

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Гаврилина Елизавета Сергеевна

**СТРУКТУРНАЯ АДАПТАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА К
ВОЗДЕЙСТВИЮ ОКИСЛИТЕЛЕЙ**

1.5.2. Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Васильева Александра Дмитриевна

Москва – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Современные представления о структуре плазминогена	11
1.1.1. Структура молекулы плазминогена	11
1.1.2. Конформации плазминогена	12
1.1.3. Общая архитектура крингл-доменов.....	15
1.1.4. Общая архитектура серинового протеазного домена.....	18
1.1.5. Активаторы плазминогена	20
1.2. Мутации плазминогена	23
1.3. Окислительные модификации белковых молекул.....	26
1.3.1. Воздействие активных форм кислорода на метионин	30
1.3.2. Воздействие активных форм кислорода на триптофан.....	31
1.3.3. Воздействие активных форм кислорода на другие аминокислотные остатки.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1. Материалы.....	35
2.2. Методы.....	35
2.2.1. Выделение фибриногена	35
2.2.2. Выделение плазминогена	36
2.2.3. Определение концентрации, выделенных белков	36
2.2.4. Превращение плазминогена в плазмин и образование комплекса плазминоген-стрептокиназа	37
2.2.5. Окисление плазминогена	37
2.2.6. Влияние окисления на ферментативную активность плазмина и комплекса плазминоген-стрептокиназа	37
2.2.7. Измерения методом динамического рассеяния света	38
2.2.8. Определение термодинамических параметров денатурации плазминогена при окислении.....	38
2.2.9. Подготовка образцов и анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией	39

2.2.10. Анализ результатов высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией.....	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1. Активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена	42
3.2. Масс-спектрометрический анализ окислительных модификаций плазминогена	46
3.3. Динамическое рассеяние света	50
3.4. Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии.....	51
3.5. Активность комплекса плазминогена со стрептокиназой при окислении	54
3.6. Масс-спектрометрический анализ плазминогена в комплексе со стрептокиназой.....	57
3.7. Обсуждение результатов.....	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	70
ВЫВОДЫ	72
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	73
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	74
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Известно, что белковые молекулы являются восприимчивыми мишенями для активных форм кислорода (АФК). Ввиду высокой реакционной способности активных форм кислорода они выступают ключевыми агентами окислительной модификации белков [1], индуцируя конформационные и химические изменения в молекулах, причем характер этих нарушений во многом зависит как от структуры белка, так и от природы АФК [2]. В целом, действие АФК на белок может вызывать окисление боковых радикалов аминокислот, генерацию внутри- и межмолекулярных сшивок, а также атаку пептидного остова, ведущую к протеолитической деградации [3, 4]. Накопление белков с окислительными посттрансляционными модификациями (ПТМ), коррелирует с процессами клеточного старения, а также с этиологией и патогенезом ряда заболеваний [5]. Это обуславливает высокую актуальность ПТМ в первичной структуре белков. Взаимосвязь между ПТМ и структурно-функциональными нарушениями является предметом исследований на примере многих белков плазмы, таких как фибриноген [6, 7, 8], альбумин [9], фактор свертывания крови XIII [10], α 2-макроглобулин [11] и других. Окислительные ПТМ плазминогена остаются недостаточно изученными.

Плазминоген является одним из важнейших белков системы фибринолиза. Также он вовлечен в ряд физиологических процессов, включая клеточную миграцию [12], эмбриогенез, ангиогенез и регенерацию тканей. Кроме того, плазминоген участвует и в развитии патологических процессов, в частности, способствует росту злокачественных новообразований и их метастазированию [13].

Плазминоген принадлежит к классу сериновых протеаз, для представителей которого характерно наличие эволюционно консервативных доменов. Поскольку плазминоген содержит домены, которые не являются для него уникальными [13], идентификация ПТМ плазминогена при индуцированном окислении может способствовать пониманию универсального механизма сохранения

функциональной активности различных сериновых протеаз в условиях избытка АФК.

Цель исследования: выявление механизмов нарушения молекулярной структуры и функциональной активности плазминогена при его индуцированном окислении.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние окислительных модификаций плазминогена, возникающих под воздействием гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) и перекиси водорода (H_2O_2), на функциональные свойства плазмина, образующегося из него методами электрофореза в ПААГ и колориметрии.

2. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) дать характеристику модифицированных аминокислотных остатков плазминогена: определить локализацию модифицированных аминокислотных остатков, определить их химическую природу, количественно оценить степень модификации и выявить наиболее уязвимые для окисления структурные элементы белка.

3. Исследовать термическую денатурацию плазминогена в присутствии различных концентраций гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и оценить изменения термодинамических параметров денатурации.

4. Провести сравнение окислительных модификаций в плазминогене и комплексе плазминогена и стрептокиназы, образующихся в результате индуцированного гипохлоритом натрия (NaOCl/OCl) окисления.

5. Оценить вклад конформации молекулы плазмин(оген)а в сохранение его функциональной активности при окислении.

Научная новизна

1. Впервые методом масс-спектрометрии (МС) было исследовано влияние окислителей с различной химической активностью – гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) и пероксида водорода (H_2O_2) – на структуру плазминогена. Установлено, что индуцированное окисление вызывает формирование ПТМ преимущественно в сериновопроteaseазном (SP) домене и четвертом крингл-домене (KR4).
2. Посттрансляционные окислительные модификации, индуцированные в SP-домене, не приводят к существенному изменению его функциональной активности.
3. Остатки метионина Met57, Met182, Met385, Met404, Met788 могут являться внутримолекулярными перехватчиками АФК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Сопоставив данные об окислительных ПТМ, возникающих в плазминогене и изменениях его функциональной активности было установлено, что некоторые из выявленных окислительные модификации, могут быть ответственны за подавление фибринолитической функции белка. Эти данные расширяют представления о взаимосвязи между накоплением плазминогена, содержащего ПТМ с развитием тромбозов и других патологий, которые могут быть связаны с дисфункцией белка.

Плазминоген служит оптимальной моделью для изучения молекулярных механизмов адаптации белков к окислительному стрессу в плазме крови: анализ его индуцированных окислительных ПТМ позволяет раскрыть общие принципы адаптации белков к окислению.

Методология и методы исследования

Выделение плазминогена (ПГ) из донорской плазмы крови человека осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Lys-Sepharose 4B (Amersham, Великобритания). Концентрацию выделенного белка определяли спектрофотометрически.

Окисление плазминогена индуцировали гипохлоритом натрия (NaOCl/OCl) или перекисью водорода (H_2O_2) в выбранных концентрациях.

Влияние окисления на ферментативную активность плазмина оценивали с помощью синтетического субстрата S2251TM (Chromogenix, США), а также методом электрофореза в ПААГ по изменению соотношения продуктов деградации фибриногена.

Значения гидродинамического диаметра для различных образцов молекул плазминогена до и после окисления измеряли с помощью прибора Zetasizer Nano S (Malvern, Англия).

Термодинамические параметры денатурации плазминогена определяли методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Обработку данных ДСК проводили с использованием специализированного программного обеспечения: температуры фазовых переходов и энтальпию денатурации рассчитывали в программе НАИРТА (ИНЭОС РАН), а деконволюцию термограмм осуществляли с помощью пакета Peak Fit версии 4 (AISN Software Incorporated).

Идентификацию модифицированных аминокислотных остатков проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографической системе Agilent 1200, сопряженной с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific, Германия). Разделение триптических пептидов осуществляли на колонке Reprosil-Pur Basic C18 (75 мкм × 12 см, 3 мкм; Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия). Полученные МС/МС-спектры обрабатывали в программе PEAKS Studio версии 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада), выполняя поиск по базе данных UniProtKB (Homo sapiens, таксономический идентификатор UP000005640).

Положения, выносимые на защиту

1. На основании исследования индуцированной окислительной модификации плазминогена и плазминогена в комплексе со стрептокиназой методом ВЭЖХ-МС/МС показано, что наибольшее число модификаций и повышенный уровень окисления аминокислотных остатков наблюдается в

образцах плазминогена в комплексе со стрептокиназой. Окисление аминокислотных остатков, расположенных в крингл-доменах, вероятно может приводить к потере функциональной активности белка.

2. Наиболее подверженными окислительной модификации структурными элементами во всех исследуемых образцах оказались домены KR4 и SP.

3. При анализе протеазной активности плазминогена и комплекса плазминоген-стрептокиназа методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), в обоих случаях значительное снижение активности было обнаружено при окислении 50 мкМ NaOCl/–OCl.

4. Анализ результатов дифференциальной сканирующей калориметрии показал, что окислительная модификация плазминогена, индуцированная NaOCl/–OCl, приводит к уменьшению молярной энтальпии денатурации. Несмотря на выраженное уменьшение энтальпии, стабильность наиболее устойчивого к нагреванию фрагмента белка сохраняется, что подтверждается близостью его температуры денатурации относительно контроля. Это свидетельствует о том, что при окислении SP-домен остается наиболее устойчивым к тепловой денатурации структурным элементом.

Личный вклад диссертанта

Личный вклад автора заключался в постановке целей и задач исследования, самостоятельном планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных и подготовке публикаций по теме работы. Результаты исследования были представлены на российских и международных научных конференциях.

Исследования с применением оборудования центра коллективного пользования ИБХФ РАН (ВЭЖХ-МС/МС) были проведены в сотрудничестве с научными сотрудниками: к.ф.-м.н. Кононихиным А.С., к.б.н. Бугровой А.Е., н.с. Индейкиной М.И. и д.ф.-м.н. Николаевым Е.Н. Исследования на микрокалориметре ДАСМ-4 были проведены в сотрудничестве с с.н.с., к.х.н. Вассерман Л.А.

Степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов обеспечиваются применением комплекса современных физико-химических методов анализа белковых структур и их функциональной активности. Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием специализированного программного обеспечения, реализующего оригинальные алгоритмы анализа и позволяющего выполнять строгую статистическую оценку погрешности измерений.

Достоверность полученных результатов обеспечивалась сопоставлением собственных данных с литературными источниками, в которых аналогичные системы изучались альтернативными физико-химическими методами. Техническое обеспечение экспериментов осуществлялось ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН на сертифицированном научном оборудовании.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены:

- 1) IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции" (Москва, 2022)
- 2) XXII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2022)
- 3) 3rd International Conference "Systems Biology and Systems Physiology: Intracellular Signaling and Metabolism Regulation" (Москва, 2022)
- 4) 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023)
- 5) Second Moscow International Conference on Multi-omics Technologies for Precision Medicine (Московская область, 2023)
- 6) XXIII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2023)
- 7) XXIV Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2024)

8) XXV Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2025)

9) Всероссийская научно-практическая конференция "Экспериментальная медицина", посвященная 135-летию Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2025)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них – 4 статьи в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК; 9 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, главы с изложением результатов работы и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы (137 источников), приложение А. Работа изложена на 95 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 26 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структуре плазминогена

1.1.1. Структура молекулы плазминогена

Плазминоген, предшественник сериновой протеазы плазмина и антиангиогенных молекул ангиостатинов, синтезируется в виде гликопротеина массой 92 кДа. Он экспрессируется в различных тканях организма, однако основными продуцентами выступают гепатоциты [14, 15, 16]. Плазминоген является ключевым компонентом системы фибринолиза [17], но также принимает участие в миграции клеток, ремоделирования тканей, воспалении, инвазии опухолевых клеток [17] и заживлении ран [18].

Плазминоген кодируется геном *PLG*, расположенным на хромосоме 6q26 (координаты chr6:160,702,193–160,754,097, сборка GRCh38) [19]. Ген содержит 19 экзонов и 18 интронов и имеет длину приблизительно 51 861 пар нуклеотидов [19, 20]. Первичный трансляционный продукт состоит из 810 аминокислотных остатков, включая сигнальный пептид из 19 аминокислотных остатков, который отщепляется при секреции [19] и формировании зрелого белка Glu1–Asn791 [21]. Кроме того, в зрелом белке гликозилированы остатки Asn289 и Thr346 и присутствует сайт фосфорилирования Ser578 [22, 23, 24].

Молекула плазминогена содержит семь структурных доменов, которые располагаются линейно от N- к С-концу [21, 25]: PAp-домен (Pan-Apple домен, NTP) включает остатки 1–77; пять расположенных последовательно крингл-доменов (KR1–KR5) по 78–80 остатков; сериновый протеазный (SP) домен из 230 аминокислот (Val562–Asn791), содержащий каталитическую триаду His603–Asp646–Ser741 (Рисунок 1) [26]. Границы доменов определяются по консервативным остаткам цистеина: Cys84–Cys162 в KR1, Cys166–Cys243 в KR2, Cys256–Cys333 в KR3, Cys358–Cys435 в KR4 и Cys462–Cys541 в KR5 [25]. Каждый крингл-домен стабилизируется тремя дисульфидными связями и содержит лизин-связывающий сайт (LBS), функциональная активность которого варьирует в зависимости от домена [27].

SP-домен приобретает каталитическую активность при формировании плазмина, в результате протеолитического расщепления связи Arg561–Val562 активаторами плазминогена [26, 28].

1.1.2. Конформации плазминогена

В плазме крови Glu-плазминоген циркулирует преимущественно в закрытой α -конформации. Семь доменов организованы в компактную структуру, стабилизированную ключевыми взаимодействиями, описанными ниже.

Сам по себе PAR-домен не имеет компактной организации, но выполняет ключевую функцию в поддержании закрытой конформации плазминогена, благодаря взаимодействиям Lys50, Arg68 и Arg70 с сайтами связывания лизина (LBS) в доменах KR4 и KR5 [26]. Боковая цепь Lys50 образует не очень прочный солевой мостик с карбоксильной группой Asp518 KR5, тогда как Arg68 и Arg70 координируются с LBS KR4.

SP-домен взаимодействует с LBS KR2, формируя солевые мостики между Lys708 и Asp219 или Glu221, а также между Glu706 и Arg234 дистального конца KR2. Закрытую конформацию плазминогена также поддерживают взаимодействия между KR4, неструктурированным участком (линкером) между доменами KR3 и KR4, активационной петлей и SP-доменом. KR4 взаимодействует в основном с остатками 350–352 линкера KR3/KR4. Glu554, относящийся к активационной петле, взаимодействует с азотом основной цепи остатка Val355. Эти взаимодействия служат для удержания области линкера KR3/KR4 в положении, защищающем профермент от нежелательной активации. Также, две петли (672–678 и 703–713) в SP-доме образуют обширные взаимодействия с доменом KR2. Два иона хлора (Cl^-), координируются Arg234, Trp235 и азотом основной цепи Lys708, что указывает на физиологическую роль ионов хлора в стабилизации закрытой конформации молекулы плазминогена (Рисунок 2) [26].

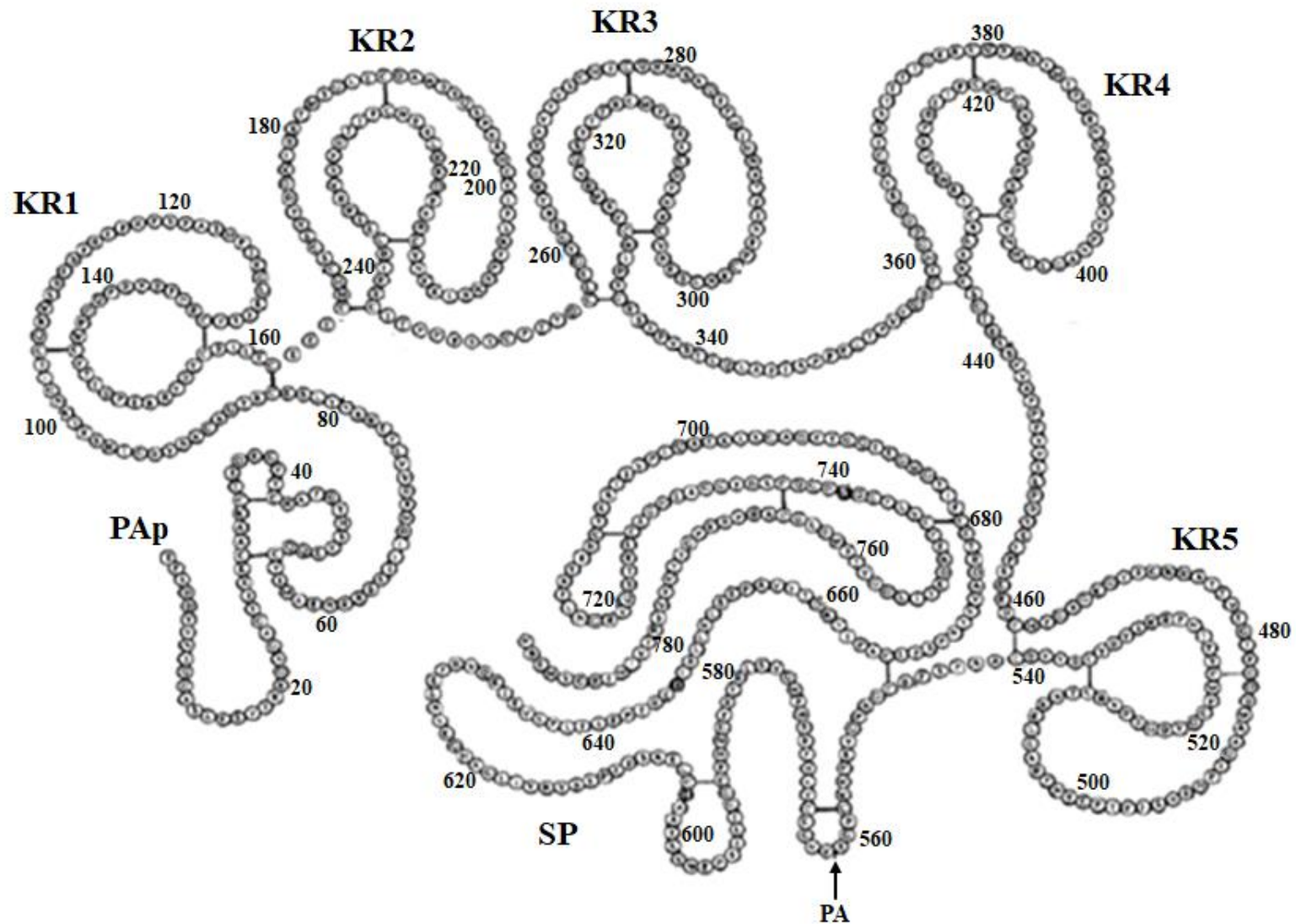


Рисунок 1 – Структура молекулы Glu-плазминогена. SP – сериновый протеазный домен (Val562–Asp791); KR1 – KR5 – крингл-домены; PAp – Pan-apple домен; PA – сайт воздействия активаторов плазминогена Arg561–Val562 [18]

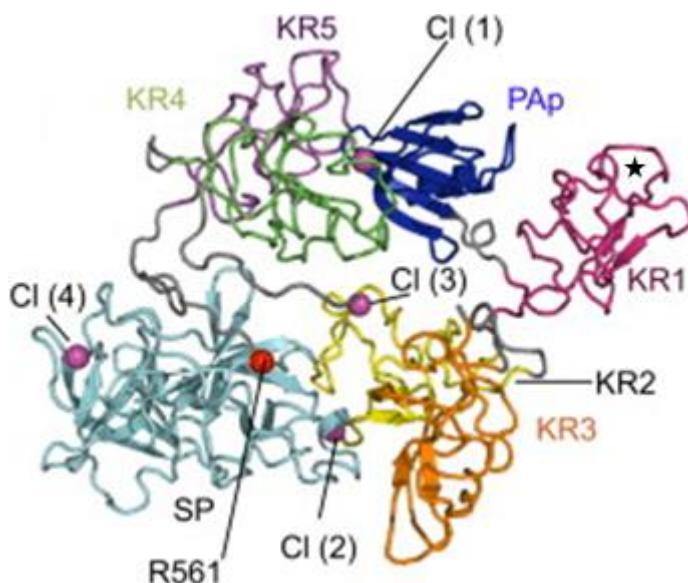


Рисунок 2 – Структура плазминогена человека с указанием взаимодействий, стабилизирующих закрытую конформацию. Домены обозначены и окрашены следующим образом: PAp — синий; KR1 — розовый; KR2 — желтый; KR3 — оранжевый; KR4 — зеленый; KR5 — фиолетовый; SP — голубой. Ионы хлорида Cl-(1) и Cl-(2) находятся на границе раздела KR4/PAp и KR2/SP, соответственно, и показаны в виде розовых сфер. Два других иона хлорида, Cl-(3) и Cl-(4), связываются с доменами KR2 и SP, соответственно. Положение активационной петли (R561) отмечено красной сферой. LBS KR1 отмечен звездочкой [26]

Из всех LBS только KR1 остаётся свободным в закрытой конформации, что определяет его роль в первичном взаимодействии плазминогена с субстратом. Переход плазминогена в открытую γ -конформацию индуцируется его связыванием с остатками лизина (или аналогами лизина) на фибрине или клеточных рецепторах. Свободный LBS KR1 опосредует первоначальное связывание с фибрином или поверхностью клетки, после чего LBS KR5 становится доступным для взаимодействия с содержащими лизин лигандами, в результате чего запускается каскадная конформационная перестройка молекулы [26].

Также существует полуоткрытая β -конформация несвязанного укороченного Lys-плазминогена, который образуется в результате протеолитического отщепления плазмином всего PAp-домена [29], из-за чего внутримолекулярные взаимодействия с KR4 и KR5 становятся невозможными, что значительно дестабилизирует структуру плазминогена.

1.1.3. Общая архитектура крингл-доменов

Крингл-домены представляют собой эволюционно консервативные участки белков, входящих в состав семейства сериновых протеаз (KSP; kringle-serine proteinase) [30, 31]. Так, например, в тканевом активаторе плазминогена (tPA) содержатся два таких домена (KR1 и KR 2) [16], из которых только KR2 обладает функциональным LBS, опосредующим связывание с фибрином [32]. Урокиназный активатор плазминогена (uPA) содержит один крингл-домен без функционального LBS [33]. Протромбин содержит два крингл-домена (именно в нём крингл-мотив был описан впервые) [34]. Аполипопротеин(а) содержит множественные повторы KR4-подобных доменов (10 подтипов KIV-1–KIV-10; KIV-2 варьирует от 1 до >40 копий), один KR5-подобный домен и инактивированный протеазный домен; гомология этого белка с плазминогеном составляет ~75–90% [35].

В плазминогене крингл-домены участвуют в связывании с субстратом и поддержании конформации молекулы; домены KR1, KR2, KR4 и KR5 способны связываться с остатками лизина, что характерно для этого семейства доменов [36].

Каждый крингл-домен состоит из тройной петлевой структуры, стабилизированной тремя дисульфидными мостиками, образованными шестью консервативными остатками цистеина: Cys1–Cys6, Cys2–Cys4, Cys3–Cys5 [25]. Структурное ядро содержит два коротких антипараллельных β -листа, формирующих β -шпильки, содержащих две перекрывающиеся дисульфидные связи; один цистин включен в соседние β -тяжи, тогда как другой расположен непосредственно за концами несмежных β -тяжей. Эта структура является структурным признаком крингл-домена и называется «дисульфидным крингловым крестом» (Рисунок 3) [30].

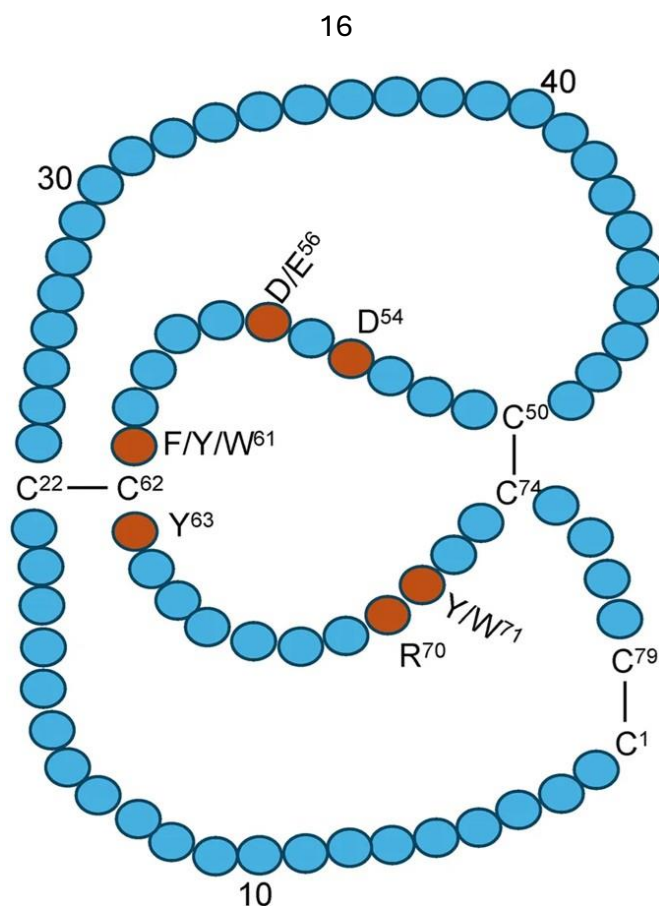


Рисунок 3 – Крингл-структура из 79 аминокислотных остатков (на основе PLG-KR1). Критически важные для связывания с субстратом сайты показаны красным цветом [19]

Лизин-связывающий сайт (LBS) крингл-доменов имеет характерную трёхкомпонентную организацию. Во-первых, в его составе есть анионный центр, образованный двумя аспартатами, Asp54 и Asp56 (нумерация начинается с Cys1), которые координируются с аминогруппой боковой цепи лизина и его аналогами, такими как ϵ -аминокапроновая кислота (EACA). Примечательно, что один из аспартатов заменен глутаматом в KR2 и лизином в KR3. Во-вторых, присутствует гидрофобный центр, в котором находятся две ароматические аминокислоты, чаще всего Trp61 и Tyr71, которые образуют кластер, стабилизирующий центральные метиленовые группы EACA. В-третьих, есть катионный центр, состоящий из основных остатков, которые взаимодействуют с карбоксильной группой лиганда. Arg70 взаимодействует с COOH-группой EACA, в то время как Tyr63 поддерживает гидрофобное ядро и образует водородную связь с COOH-группой EACA.

Многочисленные исследования показывают, что вариации в аминокислотных остатках влияют на сродство LBS к лизину [19, 37], которое снижается в ряду KR1 > KR4 > KR5 > KR2 >> KR3, где KR3 практически не способен связываться с лизином.

Единственный доступный для взаимодействия в закрытой конформации Glu-плазминогена крингл-домен KR1 (Cys84–Cys162) обладает наиболее высокоаффинным LBS. Ключевые остатки анионного центра - Asp137 и Asp139 (Asp55/Asp57 во внутренней нумерации), катионного — Arg152 (Arg71); гидрофобный жёлоб образован Trp144, Tyr146 и Tyr154 [37].

В KR2 (Cys166–Cys243) Asp57 заменён на Glu57, этот домен имеет умеренную аффинность к лизину [38]. В закрытой конформации LBS KR2 заблокирован остатком Lys708 из SP-домена, формирующим внутримолекулярный солевой мостик с Asp219/Glu221 [26].

Домен KR3 (Cys256–Cys333) не обладает функциональным LBS [14], несмотря на сохранение характерной пространственной структуры LBS [39]. Причина заключается в замене критического анионного остатка Asp311 на положительно заряженный Lys, что приводит к электростатическому отталкиванию аминокислотных групп лизина [27]. Именно в KR3 находится сайт N-гликозилирования Asn289.

Домен KR4 (Cys358–Cys435) с Lys392/Arg426 (Lys35/71) в катионном центре и Asp411 и Asp413 (Asp55/Asp57) в анионном обладает высокой аффинностью к лизину и его аналогам [40]. KR4 участвует в связывании фибрина совместно с KR1 [16], а также во взаимодействии с Lys414 стрептокиназы [41].

Крингл-домен KR5 (Cys462–Cys541) вместо обычного основного остатка (Arg/Lys) на позиции 71 имеет Leu71, что обуславливает предпочтительное связывание алкиламинов и бензамидина вместо ω -аминокарбоновых кислот. Функционально KR5 играет критическую роль в поддержании закрытой конформации через взаимодействие с Lys50 PAp-домена [16, 26].

1.1.4. Общая архитектура серинового протеазного домена

В рамках классификации MEROPS плазмин(оген) относится к клану PA (Proteases of mixed nucleophile, superfamily A; наиболее многочисленная группа протеаз, в активном центре расположена аминокислота серин или цистеин) – подклану S (обозначение субклана содержащим аминокислоту серин в активном центре) – семейству S1 (семейство химотрипсина, крупнейшее семейство сериновых протеаз) – подсемейству S1A (трипсины). Для всех белков этого семейства характерно наличие в активном центре остатков Ser, His, Asp. Выявлена также высокая схожесть пространственных структур их каталитических (SP) доменов. Общая архитектура этого домена у плазминогена очень похожа на другие химотрипсиноподобные сериновые протеазы и представлена двумя β -бочками, соединенных петлями [42].

Большинство сериновых протеаз имеют в своих каталитических доменах активационную петлю, где при активации происходит протеолитическое расщепление пептидной связи, приводящее к конформационным изменениям, включая образование нового недоступного для растворителя солевого мостика и, следовательно, к образованию функционального активного центра. У плазминогена человека эта активационная связь расположена между Arg561 и Val562 [43]. Плазминоген уникален среди сериновых протеаз тем, что его активационная петля ограничена дисульфидной связью, соединяющей остатки Cys558 и Cys566 [44].

Сериновый протеазный домен плазминогена, как и других сериновых протеаз семейства S1, структурно состоит из двух β -бочек: β_{A1} , $\beta_{B1} - \beta_{F1}$ – N-субдомен, β_{A0} , β_{A2} , $\beta_{B2} - \beta_{F2}$ – C-субдомен. Два субдомена соединены тремя транс-сегментами, а также пептидом А-цепи 542–557. Каталитическая триада расположена на границе субдоменов: His603 и Asp646 – в N-субдомене, Ser741 – в C-субдомене [42, 43].

В плазминогене SP-домен неактивен, так как His586 формирует водородную связь с Asp740, препятствуя образованию оксианионной полости, а Trp761 занимает карман S1, блокируя доступ субстрата [45]. Карман первичной специфичности S1 представляет собой полость глубиной ~ 10 Å. На его дне располагается

отрицательно заряженный Asp735 (Asp189 по химотрипсину), обеспечивающий трипсиноподобную специфичность плазмينا к Arg и Lys в позиции P1 субстрата.

Каталитический цикл сериновых протеаз включает две последовательные полуреакции – ацилирование и деацилирование – с образованием двух тетраэдрических интермедиатов [46].

Первоначально кислород гидроксильной группы каталитического Ser741 атакует карбонильную группу пептидной связи субстрата. His603 выступает в качестве общего основания, которое само поддерживается водородной связью с Asp646 [47, 48].

Стабилизация отрицательно заряженного тетраэдрического промежуточного соединения обеспечивается аминокислотами Gly739 и Ser741. Вместе эти аминокислотные остатки формируют положительно заряженную «оксианионную полость» в активном центре фермента. Распад тетраэдрического промежуточного соединения ведет к образованию ацил-ферментного промежуточного соединения, координация освободившегося N-конца осуществляется посредством His603. Затем молекула воды вытесняет свободный фрагмент полипептида и атакует карбонильную группу ацил-ферментного комплекса. Оксанионная полость стабилизирует второй тетраэдрический промежуточный продукт, распад которого формирует новый C-конец на субстрате (Рисунок 4) [48].

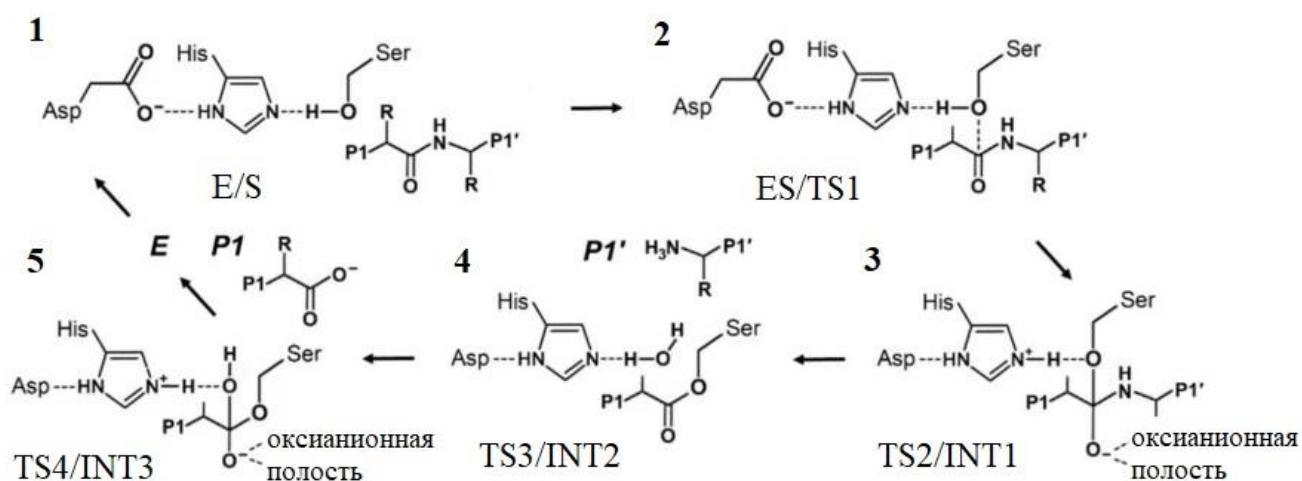


Рисунок 4 – Механизм действия сериновых протеаз. 1. Образование комплекса Михаэлиса (E/S). 2. Нуклеофильная атака отрицательно

поляризованного атома Оу на карбонильный атом С остатка P1 (TS1), приводящая к образованию тетраэдрического промежуточного соединения с отрицательным зарядом на атоме О карбонильной группы (INT1), которое связано с оксианионной полостью. 3. Протонирование амидной группы NH разрывает расщепляемую связь (TS2) с высвобождением продукта P1'. 4. Ацильное промежуточное соединение (INT2) подвергается атаке каталитической воды (TS3) и образует второе тетраэдрическое промежуточное соединение (INT3). 5. Высвобождение продукта P1 (TS4/E/P1) с новым С-концом [49]

1.1.5. Активаторы плазминогена

Регуляция активации плазминогена включает два активатора плазминогена (tPA и uPA), два специфических ингибитора (типа 1 и типа 2) и мембранно-связанный рецептор, специфичный для uPA. Эта система играет важную роль в различных биологических процессах, связанных с внеклеточным протеолизом. В том числе, недавние исследования показали, что при взаимодействии с интегринами и белком внеклеточного матрикса витронектином эта система участвует в регуляции миграции и пролиферации клеток, независимо от протеолитической активности [50].

Тканевый активатор плазминогена (tPA) — сериновая протеаза массой ~70 кДа (527 аминокислот), секретируемая в основном эндотелиальными клетками [51]. Доменная организация от N- к С-концу включает: F - пальцевидный домен; EGF - домен, подобный фактору роста; KR1-KR2 - крингл-домены и SP домен [52]. В норме активность tPA в кровотоке низка из-за его быстрой инактивации путем образования комплексов с ингибиторами активаторов плазминогена (PAI). Как t-PA, так и его основной ингибитор PAI-1 продуцируются и секретируются эндотелиальными клетками, тогда как гепатоциты и тромбоциты являются дополнительными источниками PAI-1 [51, 53]. Выведение tPA из крови в основном регулируется печенью с периодом полувыведения 3–5 минут [54].

Урокиназный активатор плазминогена (uPA) — это сериновая протеаза, которая превращает плазминоген в плазмин на поверхности клетки. uPA секретируется в виде неактивного одноцепочечного профермента (про-uPA), состоящего из 411 аминокислот, и имеет молекулярную массу около 53 кДа и

состоящей из трех функционально независимых доменов: домена, подобного фактору роста (EGF), крингл-домена и протеолитического домена (SP) [55]. Этот белок связывается со своим собственным рецептором (рецептором активатора плазминогена урокиназного типа, uPAR) и расщепляется соседним мембраносвязанным плазмином (или другими протеазами) в положениях Lys158–Lys159, образуя активную двухцепочечную форму [33].

Важное различие между tPA и uPA заключается в том, что, одноцепочечная форма tPA является каталитически активной, тогда как uPA, как и большинство сериновых протеаз, секретируется в виде про-uPA с незначительной или отсутствующей активностью [56]. Важным преимуществом tPA по сравнению с uPA является его высокая эффективность в присутствии фибрина, в присутствии которого tPA активирует плазминоген примерно в три раза быстрее, чем uPA. Скорость этой реакции также возрастает под влиянием других белков, таких как аннексин 2, коллаген IV, ламинин 1, тромбоспондин и сам фибрин. Во время фибринолиза tPA связывается с фибриновыми волокнами и активирует связанный плазминоген до плазмина, который, в свою очередь, разрушает фибрин, образуя растворимые продукты распада [57].

Физиологически tPA преимущественно отвечает за фибринолиз, в то время как uPA, по-видимому, участвует в перичеселлюлярном протеолизе, необходимом для миграции клеток. Это функциональное различие может быть обусловлено связыванием про-uPA с поверхностью клеток через специфический, высокоаффинный, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный рецептор плазматической мембраны (uPAR), который связывается с некаталитическим N-концевым регионом про-uPA. Связывание uPA с uPAR важно для эффективной активации плазминогена на поверхности клеток. Кроме того, образование комплекса uPA-uPAR влияет на адгезию, миграцию и хемотаксические свойства клеток [56, 58].

Помимо физиологических активаторов, существуют и бактериальные белки, способные активировать плазминоген. Одним из таких активаторов выступает стрептокиназа (СК) [59]. СК способствует вирулентности стрептококков, генерируя

плазмин, который приводит к распространению бактерий из первичного очага инфекции, вызывая фибринолиз и деградацию компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны [60, 61]. СК состоит из 414 аминокислот, формирующих три структурных гомологичных друг другу домена α , β и γ (АО 1–150, АО 151–287 и АО 288–414) [62], разделенных случайными спиралями и небольшими гибкими областями на амино- и карбоксильных концах [63]. Активирующие пламиноген человека участки межмолекулярного контакта в СК являются более консервативными, чем другие локусы в молекуле и такие же участки в СК другой видоспецифичности [64]. Высококонсервативные ($\geq 85\%$ идентичности последовательности) домены α и γ обеспечивают большинство мест контакта с SP-доменом пламиногена и проявляют синергический эффект в его активации [65]. β -домен не обеспечивает прямых контактных участков с активным центром пламина, однако он необходим для связывания пламиногена, к которому имеет максимальное сродство [59]; α -домен имеет более низкое сродство, а сродство γ -домена - наименьшее [63]. Предполагается, что как α -, так и β -домены СК участвуют в распознавании молекул пламиногена [66]. При этом, связывание СК с Lys-пламиногеном более прочное, чем с Glu-пламиногеном, отчасти из-за взаимодействия С-концевого остатка Lys414 стрептокиназы с увеличенным числом доступных LBS на крингл-доменах [41].

Таким образом образование комплекса ПГ-СК инициируется быстрым и обязательным взаимодействием между β -доменом СК и кринглом 5 пламиногена. Это взаимодействие запускает переход пламиногена из закрытой в открытую конформацию, после чего происходит связывание всех трёх доменов СК с сериновым протеазным доменом пламиногена (Рисунок 5) [65].

Ферментативная активность комплекса пламиноген–стрептокиназа реализуется за счёт формирования солевого мостика между остатком Ile1 СК и остатком Asp740 пламиногена, который приводит к изменению конформации SP-домена пламиногена и экспозиции каталитической триады и оксианионного центра, что необходимо для протеолитической активности комплекса. Кроме того,

Plе1 стрептокиназы выступает в роли противоиона для Asp740 в активном центре, способствуя стабилизации ферментативного комплекса [67].

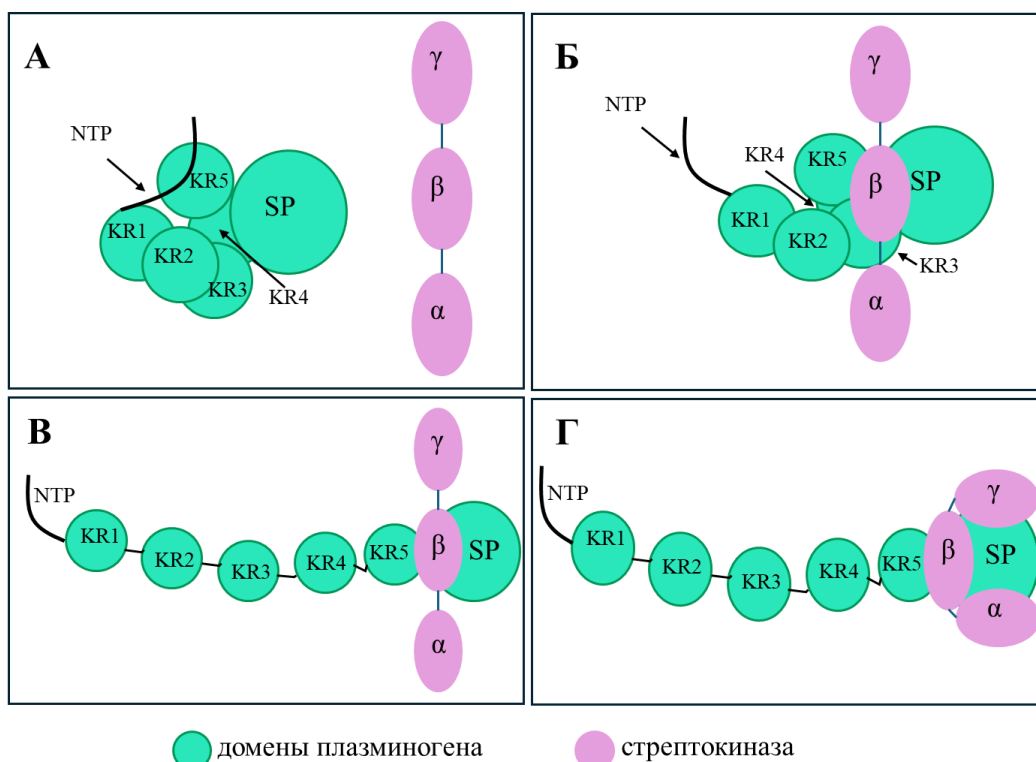


Рисунок 5 – Модель связывания стрептокиназы с плазминогеном. А: ПГ и СК не взаимодействуют. ПГ находится в закрытой конформации. Б: β-домен СК связывается с KR5 ПГ, вытесняя NTP. В: ПГ переходит из закрытой в открытую конформацию. Г: все три домена СК связываются с каталитическим доменом ПГ. Адаптировано из [65]

1.2. Мутации плазминогена

Патогенные мутации плазминогена приводят к возникновению редкой патологии – дефициту плазминогена. Эту патологию делят на два типа: тип I, истинный дефицит плазминогена или гипоплазминогенемия (Plasminogen Deficiency type 1, PLGD1), впервые описан Хасегавой и др. [68]; тип II, дисплазминогенемия (Plasminogen Deficiency type 2, PLGD2), впервые описан Аоки и др. [69]. PLGD1 — это генетическое заболевание, характеризующееся низким или неопределяемым уровнем плазминогена. PLGD2, характеризуется нормальным или слегка пониженным уровнем плазминогена при сниженной или аномальной

активности. Мутации, приводящие к PLGD2, встречаются значительно реже чем, мутации, приводящие к PLGD1 (Рисунок 6).

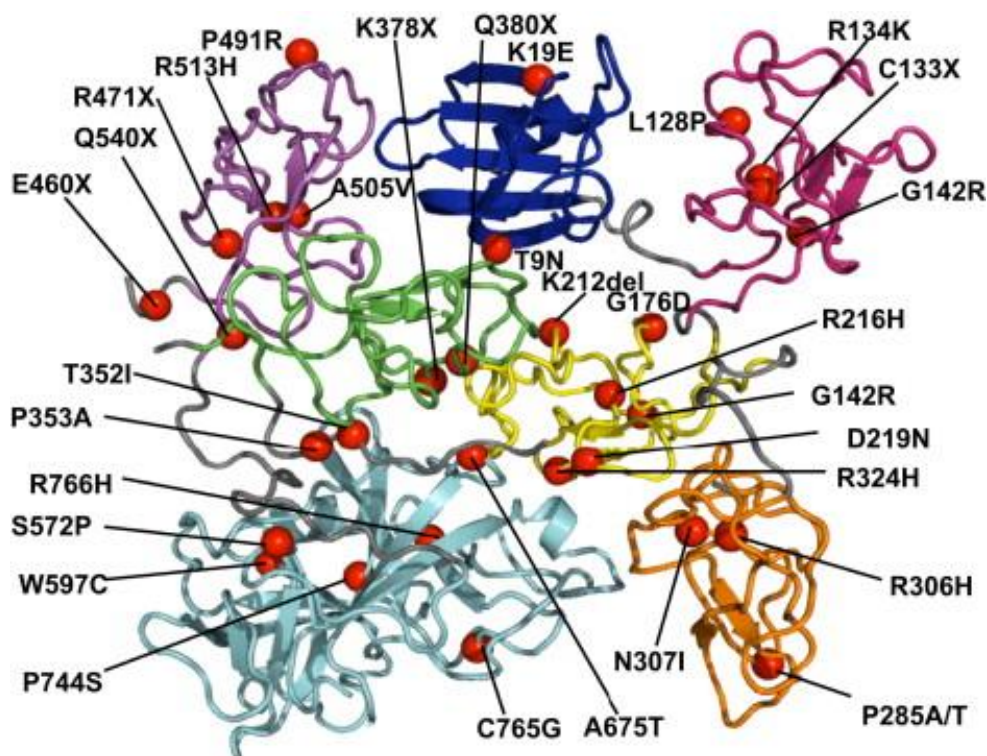


Рисунок 6 – Расположение мутаций плазминогена человека, приводящих к его тяжелому дефициту [26]

Среди мутаций, приводящих к PLGD2, наиболее часто встречается замена Ala601 на Thr (Ala601Thr). У гомозиготных носителей с этой мутацией активность плазминогена составляет около 14% от нормы, у гетерозигот – примерно 57%. Данная замена ассоциирована с предрасположенностью к тромбозам, однако клинические проявления могут быть вариабельны [19, 70, 71].

Еще одной достаточно распространённой мутацией, приводящей к PLGD2, является Val355Phe. Это патогенный вариант, локализующийся в линкере между KR3 и KR4. Эта мутация также связана с повышенным риском тромбообразования [19, 70, 71].

Asp676Asn – мутация, в результате которой нарушается структура активного центра серинового протеазного домена. Это известная мутация, при которой отрицательная группа карбоксила (-COO) аспартата меняется на нейтральную

амидную группу (-CONH) аспарагина, которая отменяет одну из анионных связей, необходимых для поддержания стабильной структуры молекулы плазминогена [71].

К другим распространённым мутациям относятся Gly693Arg, Leu696Pro, Gly732Arg. Gly693Arg – ассоциирована не только с PLGD2, но и с атипичным гемолитико-уремическим синдромом, что указывает на возможное плейотропное действие данной мутации. Leu696Pro – патогенный вариант, приводящий к нарушению функции серинового протеазного домена и развитию PLGD2. Gly732Arg – вариант, известный как Kanagawa-I [72], также вызывает снижение активности плазминогена и относится к мутациям, вызывающим PLGD2. Интересно, что мутации, приводящие к PLGD2, преимущественно располагаются в сериновом протеазном домене.

В тоже время, мутации, приводящие к PLGD1, в основном локализованы в крингл-доменах и могут влиять на целостность LBS. К таким аминокислотным заменам относится замена аргинина на лизин в позиции 134 (Arg134Lys). Несмотря на то, что аргинин и лизин обладают похожей структурой и одинаковым положительным зарядом, они различаются размером боковой цепи и гидрофобностью. Замена может изменять пространственную организацию боковых цепей соседних остатков, влияя на общую архитектуру белка. Arg134, располагается в домене KR1 и влияет на стабилизацию конформации белка. Замена на лизин может приводить к ослаблению устойчивости молекулярной структуры и, как следствие, к снижению функциональной активности белка [19]. К аналогичным последствиям могут приводить замены Thr181Ala Arg234His Gly401Asn, ведущие к нарушению водородных связей, либо ионных или гидрофобных взаимодействий.

Замена Ala488Val, одна из наиболее исследованных мутаций плазминогена, отличается от перечисленных выше тем, что не меняет характера внутренних взаимодействий между остатками ввиду замены неполярного аланина на неполярный валин. Тем не менее, больший размер боковой цепи валина также может несколько менять локальную конформацию молекулы, влияя на стабильность третичной структуры плазминогена.

1.3. Окислительные модификации белковых молекул

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой крайне реакционноспособные производные кислорода, составляющие до 95% всех свободных радикалов в организме человека. К АФК относятся как молекулярные соединения, такие как озон (O_3), синглетный кислород ($^1O_2$), перекись водорода (H_2O_2), так и высокореакционные свободные радикалы: гидроксильный радикал ($HO\bullet$) и супероксид-анион (O_2^-). Кроме того, под действием гемсодержащих пероксидаз в организме образуются гипогалоидные кислоты ($HOCl$, $HOBr$, HOI), которые являются мощными окислителями, активно взаимодействующими с органическими молекулами. Образование АФК может быть обусловлено как экзогенными причинами, например воздействием загрязнителей воздуха, так и эндогенными процессами – в качестве побочных продуктов клеточных ферментативных реакций (Рисунок 7).

В норме АФК выступают ключевыми медиаторами, обеспечивающими проведение сигнала внутри клетки и индукцию иммунного ответа [73]. Окислительный стресс возникает из-за избытка эндогенных или экзогенных активных форм кислорода (АФК) в организме и тесно связан с воспалительными реакциями [73].

Синтез и реакционная способность АФК строго контролируются ферментативными и неферментативными защитными системами. Ферментативные защитные системы включают ферменты, удаляющие окислители или их предшественников (например, супероксиддисмутазы, пероксиредоксины, тиоредоксинредуктаза, изоформы глутатионпероксидазы и каталазы), к неферментативным относятся водо- и жирорастворимые поглотители окислителей, включая тиолы (например, глутатион и тиоредоксин), аскорбиновую кислоту (витамин С), урат, изоформы токоферола (витамин Е), хинолы (например, восстановленный кофермент Q10), каротиноиды и полифенолы [74]. Кроме того, эти защитные системы дополняются механизмами, которые направлены на удаление поврежденных макромолекул или восстановление их функциональной активности (например, метионинсульфоксидредуктазы,

дисульфидредуктазы/изомеразы, глутаредоксины, сульфiredоксины, протеасомы, лизосомы, протеазы, фосфолипазы и ферменты репарации ДНК) [75, 76].

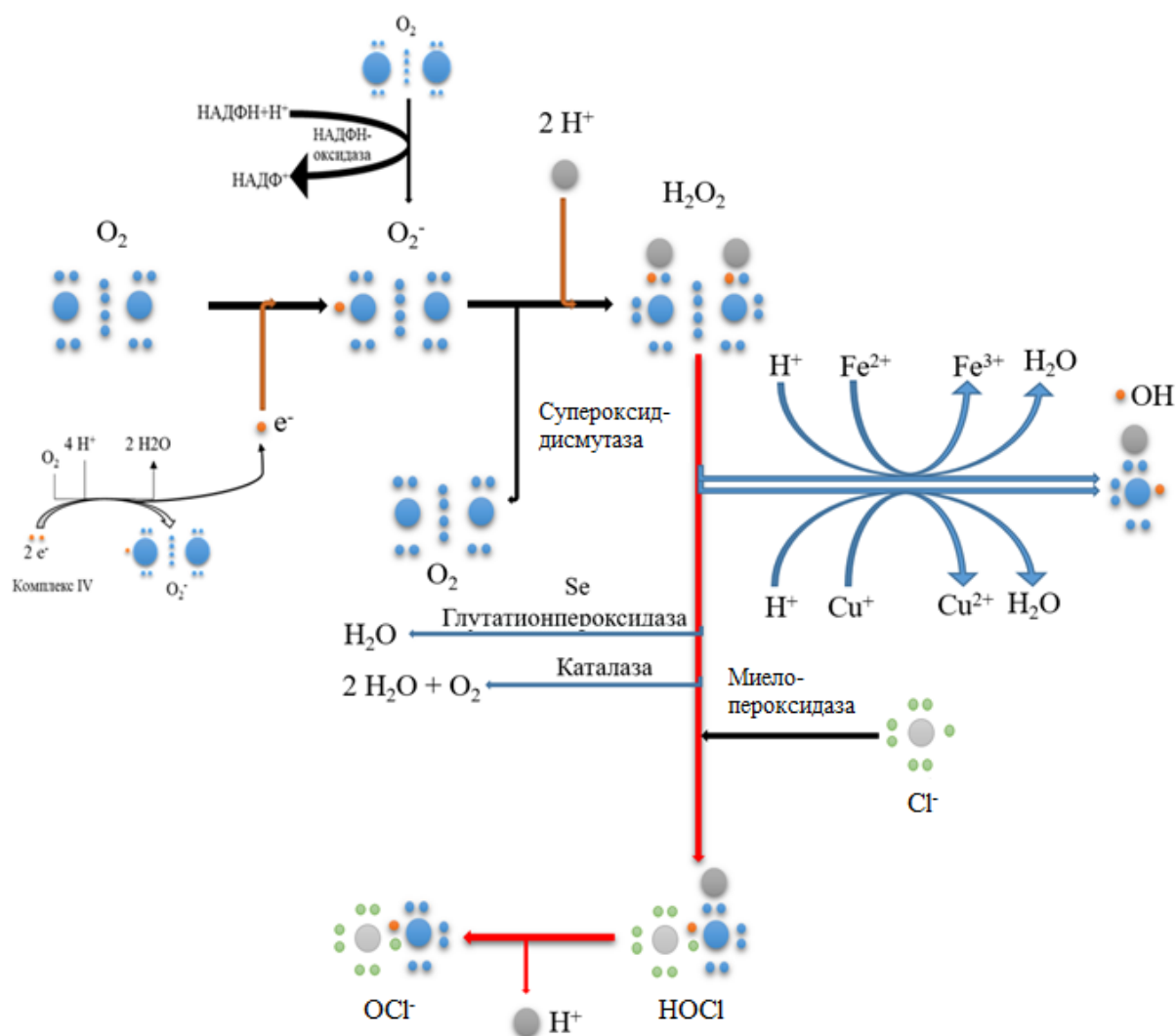


Рисунок 7 – Образование активных форм кислорода. Адаптировано из [77]

АФК, такие как H_2O_2 , супероксид и гидроксильный радикал, играют важную роль в борьбе с инфекцией. Однако хроническое повышение уровня этих веществ может приводить к повреждениям клеточных компонентов, а также к окислению белков, являющихся основной мишенью для АФК [78], обычно имеющих высокую концентрацию (до 1–3 мМ в плазме и 5–10 мМ в клетках) [74]. Окисление является одной из основных причин деградации белков и может приводить к нарушению их конформаций и функций [79].

Окислительной модификации в белках в первую очередь подвергаются аминокислотные остатки с высокой реакционной способностью: метионин, цистеин, триптофан, тирозин и некоторые другие (Таблица 1). Их уязвимость к окислительным модификациям обусловлена наличием реакционноспособных атомов серы и ароматических колец, которые активно взаимодействуют с АФК [80].

Таблица 1 – Аминокислоты, наиболее подверженные окислению и продукты их окисления [2]

Аминокислоты	Продукты окисления
Цистеин	Дисульфиды, цистеиновая кислота
Метионин	Метионинсульфоксид, метионинсульфон
Триптофан	2-, 4-, 5-, 6- и 7-гидрокситриптофан, нитротриптофан, кинуренин, 3-гидроксикинурунин, формилкинурунин
Фенилаланин	2,3-Дигидроксифенилаланин, 2-, 3- и 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-Дигидроксифенилаланин, тирозин-тирозиновые поперечные сшивки, Tyr-O-Tyr, сшитый нитротирозин
Гистидин	2-Оксогистидин, аспарагин, аспарагиновая кислота
Аргинин	Глутаминовый полуальдегид
Лизин	α -Аминоадипиновый полуальдегид
Пролин	2-пирролидон, 4- и 5-гидроксипролин пироглутаминовая кислота, глутаминовый полуальдегид
Треонин	2-Амино-3-кетомасляная кислота

Длительный окислительный стресс может приводить к развитию многих хронических системных патологий, таких как сердечно-сосудистые заболевания [81, 82], различные типы онкологии [81, 83], болезнь Паркинсона [84] и болезнь Альцгеймера [85].

Перекись водорода

Перекись водорода (H_2O_2) – стабильный, незаряженный, двухэлектронный окислитель, который постоянно присутствует в организме человека и в низких концентрациях участвует в различных физиологических процессах, таких как передача сигналов через мембрану, экспрессия генов, клеточная дифференциация, метаболизм инсулина, определение формы клеток и сигнальные каскады, индуцируемые факторами роста [86, 87, 88]. Окислительный стресс, помимо повышения уровня других АФК, связан с аномальными концентрациями H_2O_2 в организме.

Митохондрии являются основными органеллами, продуцирующими H_2O_2 [89]. Для митохондрий H_2O_2 является побочным продуктом, образующимся из-за утечки электронов в цепи переноса электронов. Эти электроны реагируют с кислородом с образованием супероксид-анион-радикала (O_2^-), который далее с помощью фермента супероксиддисмутазы превращается в H_2O_2 [90]. Помимо этого, H_2O_2 непосредственно образуется рядом ферментов: НАДФН-оксидазой-4, моноаминоксидазами, гексозооксидазами, аминокислотными оксидазами, другими оксидоредуктазами, белково-дисульфидными изомеразам и Ego1p во время синтеза и сворачивания белка [91].

По химической природе, H_2O_2 обладает низкой реакционной способностью: она может действовать как слабый окислитель или как слабый восстановитель, но окисление большинства биомолекул, включая липиды и ДНК, не является прямым [92]. H_2O_2 , генерируемая активированными фагоцитами, участвует в воспалительном процессе, влияя на повышение экспрессии молекул адгезии, контроль пролиферации клеток или апоптоз и модуляцию агрегации тромбоцитов [93, 94, 95]. Значительная часть окислительных повреждений, индуцируемых перекисью водорода, происходит опосредованно, например, через реакцию Фентона в присутствии двухвалентного железа (Fe^{2+}), что приводит к генерации гидроксильных радикалов [82].

Наряду с этим белки подвержены прямому окислению перекисью водорода, что приводит к модификации таких аминокислотных остатков, как метионин,

цистеин и триптофан [74, 96], однако эти реакции протекают с очень низкими константами скорости [74, 97].

Гипохлорит

Реакция H_2O_2 с гемопероксидазами, такими как миелопероксидаза, эозинофильная пероксидаза и лактопероксидаза, приводит к образованию гипогалогеновых кислот, которые в случае их образования во внеклеточном пространстве могут приводить к повреждению тканей организма (HO_2X , где $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ или SCN) [98]. Кроме того, HOCl находится в равновесии с Cl_2 при низких значениях pH , является ключевым компонентом врожденного иммунного ответа против патогенов и образуется в высоких концентрациях в фаголизосомах нейтрофилов [99]. HOCl и HOBr являются наиболее реакционноспособными соединениями, образующимися *in vivo*, оба обладают сильными окислительными и галогенирующими свойствами. Эти кислоты вызывают окислительное повреждение белков [100], ДНК [101] и липидов [102]. Однако основной мишенью для HOCl и HOBr являются белки [100] и воздействие высоких концентраций HOCl обычно приводит к различным модификациям белков плазмы [103].

HOCl вступает в реакции значительно быстрее, чем H_2O_2 , с константой скорости в реакции с метионином примерно в 10^8 раз выше [4, 104].

1.3.1. Воздействие активных форм кислорода на метионин

Согласно результатам кинетического исследования, HOCl окисляет метионин преимущественно до метионинсульфоксида (Рисунок 8) через двухэтапный механизм. На первом этапе происходит образование сульфоксидного катиона в результате электрофильной атаки хлора на атом серы. На втором этапе катион взаимодействует с молекулами воды, формируя устойчивый сульфоксид [105, 106]. H_2O_2 окисляет метионин до сульфоксида по другому механизму: H_2O_2 действует как нуклеофильный агент, напрямую атакующий серосодержащую группу метионина. Реакция с H_2O_2 протекает медленнее, чем с HOCl , но демонстрирует высокую селективность и не приводит к образованию иных продуктов реакции [107]. В

обоих случаях в результате окисления метионина образуется смесь S- и R-диастереомеров относительно атома S (~1:1 от H_2O_2 ; смещённое распределение от HOCl) [108].

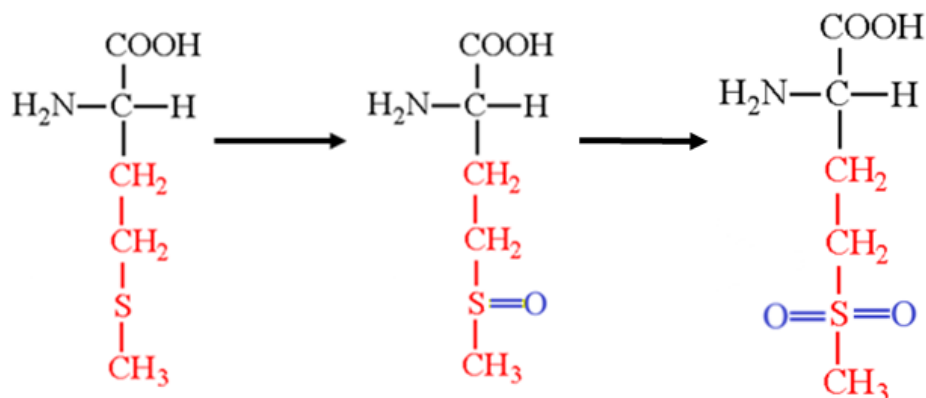


Рисунок 8 – Окисление метионина до сульфоксида (+15.99; +O) и сульфона (+31.99; +2O) метионина. Разработан автором

При избытке HOCl возможно дальнейшее окисление метионинсульfoxида до сульфона (Рисунок 8). Этот процесс требует дополнительных эквимольных количеств гипохлорита и протекает через образование промежуточного сульфоксид-хлорамина. Образование сульфона необратимо изменяет структуру остатка, что может приводить к полной потере функциональности белка, однако эта реакция маловероятна в физиологических условиях [108].

Метионинсульfoxид более гидрофилен, чем метионин [109], поэтому окисление остатков метионина в белках может вызывать серьезные структурные изменения, неправильное сворачивание или агрегацию, что в конечном итоге ухудшает функцию белка [108, 110].

1.3.2. Воздействие активных форм кислорода на триптофан

Индольное кольцо Trp обладает высоким окислительно-восстановительным потенциалом и является мишенью для широкого спектра АФК. Окислительная деградация триптофана может проходить по нескольким путям с образованием оксиндолеаланина, (4, 5, 6 или 7)-гидрокситриптофана, диоксиндолеаланина, кинуренина, N-формилкинуренин и других продуктов (Рисунок 9) [4, 111], спектр которых зависит от окислителя: H_2O_2 и одноэлектронные радикалы

преимущественно окисляют триптофан до гидрокситриптофана, N-формилкинуруенина и кинуруенина; HOCl – до хлориндолениновых производных, моно- и ди-окситриптофана [112].

Trp часто играет структурную роль в гидрофобных ядрах и центрах связывания, поэтому окисление его кольца нарушает локальную конформацию, что может влиять на функциональность белка [111].

1.3.3. Воздействие активных форм кислорода на другие аминокислотные остатки

Основным продуктом окисления тирозина гипохлоритом в белках является хлоротирозин (Рисунок 10А) [113, 114, 115]. В случае окисления свободного тирозина, вместо образования хлоротирозина, окисление происходит преимущественно до 4-гидроксифенилацетальдегида [116]. Предполагается, что в обоих случаях первичной стадией взаимодействия с HOCl является образование хлорамина [117]. В условиях избытка окислителя хлоротирозин подвергается дальнейшему хлорированию с образованием 3,5-дихлортирозина и альдегидов, в частности хлорированного 4-гидроксифенилацетальдегида [116].

HOCl также легко реагирует со свободными аминогруппами N-конца и боковых цепей [116]. Реакция с NH₂-группой Lys является основным источником белковых хлораминов [118]. Основным продуктом окисления Lys является аминокадипиновый полуальдегид (Рисунок 10В) [2, 119]. Это соединение способно образовывать основания Шиффа с аминогруппами других белков (внутри- и межмолекулярные сшивки) и с фосфатидилэтаноламином; кроме того, окисленный остаток лизина теряет положительный заряд, что снижает изоэлектрическую точку белка и нарушает электростатические взаимодействия.

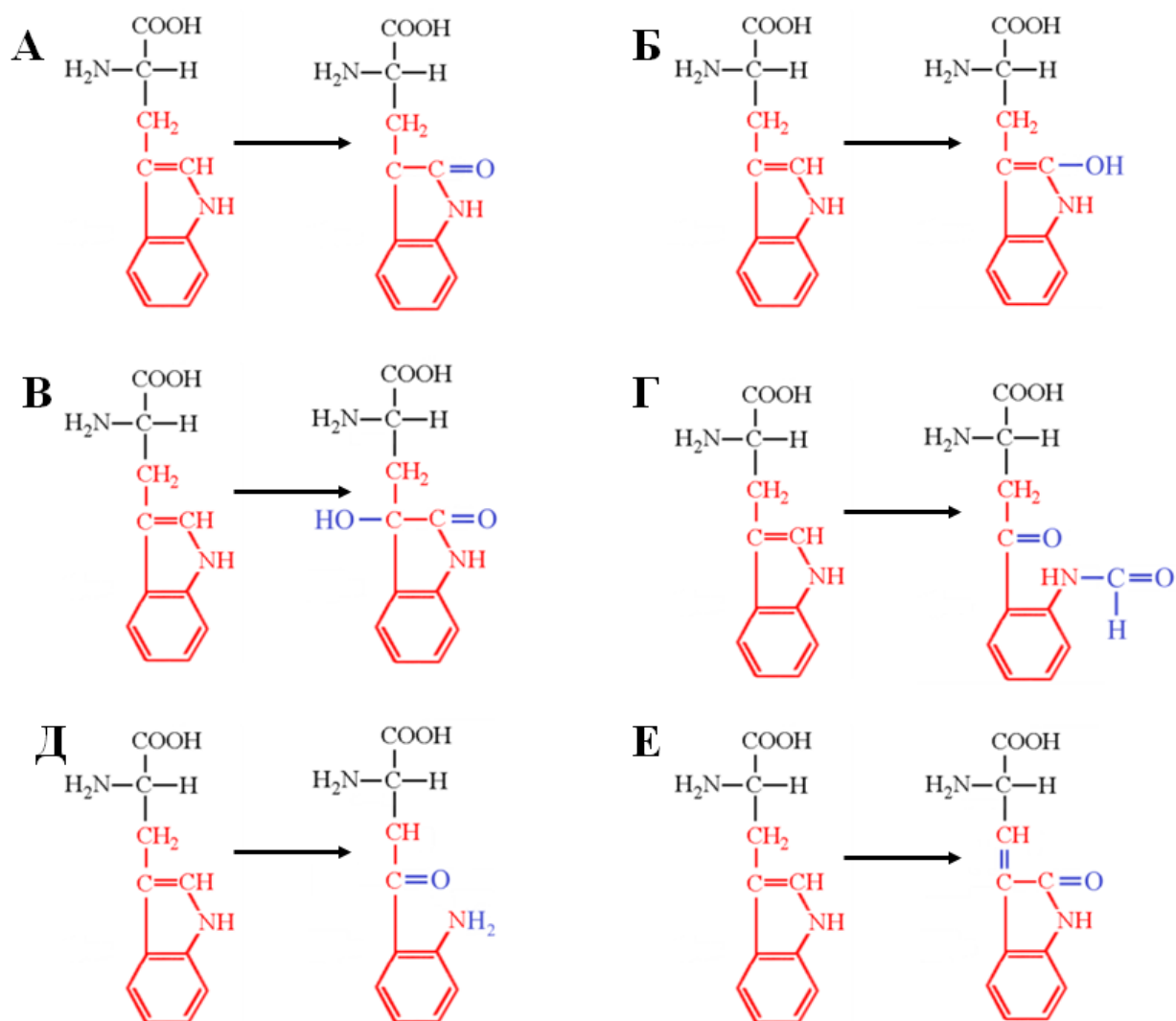


Рисунок 9 – Типы окислительных модификаций триптофана: А – до оксииндоаланина (+15.99) (+O); Б – до 2-гидрокситриптофана (+15.99) (+O); В – до диоксииндоаланина (+31.99) (+2O); Г – до формилкинуренина (+31.99) (+2O); Д – до кинуренина (+3.99) (–C +O); Е – до оксолактона (+13.98) (–2H +O). Разработан автором

Свободный Pro чаще всего окисляется АФК по атому C4 пирролидинового кольца с раскрытием цикла и образованием глутаминового полуальдегида и 2-пирролидона. Глутаминовый полуальдегид содержит свободную карбонильную группу и относится (как и α-аминоадипиновый полуальдегид) к двум главным карбонильным продуктам окисления, на долю которых приходится 55–100 % всех белковых карбониллов [2, 120]. Помимо этого, окисление пролина может приводить к образованию промежуточного соединения 5-гидроксипролина (Рисунок 10Б) [121].

При окислении аминокислотных остатков аргинина гипохлоритом образуется гидроксиаргинин (Рисунок 10Г) [122].

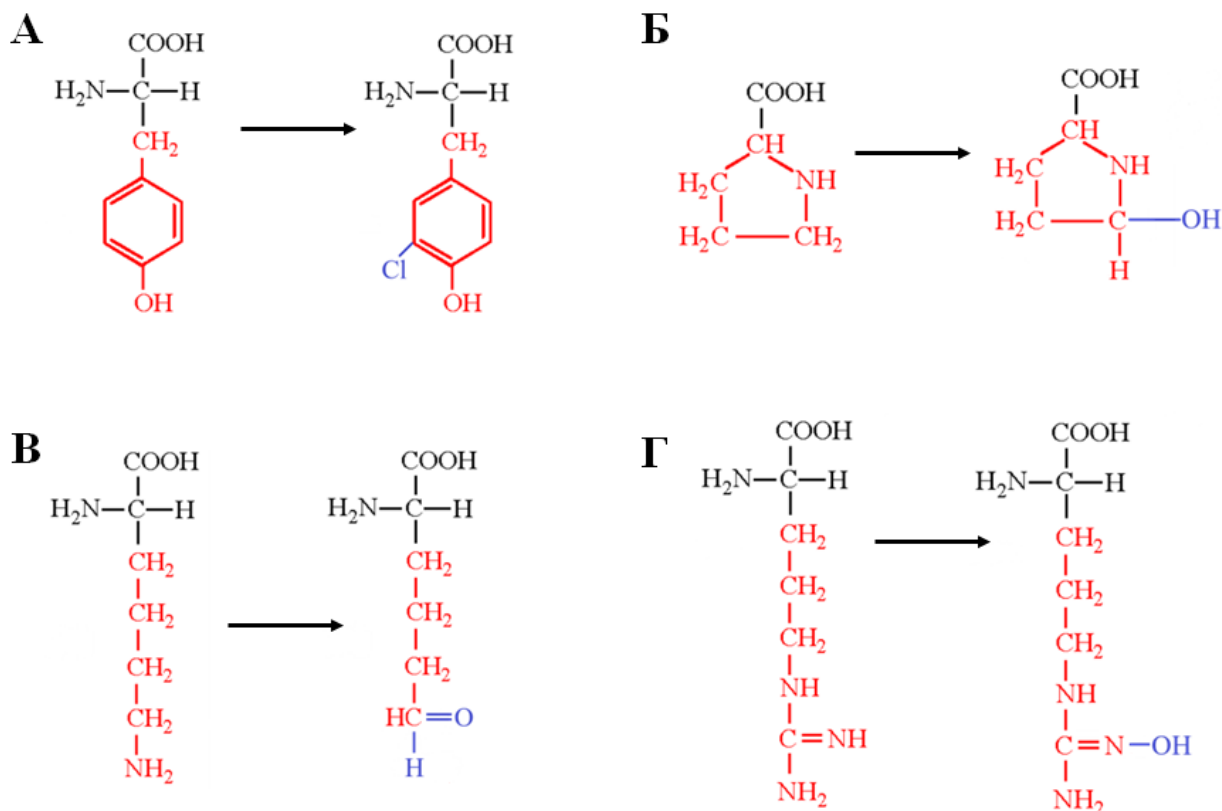


Рисунок 10 – Реакции окисления различных аминокислотных остатков при воздействии АФК. А – хлорирование тирозина в белке (+33.96) (+Cl). Б – окисление пролина до 5-гидроксипролина (+15.99) (+O). В – окисление лизина до аминокадипинового полуальдегида (-1.03) (-3H - N + O). Г – окисление аргинина до гидроксиаргинина (+15.99) (+O). Разработан автором

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе были использованы образцы донорской плазмы крови, предоставленные Московским центральным пунктом переливания крови. Средний возраст доноров плазмы составил 29 ± 11 (SD) лет. Все участники были здоровы и не имели в анамнезе заболеваний крови или воспалительных заболеваний/инфекций в течение последних 2 недель. Исследование проводили в соответствии с Декларацией этических принципов медицинских исследований с участием людей. В работе использовали реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) компании Amresco (США); маркер молекулярной массы белков Page Ruler™ Plus (от 10 до 250 кДа) и краситель кумасси R-250 - Thermo Fisher Scientific (США); дитиотреитол и йодацетамид - Merck (Дармштадт, Германия); трипсин (Gold) масс-спектрометрического качества – Promega (США). Все остальные химические реактивы имели чистоту не ниже аналитической. Все растворы готовили с использованием деионизованной воды Milli-Q.

2.2. Методы

2.2.1. Выделение фибриногена

Фибриноген получали из цитратной плазмы крови методом глицинового осаждения [123]. Плазму смешивали с глицином (из расчета 15,6 мг на 0,1 мл плазмы), инкубировали в течение 1 часа при $+4$ °С и осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин). Осадок растворяли в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) с добавлением 150 мМ NaCl, после чего процедуру высаливания повторяли еще дважды.

2.2.2. Выделение плазминогена

Плазминоген выделяли из плазмы методом аффинной хроматографии с использованием модифицированной лизином CNBr-Sepharose 4В (Amersham, Англия) при +4°C [124]. Для предотвращения протеолиза и инактивации металлопротеиназ во все буферы вносили ингибиторы: апротинин (5 КIU/мл) и ЭДТА (0,003 М). Плазму в объёме 340 мл разбавляли до 1 л фосфатным буфером (100 мМ рН7,4) и пропускали через колонку со скоростью 1,25 мл/мин для связывания ПГ с носителем. Затем колонку промывали фосфатным буфером (1,75 мл/мин) до оптической плотности элюата при 280 нм (OD_{280}) $\leq 0,01$. Элюцию плазминогена проводили 0,2 М ϵ -аминокапроновой кислотой в фосфатном буфере (рН 7,4) со скоростью 1,75 мл/мин. Полученный элюат концентрировали и переводили в рабочий буфер (50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, рН 7,4) с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra–0,5 мл (10 кДа, UFC501096, Merck, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Выделенный плазминоген в концентрации 7-8 мг/мл хранили в аликвотах при -20 °С.

2.2.3. Определение концентрации, выделенных белков

Определение концентрации выделенного белка проводили спектрофотометрическим методом по поглощению белка при $\lambda=280$ нм. Перед измерением белок разводили в 20 раз. Концентрацию рассчитывали по формуле Бугера-Ламберта-Берра:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l,$$

где А – оптическая плотность; ε – коэффициент экстинкции (равный 1,7 для раствора плазминогена 1 мг/мл); С – концентрация раствора; l – длина оптического пути.

2.2.4. Превращение плазминогена в плазмин и образование комплекса плазминоген-стрептокиназа

Превращение Glu-плазминогена в плазмин инициировали стрептокиназой (Behringwerke, Германия). Инкубацию проводили при +37 °С в течение 40 минут.

Для образования комплексов плазминоген-стрептокиназа белки смешивали в эквимольном соотношении и инкубировали 40 минут при +37 °С.

2.2.5. Окисление плазминогена

Окисление ПГ индуцировали гипохлоритом натрия (Sigma-Aldrich, Германия), либо перекисью водорода. ПГ (0,1 мг/мл) окисляли 25, 50 или 100 мкМ гипохлоритом натрия (NaOCl/OCl) в течение 2-х часов при +37 °С. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного молярного избытка L-метионина. Концентрации NaOCl/OCl стандартизировали при pH 11,0 по поглощению при 292 нм ($\epsilon=350 \text{ M}^{-1}\times\text{см}^{-1}$). Окисление ПГ в присутствии 100 или 300 мкМ H_2O_2 проводили в тех же условиях. L-метионин удаляли центрифугированием на фильтрах Amicon Ultra (0,5 мл, 10 кДа, Merck) согласно протоколу производителя.

2.2.6. Влияние окисления на ферментативную активность плазмина и комплекса плазминоген-стрептокиназа

Влияние окисления на ферментативную активность плазмина оценивали с помощью синтетического хромогенного субстрата S2251TM (Chromogenix, США). ПГ (100 мкл, 0,3 мг/мл), активированный стрептокиназой (СК), смешивали с 900 мкл реакционной смеси до 0,8 мМ S2251TM, 3,7% HSA, 40 мМ Трис-HCl (pH=7,4). Изменение поглощения при 405 нм оценивали каждые 60 с в течение 40 мин с использованием микропланшетного абсорбционного спектрофотометра xMark™ (BioRad, США). Эксперименты проводили в трех повторениях. Среднее значение активности плазмина, образованного из неокисленного плазминогена, принимали за 100%.

Методом SDS-PAGE (Лэммли) оценивали накопление продуктов деградации фибриногена при фибринолизе, опосредованном плазмином, либо комплексом плазминоген-стрептокиназа (ПГ-СК). Фибриноген (125 мкл, 2 мг/мл) смешивали с 15 мкл плазмينا или ПГ-СК (0,1 мг/мл) и инкубировали 90 минут при +37 °С. В конце добавляли 4× буфер для образцов (Лэммли), денатурировали белки (5 мин, +90°С) и проводили электрофорез. Белковые полосы проявляли красителем Кумасси R250.

2.2.7. Измерения методом динамического рассеяния света

Метод динамического рассеяния света применяли для измерения распределения размеров молекул ПГ, значения гидродинамического диаметра для которых (до и после окисления) измеряли с помощью Zetasizer Nano-S (Malvern, Англия). Предварительно из всех белковых растворов удаляли пыль методом ультрафильтрации.

2.2.8. Определение термодинамических параметров денатурации плазминогена при окислении

Окислительную модификацию плазминогена проводили путем инкубации белка с гипохлоритом натрия в различных концентрациях (3,0; 6,25; 12,5 и 25,0 мкмоль NaOCl/ OCl на 1 мг плазминогена) в течение одного часа при +37 °С. Для остановки реакции использовали десятикратный избыток L-метионина. Термодинамические параметры денатурации ПГ (3,0 мг/мл) определяли до и после окисления методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Объем исследуемого образца составлял 0,5 мл, измерения проводили в герметичной ячейке. Температурный диапазон сканирования — от +10 до +90 °С при постоянном давлении 2,5 МПа и скорости нагрева 1 °С/мин. Калибровку шкалы избыточной теплоёмкости проводили электрическим методом на основе эффекта Джоуля—Ленца. В качестве эталонного раствора использовали 50 мМ фосфатный буфер, содержащий 150 мМ NaCl, pH 7,4.

Температуры термодинамических переходов соответствовали максимумам на дифференциальной термограмме. Экспериментальную энтальпию денатурации определяли путем численного интегрирования кривой избыточной теплоёмкости по температуре. Температуры переходов и энтальпию денатурации рассчитывали с использованием программного обеспечения НАИРТА (ИНЭОС РАН). Молярную энтальпию денатурации (ΔH) пересчитывали в расчете на один моль плазминогена.

Для деконволюции термограмм использовали программу Peak Fit (AISN Software Incorporated, версия 4). Для каждого выявленного термодинамического перехода вычисляли термодинамические параметры [125].

2.2.9. Подготовка образцов и анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией

Восстановление дисульфидных связей в белке проводили с помощью 5 мМ дитиотреитола с последующей блокировкой свободных сульфгидрильных групп 10 мМ йодацетамидом. Трипсиновый протеолиз инициировали растворением образцов в 50 мМ трис-HCl буфере, 0,15 М NaCl (pH 8,0), в соотношении 2 мкг фермента на 100 мкг ПГ. и инкубировали 16 часов при +37 °C. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до 0,1%.

Трипсиновые гидролизаты анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на системе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), совмещённой с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Германия). Пептидные фракции разделяли на колонке C18 (75 мкм × 12 см, Reprosil-Pur Basic C18, 3 мкм; Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия) [126]. Подвижная фаза состояла из смеси 0,1% муравьиной кислоты в воде (раствор А) и ацетонитрила (раствор Б). Элюирование проводили в линейном градиенте: долю раствора Б увеличивали с 3% до 50% в течение 60 минут. Напряжение на источнике ионов составляло 2,3 кВ.

Масс-спектрометрический (МС) анализ проводили в режиме автоматического сбора данных с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Electron, Германия). На первом этапе определяли точные массы пептидов в диапазоне $m/z = 300\text{--}1600$ с разрешением 50 000 при $m/z = 400$ (целевое количество ионов в ячейке ионно-циклотронного резонанса — 5×10^6). Затем пять наиболее интенсивных ионов последовательно изолировали для фрагментации методом столкновительной диссоциации (Collision-induced dissociation, CID) и регистрировали спектры в линейной ионной ловушке (целевое количество ионов — 3×10^4). После фрагментации соответствующие массы исключались из повторного анализа на 30 секунд [126].

Для обеспечения статистической достоверности и оценки воспроизводимости каждый тип образца анализировали в трех независимых биологических повторностях. Каждый из независимых биологических образцов был проанализирован в трех технических повторях.

2.2.10. Анализ результатов высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией

Идентификацию триптических пептидов плазминогена осуществляли с помощью программы PEAKS Studio (версия 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Канада), путем поиска по базе данных UniProtKB (UP000005640–9606, Homo sapiens). В параметрах алгоритма задавали специфичность трипсина с допущением одного неспецифического расщепления. Точность измерения массы иона-предшественника составляла 15 ppm, а для фрагментов MS/MS — 0,05 Да. Уровень ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) для пептидов не превышал 0,1%.

При анализе модификаций допускали наличие до трех возможных переменных посттрансляционных модификаций (ПТМ) на один пептид согласно ранее опубликованным рекомендациям [127, 128, 129]. Степень окислительной модификации (%) каждого аминокислотного остатка рассчитывали как отношение площади пика окисленного пептида к суммарной площади всех форм (окисленных

и нативных), содержащих данный остаток. Аминокислоту считали модифицированной при условии увеличения уровня её окисления не менее чем на 1% относительно контрольной группы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена

Активность плазмина, образованного из нативного плазминогена, была принята за 100% (Рисунки 11 и 12). Обработка плазминогена 25 мкМ гипохлорита натрия или 100 мкМ перекиси водорода оказывала минимальное влияние на активность образовавшегося плазмина, которая составляла $97,08 \pm 7,26 \%$ и $92,17 \pm 7,60 \%$, соответственно. Окисление образцов 300 мкМ H_2O_2 снижало активность плазмина более существенно, до $77,91 \pm 6,82 \%$. Ещё более выраженным эффект оказался при окислении плазминогена 50 мкМ и 100 мкМ гипохлоритом натрия со снижением активности плазмина до $64,29 \pm 4,91\%$ и $30,69 \pm 3,05\%$, соответственно.

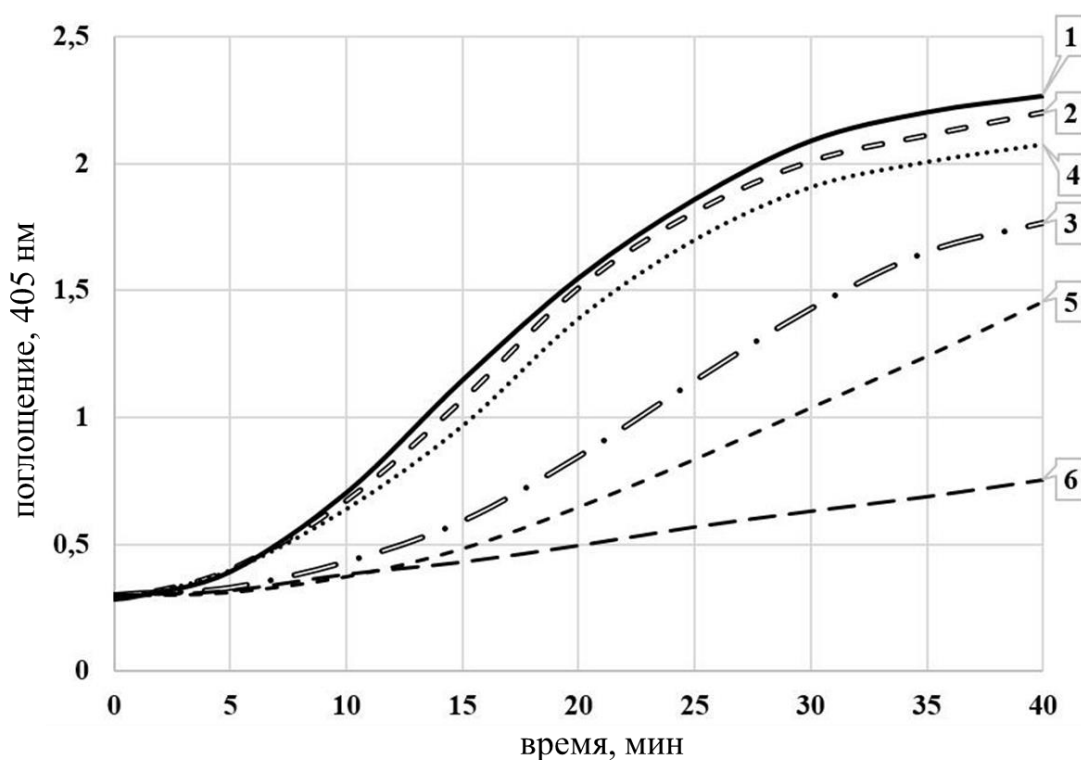


Рисунок 11 – Сравнение амидолитической активности плазмина, образующегося из нативного ПГ (кривая 1) и ПГ, обработанного окислителями: 2 – 100 мкМ H_2O_2 , 3 – 300 мкМ H_2O_2 , 4, 5 и 6 – 25, 50 и 100 мкМ NaOCl/OCl , соответственно [130]

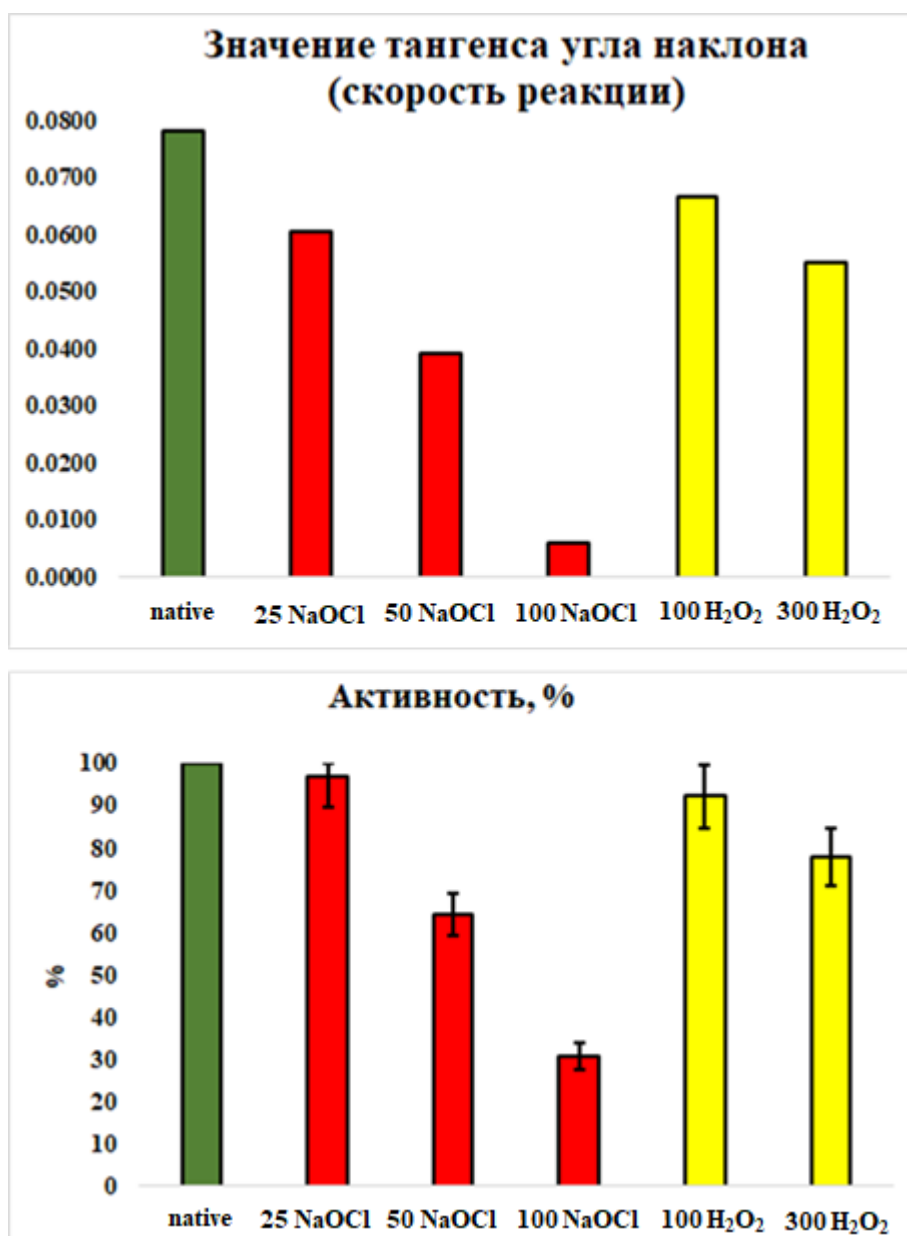


Рисунок 12 – Анализ кривых амидолитической активности плазмина, образованного из нативного и окисленного разными концентрациями окислителей плазминогена. Разработан автором

Гидролиз фибриногена опосредованный плазмином приводил к накоплению продуктов деградации фибриногена, фрагментов X, Y, D и E. Окисление плазминогена минимальными концентрациями окислителей (25 мкМ NaOCl и 100 мкМ H₂O₂) незначительно влияло на их накопление (Рисунок 13, дорожки 8 и 5), по сравнению с контрольным неокисленным образцом (дорожка 3). Однако при увеличении концентрации окислителей (дорожки 4, 6 и 7) становилось заметным уменьшение количества продуктов поздней деградации фибриногена (фрагментов

D и E) и увеличение доли продуктов ранней деградации (фрагментов X и Y), что отражало снижение активности плазмина. Кроме того, при высоких концентрациях окислителей сохранялось больше нативного фибриногена (Рисунок 14).

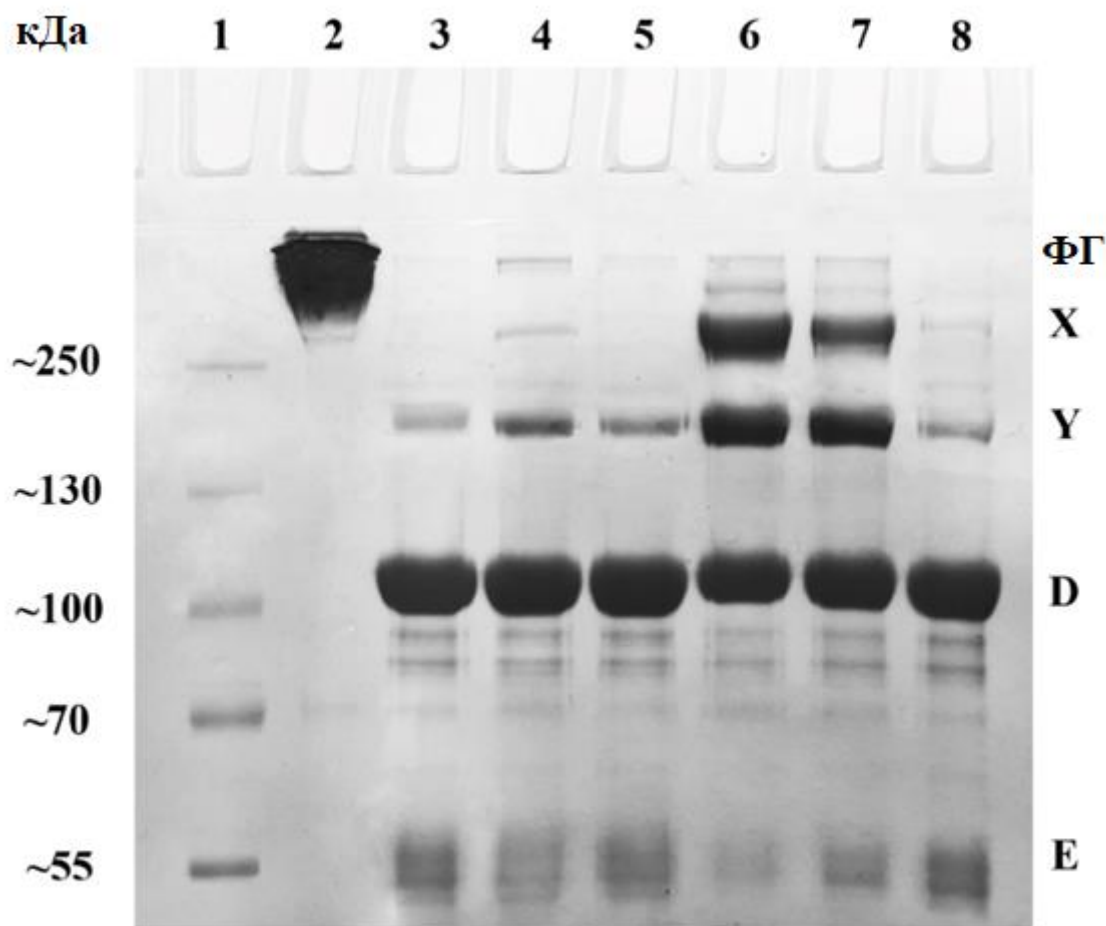


Рисунок 13 – Результаты SDS-PAGE продуктов деградации фибриногена (5 % концентрирующий гель, 8 % разделяющий гель) в реакции с плазмином, полученным из нативного и окисленного ПГ. Дорожка 1 – маркерные белки; 2 – нативный фибриноген; 3–8 – продукты деградации фибриногена плазмином образованном из: нативного ПГ (3) и ПГ, обработанного 300 и 100 мкМ H_2O_2 (4 и 5), либо 100, 50 и 25 мкМ $NaOCl/OCl$ (6–8), соответственно [130]

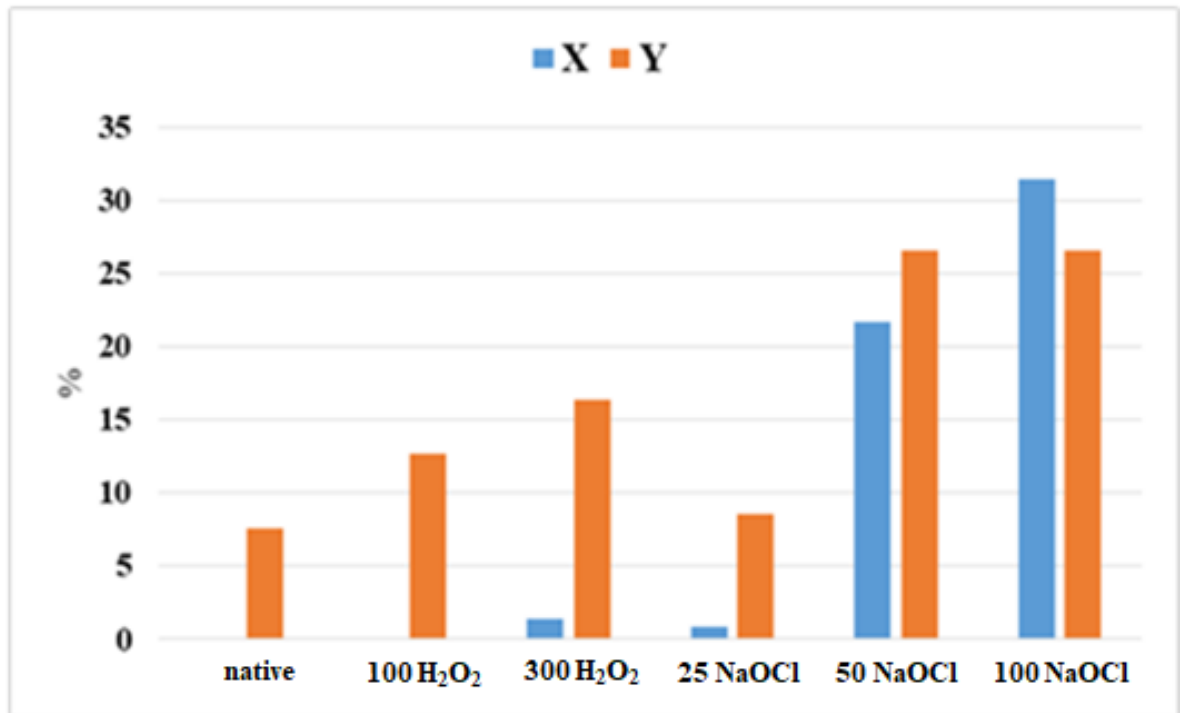
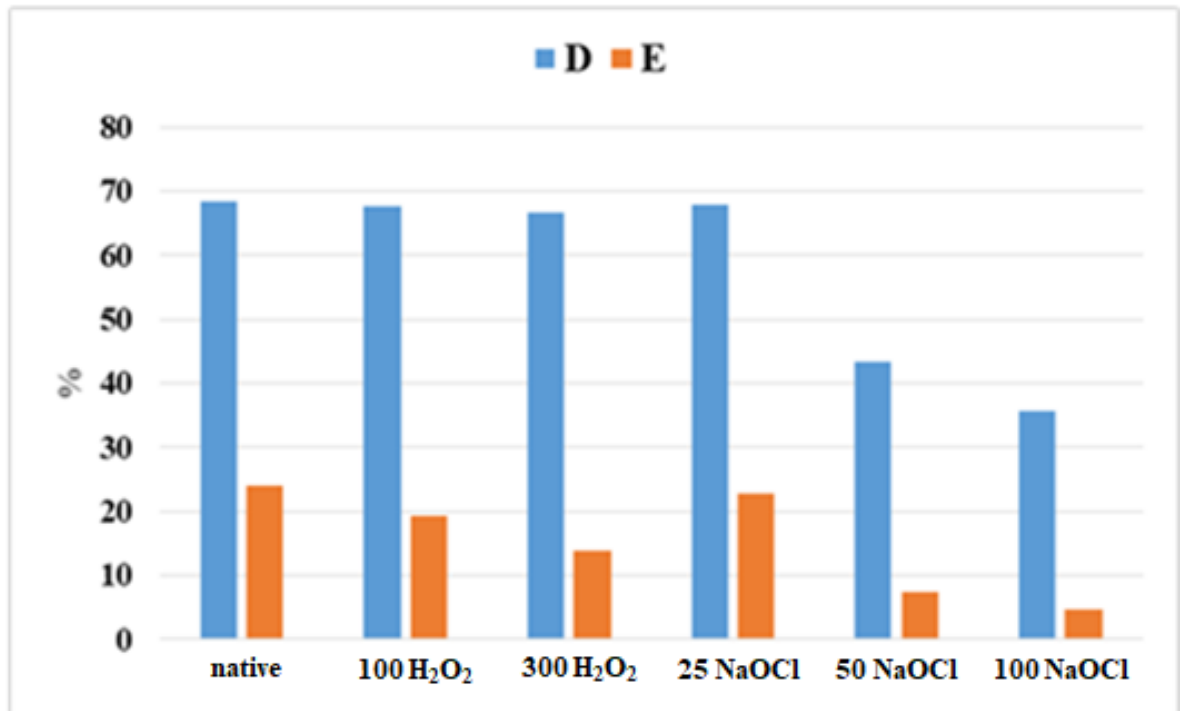
А**Б**

Рисунок 14 – Анализ накопления продуктов деградации фибриногена под воздействием плазмина, образованного из окисленного плазминогена (ImageJ 1.54g). При увеличении концентрации окислителей. **А:** увеличивается содержание фрагментов X (0 % - 31,4 % для NaOCl или 0 % - 1,3 % для H₂O₂) и Y (7,6 % - 26,6 % для NaOCl или 7,6 % - 16,3 % для H₂O₂). **Б:** уменьшается содержание фрагментов D (68,3 % - 35,5 % для NaOCl или 68,3 % - 66,7 % для H₂O₂) и E (24,1 % - 4,7 % для NaOCl или 24,1 % - 13,9 % для H₂O₂). Разработан автором

3.2. Масс-спектрометрический анализ окислительных модификаций плазминогена

Масс-спектрометрический анализ выявил увеличение содержания (площади пиков) окисленных пептидов и уменьшение содержания неокисленных пептидов для плазминогена после воздействия окислителями. Анализ показал, что в окислительную модификацию было вовлечено до 22 аминокислотных остатков.

В контрольном образце только Met182 и Met404 подвергались окислительной модификации до сульфоксида метионина (Таблица 2). После обработки ПГ 25 мкМ NaOCl/OCl число окисленных остатков возросло до 5-ти метионинов (Met57, Met182, Met385, Met404, Met788) и 1-го триптофана (Trp523). При увеличении концентрации окислителя до 50 мкМ в окислительную модификацию вовлекались некоторые аминокислотные остатки тирозина (Tyr80, Tyr397, Tyr672), а также дополнительные остатки метионина и триптофана; ещё дополнительные остатки триптофана и тирозина модифицировались при 100 мкМ окислителе (Таблица 2). Степень окисления обнаруженных аминокислотных остатков возрастала при увеличении концентрации гипохлорита натрия (Рисунок 15).

При взаимодействии ПГ со 100 мкМ H₂O₂ в окисление вовлеклось 6 остатков метионина и 5 – триптофана. Повышение концентрации перекиси до 300 мкМ привело к модификации всего двух дополнительных остатков, однако у остальных возросла степень окисления (Рисунок 16).

Среди типов модификаций наиболее часто встречались окисление метионина до сульфоксида метионина, триптофана – до кинуренинина или оксолактона, а также хлорирование тирозина (Таблица 2).

Наибольшее количество модифицированных остатков при окислении гипохлоритом натрия было выявлено в SP домене ПГ. Во 2 и 4 крингл-доменах было детектировано по 4 модифицированных остатка. Однако степень окисления остатков в KR4 была в среднем выше, чем в KR2 и SP. Наименее окисленным оказался KR3, в котором при обработке 100 мкМ окислителя был детектирован 1 модифицированный остаток с уровнем модификации 5,3% (Рисунок 17).

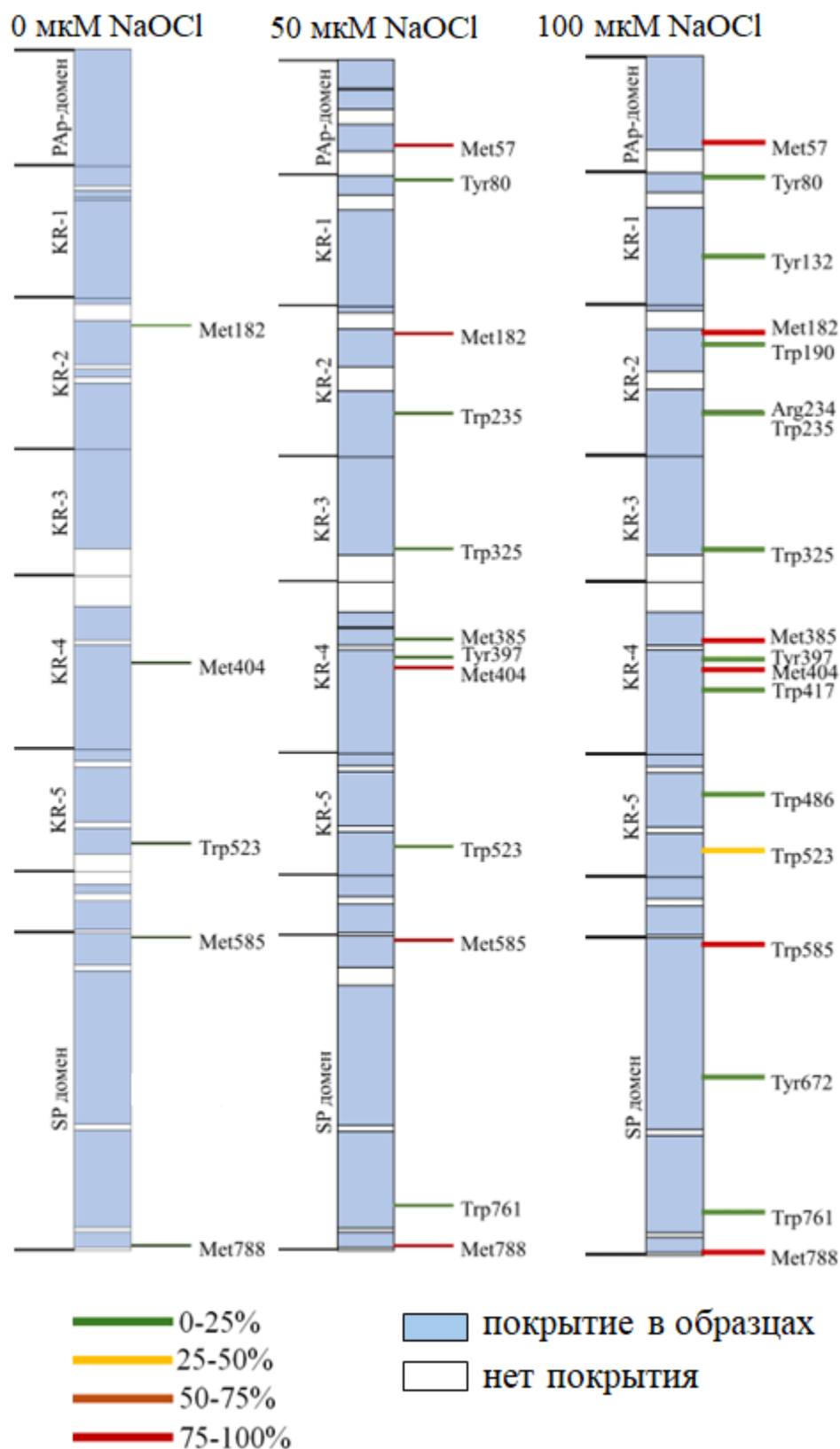


Рисунок 15 – Схематическое изображение детектированных участков аминокислотной последовательности молекулы плазминогена с нанесенными сайтами модификаций при окислении разными концентрациями NaOCl/-OCl. Разработан автором

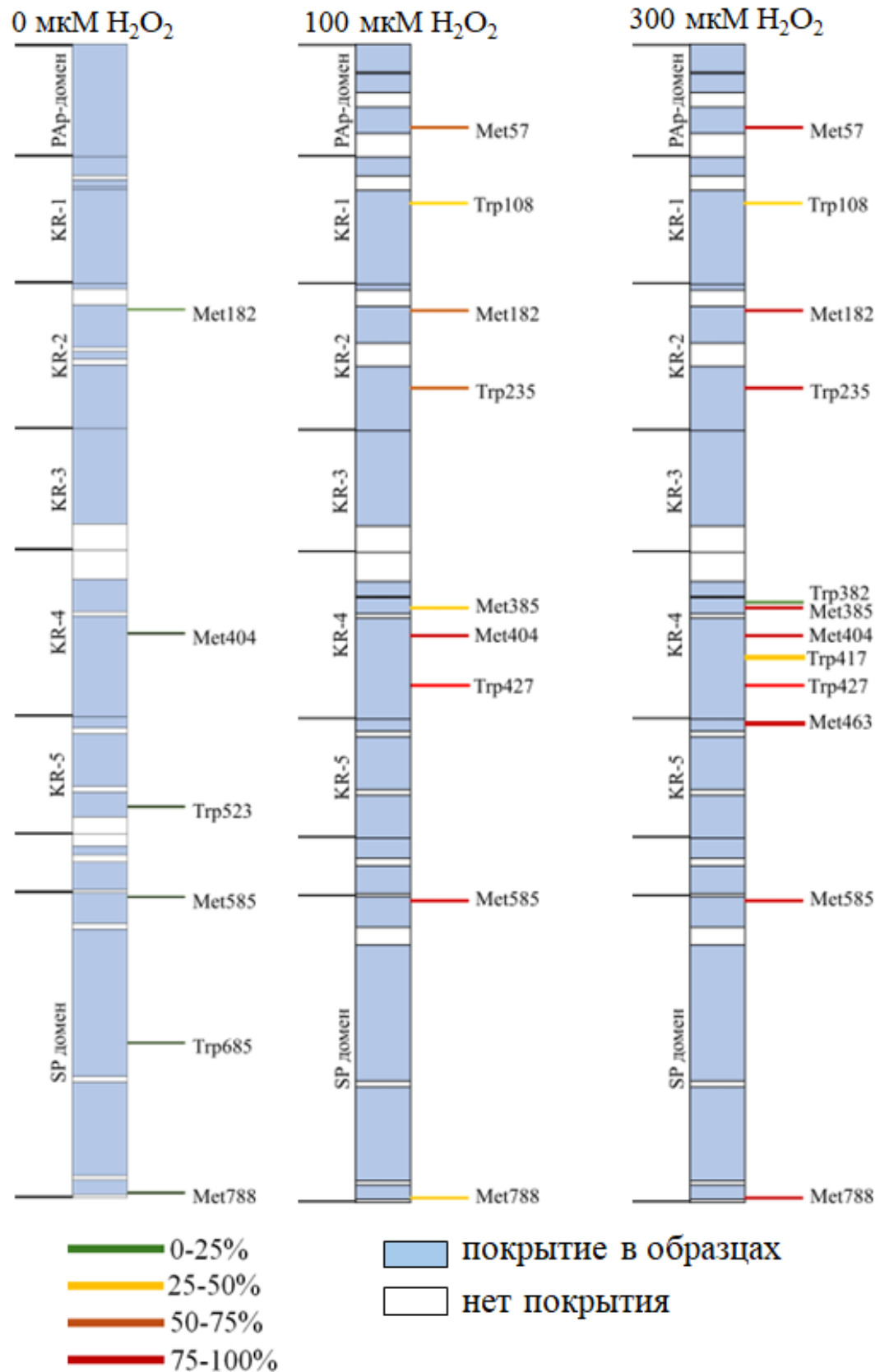


Рисунок 16 – Схематическое изображение детектированных участков аминокислотной последовательности молекулы плазминогена с нанесенными сайтами модификаций при окислении разными концентрациями H_2O_2 . Разработан автором

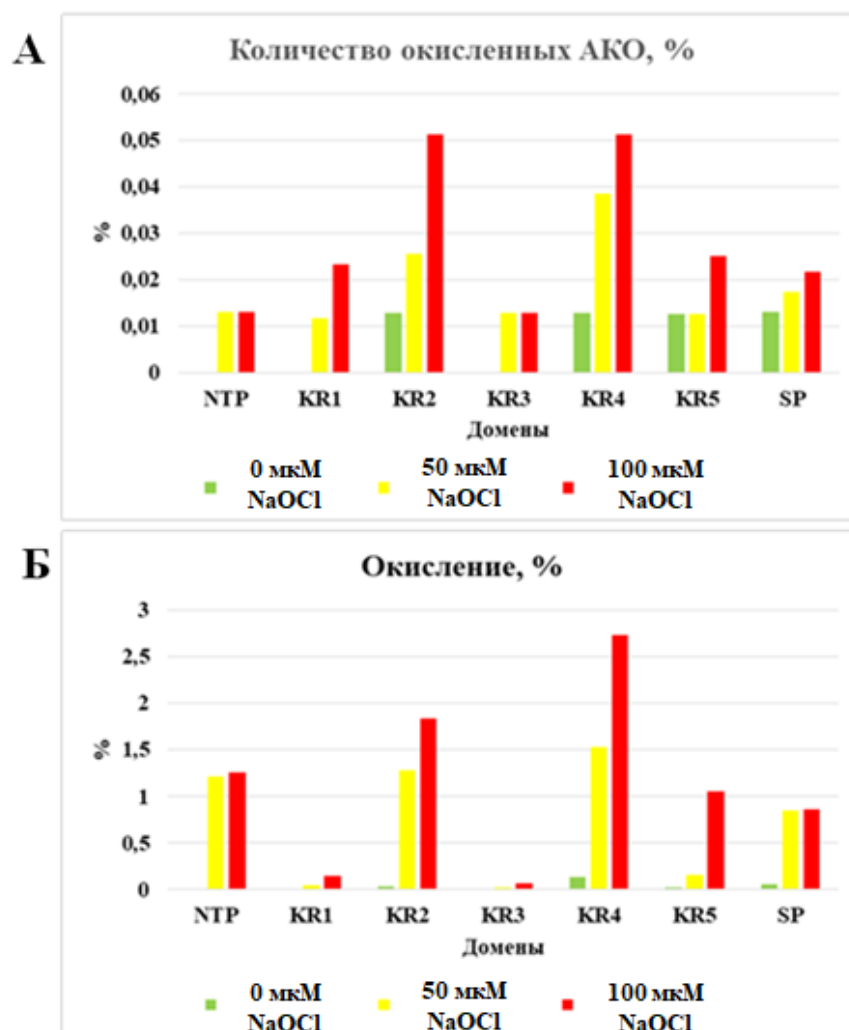


Рисунок 17 – Данные об окислительных модификациях, возникающих в молекуле плазминогена при окислении NaOCl/OCI. А: распределение окисленных аминокислотных остатков молекулы плазминогена, по доменам. Б: общая степень окисления структурных доменов NTP, KR1-KR5, SP-домена плазминогена. Разработан автором

При окислении H_2O_2 наибольшее количество модифицированных аминокислотных остатков было выявлено в доменах SP и KR4; второй оказался наиболее окисленным. В домене KR3 не было обнаружено окисленных остатков.

Таблица 2 – Тип и степень модификации аминокислотных остатков в первичной структуре плазминогена [130]

АО	Тип модификации	0 мкМ	NaOCl/OCI			H ₂ O ₂	
			25 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	100 мкМ	300 мкМ
Met57	Окисление	0	22±5,5	97±2,1	100±1	69±7	88±3,2
Tyr80	Хлорирование	0	0	9±2	25±6,1	0	0
Trp108	Окисление до оксииндоаланина	0	0	0	2±0,5	21±2,2	23±3

	Карбоксилирование	0	0	0	0	6±2,4	4±0,5
Met182	Окисление	3±1,1	20±6	100±3,2	100±1	61±13,5	96±2,6
Trp190	Окисление до оксииндоаланина	0	0	16±4,3	21±2	0	0
Trp235	Окисление до оксииндоаланина	0	0	18±3,3	20±3	10±2,5	15±2
	Окисление до оксолактона	0	0	0	11±4	0	0
	Окисление до формилкинурины	0	0	6±2	3±2	58±5,8	74±7
Tyr304	Хлорирование	0	0	0	2±0,5	0	0
Trp325	Окисление до оксииндоаланина	0	0	4±0,6	5±2	0	0
Trp382	Окисление до формилкинурины	0	0	0	0	0	6
Met385	Окисление	0	13±0,7	56±4,7	100±0,5	42±11	87±7
Tyr397	Хлорирование	0	0	3±0,5	8±2	0	0
Met404	Окисление	10±0,8	14±2,2	99±4	100±0,3	84±1	99±2
Trp417	Окисление до оксииндоаланина	0	0	6±2	6±1	0	34±4
Trp427	Окисление до оксииндоаланина	0	0	0	0	56±14,7	70±6,2
Met463	Окисление	0	0	0	0	0	100±1
Trp486	Окисление до оксииндоаланина	0	0	4±2,2	11±3,1	0	0
Trp523	Окисление до оксииндоаланина	0	10±2	66±4	81±1	0	0
Met585	Окисление	0	0	84±3	100±0,3	96±4,9	100±1
Tyr672	Хлорирование	0	0	3±0,5	3±0,5	0	0
Trp685	Окисление до оксииндоаланина	0	0	1±0,2	13±3,2	0	0
	Окисление до кинурины	0	0	3±1	14±2	0	0
	Окисление до формилкинурины	0	0	0	37±4,2	0	0
Trp761	Окисление до оксииндоаланина	0	0	5±2,2	17±2	0	0
	Окисление до оксолактона	0	0	2±2,8	16±1	0	0
	Окисление до формилкинурины	0	0	0	3±1	0	0
Met788	Окисление	0	6±2,1	99±0,3	99±0,7	32±6	86±1

3.3. Динамическое рассеяние света

Данные динамического рассеяния света показали, что распределение размеров нативного и окисленного ПГ является унимодальным (Рисунок 18). Средний размер молекулы нативного ПГ составил $7,53 \pm 0,32$ нм, но при окислении

он уменьшался до $5,89 \pm 0,28$ нм, $5,30 \pm 0,29$ нм и $4,95 \pm 0,32$ нм (для 25, 50 и 100 мкМ NaOCl/-OCl, соответственно) и до $6,50 \pm 0,27$ нм и $5,62 \pm 0,29$ нм (для 100 и 300 мкМ H₂O₂, соответственно).

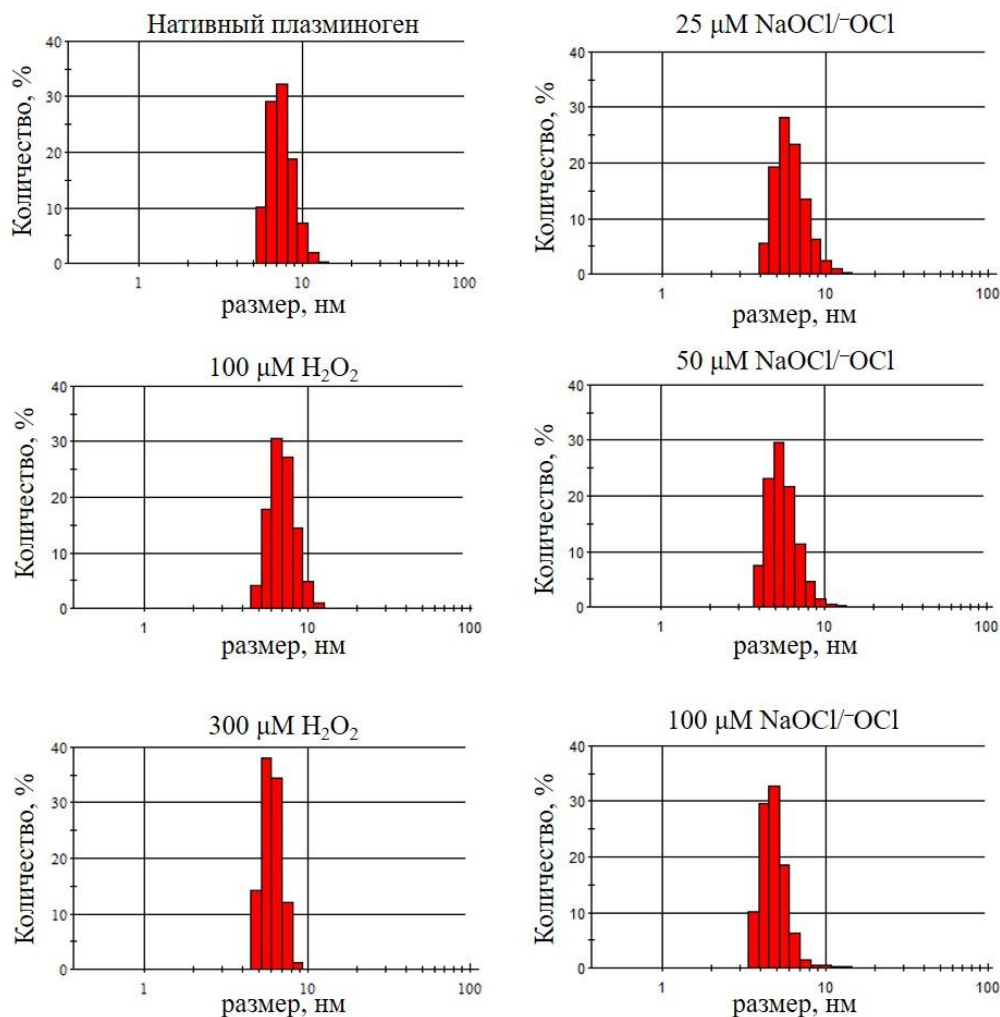


Рисунок 18 – Распределение размеров молекул нативного и окисленного плазминогена [130]

3.4. Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии

На Рисунке 19 представлены ДСК-термограммы, а в Таблице 3 приведены термодинамические параметры денатурации нативного ПГ и окисленного гипохлоритом натрия ПГ.

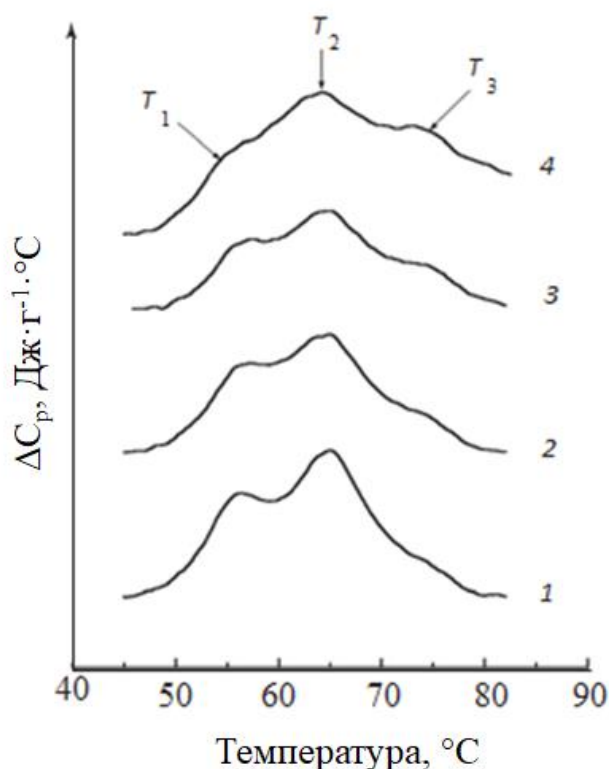


Рисунок 19 – ДСК-Термограммы денатурации контрольного образца ПГ (1) и образцов, обработанных гипохлоритом натрия в концентрациях: 6,25 мкМ (2), 12,5 мкМ (3), 25,0 мкМ (4). Анализ проведён в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), 150 мМ NaCl, при концентрации ПГ 3 мг/мл. T_1 , T_2 , T_3 – температуры денатурации переходов [125]

Таблица 3 – Термодинамические параметры денатурации контрольного и обработанных NaOCl образцов плазминогена [125]

Концентрация окислителя, мкМ	ΔH , кДж/Моль	T_1 , °C	T_2 , °C	T_3 , °C
0	$1,48 \pm 0.13$	56,8	65,0	75,0
6,25	$1,25 \pm 0.13$	56,5	64,4	74,2
12,5	$1,02 \pm 0.11$	56,4	64,2	73,4
25,0	$0,78 \pm 0.13$	56,2	63,7	73,1

На термограммах денатурации плазминогена (Рисунок 20) можно выделить три характерных температурных перехода: первый — при +56–+58 °C, второй — около +65 °C, и третий — в районе +74 °C. Первый, низкотемпературный, переход (пик T_1) связан с плавлением крингл-доменов KR1–KR3, второй (пик T_2) — с плавлением доменов KR4–KR5 и NTP, а высокотемпературный (пик T_3) — с тепловой денатурацией SP-домена [125].

При обработке ПГ гипохлоритом натрия наблюдается снижение общей

молярной энтальпии денатурации. Температура первого перехода с ростом концентрации окислителя незначительно понижается, тогда как температуры второго и третьего переходов снижаются сильнее.

Хотя температура низкотемпературного перехода практически не изменяется при увеличении концентрации гипохлорита, доля его молярной энтальпии в общей энтальпии денатурации снижается (Таблица 4).

Для второго перехода наблюдается снижение как температуры, так и доли молярной энтальпии по сравнению с контрольным образцом (Таблица 4).

Температура третьего перехода при окислении существенно снижается, однако доля его молярной энтальпии в общей энтальпии денатурации возрастает. При этом значение энтальпии денатурации для этого перехода незначительно уменьшается при концентрации гипохлорита натрия 6,25 мкМ по сравнению с контролем, а дальнейшее повышение концентрации окислителя не оказывает существенного влияния на этот параметр (Таблица 4).

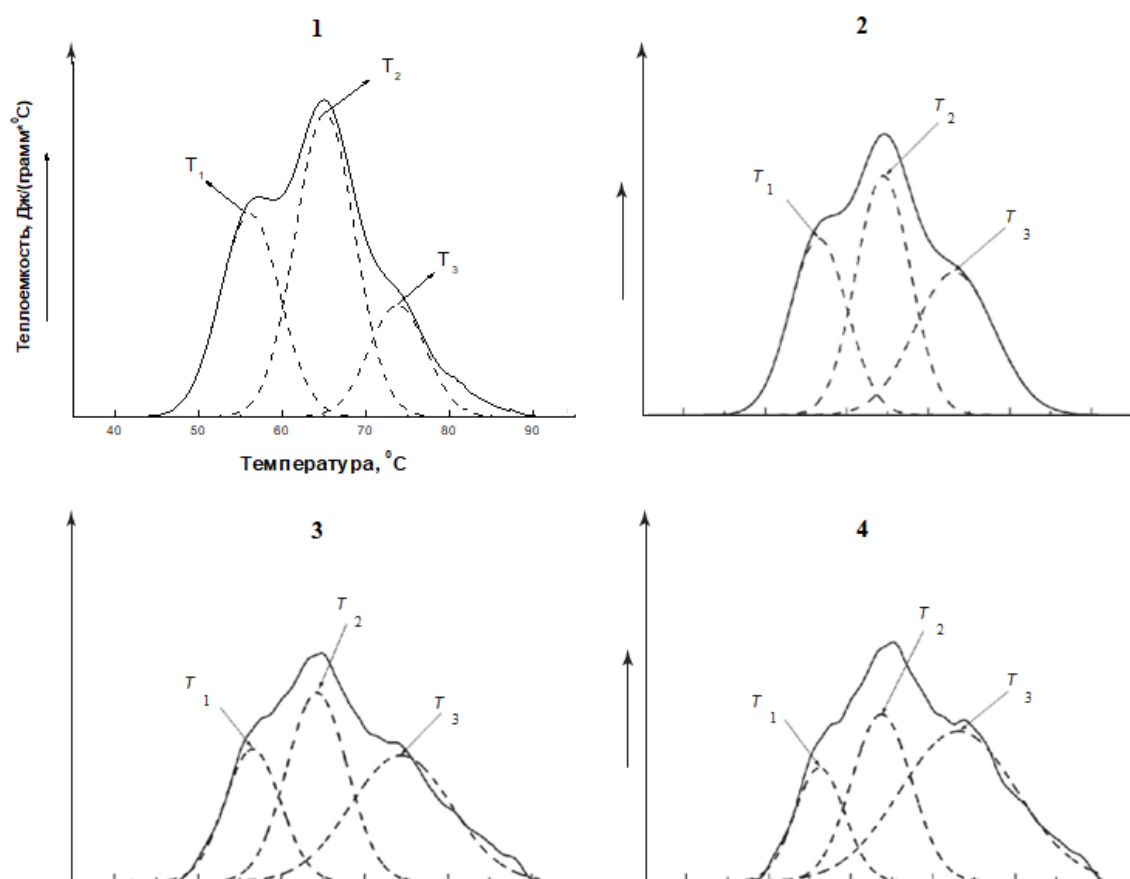


Рисунок 20 – Деконволюция ДСК-термограмм денатурации. 1. контрольного образца плазминогена и в присутствии гипохлорита натрия при разных

концентрациях: 2. 6,25 мкМ; 3. 12,5 мкМ; 4. 25,0 мкМ на 1 мг белка. Сплошная линия – экспериментальная ДСК-термограммы, пунктирная – результат деконволюции ДСК-термограмм, где T₁, T₂ и T₃ соответствуют температурным переходам [125]

Таблица 4 – Результаты деконволюции термограмм денатурации контрольного образца плазминогена и образцов, обработанных NaOCl/–OCl [125]

Концентрация окислителя, мкМ	Низкотемпературный переход			Второй температурный переход			Высокотемпературный переход		
	T ₁ , °C	α ₁ , %	ΔH ₁ , кДж/М	T ₂ , °C	α ₂ , %	ΔH ₂ , кДж/М	T ₃ , °C	α ₃ , %	ΔH ₃ , кДж/М
0	56.8	32.0	0.46	65.0	46.6	0.69	75.0	21.4	0.33
6,25	56.5	31.3	0.40	64.4	45.7	0.57	74.2	23.0	0.30
12,5	56.4	28.5	0.29	64.2	44.4	0.45	73.4	27.1	0.28
25,0	56.2	23.1	0.19	63.7	41.3	0.32	73.1	35.6	0.27

При окислении плазминогена нарушается конформация NTP, а также KR1-KR5. В то же время SP-домен, проявляет большую устойчивость к окислению.

3.5. Активность комплекса плазминогена со стрептокиназой при окислении

При гидролизе фибриногена комплексом ПГ-СК происходит накопление продуктов деградации фибриногена – фрагментов X, Y, D и E. Электрофоретический анализ показал, что окисление комплекса ПГ-СК гипохлоритом натрия (NaOCl/–OCl) в низких концентрациях (25 и 50 мкМ; Рисунок 21, дорожки 5 и 6) практически не влияет на накопление продуктов деградации фибриногена по сравнению с контролем (дорожка 4).

Однако при повышении концентрации окислителя до 100 мкМ наблюдается снижение активности комплекса ПГ-СК. Это выражается в уменьшении накопления поздних продукта деградации фибриногена (фрагмента D и E) при одновременном росте пула ранних продуктов деградации – фрагментов X и Y (Рисунок 22).

Максимальная протеолитическая активность наблюдается у комплекса ПГ-СК, не подверженному последующей двухчасовой инкубации (дорожка 3), что указывает на слабовыраженный процесс автокатализа белковых молекул.

Эти наблюдения согласуются с ранее полученными данными о гидролизе фибриногена плазмином, который был получен из окисленного предшественника – плазминогена [130].

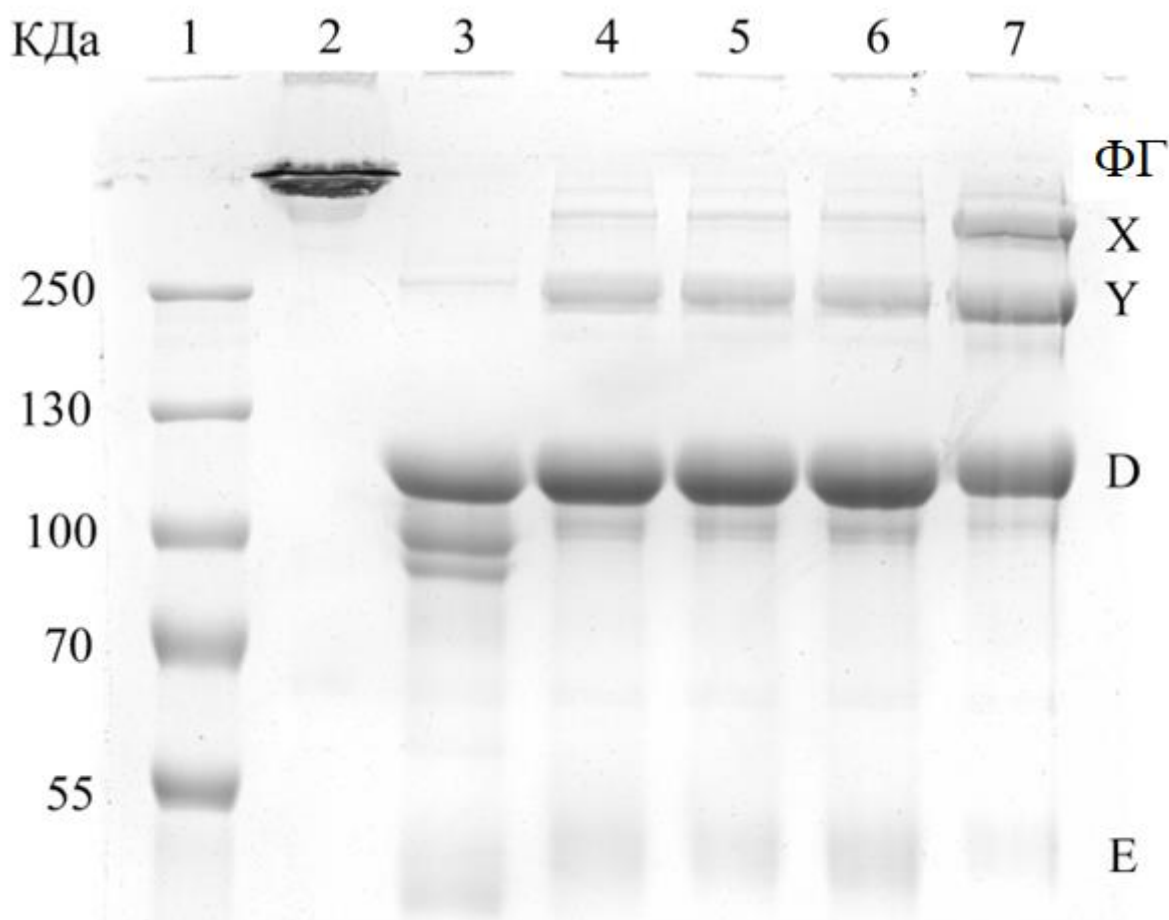


Рисунок 21 – Результаты SDS-ПААГ продуктов деградации фибриногена (5% концентрирующий гель, 8% разделяющий гель), полученных под воздействием нативного и окисленного комплекса ПГ-СК: дорожка 1 – маркерные белки; 2 – нативный фибриноген; 3 – продукты деградации фибриногена, продуцируемые только что активированным комплексом ПГ-СК; 4-7 – продукты деградации фибриногена, продуцируемые комплексом ПГ-СК, окисленным 0, 25, 50 и 100 мкМ NaOCl/-OCl [131]

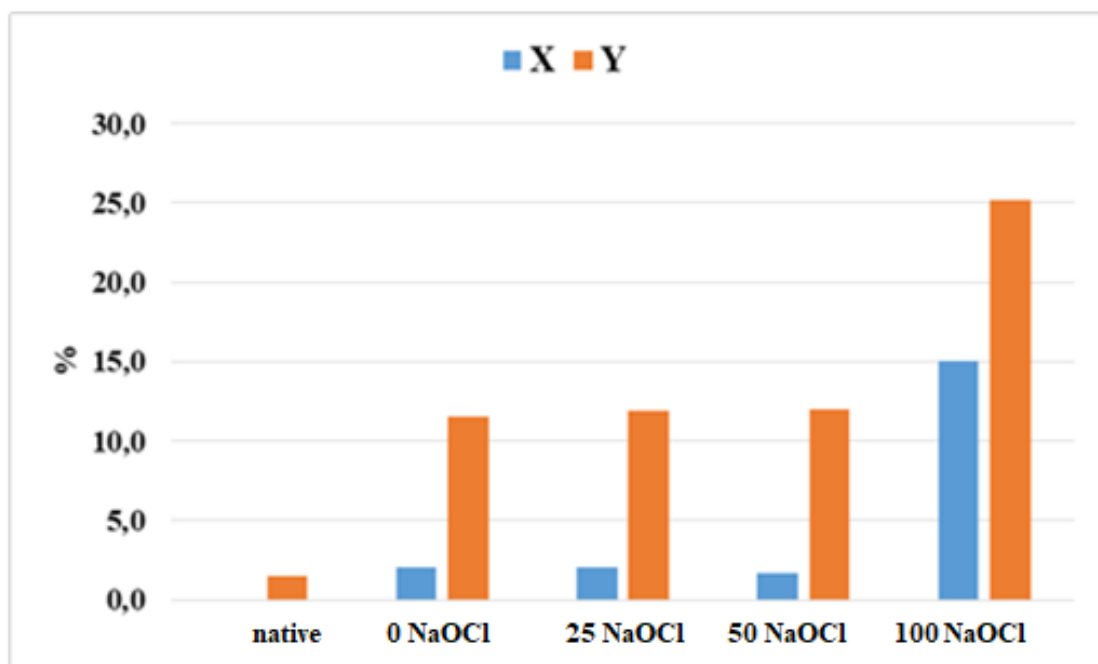
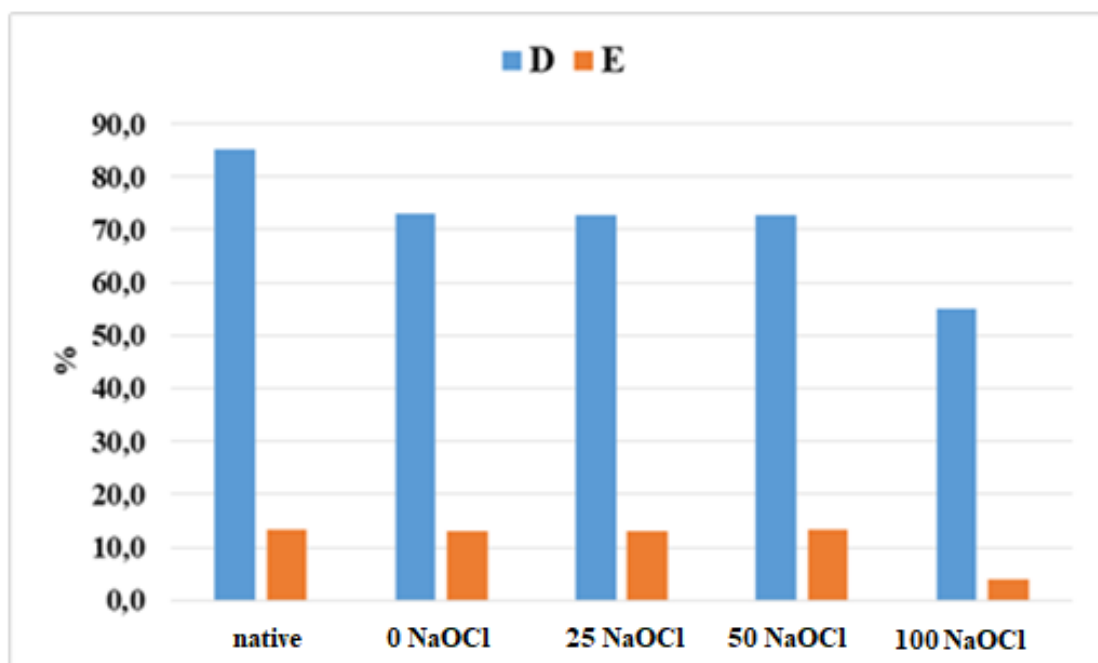
А**Б**

Рисунок 22 – Анализ накопления продуктов деградации фибриногена под воздействием, окисленного NaOCl/·OCl комплекса ПГ-СК (ImageJ 1.54g). При увеличении концентрации окислителей. **А:** увеличивается содержание фрагментов X (0 % – 15,1 %) и Y (1,5 % – 25,2 %). **Б:** уменьшается содержание фрагментов D (85,2 % – 55,2 %) и E (13,3 % – 4,1 %). Разработан автором

3.6. Масс-спектрометрический анализ плазминогена в комплексе со стрептокиназой

Методом ВЭЖХ-МС/МС были исследованы образцы нативного и окисленного плазминогена в комплексе со стрептокиназой. В неокисленном (контрольном) комплексе ПГ-СК были выявлены модифицированные остатки метионина (Met57, Met182, Met404, Met585, Met788) и триптофана (Trp523, Trp685): уровень модификации Met57 оказался самым высоким и составил около 70%, остальные метионины были окислены на уровне ~10% (каждый); уровень окисления остатков триптофана был совсем незначительным (Таблица 5).

В результате воздействия 50 мкМ NaOCl/-OCl в комплексе ПГ-СК были выявлены модифицированные остатки метионина (Met57, Met182, Met385, Met404, Met585, Met788), триптофана (Trp325, Trp523, Trp685, Trp761) и тирозина (Tyr80, Tyr397). Наиболее распространёнными вариантами модификаций оказались образование метионин-сульфоксида (+15.99) и хлорированного тирозина (+33.96). Для триптофана чаще идентифицировались окисление до оксолактона (+13.98), диоксииндоаланина (+31.99) и оксииндоаланина (+15.99) (Таблица 5).

При 100 мкМ NaOCl/-OCl степень модификации остатков увеличивалась, а также появлялись новые формы окисления среди уже затронутых остатков и новые модификации: окисление лизина (Lys78) до аминокетонального альдегида (-1.03), хлорирование тирозина (Tyr132, Tyr304 и Tyr672), окисление (+15.99) пролина (Pro224) и аспарагиновой кислоты (Asp485).

Наибольшее количество модифицированных остатков было детектировано преимущественно в SP-доме и, в меньшей степени, в KR2 доме; уровень окисления KR3 был наименьшим (Рисунки 23 и 24).

Таблица 5 – Типы и уровни модификаций аминокислотных остатков в комплексе ПГ-СК [131]

АО	Тип модификации	NaOCl/OCI		
		0 кММ	50 кММ	100 кММ
Met57	Окисление	70 ±3	100 ±2,8	100 ±2
Lys78	Окисление до аминокислотного альдегида	0	0	6 ±0,5
Tyr80	Хлорирование	0	16 ±3	25 ±2
Tyr132	Хлорирование	0	0	1 ±0,5
Met182	Окисление	4 ±1	98 ±7,3	100 ±5,9
Trp190	Окисление до оксииндоаланина	0	0	7 ±1,4
Pro224	Окисление	0	0	17 ±2
Arg234	Окисление	0	0	1 ±0,1
Trp235	Окисление до оксолактона	0	0	11 ±0,7
	Окисление до оксииндоаланина	0	4 ±1	20 ±3,4
	Окисление до диоксииндоаланина	0	0	3 ±0,7
Tyr304	Хлорирование	0	0	2 ±0,3
Trp325	Окисление до оксииндоаланина	0	2 ±1	4 ±0,8
Met385	Окисление	0	12 ±2,8	12 ±2
Tyr397	Хлорирование	0	1 ±1	3 ±0,7
Met404	Окисление	12 ±3,1	97 ±4,9	100 ±8
Trp417	Окисление до оксииндоаланина	0	0	1 ±0,4
Asp485	Окисление	0	0	3 ±1
Trp486	Окисление до оксииндоаланина	0	0	5 ±1
Trp523	Окисление до оксииндоаланина	1 ±0,2	8 ±2	81 ±3,6
Met585	Окисление	8 ±2,1	100 ±5,5	100 ±5,2
Tyr672	Хлорирование	0	0	2 ±1
Trp685	Окисление до оксииндоаланина	0	11 ±1	13 ±1,4
	Окисление до кинуренина	1 ±1	2 ±0,2	1 ±0,1
	Окисление до диоксииндоаланина	0	21 ±3	37 ±3,2
Trp761	Окисление до оксолактона	0	2 ±0,5	16 ±1
	Окисление до оксииндоаланина	0	4 ±1,6	17 ±2,2
	Окисление до диоксииндоаланина	0	0	3 ±0,9
Met788	Окисление	5 ±1,1	97 ±5,2	99 ±6,4

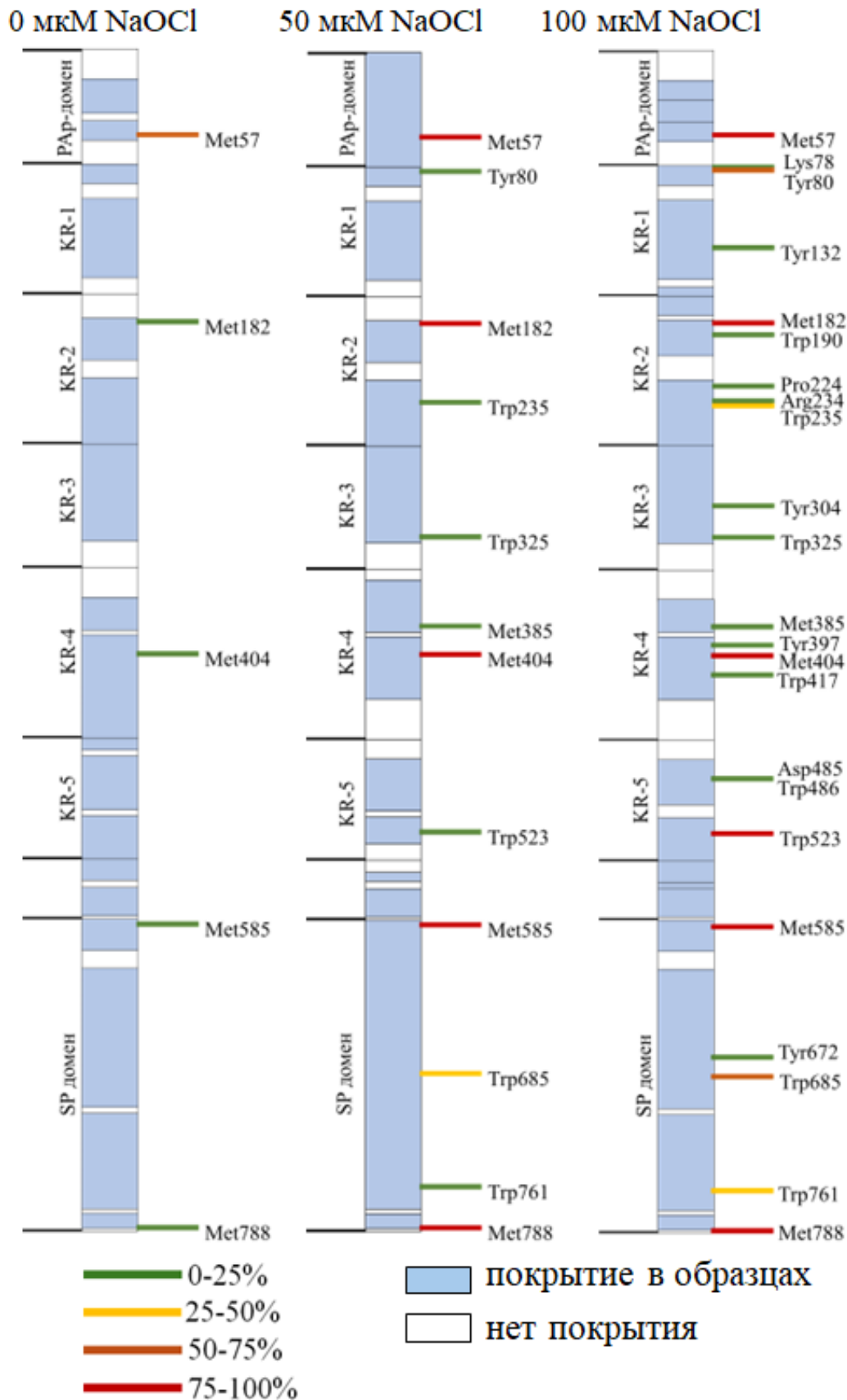
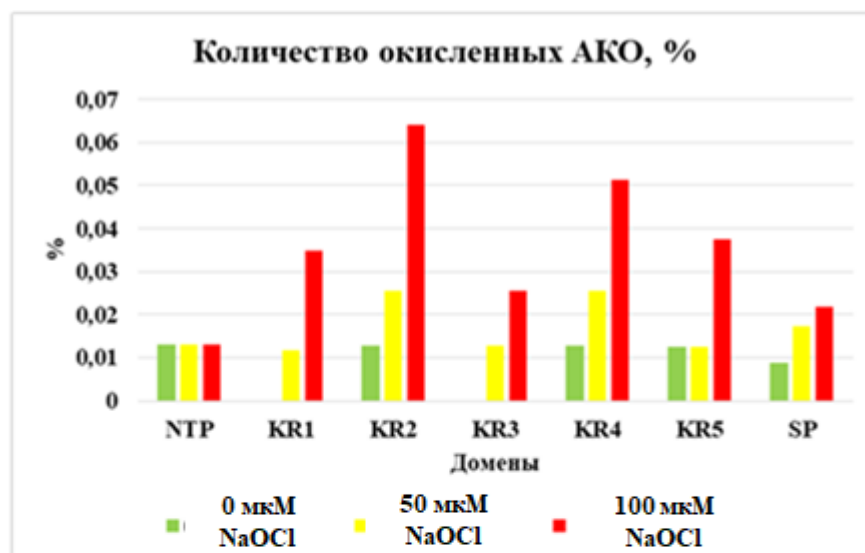


Рисунок 23 – Схематическое изображение детектированных участков аминокислотной последовательности плазминогена в комплексе со стрептокиназой с нанесенными сайтами модификаций при окислении разными концентрациями NaOCl/ OCl. Разработан автором

А



Б

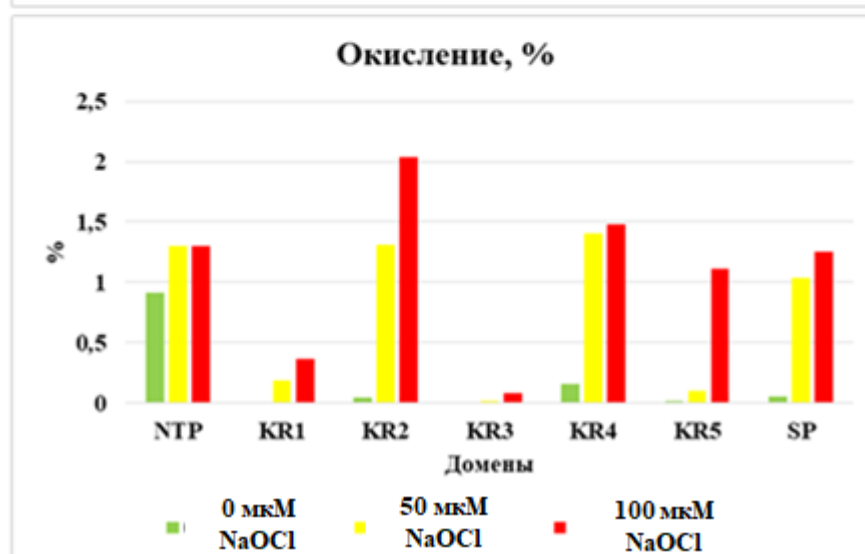


Рисунок 24 – Данные об окислительных модификациях, возникающих в плазминогене, находящемся в комплексе со стрептокиназой при окислении NaOCl/OCl⁻. А: распределение окисленных аминокислотных остатков молекулы плазминогена, по доменам. Б: общая степень окисления структурных доменов NTP, KR1-KR5, SP-домена комплекса плазминоген-стрептокиназа. Разработан автором

3.7. Обсуждение результатов

В работе исследовалось влияние $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ и H_2O_2 на плазминоген, а также влияние $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ на плазминоген, находящийся в комплексе со стрептокиназой.

При относительно низких концентрациях окислителей (25 мкМ $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ или 100 мкМ H_2O_2) функциональная активность плазмина, полученного из окисленного ПГ, не снижалась статистически значимо и составляла $97,1 \pm 7,3 \%$ и $92,2 \pm 7,6 \%$ от контроля соответственно. Согласно данным ВЭЖХ-МС/МС, при этих концентрациях в окислительную модификацию вовлекаются остатки метионина Met57, Met182, Met385, Met404 и Met788. Таким образом, можно полагать, что в физиологических условиях окисление указанных остатков не приводит к потере биологической активности ПГ. Поскольку перечисленные остатки не входят в состав каталитической триады и не участвуют непосредственно в связывании субстрата, их окисление, по-видимому, выполняет антиоксидантную функцию, перехватывая активные формы кислорода и защищая функционально значимые сайты. Это согласуется с литературными представлениями о роли метионинов как эндогенных ловушек АФК [130].

Тот факт, что Met585 остался неокисленным в ПГ, обработанном 25 мкМ $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$, но легко модифицировался как 50 и 100 мкМ $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$, так и 100 и 300 мкМ H_2O_2 , также позволяет предположить, что этот остаток обладает антиоксидантной активностью. Вероятно, изначально локализованный внутри белковой глобулы, Met585 становится пространственно доступным для окислителя лишь после модификации более экспонированных метионинов, что сопровождается изменением третичной структуры белка. В некоторой степени это также можно отнести к остатку Met463. Во всем диапазоне концентраций $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ этот остаток оставался не модифицированным и окислялся только при обработке плазминогена 300 мкМ H_2O_2 .

Полученные результаты показывают, что окислительная модификация отдельных остатков метионина, вызванная $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ или H_2O_2 , не связана напрямую с их доступностью для окислителя, что предполагает изменения в третичной структуре ПГ, инициированные окислением. Окисление остатков Met

обычно увеличивает гидрофобность поверхности белков [132] за счет конформационных перестроек и миграции гидрофобных аминокислотных остатков, в том числе других остатков метионина, к поверхности молекулы [132, 133], таким образом обеспечивая их взаимодействие с окислителем [134]. Поэтому можно предположить, что окисление остатков метионина происходит как процесс, близкий к кооперативному.

Механизм снижения биологической активности ПГ под воздействием повышенных концентраций окислителей (50, 100 мкМ NaOCl/-OCl и 300 мкМ H₂O₂) может быть связан с некоторыми из обнаруженных модификаций в ароматических аминокислотных остатках. Известно, что Trp235 участвует в образовании солевого мостика между LBS в KR2 и SP-доменом [26]. Tyr672 расположен в петле Tyr672–Thr678 SP-домена, которая вместе с петлей Pro703–Tyr713 также образует обширные взаимодействия с доменом KR2 [26]. Остатки Trp417 и Trp427 расположены в гидрофобном центре LBS KR4, и их окисление может существенно влиять на способность KR4 связываться с субстратом. Trp761 является одним из консервативных остатков сайта S2, ответственного за связывание субстрата [135].

Для оценки возможного вклада окислительной модификации отдельных аминокислотных остатков в нарушение функциональной активности плазминогена был проведён сопоставительный анализ литературных данных о миссенс-вариантах, аннотированных в ClinVar, Ensembl VEP и других базах, с результатами ВЭЖХ-МС/МС, полученными в настоящей работе. Подход основан на представлении, что замена аминокислотного остатка и его посттрансляционная модификация могут вызывать сопоставимые локальные изменения физико-химических свойств боковой цепи: электростатического заряда, гидрофильно-липофильных свойств, π -электронной делокализации ароматической системы, ван-дер-ваальсова объёма, конформационной ригидности и способности к образованию водородных связей. Если в одной и той же позиции известна миссенс-замена, физико-химически близкая к ПТМ, и эта замена оценивается предикторами как

патогенная, появляется основание для осторожного переноса оценки на соответствующую модификацию.

Для устранения субъективности при классификации миссенс-замен использованы пороги, рекомендованные разработчиками соответствующих инструментов: AlphaMissense – $\text{am_pathogenicity} > 0.564$ (likely pathogenic), < 0.34 (likely benign); ClinPred – ≥ 0.5 ; REVEL – ≥ 0.644 (PP3), ≤ 0.290 (BP4); SIFT – ≤ 0.05 (deleterious); PolyPhen-2 – ≥ 0.85 (probably damaging), < 0.5 (benign). Пороги для AlphaMissense соответствуют рекомендациям [136], для REVEL – [137] для критериев ACMG/AMP PP3/BP4.

Физико-химические соответствия между окислительными модификациями и миссенс-заменами не являются абсолютными, но позволяют выделить наиболее близкие аналоги. Окисление метионина до сульфоксида повышает полярность и снижает липофильность боковой цепи, поэтому химически близкой заменой следует считать $\text{Met} > \text{Thr}$. Окисление лизина сопровождается нейтрализацией положительного заряда ϵ -аминогруппы и образованием альдегидной группы, что по утрате заряда и приобретению полярности частично сходно с $\text{Lys} > \text{Asn}$. Окисление аргинина ведёт к нейтрализации положительного заряда гуанидиновой группы, что частично сходно с $\text{Arg} > \text{Cys}$. Окисление триптофана нарушает индольную ароматическую систему и π -электронную делокализацию, что соответствует $\text{Trp} > \text{Ser}$. Окисление пролина нарушает конформационную ригидность пирролидинового кольца, что частично воспроизводится $\text{Pro} > \text{Ser}$. Хлорирование тирозина модифицирует ароматическую систему и способность к образованию водородных связей, что частично напоминает $\text{Tyr} > \text{Phe}$.

Сводные данные о миссенс-вариантах, сопоставленных с детектированными в настоящей работе окислительными модификациями, приведены в Таблице А.1 Приложения А.

Наиболее приоритетными для дальнейшего изучения являются Trp427 (KR4), Trp761 (SP-домен), Tyr672 (SP-домен), Trp108 (KR1), Trp382 (KR4), Arg234 (KR2) и Met788 (SP-домен). Для Trp427 ($\text{Trp} > \text{Gly}$: SIFT 0.02, PolyPhen 0.453, AlphaMissense 0.908, ClinPred 0.9996, REVEL 0.517) и Trp761 ($\text{Trp} > \text{Arg}$: SIFT 0.01, PolyPhen 1.0,

AlphaMissense 0.843, ClinPred 0.993, REVEL 0.871) мутационные предсказания демонстрируют согласованность по ≥ 4 предикторам. Окисление триптофана нарушает индольную ароматическую систему и π -электронную делокализацию, что физико-химически ближе всего к замене Trp > Ser. Для Trp427 это согласуется с его локализацией в гидрофобном центре LBS KR4: замена или модификация этого остатка может нарушать связывание субстрата, что соответствует наблюдаемому снижению фибринолитической активности. Для Trp761, расположенного в SP-домене, мутационные данные также демонстрируют конкордантность, а его роль в экранировании кармана S1/S2 в проферменте делает его окисление потенциально значимым для конформационной активации. Для Arg234 замена Arg > Cys оценивается как патогенная (SIFT 0, PolyPhen 1.0, AlphaMissense 0.581, ClinPred 0.997, REVEL 0.662). Окисление Arg234, приводящее к нейтрализации положительного заряда, физико-химически ближе к Arg > Cys (по утрате заряда). Учитывая локализацию Arg234 в KR2 и его участие в координации иона хлора и солевом мостике с Glu706, окисление этого остатка может нарушать внутримолекулярные электростатические взаимодействия, стабилизирующие закрытую конформацию. Для Trp108 (Trp > Leu: AlphaMissense 0.969, ClinPred 0.995, REVEL 0.739) и Trp382 (Trp > Ser: SIFT 0, PolyPhen 1.0, AlphaMissense 0.979, ClinPred 0.9999, REVEL 0.776) патогенность мутаций оценивается как высокая, а локализация в KR1 и KR4 делает их перспективными мишенями для дальнейших исследований и сайт-направленного мутагенеза. Окисление M788 до сульфоксида повышает полярность, что согласуется с Met > Thr (PolyPhen 0.841, ClinPred 0.982, REVEL 0.698) которая также оценивается как патогенная.

Для Met57, Met182, Met463, Met585, Lys78 и Asp485 мутационные данные в основном оцениваются как толерантные (SIFT > 0.05) или доброкачественные (PolyPhen < 0.5), AlphaMissense чаще относит их к вероятно доброкачественным, а ClinPred – к доброкачественным. Окисление этих остатков, по-видимому, является частью физиологического защитного механизма (для метионинов) либо затрагивает остатки, не являющиеся критически важными для функциональной активности.

Полученные результаты согласуются с данными о снижении функциональной активности ПГ при окислении. Наиболее выраженное падение активности наблюдается при 50 и 100 мкМ NaOCl/OCl, что соответствует увеличению степени окисления Trp427, Trp761, Tyr672 и Arg234.

Дифференциальная сканирующая калориметрия белков позволяет получить информацию о параметрах термической денатурации молекулы. Одним из таких параметров является общая энтальпия белка, которая определяет конформационную стабильность молекулы. Известно, что процесс окисления плазминогена сопровождается снижением энтальпии денатурации [125]. Особенно выраженное снижение наблюдается для пика, показывающего плавление крингл-доменов KR4 и KR5, а также NTP (пик T₂), что соответствует результатам ВЭЖХ-МС/МС по окислительным модификациям аминокислотных остатков ПГ, окисленного гипохлоритом натрия. Наиболее подверженным окислительным модификациям является крингл-домен 4, где были детектированы следующие окисленные аминокислотные остатки: Met385, Tyr397, Met404 и Trp417. В соседнем домене KR5 найдены два окисленных аминокислотных остатка триптофана – на позициях 486 и 523. Для N-терминального пептида отмечен один окисленный остаток метионина (Met57) [130].

Уменьшение доли молярной энтальпии низкотемпературного пика, показывающего плавление первых трех крингл-доменов (KR1-KR3), менее значительное, чем у пика T₂. Окисленные аминокислотные остатки были детектированы в каждом из этих доменов: в KR1 обнаружены окисленные Tyr80 и Trp108, в KR2 были подвержены модификации аминокислотные остатки Met182, Trp190, Trp235, а в KR3 окисленными оказались остатки Tyr304 и Trp325 [130]. Следует отметить, что локализованный в KR2 Trp235 участвует во взаимодействии между различными доменами молекулы ПГ, поддерживая её закрытую конформацию.

Вклад доли молярной энтальпии высокотемпературного пика (T₃), показывающего плавление SP-домена, увеличивается относительно общей энтальпии денатурации. Это свидетельствует об относительной устойчивости SP-

домена к термической денатурации даже при его окислении. SP-домен критически важен для ферментативной активности ПГ благодаря наличию каталитической триады (His603, Asp646 и Ser741). Среди окисленных аминокислотных остатков в этом домене обнаруживаются Met585, Tyr672, Trp685, Trp761 и Met788. Tyr672 аналогично Trp235 влияет на конформацию ПГ, участвуя в междоменных взаимодействиях [130].

Тот факт, что SP-домен по данным ДСК остаётся относительно устойчивым к термической денатурации, может объясняться тем, что окисленные остатки в SP-доме (Trp 761, Tyr 672, Met 788) локализованы в поверхностных петлях и не нарушают ядро домена, тогда как их модификация влияет на связывание субстрата. Напротив, окисление Trp 427 и R234 в крингл-доменах KR4 и KR2, участвующих в лиганд-связывающих взаимодействиях и стабилизации закрытой конформации, может вносить основной вклад в снижение фибринолитической активности. Это согласуется с выводом о том, что ключевую роль в нарушении функциональной активности ПГ играют окислительные модификации остатков, расположенных в крингл-доменах.

В комплексе ПГ со стрептокиназой (ПГ-СК) детектируется большее количество сайтов окисления по сравнению со свободным ПГ. Это, вероятно, связано с тем, что при образовании комплекса конформация ПГ становится более открытой из-за нарушения междоменных контактов, в том числе между NTP и крингл-доменами 4 и 5. В результате ранее недоступные аминокислотные остатки становятся доступными для NaOCl/OCl, что может объяснить появление новых сайтов окислительной модификации.

При обработке комплекса ПГ-СК 50 мкМ NaOCl/OCl количество детектированных модифицированных аминокислотных остатков примерно такое же, как и в свободном ПГ, однако процент модификации отдельных остатков (например, Tyr80, Trp685, Trp761) оказывается выше, чем в ПГ, обработанном 100 мкМ NaOCl/OCl. Между тем, в последнем случае в комплексе ПГ-СК наблюдается более выраженное окисление Trp235 и Trp523, а также появляются

новые модифицированные остатки (Lys78, Pro224, Asp485), которые не окисляются в свободном ПГ.

Стоит отметить, что в комплексе ПГ-СК остаток Met57 значительно окислен даже в контрольном образце. Это может быть связано с изменением конформации белка при образовании комплекса из-за нарушения взаимодействия между NTP и KR5, что делает аминокислотные остатки NTP, включая Met57, более доступными для окислителя.

Единственным аминокислотным остатком, который в ПГ окислен сильнее, чем в комплексе ПГ-СК, является Met385 (домен KR4), что также может быть связано с конформационными особенностями [26].

Наибольшее повышение уровня окислительных модификаций при повышении концентрации NaOCl/OCl⁻ наблюдаются в SP-домене, особенно в остатках Trp685 и Trp761. Известно, что в ПГ Trp761 блокирует доступ к сайту связывания субстрата S2 и активному центру, предотвращая активность ПГ, в отличие от плазмينا, где конформационные изменения открывают этот сайт и активный центр. Аналогично, в комплексе ПГ-СК изменение конформации SP-домена приводит к изменению положения Trp761, делая активный центр и сайт S2 доступными и обеспечивая, таким образом, ферментативную активность комплекса [42, 43] (Рисунок 25).

Сравнение 3D структур SP-домена ПГ и комплекса ПГ-СК показало, что аминокислотные остатки Trp761 и Trp685, а также Met585 становятся более доступными для окислителя в комплексе (Рисунок 26), что также подтверждается МС данными (Таблицы 2 и 5).

Несмотря на значительно больший уровень окисления SP-домена комплекса ПГ-СК снижение активности ПГ при его окислении в комплексе со стрептокиназой примерно такое же, как снижение активности плазмينا, образованного из окисленного ПГ. Вероятно, наиболее подверженные окислению остатки в SP-домене комплекса ПГ-СК могут выступать в роли «ловушек» для окислителя, защищая, таким образом, открытый каталитический сайт от окисления. Это позволяет предположить, что ключевую роль в нарушении функциональной

активности ПГ играют окислительные модификации аминокислотных остатков, расположенных в крингл-доменах.

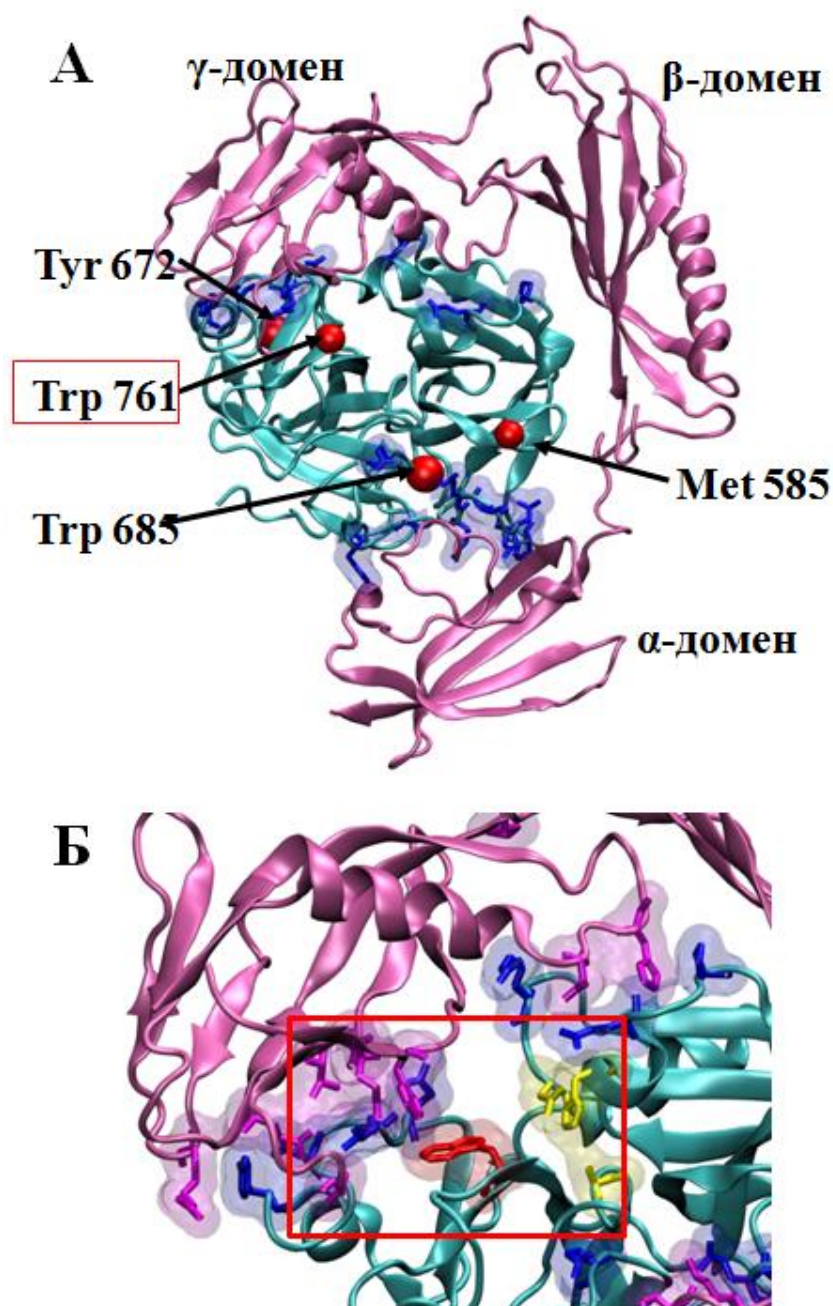


Рисунок 25 – Схематичное изображение комплекса каталитического домена ПГ и стрептокиназы. *А*: структура SP-домена в комплексе ПГ-СК. *Б*: структура области каталитического центра ПГ-СК (PDB ID: 1BML). Зеленый цвет – SP-домен ПГ; розовый – стрептокиназа; синим цветом, показаны области взаимодействия плазминогена и стрептокиназы; желтым цветом выделена каталитическая триада; красным – показаны аминокислотные остатки, подверженные окислительной модификации [131]

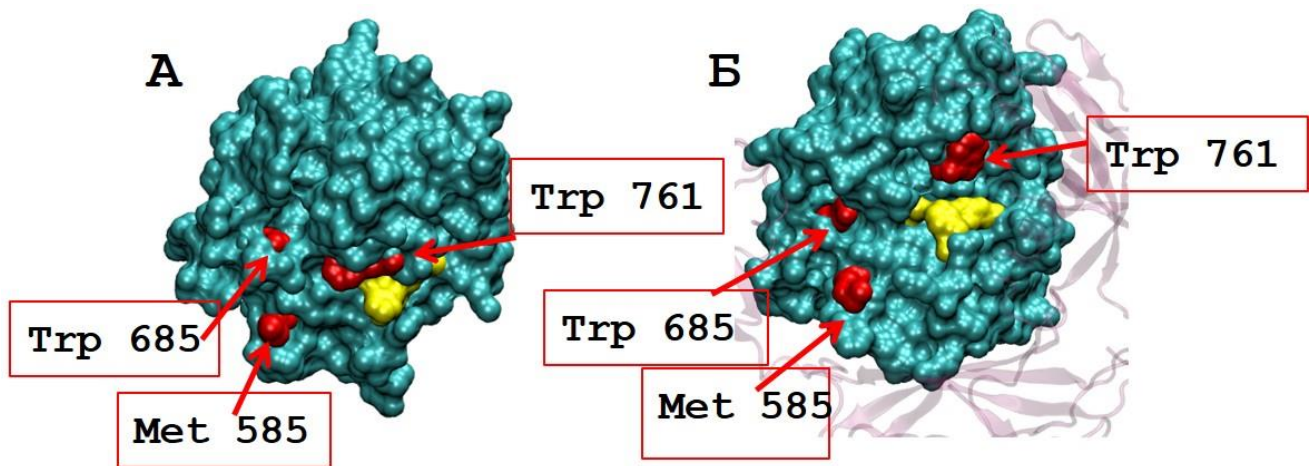


Рисунок 26 – Сравнение экспонированных областей SP-домена (А) свободного ПГ и (Б) ПГ в комплексе со стрептокиназой (PDB ID: 1BML). Зеленым цветом показан SP-домен ПГ; прозрачным розовым – стрептокиназа; желтым цветом выделена каталитическая триада; красным – показаны окисленные аминокислотные остатки [131]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекула плазминогена проявляет устойчивость к умеренному окислительному воздействию без существенной потери функциональной активности при индуцированном окислении гипохлоритом натрия и пероксидом водорода. При минимальных концентрациях окислителей (25 мкМ NaOCl/-OCl или 100 мкМ H₂O₂) статистически значимого снижения амидолитической активности не зарегистрировано, однако остатки метионина (Met57, Met182, Met385, Met404, Met788) вовлекаются в окислительную модификацию, что позволяет рассматривать их в качестве внутримолекулярных перехватчиков активных форм кислорода, обеспечивающих защиту функционально значимых сайтов. При увеличении концентрации окислителей до 100 мкМ NaOCl/-OCl или 300 мкМ H₂O₂ окисление метиониновых остатков до метионинсульфоксида сопровождается повышением полярности и снижением липофильности боковых цепей, что может инициировать локальные конформационные перестройки полипептидной цепи и повышать доступность отдельных сайтов для окислителя. Указанные перестройки, по-видимому, носят кооперативный характер и способны приводить к дестабилизации молекулы и снижению её функциональной активности.

При повышении концентрации окислителей до 50–100 мкМ NaOCl/-OCl и 300 мкМ H₂O₂ наблюдаются окислительные модификации критически важных ароматических аминокислотных остатков (Trp235, Tyr672, Trp417, Trp427, Trp761, а также Arg234), преимущественно локализованных в крингл-доменах. Нарушение индольной системы триптофана, нейтрализация положительного заряда аргинина и разрушение солевых мостиков между крингл-доменами и SP-доменом также приводят к конформационным перестройкам белка и нарушению его функций.

Данные дифференциальной сканирующей калориметрии согласуются с результатами масс-спектрометрии. По результатам ДСК видно, что при окислении ПГ гипохлоритом натрия общая энтальпия молекулы уменьшается, что свидетельствует о дестабилизации белка. Доля вкладов в общую энтальпию пиков T1 и T2 уменьшается, однако вклад пика T3 растет. Это говорит о том, что сериновый протеазный домен, плавление которого показывает пик T3, в отличие от

крингл-доменов (пики T1 и T2), оказывается достаточно устойчивым к воздействию окислителя.

Таким образом, потеря функциональной активности плазминогена при окислительном стрессе, вероятно связана с модификациями аминокислотных остатков крингл-доменов.

Активность плазминогена, находящегося в комплексе со стрептокиназой при минимальных концентрациях окислителя демонстрирует незначительное снижение по сравнению с контролем. При увеличении концентрации окислителя активность комплекса снижается более значительно. Однако, в среднем, эти данные схожи с данными об изменении активности плазмина, образованного из окисленного плазминогена. По сравнению со свободным плазминогеном комплекс ПГ-СК имеет повышенную чувствительность к воздействию окислителя, причем наиболее сильно окислению подвержен сериновый протеазный домен. Вероятнее всего это происходит из-за более открытой конформации молекулы плазминогена, находящегося в комплексе. Такая конформация объясняется нарушением взаимодействий между доменами плазминогена, в первую очередь между NTP и KR5. Это информация дополнительно подтверждает предположение о том, что первопричиной нарушения функциональной активности белка являются окислительные модификации остатков в крингл-доменах.

Таким образом, можно предположить, что снижение активности плазминогена обусловлено окислением его крингл-доменов и нарушением их способности связываться с субстратом. Окисленные аминокислотные остатки, детектируемые в SP-домене, незначительно влияют на функционирование белка и, вероятно, также, как и остатки метионина, могут выполнять функцию ловушек для активных форм кислорода, защищая каталитическую триаду.

ВЫВОДЫ

1. Методами колориметрии и электрофореза в ПААГ было установлено, что при окислении ПГ гипохлоритом натрия или перекисью водорода функциональная активность образованного из него плазмина незначительно снижалась при 25 мкМ и 100 мкМ соответственно. Наиболее существенное снижение активности наблюдалось при 100 мкМ NaOCl/-OCl и 300 мкМ H₂O₂.

2. Методом ВЭЖХ-МС/МС установлено, что окисление плазминогена H₂O₂ и NaOCl преимущественно затрагивает остатки Met и Trp, а воздействие NaOCl дополнительно модифицирует Tyr. Степень окисления плазминогена при действии гипохлорита натрия в среднем выше, чем при окислении перекисью водорода. Для обоих окислителей степень модификации возрастает с увеличением их концентрации. Несмотря на больший размер SP-домена, нормирование по количеству аминокислот показало максимальную частоту модификаций в домене KR4.

3. Окисление плазминогена гипохлоритом приводит к снижению энтальпии его термической денатурации, что свидетельствует о дестабилизации структуры белка. Наиболее чувствительными к окислению оказались крингл-домены KR4–KR5 и NTP. При этом SP-домен проявляет большую устойчивость к окислению.

4. Комплекс ПГ-СК более подвержен окислительной модификации, чем ПГ, что выражается в возникновении новых сайтов окисления, появлении других типов модификаций уже окисленных аминокислотных остатков и к повышению уровня модификаций в конкретном сайте.

5. Закрытая конформация молекулы ПГ делает функционально значимые аминокислотные остатки, менее доступными для окислителя. В комплексе ПГ-СК остатки метионина и триптофана в SP-домене также выполняют функцию перехватчиков АФК и защищают каталитическую триаду молекулы. Эти факторы обеспечивают ограниченную резистентность плазминогена к воздействию окислителя.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ДСК - дифференциальная сканирующая калориметрия

ПТМ – посттрансляционные модификации

ПГ – плазминоген

KR1-KR5 – крингл домены 1-5

NTP, Pap – Pan-Apple домен

SP-домен – сериновый протеазный домен

LBS – lysine binding site, лизин связывающие участки

tPA – тканевый активатор плазминогена

uPA – урокиназный активатор плазминогена

СК – стрептокиназа

ПААГ – полиакриламидный гель

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

АО – аминокислотные остатки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stadtman, E. R. Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases / E. R. Stadtman // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 928. – № 1. – P. 22-38.
2. Berlett, B. S. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272. – № 33. – P. 20313-20316.
3. Hawkins, C. L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. J. Davies // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25. – № 3-4. – P. 259-274.
4. Davies, M. J. Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 473. – № 7. – P. 805-825.
5. Stadtman, E. R. Protein Oxidation and Aging / E. R. Stadtman // Science. – 1992. – Vol. 257. – № 5074. – P. 1220-1224.
6. Weigandt, K. M. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen / K. M. Weigandt, N. White, D. Chung, E. Ellingson, Y. Wang, X. Fu, D. C. Pozzo // Biophysical Journal. – 2012. – Vol. 103. – № 11. – P. 2399-2407.
7. Yurina, L. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry / L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina, A. Bugrova, M. Biryukova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld // Free Radical Research. – 2019. – Vol. 53. – Ozone-induced damage of fibrinogen molecules. – № 4. – P. 430-455.
8. Sovová, Ž. Impact of posttranslational modifications on atomistic structure of fibrinogen / Ž. Sovová, J. Štikarová, J. Kaufmanová, P. Májek, J. Suttner, P. Šácha, M. Malý, J. E. Dyr // PLOS ONE. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. e0227543.

9. Salavej, P. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase / P. Salavej, H. Spalteholz, J. Arnhold // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 40. – № 3. – P. 516-525.
10. Vasilyeva, A. The Structure of Blood Coagulation Factor XIII Is Adapted to Oxidation / A. Vasilyeva, L. Yurina, A. Shchegolikhin, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 914.
11. Kim, G. Methionine oxidation and reduction in proteins / G. Kim, S. J. Weiss, R. L. Levine // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2014. – Vol. 1840. – № 2. – P. 901-905.
12. Ploplis, V. A. Nonfibrinolytic Functions of Plasminogen / V. A. Ploplis, F. J. Castellino // *Methods*. – 2000. – Vol. 21. – № 2. – P. 103-110.
13. Castellino, F. J. Structure and function of the plasminogen/plasmin system / F. J. Castellino, V. A. Ploplis // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 93. – № 04. – P. 647-654.
14. Bohnsack, R. N. Residues Essential for Plasminogen Binding by the Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor / R. N. Bohnsack, M. Patel, L. J. Olson, S. S. Twining, N. M. Dahms // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 635-644.
15. Saksela, O. Local synthesis of plasminogen by the seminiferous tubules of the testis / O. Saksela, K. K. Vihko // *FEBS Letters*. – 1986. – Vol. 204. – № 2. – P. 193-197.
16. Kumar, Y. Decoy Plasminogen Receptor Containing a Selective Kunitz-Inhibitory Domain / Y. Kumar, K. Vadivel, A. E. Schmidt, G. I. Ogueli, S. M. Ponnuraj, N. Rannulu, J. A. Loo, M. S. Bajaj, S. P. Bajaj // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53. – № 3. – P. 505-517.
17. Cesarman-Maus, G. Molecular mechanisms of fibrinolysis / G. Cesarman-Maus, K. A. Hajjar // *British Journal of Haematology*. – 2005. – Vol. 129. – № 3. – P. 307-321.

18. Aisina, R. B. Structure and function of plasminogen/plasmin system / R. B. Aisina, L. I. Mukhametova // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2014. – Vol. 40. – № 6. – P. 590-605.
19. Brito-Robinson, T. Plasminogen missense variants and their involvement in cardiovascular and inflammatory disease / T. Brito-Robinson, Y. A. Ayinuola, V. A. Ploplis, F. J. Castellino // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2024. – T. 11. – C. 1406953.
20. Martin-Fernandez, L. The Unravelling of the Genetic Architecture of Plasminogen Deficiency and its Relation to Thrombotic Disease / L. Martin-Fernandez, P. Marco, I. Corrales, R. Pérez, L. Ramírez, S. López, F. Vidal, J. M. Soria // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 39255.
21. Miszta, A. Assessing Plasmin Generation in Health and Disease / A. Miszta, D. Huskens, D. Donkervoort, M. J. M. Roberts, A. S. Wolberg, B. De Laat // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 5. – P. 2758.
22. Hayes, M. L. Carbohydrate of the human plasminogen variants. I. Carbohydrate composition, glycopeptide isolation, and characterization. / M. L. Hayes, F. J. Castellino // Journal of Biological Chemistry. – 1979. – Vol. 254. – № 18. – P. 8768-8771.
23. Hayes, M. L. Carbohydrate of the human plasminogen variants. II. Structure of the asparagine-linked oligosaccharide unit. / M. L. Hayes, F. J. Castellino // Journal of Biological Chemistry. – 1979. – Vol. 254. – № 18. – P. 8772-8776.
24. Wang, H. Serine-578 Is a Major Phosphorylation Locus in Human Plasma Plasminogen / H. Wang, M. Prorok, R. K. Bretthauer, F. J. Castellino // Biochemistry. – 1997. – Vol. 36. – № 26. – P. 8100-8106.
25. Castellino, F. J. The Kringle Domains of Human Plasminogen / F. J. Castellino, S. G. McCance. – Text : electronic // Novartis Foundation Symposia / eds. G. R. Bock, J. A. Goode. – Wiley, 2007. – P. 46-65. – URL:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470515457.ch4> (date accessed: 30.04.2026).

26. Law, R. H. P. The X-ray Crystal Structure of Full-Length Human Plasminogen / R. H. P. Law, T. Caradoc-Davies, N. Cowieson, A. J. Horvath, A. J. Quek, J. A. Encarnacao, D. Steer, A. Cowan, Q. Zhang, B. G. C. Lu, R. N. Pike, A. I. Smith, P. B. Coughlin, J. C. Whisstock // *Cell Reports*. – 2012. – Vol. 1. – № 3. – P. 185-190.
27. Ayinuola, Y. A. Inactivation of the lysine binding sites of human plasminogen (hPg) reveals novel structural requirements for the tight hPg conformation, M-protein binding, and rapid activation / Y. A. Ayinuola, F. J. Castellino // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2023. – T. 10. – C. 1166155.
28. Napolitano, F. Role of Plasminogen Activation System in Platelet Pathophysiology: Emerging Concepts for Translational Applications / F. Napolitano, N. Montuori // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Role of Plasminogen Activation System in Platelet Pathophysiology. – № 11. – P. 6065.
29. Violand, B. N. Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. / B. N. Violand, F. J. Castellino // *Journal of Biological Chemistry*. – 1976. – Vol. 251. – № 13. – P. 3906-3912.
30. Ozhogina, O. A. Characterization of the kringle fold and identification of a ubiquitous new class of disulfide rotamers / O. A. Ozhogina, E. L. Bominaar // *Journal of Structural Biology*. – 2009. – Vol. 168. – № 2. – P. 223-233.
31. Holsberger, D. R. Expression of a hepatocyte growth-factor activator protein in turkey (*Meleagris gallopavo*) deferent duct epithelial cells / D. R. Holsberger, A. E. Becker, R. J. Thurston, C. D. Rice // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 132. – № 4. – P. 769-777.
32. Bakker, A. H. Introduction of lysine and clot binding properties in the kringle one domain of tissue-type plasminogen activator. / A. H. Bakker, W. Van Der Greef,

E. F. Rehberg, K. R. Marotti, J. H. Verheijen // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – Vol. 268. – № 25. – P. 18496-18501.

33. Crippa, M. P. Urokinase-type plasminogen activator / M. P. Crippa // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2007. – Vol. 39. – № 4. – P. 690-694.

34. Pozzi, N. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities / N. Pozzi, E. Di Cera // Expert Review of Proteomics. – 2014. – Vol. 11. – Prothrombin structure. – № 6. – P. 653-655.

35. Ye, Q. High-resolution crystal structure of apolipoprotein(a) kringle IV type 7: Insights into ligand binding / Q. Ye, M. N. Rahman, M. L. Koschinsky, Z. Jia // Protein Science. – 2001. – Vol. 10. – High-resolution crystal structure of apolipoprotein(a) kringle IV type 7. – № 6. – P. 1124-1129.

36. Law, R. H. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system / R. H. Law, D. Abu-Ssaydeh, J. C. Whisstock // Current Opinion in Structural Biology. – 2013. – Vol. 23. – № 6. – P. 836-841.

37. Mathews, I. I. Crystal Structures of the Recombinant Kringle 1 Domain of Human Plasminogen in Complexes with the Ligands ϵ -Aminocaproic Acid and *trans* -4-(Aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic Acid / I. I. Mathews, P. Vanderhoff-Hanaver, F. J. Castellino, A. Tulinsky // Biochemistry. – 1996. – Vol. 35. – № 8. – P. 2567-2576.

38. Marti, D. N. Ligand Preferences of Kringle 2 and Homologous Domains of Human Plasminogen: Canvassing Weak, Intermediate, and High-Affinity Binding Sites by¹ H-NMR / D. N. Marti, C.-K. Hu, S. S. A. An, P. Von Haller, J. Schaller, M. Llinás // Biochemistry. – 1997. – Vol. 36. – Ligand Preferences of Kringle 2 and Homologous Domains of Human Plasminogen. – № 39. – P. 11591-11604.

39. Christen, M. T. Human Plasminogen Kringle 3: Solution Structure, Functional Insights, Phylogenetic Landscape, / M. T. Christen, P. Frank, J. Schaller, M. Llinás //

Biochemistry. – 2010. – Vol. 49. – Human Plasminogen Kringle 3. – № 33. – P. 7131-7150.

40. Tulinsky, A. Lysine/fibrin binding sites of kringles modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin / A. Tulinsky, C. H. Park, B. Mao, M. Llináas // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 1988. – Vol. 3. – № 2. – P. 85-96.

41. Verhamme, I. M. Rapid Binding of Plasminogen to Streptokinase in a Catalytic Complex Reveals a Three-step Mechanism / I. M. Verhamme, P. E. Bock // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 40. – P. 28006-28018.

42. Peisach, E. Crystal Structure of the Proenzyme Domain of Plasminogen / E. Peisach, J. Wang, T. De Los Santos, E. Reich, D. Ringe // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 34. – P. 11180-11188.

43. Wang, X. Human plasminogen catalytic domain undergoes an unusual conformational change upon activation / X. Wang, S. Terzyan, J. Tang, J. A. Loy, X. Lin, X. C. Zhang // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 295. – № 4. – P. 903-914.

44. Linde, V. Elimination of the Cys558-Cys566 bond in Lys78-plasminogen: Effect on activation and fibrin interaction / V. Linde, L. S. Nielsen, D. C. Foster, L. C. Petersen // *European Journal of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 251. – Elimination of the Cys558-Cys566 bond in Lys78-plasminogen. – № 1-2. – P. 472-479.

45. Goettig, P. Surface loops of trypsin-like serine proteases as determinants of function / P. Goettig, H. Brandstetter, V. Magdolen // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 166. – P. 52-76.

46. Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity / L. Hedstrom // *Chemical Reviews*. – 2002. – Vol. 102. – № 12. – P. 4501-4524.

47. Laskar, A. Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases / A. Laskar, E. J. Rodger, A. Chatterjee, C. Mandal // *BMC Research Notes*. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 256.

48. Di Cera, E. Serine proteases / E. Di Cera // IUBMB Life. – 2009. – Vol. 61. – № 5. – P. 510-515.
49. Elsässer, B. Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies / B. Elsässer, P. Goettig. – 2021. – T. 22. – № 6. – C. 3232.
50. Irigoyen, J. P. The plasminogen activator system: biology and regulation: / J. P. Irigoyen, P. Muñoz-Cánoves, L. Montero, M. Koziczak, Y. Nagamine // Cellular and Molecular Life Sciences. – 1999. – Vol. 56. – The plasminogen activator system. – № 1. – P. 104-132.
51. Seillier, C. Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response / C. Seillier, P. Hélie, G. Petit, D. Vivien, D. Clemente, B. Le Mauff, F. Docagne, O. Toutirais // Cellular Immunology. – 2022. – Vol. 371. – P. 104451.
52. Van Zonneveld, A. Structure and function of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) / A. Van Zonneveld, H. Veerman, M. E. MacDonald, H. Pannekoek, J. A. Van Mourik // Journal of Cellular Biochemistry. – 1986. – Vol. 32. – № 3. – P. 169-178.
53. Porte, R. J. Systemic effects of tissue plasminogen activator-associated fibrinolysis and its relation to thrombin generation in orthotopic liver transplantation / R. J. Porte, F. A. Bontempo, E. A. R. Knot, J. H. Lewis, Y. G. Kang, T. E. Starzl // Transplantation. – 1989. – Vol. 47. – Systemic effects of tissue plasminogen activator-associated fibrinolysis and its relation to thrombin generation in orthotopic liver transplantation. – № 6. – P. 978-983.
54. Brommer, E. J. P. Renal and Hepatic Handling of Endogenous Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA) and Its Inhibitor in Man / E. J. P. Brommer, F. H. M. Derkx, M. A. D. H. Schalekamp, G. Dooijewaard, M. M. V. D. Klaauw // Thrombosis and Haemostasis. – 1988. – Vol. 59. – № 03. – P. 404-411.

55. Sugioka, K. Urokinase-type plasminogen activator promotes corneal epithelial migration and nerve regeneration / K. Sugioka, T. Nishida, A. Kodama-Takahashi, J. Murakami, M. Fukuda, O. Matsuo, S. Kusaka // *Exp Eye Res.* – 2023. – C. 109559.
56. Zhou, H.-M. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor synergize to promote pathogenic proteolysis / H.-M. Zhou // *The EMBO Journal.* – 2000. – T. 19. – № 17. – C. 4817-4826.
57. Bannish, B. E. The effect of plasmin-mediated degradation on fibrinolysis and tissue plasminogen activator diffusion / B. E. Bannish, B. Paynter, R. A. Risan, M. Shroff, V. Tutwiler // *Biophysical Journal.* – 2024. – Vol. 123. – № 5. – P. 610-621.
58. Shanmukhappa, K. Urokinase-type plasminogen activator supports liver repair independent of its cellular receptor / K. Shanmukhappa, G. E. Sabla, J. L. Degen, J. A. Bezerra // *BMC Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 40.
59. Lizano, S. Structural Diversity of Streptokinase and Activation of Human Plasminogen / S. Lizano, K. H. Johnston // *Infection and Immunity.* – 2005. – Vol. 73. – № 7. – P. 4451-4453.
60. Khil, J. Plasminogen Enhances Virulence of Group A Streptococci by Streptokinase-Dependent and Streptokinase-Independent Mechanisms / J. Khil, M. Im, A. Heath, U. Ringdahl, L. Mundada, N. Cary Engleberg, W. P. Fay // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2003. – Vol. 188. – № 4. – P. 497-505.
61. Sun, H. Plasminogen Is a Critical Host Pathogenicity Factor for Group A Streptococcal Infection / H. Sun, U. Ringdahl, J. W. Homeister, W. P. Fay, N. C. Engleberg, A. Y. Yang, L. S. Rozek, X. Wang, U. Sjöbring, D. Ginsburg // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – № 5688. – P. 1283-1286.
62. Wang, X. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase / X. Wang, X. Lin, J. A. Loy, J. Tang, X. C. Zhang // *Science.* – 1998. – Vol. 281. – № 5383. – P. 1662-1665.

63. Dhar, J. Involvement of a Nine-residue Loop of Streptokinase in the Generation of Macromolecular Substrate Specificity by the Activator Complex through Interaction with Substrate Kringle Domains / J. Dhar, A. H. Pande, V. Sundram, J. S. Nanda, S. C. Mande, G. Sahni // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 15. – P. 13257-13267.
64. Gladysheva, I. P. Coevolutionary patterns in plasminogen activation / I. P. Gladysheva, R. B. Turner, I. Y. Sazonova, L. Liu, G. L. Reed // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 16. – P. 9168-9172.
65. Loy, J. A. Domain Interactions between Streptokinase and Human Plasminogen / J. A. Loy, X. Lin, M. Schenone, F. J. Castellino, X. C. Zhang, J. Tang // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – № 48. – P. 14686-14695.
66. Nihalani, D. Role of the amino-terminal region of streptokinase in the generation of a fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides / D. Nihalani, R. Kumarm, K. Rajagopal, G. Sahni // *Protein Science*. – 1998. – Vol. 7. – № 3. – P. 637-648.
67. Wang, S. Deletion of Ile1 Changes the Mechanism of Streptokinase: Evidence for the Molecular Sexuality Hypothesis / S. Wang, G. L. Reed, L. Hedstrom // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – Deletion of Ile1 Changes the Mechanism of Streptokinase. – № 16. – P. 5232-5240.
68. Hasegawa, D. K. Thrombotic disease in three families with inherited plasminogen deficiency / D. K. Hasegawa, B. J. Tyler, J. R. Edson // *Blood*. – T. 60. – № suppl 1. – C. 213a.
69. Aoki, N. Abnormal Plasminogen / N. Aoki, M. Moroi, Y. Sakata, N. Yoshida, M. Matsuda // *Journal of Clinical Investigation*. – 1978. – Vol. 61. – № 5. – P. 1186-1195.
70. Schuster, V. Plasminogen deficiency / V. Schuster, B. Hügler, K. Tefs // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5. – № 12. – P. 2315-2322.

71. Tsutsumi, S. Genetic Diagnosis of Dysplasminogenemia: Detection of an Ala601 - Thr Mutation in 118 out of 125 Families and Identification of a New Asp676-Asn Mutation / S. Tsutsumi, T. Saito, T. Sakata, T. Miyata, A. Ichinose // Thrombosis and Haemostasis. – 1996. – Vol. 76. – Genetic Diagnosis of Dysplasminogenemia. – № 02. – P. 135-138.

72. Higuchi, Y. Plasminogen Kanagawa-I, a novel missense mutation, is caused by the amino acid substitution G732R / Y. Higuchi, K. Furihata, I. Ueno, S. Ishikawa, N. Okumura, M. Tozuka, N. Sakurai // British Journal of Haematology. – 1998. – Vol. 103. – № 3. – P. 867-870.

73. Ray, P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji // Cellular Signalling. – 2012. – Vol. 24. – № 5. – P. 981-990.

74. Hawkins, C. L. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications / C. L. Hawkins, M. J. Davies // Journal of Biological Chemistry. – 2019. – Vol. 294. – № 51. – P. 19683-19708.

75. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. – Oxford University Press, 2015. – URL: <https://academic.oup.com/book/40045> (дата обращения: 30.04.2026). – Текст: электронный.

76. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones. – 2017. – Т. 20. – № 86. – С. 715-748.

77. Солвей, Дж. Г. Наглядная медицинская биохимия: учебное пособие / Дж. Г. Солвей. – перевод с английского под редакцией Е. С. Северина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 168 с.

78. Carriere, V. M. In Vitro Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide in Activated Macrophages via a Platinum Microelectrode Array / V. M. Carriere,

J. P. Rodrigues, C. Tan, P. Arumugam, S. Poh // *Sensors*. – 2021. – Vol. 21. – № 16. – P. 5607.

79. Davies, M. J. The oxidative environment and protein damage / M. J. Davies // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2005. – Vol. 1703. – № 2. – P. 93-109.

80. Torosantucci, R. Oxidation of Therapeutic Proteins and Peptides: Structural and Biological Consequences / R. Torosantucci, C. Schöneich, W. Jiskoot // *Pharmaceutical Research*. – 2014. – Vol. 31. – Oxidation of Therapeutic Proteins and Peptides. – № 3. – P. 541-553.

81. Pizzino, G. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – Vol. 2017. – Oxidative Stress. – № 1. – P. 8416763.

82. Wittmann, C. Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin / C. Wittmann, P. Chockley, S. K. Singh, L. Pase, G. J. Lieschke, C. Grabher // *Advances in Hematology*. – 2012. – Vol. 2012. – Hydrogen Peroxide in Inflammation. – P. 1-6.

83. Jorgenson, T. C. Redox Imbalance and Biochemical Changes in Cancer / T. C. Jorgenson, W. Zhong, T. D. Oberley // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 20. – P. 6118-6123.

84. Aramouni, K. Biochemical and cellular basis of oxidative stress: Implications for disease onset / K. Aramouni, R. Assaf, A. Shaito, M. Fardoun, M. Al-Asmakh, A. Sahebkar, A. H. Eid // *Journal of Cellular Physiology*. – 2023. – Vol. 238. – Biochemical and cellular basis of oxidative stress. – № 9. – P. 1951-1963.

85. Dhapola, R. Oxidative stress in Alzheimer's disease: current knowledge of signaling pathways and therapeutics / R. Dhapola, S. K. Beura, P. Sharma, S. K. Singh,

D. HariKrishnaReddy // Molecular Biology Reports. – 2024. – Vol. 51. – Oxidative stress in Alzheimer's disease. – № 1. – P. 48.

86. Puppo, A. Formation of Hydroxyl Radicals in Biological Systems. Does Myoglobin Stimulate Hydroxyl Radical Formation from Hydrogen Peroxide? / A. Puppo, B. Halliwell // Free Radical Research Communications. – 1988. – Vol. 4. – № 6. – P. 415-422.

87. Schreck, R. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. / R. Schreck, P. Rieber, P. A. Baeuerle // The EMBO Journal. – 1991. – Vol. 10. – № 8. – P. 2247-2258.

88. Pravda, J. Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics / J. Pravda // Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 26. – Hydrogen peroxide and disease. – № 1. – P. 41.

89. Liu, C. A simple mitochondria-immobilized fluorescent probe for the detection of hydrogen peroxide / C. Liu, X. Li, H. Zhu, K. Wang, X. Rong, L. Ma, X. Zhang, M. Liu, W. Li, W. Sheng, B. Zhu // Talanta. – 2024. – Vol. 275. – P. 126091.

90. Fang, J. Production of superoxide and hydrogen peroxide in the mitochondrial matrix is dominated by site IQ of complex I in diverse cell lines / J. Fang, H.-S. Wong, M. D. Brand // Redox Biology. – 2020. – Vol. 37. – P. 101722.

91. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // Redox Biology. – 2017. – Vol. 11. – Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress. – P. 613-619.

92. Halliwell, B. Hydrogen peroxide in the human body / B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long // FEBS Letters. – 2000. – Vol. 486. – № 1. – P. 10-13.

93. Roebuck, K. A. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB

(Review). / K. A. Roebuck. – Текст : электронный // International Journal of Molecular Medicine. – 1999. – Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression. – URL: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.4.3.223> (дата обращения: 30.04.2026).

94. Vepa, S. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells / S. Vepa, W. M. Scribner, N. L. Parinandi, D. English, J. G. N. Garcia, V. Natarajan // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 1999. – Vol. 277. – № 1. – P. L150-L158.

95. Naseem, K. M. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets / K. M. Naseem, K. R. Bruckdorfer // Biochemical Journal. – 1995. – Vol. 310. – № 1. – P. 149-153.

96. Cheng, W. Hydrogen Peroxide Induced Protein Oxidation During Storage and Lyophilization Process / W. Cheng, X. Zheng, M. Yang // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 105. – № 6. – P. 1837-1842.

97. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species / C. C. Winterbourn // Nature Chemical Biology. – 2008. – Vol. 4. – № 5. – P. 278-286.

98. Davies, M. J. Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications / M. J. Davies, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. D. Rees // Antioxidants & Redox Signaling. – 2008. – Vol. 10. – Mammalian Heme Peroxidases. – № 7. – P. 1199-1234.

99. Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms / S. J. Klebanoff, A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn, W. M. Nauseef // Journal of Leukocyte Biology. – 2013. – Vol. 93. – Myeloperoxidase. – № 2. – P. 185-198.

100. Winter, J. Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding / J. Winter, M. Ilbert, P. C. F. Graf, D. Özcelik, U. Jakob // *Cell*. – 2008. – Vol. 135. – № 4. – P. 691-701.
101. Prütz, W. A. Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates / W. A. Prütz // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1996. – Vol. 332. – № 1. – P. 110-120.
102. Winterbourn, C. C. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid / C. C. Winterbourn, J. J. M. Van Den Berg, E. Roitman, F. A. Kuypers // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1992. – Vol. 296. – № 2. – P. 547-555.
103. Ulfig, A. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens / A. Ulfig, L. I. Leichert // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – Vol. 78. – № 2. – P. 385-414.
104. Pattison, D. I. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds / D. I. Pattison, M. J. Davies // *Chemical Research in Toxicology*. – 2001. – Vol. 14. – № 10. – P. 1453-1464.
105. Rosen, H. Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils / H. Rosen, S. J. Klebanoff, Y. Wang, N. Brot, J. W. Heinecke, X. Fu // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 44. – P. 18686-18691.
106. Stropoli, S. J. Characterization of Oxidation Products from HOCl Uptake by Microhydrated Methionine Anions Using Cryogenic Ion Vibrational Spectroscopy / S. J. Stropoli, K. Greis, T. Schleif, M. A. Johnson // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2023. – Vol. 127. – № 19. – P. 4269-4276.
107. Sjöberg, B. Methionine oxidation by hydrogen peroxide in peptides and proteins: A theoretical and Raman spectroscopy study / B. Sjöberg, S. Foley, B. Cardey, M. Fromm, M. Enescu // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. –

2018. – Vol. 188. – Methionine oxidation by hydrogen peroxide in peptides and proteins. – P. 95-99.

108. Vincent, M. S. Methionine oxidation in bacteria: A reversible post-translational modification / M. S. Vincent, B. Ezraty // *Molecular Microbiology*. – 2023. – Vol. 119. – Methionine oxidation in bacteria. – № 2. – P. 143-150.

109. Black, S. D. Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications / S. D. Black, D. R. Mould // *Analytical Biochemistry*. – 1991. – Vol. 193. – № 1. – P. 72-82.

110. Chao, C.-C. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems / C.-C. Chao, Y.-S. Ma, E. R. Stadtman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Vol. 94. – № 7. – P. 2969-2974.

111. Malle, E. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid / E. Malle, G. Marsche, J. Arnhold, M. J. Davies // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2006. – Vol. 1761. – № 4. – P. 392-415.

112. Bergt, C. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport / C. Bergt, S. Pennathur, X. Fu, J. Byun, K. O'Brien, T. O. McDonald, P. Singh, G. M. Anantharamaiah, A. Chait, J. Brunzell, R. L. Geary, J. F. Oram, J. W. Heinecke // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 35. – P. 13032-13037.

113. Mu, H. Chlorotyrosine promotes human aortic smooth muscle cell migration through increasing superoxide anion production and ERK1/2 activation / H. Mu, X. Wang, P. H. Lin, Q. Yao, C. Chen // *Atherosclerosis*. – 2008. – Vol. 201. – № 1. – P. 67-75.

114. Delporte, C. Impact of myeloperoxidase-LDL interactions on enzyme activity and subsequent posttranslational oxidative modifications of apoB-100 / C. Delporte,

K. Z. Boudjeltia, C. Noyon, P. G. Furtmüller, V. Nuyens, M.-C. Slomianny, P. Madhoun, J.-M. Desmet, P. Raynal, D. Dufour, C. N. Koyani, F. Reyé, A. Rousseau, M. Vanhaeverbeek, J. Ducobu, J.-C. Michalski, J. Nève, L. Vanhamme, C. Obinger, E. Malle, P. Van Antwerpen // *Journal of Lipid Research*. – 2014. – Vol. 55. – № 4. – P. 747-757.

115. Kettle, A. J. Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine / A. J. Kettle // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 379. – № 1. – P. 103-106.

116. Fu, S. Reactions of Hypochlorous Acid with Tyrosine and Peptidyl-tyrosyl Residues Give Dichlorinated and Aldehydic Products in Addition to 3-Chlorotyrosine / S. Fu, H. Wang, M. Davies, R. Dean // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 15. – P. 10851-10858.

117. Anderson, M. M. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. / M. M. Anderson, S. L. Hazen, F. F. Hsu, J. W. Heinecke // *Journal of Clinical Investigation*. – 1997. – Vol. 99. – № 3. – P. 424-432.

118. Nightingale, Z. D. Relative reactivity of lysine and other peptide-bound amino acids to oxidation by hypochlorite / Z. D. Nightingale, A. H. Lancha, S. K. Handelman, G. G. Dolnikowski, S. C. Busse, E. A. Dratz, J. B. Blumberg, G. J. Handelman // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – Vol. 29. – № 5. – P. 425-433.

119. Yin, V. Lysine carbonylation is a previously unrecognized contributor to peroxidase activation of cytochrome *c* by chloramine-T / V. Yin, S. H. Mian, L. Konermann // *Chemical Science*. – 2019. – Vol. 10. – № 8. – P. 2349-2359.

120. Requena, J. R. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins / J. R. Requena, C.-C. Chao,

R. L. Levine, E. R. Stadtman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 1. – P. 69-74.

121. Osberger, T. J. Oxidative diversification of amino acids and peptides by small-molecule iron catalysis / T. J. Osberger, D. C. Rogness, J. T. Kohrt, A. F. Stepan, M. C. White // *Nature*. – 2016. – Vol. 537. – № 7619. – P. 214-219.

122. Cline, M. R. Oxidation of N-hydroxy-L-arginine by hypochlorous acid to form nitroxyl (HNO) / M. R. Cline, T. A. Chavez, J. P. Toscano // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2013. – Vol. 118. – P. 148-154.

123. White, N. J. Post-translational oxidative modification of fibrinogen is associated with coagulopathy after traumatic injury / N. J. White, Y. Wang, X. Fu, J. C. Cardenas, E. J. Martin, D. F. Brophy, C. E. Wade, X. Wang, A. E. St. John, E. B. Lim, S. A. Stern, K. R. Ward, J. A. López, D. Chung // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 96. – P. 181-189.

124. Deutsch, D. G. Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography / D. G. Deutsch, E. T. Mertz // *Science*. – 1970. – Vol. 170. – Plasminogen. – № 3962. – P. 1095-1096.

125. Вассерман, Л. А. Исследование термической денатурации молекулы плазминогена при индуцированном окислении / Л. А. Вассерман, Е. С. Гаврилина, Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, М. А. Розенфельд // *Химическая физика*. – 2024. – Т. 43. – № 11. – С. 39-46.

126. Vasilyeva, A. Oxidation-induced modifications of the catalytic subunits of plasma fibrin-stabilizing factor at the different stages of its activation identified by mass spectrometry / A. Vasilyeva, L. Yurina, M. Indeykina, A. Bychkova, A. Bugrova, M. Biryukova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2018. – Vol. 1866. – № 8. – P. 875-884.

127. Han, X. PeaksPTM: Mass Spectrometry-Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications / X. Han, L. He, L. Xin, B. Shan, B. Ma // *Journal of Proteome Research*. – 2011. – Vol. 10. – PeaksPTM. – № 7. – P. 2930-2936.
128. Verrastro, I. Mass Spectrometry-Based Methods for Identifying Oxidized Proteins in Disease: Advances and Challenges / I. Verrastro, S. Pasha, K. Jensen, A. Pitt, C. Spickett // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5. – Mass Spectrometry-Based Methods for Identifying Oxidized Proteins in Disease. – № 2. – P. 378-411.
129. Zhang, J. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification / J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G. A. Lajoie, B. Ma // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2012. – Vol. 11. – PEAKS DB. – № 4. – P. M111.010587.
130. Vasilyeva, A. The effect of hypochlorite- and peroxide-induced oxidation of plasminogen on damage to the structure and biological activity / A. Vasilyeva, L. Yurina, V. Ivanov, D. Azarova, E. Gavrilina, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 206. – P. 64-73.
131. Гаврилина, Е. С. Влияние индуцированного гипохлоритом натрия окисления на структуру и функциональную активность комплекса плазминоген–стрептокиназа / Е. С. Гаврилина, А. Д. Васильева, Л. В. Юрина, А. Е. Бугрова, М. И. Индейкина, А. С. Кононихин, Е. Н. Николаев, М. А. Розенфельд // *Химическая физика*. – 2026. – Т. 45. – № 10. – С. 36-49.
132. Levine, R. L. Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation / R. L. Levine, J. Moskovitz, E. R. Stadtman // *IUBMB Life*. – 2000. – Vol. 50. – Oxidation of Methionine in Proteins. – № 4-5. – P. 301-307.
133. Walker, E. J. Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome / E. J. Walker, J. Q. Bettinger, K. A. Welle,

J. R. Hryhorenko, S. Ghaemmaghami // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116. – № 13. – P. 6081-6090.

134. Lim, J. M. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore / J. M. Lim, G. Kim, R. L. Levine // Neurochemical Research. – 2019. – Vol. 44. – Methionine in Proteins. – № 1. – P. 247-257.

135. Wu, G. Structural studies of plasmin inhibition / G. Wu, A. J. Quek, T. T. Caradoc-Davies, S. M. Ekkel, B. Mazzitelli, J. C. Whisstock, R. H. P. Law // Biochemical Society Transactions. – 2019. – Vol. 47. – № 2. – P. 541-557.

136. Cheng, J. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense / J. Cheng, G. Novati, J. Pan, C. Bycroft, A. Žemgulytė, T. Applebaum, A. Pritzel, L. H. Wong, M. Zielinski, T. Sargeant, R. G. Schneider, A. W. Senior, J. Jumper, D. Hassabis, P. Kohli, Ž. Avsec // Science. – 2023. – T. 381. – C. 6664.

137. Pejaver, V. Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria / V. Pejaver, A. B. Byrne, B.-J. Feng, K. A. Pagel, S. D. Mooney, R. Karchin, A. O'Donnell-Luria, S. M. Harrison, S. V. Tavtigian, M. S. Greenblatt, L. G. Biesecker, P. Radivojac, S. E. Brenner // The American Journal of Human Genetics. – 2022. – T. 109. – № 12. – C. 2163-2177.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Таблица А.1 – Миссенс-варианты плазминогена в позициях, соответствующих детектированным окислительным модификациям, и их оценки предикторами патогенности

Позиция	АО	Замена	SIFT	PolyPhen-2	AlphaMissense	ClinPred	REVEL
57	M	M>L	1 (tol)	0.007 (ben)	0.138 (LB)	0.020	0.194
57	M	M>T	0.1 (tol)	0.425 (ben)	0.245 (LB)	0.738	0.629
57	M	M>I	0.2 (tol)	0.052 (ben)	0.499 (AMB)	0.683	0.301
69	M	M>I	0.02 (del)	0.114 (ben)	0.341 (AMB)	0.348	0.311
78	K	K>N	0.13 (tol)	0.040 (ben)	0.296 (LB)	0.222	0.156
80	Y	Y>F	0.09 (tol)	0.294 (ben)	0.086 (LB)	0.954	0.336
108	W	W>L	0 (del)	0.999 (PD)	0.969 (LP)	0.995	0.739
182	M	M>T	0.09 (tol)	0.030 (ben)	0.081 (LB)	0.013	0.131
182	M	M>I	0.05 (tol)	0.003 (ben)	0.177 (LB)	0.052	0.074
224	P	P>T	0 (del)	0.942 (PD)	0.812 (LP)	0.993	0.772

Позиция	АО	Замена	SIFT	PolyPhen-2	AlphaMissense	ClinPred	REVEL
224	P	P>S	0.01 (del)	0.997 (PD)	0.848 (LP)	0.964	0.683
234	R	R>C	0 (del)	1.000 (PD)	0.581 (LP)	0.997	0.662
234	R	R>H	0 (del)	0.779 (PD)	0.191 (LB)	0.144	0.548
382	W	W>S	0 (del)	1.000 (PD)	0.979 (LP)	0.9999	0.776
385	M	M>V	0.01 (del)	0.074 (ben)	0.135 (LB)	0.579	0.234
385	M	M>I	0.01 (del)	0.593 (PD)	0.677 (LP)	0.700	0.344
404	M	M>V	0.03 (del)	0.358 (ben)	0.139 (LB)	0.349	0.127
404	M	M>I	0.01 (del)	0.540 (PD)	0.579 (LP)	0.361	0.237
427	W	W>G	0.02 (del)	0.453 (PD)	0.908 (LP)	0.9996	0.517
463	M	M>T	0.28 (tol)	0.358 (ben)	0.281 (LB)	0.499	0.300
463	M	M>I	0.33 (tol)	0.006 (ben)	0.177 (LB)	0.028	0.086
485	D	D>N	0.13 (tol)	0.042 (ben)	0.085 (LB)	0.472	0.127

Позиция	АО	Замена	SIFT	PolyPhen-2	AlphaMissense	ClinPred	REVEL
485	D	D>H	0.04 (del)	0.010 (ben)	0.162 (LB)	0.275	0.151
485	D	D>E	1 (tol)	0 (ben)	0.070 (LB)	0.089	0.081
585	M	M>V	0.78 (tol)	0.029 (ben)	0.079 (LB)	0.555	0.262
585	M	M>T	0.34 (tol)	0.007 (ben)	0.087 (LB)	0.043	0.276
585	M	M>I	1 (tol)	0 (ben)	0.142 (LB)	0.051	0.233
672	Y	Y>N	0.01 (del)	0.987 (PD)	0.187 (LB)	0.938	0.301
761	W	W>R	0.01 (del)	1.000 (PD)	0.843 (LP)	0.993	0.871
788	M	M>L	0.02 (del)	0.265 (ben)	0.203 (LB)	0.703	0.532
788	M	M>K	0.01 (del)	0.894 (PD)	0.246 (LB)	0.984	0.792
788	M	M>T	0.01 (del)	0.841 (PD)	0.456 (AMB)	0.982	0.698
788	M	M>I	0.57 (tol)	0.045 (ben)	0.355 (AMB)	0.603	0.323

Обозначения: tol – терпимо; del – вредоносный; ben – доброкачественный; PD – потенциально вредный (0.5–0.85) или вероятно, наносящий ущерб (≥ 0.85); LB – вероятно доброкачественный; AMB – двусмысленный; LP – вероятно патогенный.