

УДК 577.322.75

ГИПОХЛОРИТ-ИНДУЦИРОВАННАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ
ПЛАЗМИНОГЕНА: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯА. Д. Васильева^{1,*}, Л. В. Юрина¹, А. Н. Щеголихин¹, А. Е. Бугрова¹,
Т. С. Константинова¹, М. И. Индейкина^{1,3}, А. С. Кононихин^{1,3,4},
член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев^{1,4}, М. А. Розенфельд¹

Поступило 05.06.2019 г.

Плазминоген — предшественник плазмина, сериновой протеазы, осуществляющей внутрисосудистый тромболизис. Методом тандемной масс-спектрометрии впервые были получены данные об окислительных модификациях молекулы плазминогена при индуцированном окислении. Данные ИК-спектроскопии показывают, что при окислении вторичная структура белка также подверглась перестройкам. Высокая толерантность плазминогена к окислению может быть обусловлена как его закрытой конформацией, так и способностью некоторых из остатков метионинов служить ловушками АФК.

Ключевые слова: плазминоген, плазмин, масс-спектрометрия высокого разрешения, ИК-спектроскопия, структура, электрофорез, фотометрия, окисление, окислительные сайты.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524885560-566>

Зрелая форма плазминогена человека циркулирует в крови как одноцепочечный белок, содержащий 791 аминокислотный остаток. Полипептидная цепь формирует семь доменов: *N*-терминальный так называемый *Pan-apple* домен (*PAP*), состоящий из 77 аминокислотных остатков (*Glu1–Lys77*), пять гомологичных крингл-доменов, *KR-1* (*Lys78–Glu164*), *KR-2* (*Glu165–Tyr264*), *KR-3* (*Arg265–Ala347*), *KR-4* (*Pro348–Asp461*), *KR-5* (*Cys462–Ala542*) и сериновый протеазный домен (*SP*), включающий остатки *Val562–Asn791*. В свою очередь, *SP* связан с *KR-5* активационной петлей 543–582, часть которой — 562–582 — структурно принадлежит домену *SP*. Гидролитическое, ферментативное расщепление пептидной связи *Arg561–Val562* ведёт к образованию двуцепочечной структуры плазмина [1]. Тяжёлая цепь белка (*Glu1–Arg561*) двумя дисульфидными мостиками связана с лёгкой цепью (*Ala562–Asn791*), содержащей каталитическую триаду канонических остатков *His603*, *Asp646* и *Ser741*.

Плазминоген может принимать две различные конформации. *Glu*-плазминоген имеет максимально компактную, закрытую конформацию. *PAP*-домен за счёт его остатков лизина и аргинина (в частности, *Lys50*, *Arg68* и *Arg70*) взаимодействует с лизин-связывающими сайтами (*LBS*) доменов *KR-4* и *KR-5* [2]. Кроме того, *LBS* на *KR4* взаимодействуют с лигандом на *KR-3*. Как полагают, эти взаимодействия имеют решающее значение для поддержания закрытой конформации *Glu*-плазминогена [3]. Дополнительные междоменные взаимодействия, обеспечивающие компактность структуры *Glu*-плазминогена, обусловлены интерфейсом между *KR-2* и *Lys708* каталитического *SP*-домена [4].

Плазменные белки, которые защищены антиоксидантными ферментами в несопоставимо меньшей степени по сравнению с внутриклеточными белками, непрерывно подвергаются окислительным атакам со стороны нейтрофилов [5]. Активация нейтрофилов как *in vitro*, так и *in vivo* при определенных заболеваниях (например, при воспалительных процессах, атеросклерозе и др.) вызывает генерацию высокореактивных АФК, таких как O_2^- и H_2O_2 , и высвобождение фермента миелопероксидазы. Реакция последней с H_2O_2 в присутствии физиологических концентраций Cl^- приводит к образованию продукта $HOCl/OCl^-$, который рассматривается одним из главных окислителей в плазме крови.

В данной работе впервые была предпринята попытка исследовать действие гипохлорит-индуцированного окисления плазминогена на модификацию отдельных сайтов в первичной структуре белков, на изменения пространственной структуры окислен-

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, Москва,

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии наук, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской Академии наук, Москва

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный Московской обл.

⁴ Сколковский институт науки и технологий, Московская обл.

*E-mail: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com, ms.kadaver@mail.ru

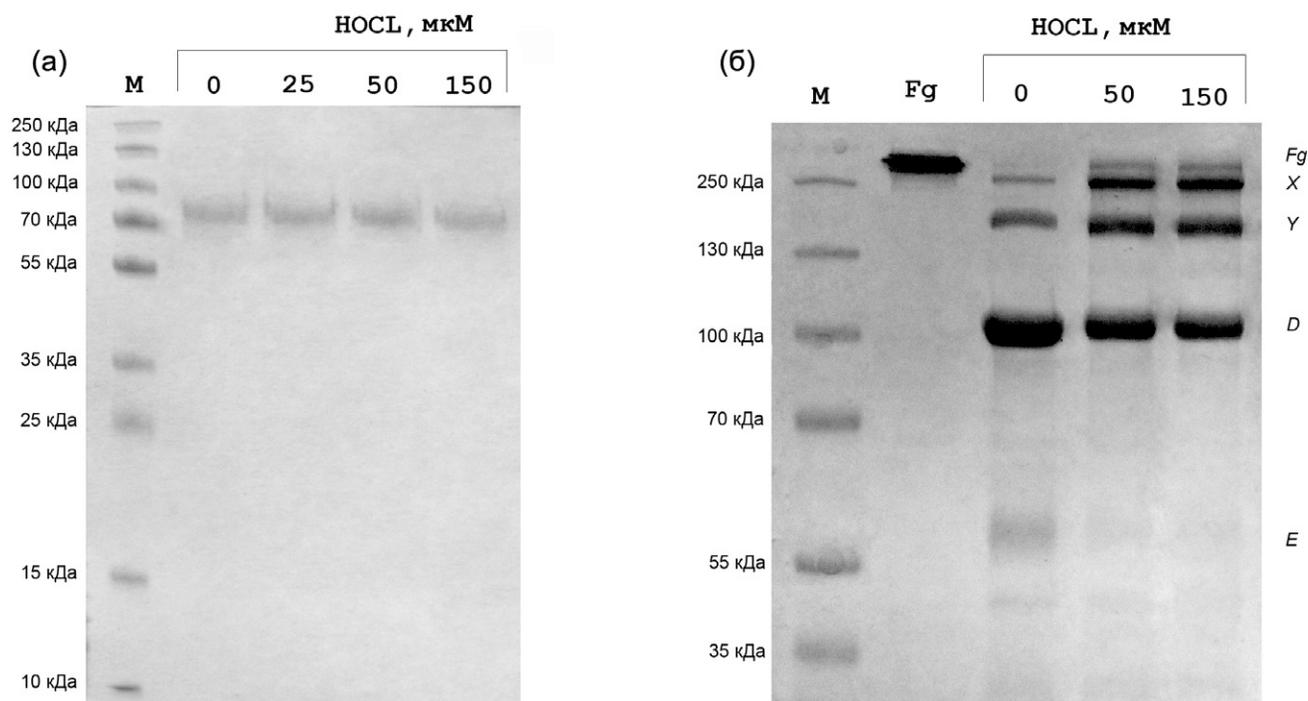


Рис. 1. Эффект HOCl/OCl^- на плазминоген (а) и плазминовый гидролиз фибриногена (б); (а) – никаких существенных изменений в структуре плазминогена не выявляется методом электрофореза; (б) – образующиеся под действием плазмина на фибриноген продукты гидролиза, так называемые фрагменты *X*, *Y*, *D* и *E*. Ферментативная активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена, обработанного нарастающими количествами HOCl/OCl^- , как видно, снижается. Это проявляется в уменьшении содержания конечного продукта, фрагмента *D*, в отсутствии фрагмента *E* и сохранении остаточного фибриногена.

ного плазминогена, а также на ферментативную активность плазмина, образованного при активации окисленного плазминогена.

Glu-плазминоген был выделен из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии [6] с добавлением во все используемые растворы апротинина до конечной концентрации 5 КIU/мл.

Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения [7].

Превращение плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (“Bachringwerke”, Германия) в молярном соотношении 100:1 (плазминоген:стрептокиназа), используя для оценки амидолитической активности образующегося плазмина хромогенный субстрат S 2251 ($\text{NH}_2\text{-D-Val-Leu-Lys-}n\text{-нитроанилид}$, “Chromogenix” США).

Ферментативная 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 раствором гипохлорита натрия (“Sigma”, SHBJ5633), как детально описано ранее [8].

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (“Agilent Technologies Inc.”, Santa Clara, USA) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (“Thermo”, Bremen, Germany) [9, 10]. При подготовке проб образцы обрабатывали 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). Все эксперименты повторялись трижды. При сравнении результатов учитывали аминокислоты, не окисленные в контроле, а также те, уровень окисления которых по сравнению с контролем возрастал более чем на 1%.

ИК-спектры образцов исходного и окисленного плазминогена регистрировали на фурье-ИК-спектрометре Spectrum Two (“Perkin-Elmer”, США), усредняя 16–25 накопленных сканов с оптическим разрешением 4 см^{-1} (цифровое разрешение 1 см^{-1}) под управлением ПО “Spectrum v.10.3” [11].

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что при обработке белка окислителем в диапазоне концентраций 25–150 мкМ/л плазминоген сохранял исходную гомогенность, т.е. не наблюдалась ни фрагментация белка, ни межцепочечное сшивание (рис. 1а). Этот результат хорошо согласуется с полученными ранее электрофоретическими данными, которые также демонстрировали сохранение целостности полипептидной цепи плазминогена, обработанного гипохлоритом [8]. Действие HOCl/OCl^- на плазминоген в концентрациях 50 и 150 мкМ вызывало снижение ферментативной активности плазмина. Это проявлялось в ингибировании реакции накопления продуктов гидролиза фибриногена, о чём свидетельствовало уменьшение содержания конечного фрагмента *D*, практически полное отсутствие фрагмента *E* и сохранение остаточного фибриногена (рис. 1б).

Кинетический анализ также выявил снижение амидолитической активности плазмина при увеличении количества HOCl/OCl^- (рис. 2). Следует обратить внимание на то, что даже при самом высоком количестве окислителя плазмин сохранял частичную способность гидролизовать хромогенный субстрат.

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы плазминогена, не подвергавшиеся воздействию гипохлорита (контроль) и обработанные 50 и 150 мкМ гипохлорита, образцы 1 и 2 соответственно (табл. 1).

Как видно из таблицы, различающиеся по структуре аминокислотные остатки повреждаются гипохлоритом с образованием, главным образом, продуктов окисления.

В контрольном образце за счёт автоокисления в процессе препаративного выделения плазминогена оказались умеренно окисленными четыре метиониновых остатка: Met182 в домене *KR-2*, Met404 в домене *KR-4*, Met585 и Met788 в *SP*-домене (рис. 3). При слабом окислении плазминогена гипохлоритом эти остатки были окисленными в той же степени, но был обнаружен дополнительно только один модифицированный остаток Met57, локализованный в *N*-концевом *Pap*-домене, который в контрольном образце оставался химически неповрежденным. Полученные масс-спектрометрические данные свидетельствовали о том, что обработка плазминогена большим количеством HOCl/OCl^- вовлекала в окисление значительное количество аминокислотных остатков, принадлежащих всем структурным частям плазминогена.

Кроме упомянутого ранее Met57 в *Pap*-домене были идентифицированы остатки Trp80 в домене

Таблица 1. Типы модификаций, обнаруженные методом масс-спектрометрии при окислении плазминогена гипохлоритом

Тип модификации	Изменение моноизотопной массы пептида	Аминокислоты, в которых обнаружена модификация
Окисление	+15,99	Met Pro Arg Trp Tyr
Диокисление	+31,99	Lys Met Trp
Окисление аргинина до глутаминового полуальдегида	-43,05	Arg
Окисление до нитро-соединения	+44,99	Trp
Хлорирование	+33,96 +67,92	Tyr His
Окисление тирозина до 2-аминотирозина	+15,01	Tyr
Окисление триптофана до кинуренина	+3,99	Trp
Окисление триптофана до оксолактона	+13,98	Trp
Окисление триптофана до гидроксикинуренина	+19,98	Trp

KR-1, Met182 и Trp235 в домене *KR-2*, Trp325 в домене *KR-3*, Met385, Tyr397, Met404 в домене *KR-4*, Trp523 в домене *KR-5*, Met585, Trp685, Trp761, Met788 в каталитическом домене. Что касается остатков Met182, Met404, Met585, Met788, степень их окислительной модификации существенно вырастала по сравнению с таковой в образце 1. Как видно, основная доля модифицированных остатков в плазминогене приходится на остатки метионинов и циклических аминокислот, среди которых триптофаны оказались наиболее уязвимыми для окислителя, что хорошо согласуется с реакционной способностью различных аминокислотных остатков в белках к действию HOCl/OCl^- [12].

Данные ИК-спектроскопии показывают, что окисление плазминогена влияет на вторичную структуру белка (рис. 4). Компоненты вторичной структуры, имеющие в ИК-спектрах поглощение в интервале $1656 \pm 2 \text{ см}^{-1}$, можно классифицировать как α -helices; несколько полос в интервале $1624-1642 \pm 2 \text{ см}^{-1}$ характеризуют внутримолекулярные β -sheets; полосы поглощения в интервале $1667-1685 \pm 2 \text{ см}^{-1}$

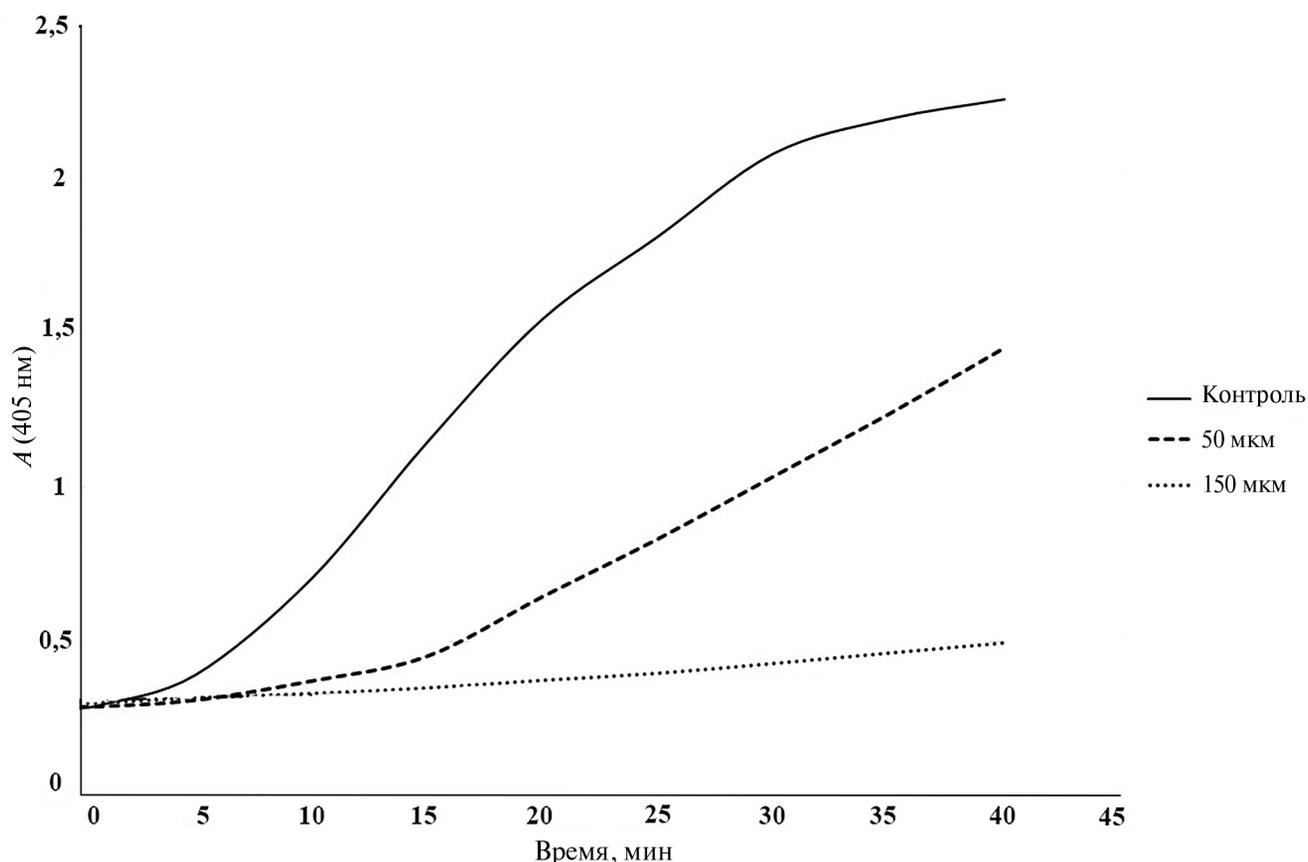


Рис. 2. Снижение амидолитической активности A плазмина, образованного из плазминогена, обработанного различными количествами HOCl/OCl^- .

характерны для β -turns; полоса вблизи $1648 \pm 2 \text{ см}^{-1}$ весьма характерна для random coils, а полоса при $1663 \pm 3 \text{ см}^{-1}$ указывает на наличие 3_{10} -helices. Дополнительно, β -sheets дают ещё слабые полосы в интервале $1691\text{--}1696 \pm 2 \text{ см}^{-1}$ [13].

Сопоставление величин относительных площадей полос для каждого из компонентов вторичной структуры свидетельствуют о том, что под действием окислителя во вторичной структуре плазминогена произошло существенное увеличение суммарного содержания структур типа β -sheet (с 55,8% до 69,1%) и заметное снижение относительного содержания random coils (от 9,3% до 5,8%). При этом относительное содержание структур α -helix в плазминогене уменьшилось с 7,4 до 6,2% и практически пропорционально ему в 1,2 раза снизилось относительное содержание структур типа 3_{10} -helix (с 6,5 до 5,3%). Следует отметить, что наибольший ущерб гипохлорит-индуцированное окисление нанесло элементам вторичной структуры плазминогена, соответствующим β -turn, общее относительное содержание которых уменьшилось с 14,5 до 8,4%.

В белках плазмы крови из-за полного отсутствия метионин сульфоксид редуктазы метионины, бу-

дучи неспособными к обратимому окислению, являются “жертвенными” антиоксидантными остатками, которые способны нейтрализовать токсическое действие АФК на другие остатки [14]. При этом антиоксидантные остатки метионинов, расположенные на поверхности белков, являются пространственно легко доступными для молекул окислителя, что делает их особо уязвимых к действию любых АФК. В противоположность им функционально значимые остатки метионинов, которые погружены внутрь белковой глобулы, являются существенно более резистентными к атаке АФК. В связи с вышеизложенным можно предположить, что шесть наиболее легко окисляемых остатков метионинов Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788, расположенных в различных частях плазминогена, служат ловушками АФК. Остающиеся неокисленными, т.е. более резистентные к действию АФК, Met69 в *PAp*-домене, Met96 в *KR*-1, Met167 в *KR*-2 и Met463 в *KR*-5, вероятно, локализованы в менее доступных областях белка и поэтому, по всей видимости, не наделены антиоксидантной функцией. Однако их точная функциональная принадлежность не ясна.

Плазминоген

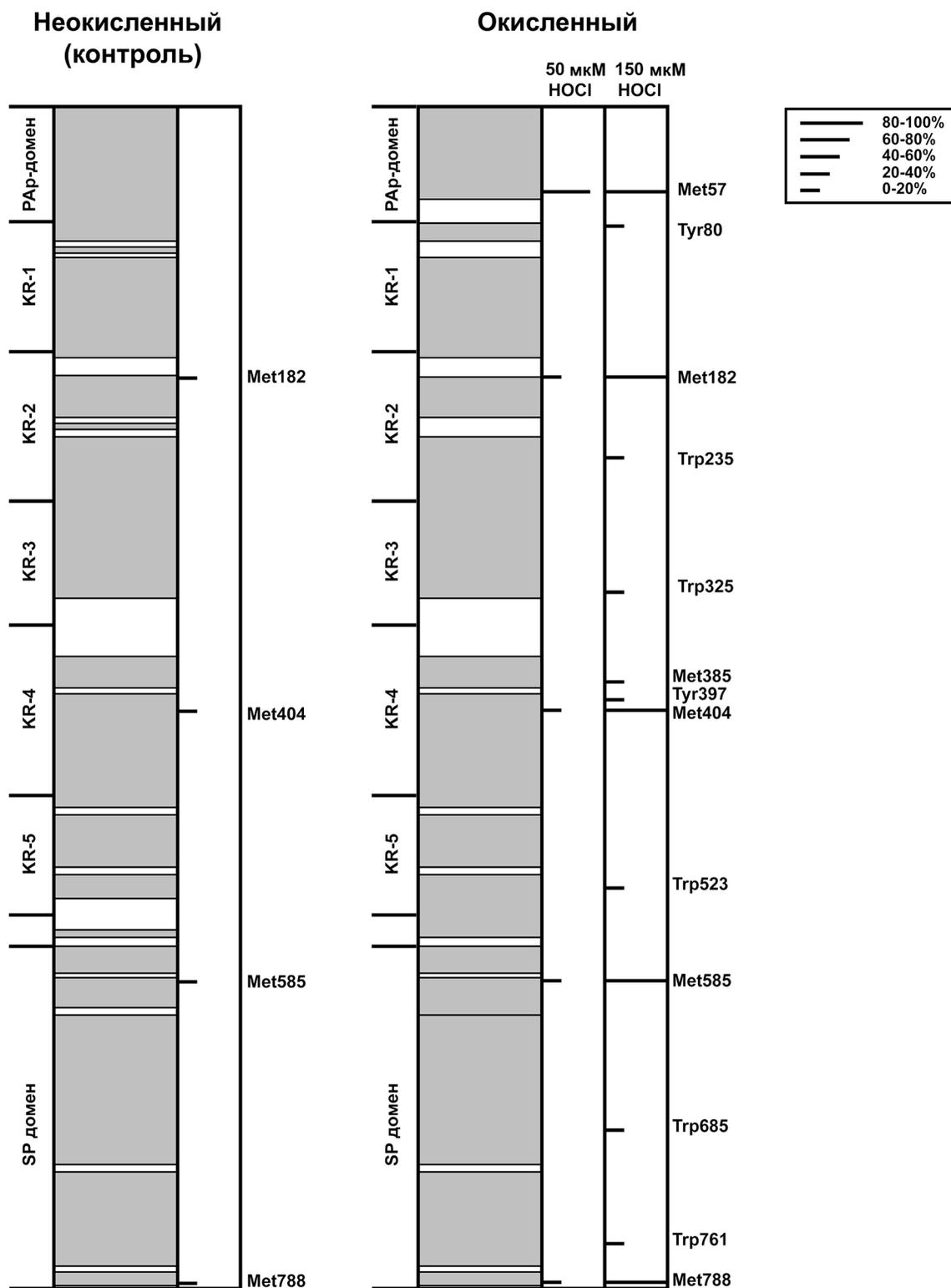


Рис. 3. Картирование аминокислотных остатков плазминогена в контрольных образцах и при индуцированном окислении белка. Процентом обозначено отношение количества модифицированной аминокислоты к общему количеству данной аминокислоты в пептидном фрагменте. Серым цветом обозначены участки молекулы, детектируемые при анализе.

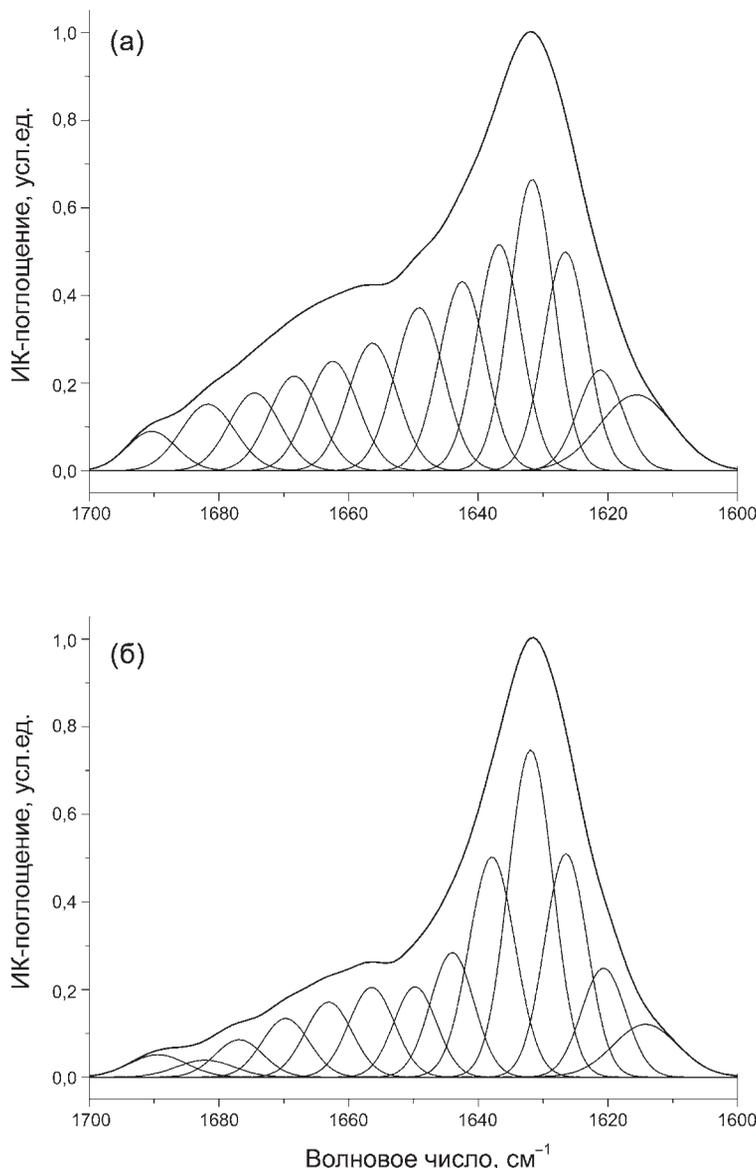


Рис. 4. Результаты разделения полос Амид I плазминогена на составляющие полосы поглощения, характеризующие различные компоненты вторичной структуры плазминогена: (а) – плазминоген, не обработанный HOCl/OCl^- ; (б) – плазминоген, обработанный $150 \mu\text{M HOCl/OCl}^-$.

В целом совокупность полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что молекула плазминогена проявляет достаточно высокую толерантность к действию окислителя, что может быть обусловлено как его закрытой конформацией, делающей недоступными для окисления ключевые в функциональном отношении аминокислотные остатки, так и способностью некоторых из остатков метионинов служить ловушками АФК.

Благодарности. В работе использовано оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Источник финансирования. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке Российского научного фонда 16–14–00181.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Castellino F. J., Ploplis V.A.* // *Thromb. Haemost.* 2005. V. 93. P. 647–654.
2. *Law R.H., Caradoc-Davies T., Cowieson N., Horvath A.J., Quek A.J., Encarnacao J.A., Steer D., Cowan A., Zhang Q., Lu B.G., Pike R.N., Smith A.I., Coughlin P.B., Whisstock J.C.* // *Cell Rep.* 2012. V. 1. P. 185–190.
3. *Ponting C.P., Marshall J M., Cederholm-Williams S.A.* // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1992. V. 3. P. 605–614.
4. *Rijken D.C. Sakharov D.V.* // *Thromb. Res.* 2001. V. 103. Suppl. 1:S41–9.
5. *Malle E., Furtmuller P.G., Sattler W., Obinger C.* // *Br. J. Pharmacol.* 2007. V. 152. P. 838–854.

6. *Deutsch D.G., Mertz E.J.* // *Science*. 1970. V. 170. P. 1095–1096.
7. *Weigand K.M., White N., Chung D., Ellingson E., Wang Y., Fu X., Pozzo D.C.* // *Biophys. J.* 2012. V. 103. P. 2399–2407.
8. *Gugliucci A.* // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008. V. 46. P. 1403–1409.
9. *Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhi A.S., Popo I.A., Nikolaev E.N., Adamska I.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. P. 184–190.
10. *Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Indeykina M.I., Bychkova A.V., Bugrova A.E., Biryukova M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E. N., Rosenfeld M. A.* // *BBA - Proteins and Proteomics*. 2018. V. 1866. P. 875–884.
11. *Rosenfeld M.A., Shchegolikhin A.N., Bychkova A.V., Leonova V.B., Biryukova M.I., Kostanova E. A.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 77. P. 106–120.
12. *Hawkins C. L., Pattison D. I., Davies M. J.* // *Amino Acids*. 2003. V. 25. P. 259–274.
13. *Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S.* // *Nature Protocols*. 2015. V. 10. P. 382–396.
14. *Lim J., Kim G., Levine R.* // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. P. 247–257. DOI:10.1007/s11064-017-2460-0

HYPOCHLORITE-INDUCED DAMAGE OF PLASMINOGEN MOLECULES: STRUCTURAL-FUNCTIONAL DISTURBANCE

**A. D. Vasilyeva¹, L. V. Yurina¹, A. N. Shchegolikhin¹, A. E. Bugrova¹,
T. S. Konstantinova¹, M. I. Indeykina^{1,3}, A. S. Kononikhin^{1,3,4},
Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev^{1,4}, M. A. Rosenfeld¹**

¹*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

²*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*

³*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation*

⁴*Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region, Russian Federation*

Received June 5, 2019

Plasminogen being a precursor of plasmin, a serine protease which plays a fundamental role in the intravascular thrombolysis. For the first time, by using high-resolution mass spectrometry, data were obtained of oxidative modifications of the plasminogen molecule under induced oxidation. The FTIR data show that under oxidation on the protein, its secondary structure also undergoes the rearrangements. The high tolerance of plasminogen to oxidation can be due to both the closed conformation and the ability of some Met residues to serve as ROS trap.

Keywords: plasminogen, plasmin, high-resolution mass spectrometry, FTIR spectroscopy, structure, oxidation, post-translational oxidative modifications.