

УДК 577.322.75

## ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА

© 2021 г. А. Д. Васильева<sup>1,\*</sup>, В. С. Иванов<sup>1</sup>, Л. В. Юрина<sup>1</sup>, М. И. Индейкина<sup>1,3</sup>, А. Е. Бугрова<sup>1</sup>,  
А. С. Кононихин<sup>2</sup>, член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев<sup>4</sup>, М. А. Розенфельд<sup>1</sup>

Поступило 19.05.2021 г.

После доработки 16.07.2021 г.

Принято к публикации 17.07.2021 г.

Плазминоген является зимогеном плазмينا, фермента, который играет фундаментальную роль в растворении фибриновых сгустков и во многих других физиологических процессах. Впервые методом хромато-масс-спектрометрии были выявлены посттрансляционные модификации в первичной структуре плазминогена, обработанного физиологически релевантными количествами перекиси водорода. Установлено, что мишенями окислителя являлись остатки метионина и триптофана, локализованные в различных структурных областях плазминогена. Показано, что окисление плазминогена вызывало доз-зависимый эффект снижения фибринолитической активности плазмина, оцениваемой по образованию продуктов деградации фибриногена. Обсуждается возможная антиоксидантная роль метионинов в окислительной модификации плазминогена.

**Ключевые слова:** плазминоген/плазмин, окисление, перекись водорода, масс-спектрометрия, электрофорез, окислительные сайты, антиоксидантные метионины

DOI: 10.31857/S2686738921060159

Плазминоген/плазмин функционирует как наиболее важная внеклеточная протеазная система *in vivo*, вовлекаясь в целый ряд патофизиологических процессов, включая тромбоз и кровотечение, заживление ран, воспаления, инсульты, инфаркты и многие другие [1, 2].

Нативная форма плазминогена (Glu-плазминоген) человека представляет собой полипептидную цепь, содержащую 791 аминокислотный остаток (Glu1-Asn791). Пространственная укладка цепи образует ряд глобулярных модулей: N-терминальный, так называемый *PAN-apple* домен (*PAp*),

пять гомологичных крингл-доменов (KP1–KP5), структура каждого из которых стабилизирована тремя дисульфидными связями, сериновый протеазный домен (*SP*), содержащий каноническую для всех сериновых протеаз каталитическую триаду остатков His603, Asp646 и Ser741, а также гибкий линкер, соединяющий домены KP4 и KP5 между собой [3]. Крингл-домены содержат сайты связывания лизина, которые позволяют плазминогену связывать фибрин и другие субстраты, содержащие N-концевые лизины [4]. Glu-плазминоген находится в закрытой, устойчивой к активации конформации, в которой остатки лизина и аргинина (в частности, Lys50, Arg68 и Arg70), присутствующие на N-концевом домене *PAp*, связываются с лиганд-связывающими сайтами KP-4 и KP-5. Таким образом, закрытая конформация Glu-плазминогена частично опосредуется междуменными взаимодействиями через сайты связывания лизина [5].

Плазминоген может быть активирован в плазмин путем расщепления связи Arg561-Val562. N-концевая часть цепи (Glu1-Arg561) образует цепь А, которая ковалентно связана с цепью В (Ala562-Asn791) посредством дисульфидных связей Cys548-Cys666 и Cys558-Cys566.

В настоящее время общепризнано, что белки выступают в качестве основной мишени для активных форм кислорода (АФК) [6]. Эти произ-

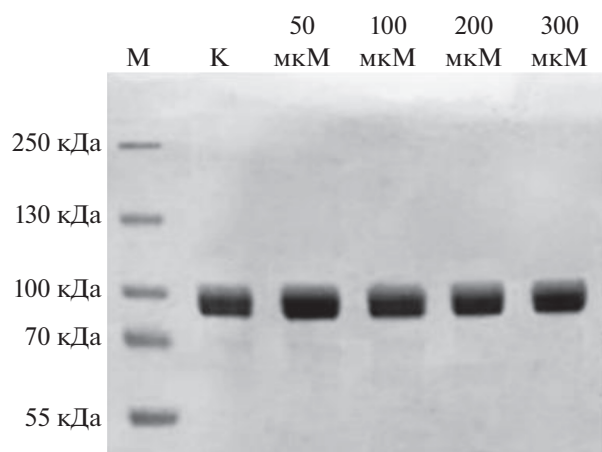
<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (государственный университет)”, Долгопрудный, Россия

<sup>4</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования “Сколковский институт науки и технологий”, Московская обл, деревня Сколково, Россия

\*e-mail: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com



**Рис. 1.** Эффект  $H_2O_2$  на молекулу плазминогена. Электрофореграмма свидетельствует об отсутствии каких-либо видимых нарушений в гомогенности полипептидной цепи белка. Полоса М соответствует молекулярным массам белковых маркеров.

водные кислорода способны повреждать белки, что оказывает влияние на их структуру, проявляющееся в более или менее выраженной потере ими свойственных им биохимических функций.

Ранее методом tandemной масс-спектрометрии [7] были идентифицированы сайты, модифицированные гипохлорит-индуцированным окислением молекулы плазминогена.

Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) является существенно менее агрессивным окислителем по сравнению с гипохлоритом. Она вырабатывается большинством клеток человеческого тела. Поступление в плазму  $H_2O_2$ , генерируемой во внутриклеточном пространстве клеток крови, незначительно по сравнению с генерацией  $H_2O_2$  из источников в плазме крови или на внешней поверхности клеток [8]. Помимо НАДФН-оксидаз, плазматические мембраны фагоцитов, эндотелиальные клетки и тромбоциты вносят значительный вклад в генерацию плазменного  $H_2O_2$  [9, 10]. Как полагают [8], значения концентрации  $H_2O_2$  в плазме могут находиться в диапазоне от нескольких мкМ до сотен мкМ, в то время как некоторые авторы [11] сообщают, что концентрация  $H_2O_2$  в плазме человека может быть существенно выше и достигать 100 мМ.

В данной работе впервые была предпринята попытка исследовать действие  $H_2O_2$ -индуцированного окисления плазминогена на модификацию отдельных сайтов в его первичной структуре, а также нарушение фибринолитической (гидролиз фибриногена) активности плазмина, образованного при активации окисленного плазминогена.

Glu-плазминоген был выделен из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии на лизин-активированной CNBr Sepharose 4B (Sigma-Aldrich), как описано ранее [12]. Фибриноген был получен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения [7].

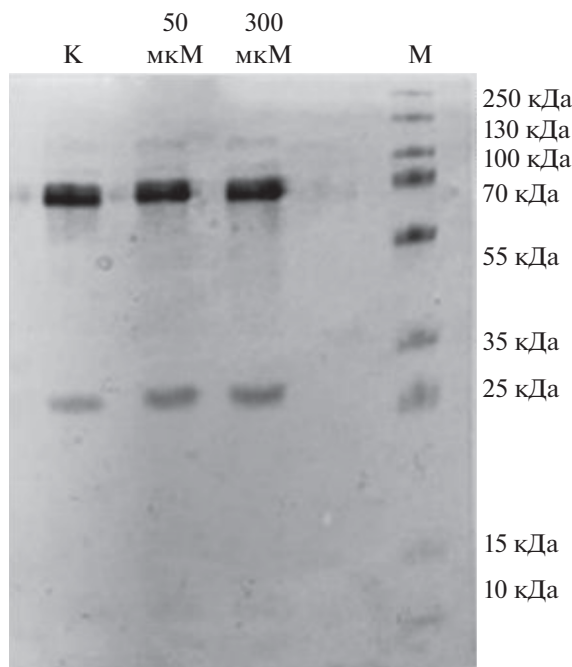
Превращение плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия) в молярном соотношении 100/1 (плазминоген/стрептокиназа) [7]. Время инкубации смеси плазминогена и стрептокиназы составляло 40 мин при 37°C.

Фибринолитическая активность плазмина оценивалась по накоплению продуктов гидролиза фибриногена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

Окисление плазминогена было индуцировано  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich) в широком диапазоне концентраций окислителя, равным 50–400 мкМ при концентрации субстрата реакции 1 мкМ. После инкубации белка с окислителем (60 мин при 37°C) реакция была остановлена добавлением в каждый образец десятикратного молярного избытка L-метионина по отношению к окислителю. Для последующих работ (и избавления от метионина) образцы переводились в исходный буфер с использованием ультрацентрифужных фильтров Amicon Ultra, 10 КДа (Millipore, Ирландия).

Анализ, проведенный методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенный с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), проводился на системе, включающей хроматограф Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) и tandemного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany) [13, 14]. При подготовке проб образцы обрабатывались дитиотреитолом (DTT) для восстановления дисульфидных связей с последующим алкилированием йодоацетоамидом и гидролизом трипсином (Promega, USA). Триптические пептиды были идентифицированы с помощью программного обеспечения PEAKS Studio (V. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, On, Canada). Для получения результатов было выполнено три независимых эксперимента, каждый из которых выполнялся в трех повторностях. При сравнении результатов учитывались аминокислоты, не окисленные в контроле, а также те, уровень окисления которых по сравнению с контролем, возрастал более чем на 1%.

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что при обработке белка окислителем во всем диапазоне концентраций плазминоген сохранял исходную гомогенность, т.е. не наблюдалось ни фрагментации белка, ни межцепочечного



**Рис. 2.** Влияние  $H_2O_2$  на активацию стрептокиназой плазминогена. Как следует из результата электрофореза, активация стрептокиназой нативного плазминогена продуцировала два основных пептида (полоса К), соответствующих тяжелой А, (~70 кДа) и легкой В (~25 кДа) цепям плазмина. Активация стрептокиназой плазминогена, окисленного 50 (1) и 300 мкМ (2)  $H_2O_2$ , не сопровождалась изменениями в электрофоретической подвижности А и В полипептидных цепей плазмина. Полоса М – молекулярные массы белковых маркеров.

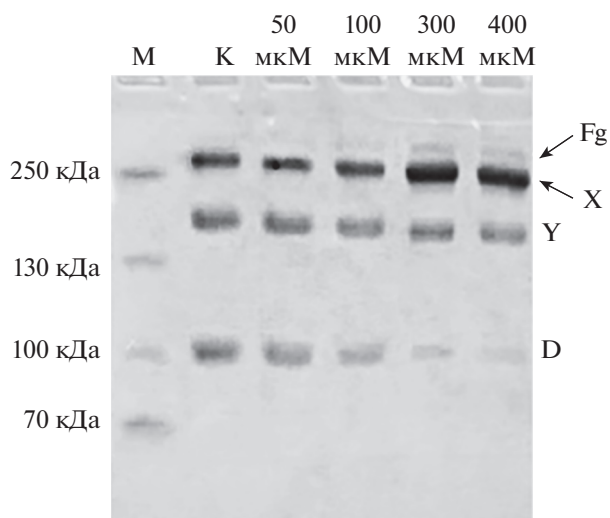
сшивания (рис. 1). Этот результат хорошо согласуется с полученными ранее электрофоретическими данными, которые также демонстрировали сохранение целостности полипептидной цепи плазминогена, обработанного гипохлоритом [7].

Индукцированная стрептокиназой активация плазминогена, как видно из рис. 2, вызывала образование плазмина, о чем свидетельствуют два продукта активации, тяжелая (А) и легкая (В) полипептидные цепи, соответствующие молекулярным массам цепей плазмина, 70 и 25 кДа соответственно. Действие 50 и 300 мкМ  $H_2O_2$  на плазминоген не оказывало влияния на его расщепление стрептокиназой.

Согласно данным ПААГ-электрофореза, обработка плазминогена 50 и 100 мкМ  $H_2O_2$  практически не влияла на гидролиз фибриногена, так как спектр продуктов деградации и их количество не отличались от свойственных контрольному образцу (рис. 3). Однако обработка исходного плазминогена 300 и 400 мкМ окислителя приводила к уменьшению накопленного фрагмента D и сохранению остаточного фибриногена в смеси (рис. 3).

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения были проанализированы образцы плазминогена, подвергавшиеся воздействию 50 и 300 мкМ  $H_2O_2$ . Модифицированные аминокис-

лотные остатки и типы их модификации, обусловленные  $H_2O_2$ -индуцированным повреждением белка, показаны в табл. 1.



**Рис. 3.** Фибринолитическая активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена, обработанного разными количествами  $H_2O_2$ . Как видно из электрофореграммы, активность плазмина снижается, что проявляется в уменьшении содержания конечного продукта деградации фибриногена, фрагмента D, и сохранении остаточного фибриногена. Полоса М – молекулярные массы белковых маркеров.

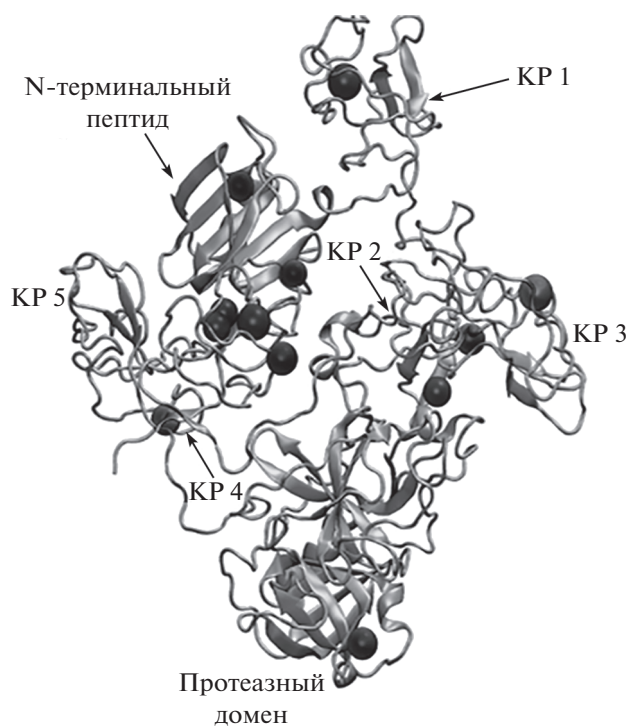
**Таблица 1.** Степени окисления идентифицированных аминокислотных остатков в плазминогене, обработанных 50 и 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и типы окислительных модификаций

Модификация	Аминокислотный остаток	50 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /1 мкМ плазминогена, % (± ст. отклон.)	300 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /1 мкМ плазминогена, % (± ст. отклон.)
Окисление	Met 57	47.5 ± 7.9	60.0 ± 5.4
Окисление	Trp 108	20.9 ± 3.9	20.1 ± 5.1
Окисление	Met 182	0.0	42.2 ± 10.3
Окисление	Trp 235	3.9 ± 0.7	3.4 ± 1.3
Диокисление	Trp 235	16.5 ± 1.4	19.1 ± 0.9
Диокисление	Trp 304	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.8
Окисление	Met 385	29.7 ± 13.3	73.9 ± 8.6
Диокисление	Trp 382	0.5 ± 0.04	5.6 ± 1.84
Окисление	Trp 382	0.0	1.7 ± 0.5
Окисление	Met 404	69.1 ± 7.6	84.6 ± 3.7
Окисление	Trp 417	18.2 ± 1.3	22.8 ± 2.5
Окисление	Trp 427	38.6 ± 7.5	70.3 ± 9.2
Окисление	Met 463	33.3 ± 12.9	100.0 ± 0.0
Окисление	Met 585	95.5 ± 2.4	100.0 ± 0.0
Окисление	Met 788	12.8 ± 7.4	85.7 ± 2.9

Примечание: степени окисления аминокислотных остатков представлены как разность между средними значениями показателей при индуцированном окислении и в контроле.

Повышение дозы окислителя с 50 до 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> способствовало увеличению степени окисления большинства идентифицированных остатков таких, как Met57, локализованный в *PAp* до-

мене; в домене KP4 – Met385, Met404, Trp417 и Trp427; в KP5 – Met463 и в каталитическом домене – Met585, Met788. В то же время степень окисления Trp108, Trp235 и Trp417, расположенных в



**Рис. 4.** 3D-структура (PDB ID: 4DUU) плазминогена с обозначенными модификациями аминокислотных остатков (черные шары) при окислении белка 300 мкМ перекиси водорода.

доменах КР1, КР2 и КР4, соответственно, практически не изменялась и, кроме того, наблюдалось вовлечение в окислительную модификацию дополнительных двух остатков, Met182 и Trp382, локализованных в структуре КР2 и КР4, соответственно, степень окисления которых при действии 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 4) не отличалась от таковой в контрольном образце. Этот эффект, вероятно, связан с конформационными превращениями в молекуле плазминогена при действии 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, делающих эти два остатка более пространственно доступными для окислителя.

Сравнение окислительных сайтов, возникающих в плазминогене при его обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или гипохлоритом [7], обнаруживает ряд общих модифицированных остатков метионина, Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met 788 и один остаток триптофана, Trp235, в то время как некоторые остатки, Met463, Trp108, Trp382, Trp417 и Trp427, подвергаются модификации только под влиянием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Что касается метионинов, по всей видимости, Met57, Met404 и Met585 можно рассматривать в качестве антиоксидантных остатков, поскольку они являются общими и наиболее легко окисляемыми для обоих окислителей. Известно, что антиоксидантные метионины локализованы на поверхности белковой глобулы и являются высоко уязвимой мишенью для различных активных форм кислорода (АФК) [15]. Интересно также отметить, что, как указывалось выше, степень окисления некоторых остатков, как, например, Trp108, Trp235 и Trp417 не меняется или меняется крайне незначительно при увеличении концентрации окислителя в 6 раз. Этот феномен может быть обусловлен также антиоксидантной ролью метионинов, которые перехватывают значительную часть окислителя при его увеличивающемся количестве, сохраняя таким образом умеренным окисление других остатков, некоторые из которых могут быть функционально значимыми. Кроме того, нельзя исключить возможность сохранения антиоксидантными метионинами целостности и других, важных в функциональном отношении остатков плазминогена. Идентификация этих остатков представляет огромную важность для понимания функционирования плазминогена в среде, генерирующей АФК, и является предметом будущих исследований.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084-2014-0001) и при поддержке Российского научно-го фонда, № 16-14-00181.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствует конфликт интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray V., Norrving B., Sandercock P., et al. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke // J. Intern. Med. 2010. V. 267. P. 191–208.
2. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin // Adv. Protein Chem. 2005. V. 70. P. 247–299.
3. Castellino F., Ploplis V. Structure and function of the plasminogen/plasmin system // Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 647–654.
4. Miles L.A., Dahlberg C.M., Plow E.F. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P.11928–11934.
5. Law R.H., Caradoc-Davies T., Cowieson N., et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen // Cell Rep. 2012. V. 1. P. 185–190.
6. Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 805–825.
7. Васильева А.Д., Юрина Л.В., Щеголихин А.Н. и др. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация плазминогена: структурно-функциональные нарушения // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2019. Т. 488. № 5. С. 560–566.
8. Forman H.J., Bernardo A., Davies K.J. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? // Arch. Biochem. Biophys. 2016. V. 603. P. 48–53.
9. Root R.K., Metcalf J., Oshino N., Chance B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors // J. Clin. Invest. 1975. V. 55. P. 945–955.
10. Pastori D., Pignatelli P., Carnevale R., Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights // Prostaglandins Other Lipid Mediators. 2015. V. 120. P. 50–55.
11. Cavarocchi N.C., England M.D., Schaff H.V., et al. Oxygen free radical generation during cardiopulmonary bypass: correlation with complement activation // Circulation. 1986. V. 74. P. 130–133.
12. Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science. 1970. V. 170. P. 1095–1096.
13. Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., et al. Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in Arabidopsis thaliana thylakoid membranes // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011. V. 25. P. 184–190.
14. Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Indeykina M.I., et al. Oxidation-induced modifications of the catalytic subunits of plasma fibrin-stabilizing factor at the different stages of its activation identified by mass spectrometry // BBA—Proteins and Proteomics. 2018. V. 1866. P. 875–884.
15. Lim J., Kim G., Levine R. Methionine in Proteins: It's not just for protein initiation anymore // Neurochem. Res. 2019. V. 44. P. 1–11.

**PEROXIDE-INDUCED DAMAGE TO PLASMINOGEN MOLECULES**

**A. D. Vasilyeva<sup>a,#</sup>, V. S. Ivanov<sup>a</sup>, L. V. Yurina<sup>a</sup>, M. I. Indeykina<sup>a,c</sup>, A. E. Budrova<sup>a</sup>, A. S. Kononikhin<sup>b</sup>,  
Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev<sup>d</sup>, and M. A. Rosenfeld<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Center of Chemical Physics,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail address: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com*

Plasminogen is a zymogenic form of plasmin, an enzyme that plays a fundamental role in the dissolution of fibrin clots as well as participating in many other physiological processes. For the first time, by the method of gas chromatography-mass spectrometry post-translational modifications in the primary structure of plasminogen treated with physiologically relevant amounts of hydrogen peroxide were identified. It was found that methionine and tryptophan residues localized in different structural regions of plasminogen served as targets the oxidant. Plasminogen oxidation caused a dose-dependent effect in decreasing the fibrinolytic activity of plasmin evidenced by the formation of fibrinogen degradation products. The possible antioxidant role of methionines in the oxidative modification of plasminogen is discussed.

*Keywords:* plasminogen/plasmin, oxidation, hydrogen peroxide, mass spectrometry, electrophoresis, oxidation sites, antioxidant methionines