen C., Skobe M., Fusing N. E., Carmeliet P., Collen D., Foidart J. M. Absence of host plasminogen activator inhibitor-1 prevents cancer invasion and vascularisation // *Nat. Med.*—1998.—**4**, N 8.—P. 923–928.
88. Deng G., Curriden S. A., Hu G., Czekay R. P., Loskutoff D. J. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin // *J. Cell Physiol.*—2001.—**198**, N 1.—P. 23–33.
89. Kamikubo Y., Neels J. G., Degryse B. Vitronectin inhibits plasminogen activator inhibitor-1 induced signaling and chemotaxis by blocking plasminogen activator inhibitor-1 binding to the low-density lipoprotein receptor-related protein // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*—2009.—**41**, N 3.—P. 578–585.
90. Degryse B., Sier C. F. M., Resnati M., Conese M., Blasi F. PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase receptor // *FEBS Lett.*—2001.—**505**, N 2.—P. 249–254.

UDK 577.112.15
Received 26.10.10