

На правах рукописи

Васильева
Александра Дмитриевна

ИНДУЦИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ КОАГУЛЯЦИОННОГО
ФАКТОРА XIII: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: **Розенфельд Марк Александрович**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Пантелеев Михаил Александрович**, доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Козин Сергей Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « » _____ 2020 года в ___ часов ___ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д.4

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 11991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на веб-сайте:

biochemphysics.ru/assets/upload/Диссертация_Васильева.pdf

Автореферат разослан « » _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 002.039.01, кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Степень разработанности темы исследования.

Окислительно-восстановительные процессы, протекающие в живом организме, имеют фундаментальное значение как для нормального клеточного и плазменного гомеостаза, так и для патологических состояний, связанных с окислительным стрессом. В организме человека более 95% свободных радикалов относятся к свободным радикалам кислорода. Активные формы кислорода (АФК) функционируют не только как сигнальные молекулы, но и как окислительно-восстановительные регуляторы белковой функции. При патологических состояниях измененный окислительно-восстановительный баланс может вызвать дисфункцию в каскаде свертывания крови и повлиять на равновесие между прокоагулянтной, антикоагулянтной и фибринолитической системами, способствуя тромботическим заболеваниям.

Известно, что многие белки, участвующие в процессе свертывания крови, способны подвергаться окислительным модификациям как *in vitro*, так и *in vivo*, приводящим к нарушению их структуры и функции. В этом отношении, коагуляционный фактор XIII (FXIII), представляющий собой один из ключевых факторов свертывания крови, является наименее изученным белком.

FXIII, который циркулирует в крови в качестве профермента и превращается в активную форму (FXIIIa) под действием тромбина и ионов кальция, играет важнейшую роль в поддержании гемостаза благодаря как ковалентному сшиванию сформированных полимеров фибрина, делая их устойчивыми к лизису плазмином, так и сшиванию фибрина с белками фибринолитической системы. Поэтому нарушение функций FXIIIa может способствовать возникновению дисбаланса между коагуляционной и фибринолитической системами. В этой связи изучение окислительной модификации FXIII при действии на него АФК и возникающие вследствие этого структурные и функциональные нарушения имеют огромное значение для понимания последствий окисления в регуляции гемостаза.

Картирование окислительных сайтов, образующихся при действии АФК на FXIII на различных ступенях его активации, впервые даст возможность провести корреляцию между модификациями отдельных аминокислотных остатков, химической природой этих модификаций, степенью их окисления и функциональными свойствами белка. В конечном итоге, это позволит оценить

возможность образования *in vivo*, в условиях окислительного стресса, аномальной структуры фермента FXIIIa, характеризующегося сниженной трансглутаминазной активностью. Важно отметить, что снижение способности FXIIIa к ковалентной стабилизации фибринового геля можно рассматривать как неизвестный ранее компенсаторный механизм, позволяющий снизить устойчивость к плазминовому гидролизу сгустка, образованного из окисленного фибриногена.

Цель и задачи исследования.

Цель исследования состояла в выявлении механизмов нарушения молекулярной структуры и функциональной активности FXIII на отдельных стадиях его активации при озон- и гипохлорит индуцированном окислении.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1) Методом ВЭЖХ-МС/МС выявить набор модифицированных аминокислотных остатков, определить химическую природу этих модификаций, а также процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков в контрольных и окисленных образцах FXIII на отдельных стадиях его активации: а) в неактивированном состоянии (FXIII), б) при частичной активации ионами кальция (FXIII+Ca²⁺) и в) при полной активации (ионами кальция и тромбином) FXIII+Ca²⁺/Thr.

2) Выявить ряд наиболее подверженных окислительной модификации структурных элементов молекулы FXIII.

3) Определить трансглутаминазную активность FXIIIa, образованного из контрольных и окисленных гипохлоритом образцов FXIII на различных стадиях его активации, используя метод ПААГ-электрофореза.

4) Оценить вклад некоторых аминокислотных остатков, пространственной структуры FXIII и её изменений в процессе активации в резистентность профермента к действию окислителей.

Научная новизна.

1) Впервые было исследовано вызванное окислением повреждение в первичной структуре FXIII на различных стадиях его превращения в активную форму. Методом масс-спектрометрии было показано, что окисление затрагивало как все структурные области каталитической FXIII-A субъединицы белка, за исключением активационного пептида, так и некоторые sushi-домены регуляторной FXIII-B субъединицы.

2) Впервые была показана уязвимость FXIII к индуцированному окислению в процессе его превращения в FXIIIa. Степень уязвимости возрастала в последовательности: профермент, FXIII < FXIII+Ca²⁺ << FXIII+Ca²⁺/тромбин (FXIIIa). При активации профермента, часть первоначально не расположенных на

поверхности белковой глобулы аминокислотных остатков становится мишенями для окислителей.

3) Впервые было установлено, что активность FXIIIa, образованного из окисленных форм профермента, полностью сохранялась, т.е. была равна активности неокисленного фермента, в то время как непосредственно окисленный FXIIIa демонстрировал резкое снижение своей трансглутаминазной активности. То, что FXIIIa, полученный из окисленного профермента, не терял ферментативной активности позволило впервые предположить, что ряд обнаруженных в каталитической субъединице остатков, в том числе метионина и цистеина, располагаются на поверхности молекулы и служат в качестве перехватчиков АФК. Кроме того, было показано, что определенный вклад в окислительную резистентность профермента вносят регуляторные FXIII-B субъединицы, также способные частично перехватывать молекулы окислителя. Результаты, полученные автором диссертационной работы, являются оригинальными и обладают научной новизной, что подтверждается публикациями в высокорейтинговых отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В условиях окислительного стресса, локальный уровень НОС1/–ОС1 при воспалении может достигать миллимолярных концентраций. Связываясь с активированными лейкоцитами через фибриноген, FXIII оказывается в очаге воспаления, что приводит к повреждению структуры FXIIIa и образованию физиологически неполноценного, слабо сшитого фибрина. Поскольку образующиеся α -полимеры, ковалентное сшивание которых катализируется FXIIIa, вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмином, их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда из фибриногена, поврежденного окислением, образуется устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой. Таким образом, полученные результаты дают новое понимание связи между тромбозом, структурой фибрина и воспалительными процессами.

Методология и методы исследования

Поиск модифицированных аминокислотных остатков осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС на нано-ЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Триптические пептиды FXIII были идентифицированы путем поиска по базе данных UniProtKB (UP000005640-9606

HUMAN, Homo sapiens) с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (v. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada).

Ферментативную активность FXIIIa оценивали методом электрофореза, анализируя накопление γ - γ -димеров и α -полимеров в ковалентно-сшитых образцах фибрина, а также проводя измерения методом колориметрии с использованием набора The BioVision Colorimetric FXIIIa Activity Assay Kit, BioVision (USA).

Положения, выносимые на защиту

1. На основании исследования методом ВЭЖХ-МС/МС контрольных и окисленных образцов FXIII на отдельных стадиях его активации показано, что наибольшее количество и процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков (по отношению к количеству аминокислотных остатков, входящих в МС-покрытие), наблюдалось в окисленных образцах активированной формы FXIIIa.

2. На основании анализа результатов, полученных методом ВЭЖХ-МС/МС показано, что наиболее подверженными окислительной модификации структурными элементами оказались β -баррель 2 каталитической субъединицы (FXIII-A) и 8-й суши-домен регуляторной субъединицы (FXIII-B).

3. При анализе методом ПААГ-электрофореза способности FXIIIa, образованного из исследуемых групп образцов, катализировать образование межмолекулярных ковалентных сшивок, было показано, что наибольшую трансклутаминазную активность по сравнению с контрольным образцом сохраняет FXIIIa, образованный из окисленного профермента (FXIII).

4. Обнаруженное в проферменте FXIII большое количество окисленных остатков метионина и цистеина, способных выполнять функции перехватчиков свободных радикалов, плотная упаковка тетрамерной структуры профермента, а также защитная функция субъединиц FXIII-B, представляют собой основные три фактора, которые обеспечивают резистентность белка к действию окислителей.

Личный вклад диссертанта.

Автор принимал участие в постановке задач и планировании экспериментов, самостоятельно проводил поиск и анализ литературных данных, непосредственно участвовал в выполнении экспериментальных работ, обработке полученных результатов и подготовке их к публикации. Материалы диссертации доложены автором в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях, форумах и конгрессах.

Исследования, проведенные на приборах центра коллективного пользования ИБХФ РАН (высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-

спектрометрией высокого разрешения (ВЭХЖ-МС/МС)) выполнялись в соавторстве с, к.б.н. Бугровой А.Е., н.с. Индейкиной М.И. и к.ф-м.н. Кононихиным А.С.

Достоверность полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов обеспечена использованием современных и общепринятых методов исследования белков, их структуры и функциональной активности, а также специального программного обеспечения, использующего уникальные алгоритмы обработки данных и статистическую оценку погрешности. Достоверность данных подкрепляется как согласованностью результатов, полученных различными методами исследования, так и литературными данными. В работе использовалось современное оборудование ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

Апробация работы.

Результаты диссертации были представлены на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и XII съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, 2016); XI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. (г. Москва, 2016); Международном семинаре 2nd International Factor XIII Workshop (Венгрия, 2016); Международном конгрессе 3rd Congress on Controversies in Thrombosis & Hemostasis (CiTH), (г. Москва, 2016); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (г. Москва, 2017); Международной школе-конференции «Биология - наука XXI века», (г. Пущино, 2017); Международном симпозиуме Debrecen University Symposium „Transglutaminases in Medicine”(Венгрия, 2017); Международном симпозиуме 31st Annual Symposium of The Protein Society, (Канада, 2017); Международной конференции The Annual Scientific Meeting «Clinical proteomics. Postgenome medicine», (г.Москва, 2017); Международном конгрессе The FEBS Congress (Чехия, 2018); Международной конференции 22-International mass spectrometry conference (IMSC), (Италия, 2018); Международной конференции 12th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”, (г. Санкт-Петербург, 2019).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них – 6 статей в международных и российских рецензируемых научных изданиях,

рекомендованных ВАК; 12 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 138 страницах, содержит 23 рисунка, 7 таблиц и 1 приложение. Список литературы включает 231 источник. Диссертация состоит из введения; главы литературного обзора; главы, описывающей материалы и методы; главы, включающей результаты экспериментов; главы, включающей обсуждение полученных результатов; заключения; выводов; списка сокращений; списка литературы; приложения.

Сокращения, принятые в работе

CID – (collision-induced dissociation) фрагментация, индуцированная соударением; **FDR** – уровень допустимого ложного обнаружения; **HEPES** – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; **PDB** – банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот; **PTM** – посттрансляционные модификации; **UNIMOD** – банк данных посттрансляционных модификаций белков; **XO** – ксантиноксидаза; **АФК** – активные формы кислорода; **ВЭЖХ-МС/МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией; **ИЦР** – ионно-циклотронный резонанс; **МС** – масс-спектрометрия; **МС/МС** – тандемная масс-спектрометрия; **ПААГ** – полиакриламидный гель.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Белки – уязвимая мишень для активных форм кислорода (АФК)

Рассмотрены аспекты окисления белков активными формами кислорода (АФК), виды АФК и механизмы их действия. Проанализированы особенности окисления внутриклеточных и внеклеточных белков, основные системы антиоксидантной защиты человеческого организма, а также изменения в функционировании некоторых белков при окислении.

Глава 2. Современные представления о структуре коагуляционного фактора XIII (FXIII) и его роли в гемостазе

В **Главе 2** проанализированы литературные данные о гетеротетрамерной структуре профермента FXIII, его субъединицах и особенностях стадий активации белка; рассмотрена функциональная роль FXIII в системе гемостаза.

Глава 3. Материалы и методы.

Коагуляционный фактор XIII и фибриноген выделяли из пула донорской цитратной плазмы крови. FXIII выделяли модифицированным методом фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-ToyoPearl M650 (Tosoh, Япония), впервые описанным Л. Лорандом. Фибриноген выделяли методом многократного переосаждения глицином.

Растворы групп образцов FXIII в Tris-HCl 0,05M буфере с 0,15 M NaCl (pH 7,5) озонировали в кварцевом реакторе объемом 5,5 мл. Исходная концентрация озона и его полное истощение в каждом эксперименте (по истечении 10 минут инкубации раствора белка в реакторе при 37°C с постоянным перемешиванием) было подтверждено спектрофотометрическими измерениями при 254 нм. Количество окислителя было равно 50 мкМ на 1 мг белка.

Обработку образцов гипохлоритом осуществляли в буферном растворе, содержащем 44 mM HEPES и 0,15 M NaCl с pH 7,4. Окисление образцов FXIII проводили раствором гипохлорита натрия (Sigma, SHBJ5633) при температуре 37°C, 1 час, при постоянном перемешивании. Количество окислителя составляло 50 и 150 мкМ. Реакцию останавливали добавлением десятикратного молярного избытка L-метионина по отношению к окислителю. Для последующих работ образцы снова переводили в буфер 0,05 M Tris-HCl с 0,15 M NaCl pH 7,5 с использованием ультрацентрифужных фильтров Amicon Ultra-0.5 mL (10 kDa, UFC501096).

Анализ активности FXIII проводили с использованием набора The BioVision Colorimetric FXIIIa Activity Assay Kit, BioVision (USA).

Детектирование сохранения способности FXIII к ковалентному сшиванию цепей фибриногена при окислении осуществляли методом ПААГ-электрофореза.

Для подготовки образцов к анализу методом ВЭЖХ-МС/МС, их подвергали ферментативному гидролизу трипсином или последовательно ферментами Glu-C и трипсином, если это было необходимо, при соотношении гидролизующий фермент / образец 1:50 (например, 2 мкг трипсина / 100 мкг FXIII) 16 часов при 37°C. Полученные пептиды затем концентрировали и обессоливали на картриджах ZipTip с обращенной фазой C18 согласно стандартному протоколу производителя (Millipore).

Эксперименты ВЭЖХ-МС/МС проводились с использованием nano-LC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), соединенным с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Масс-спектрометрический анализ пептидных фракций проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Electron, Бремен,

Германия) с автоматическим измерением спектров в 2-стадийном режиме. На первом этапе точные массы пептидов были измерены в ячейке ионного циклотронного резонанса в диапазоне $m/z = 300-1600$ с разрешением $R = 50000$ при $m/z = 400$ (количество ионов в ячейке было установлено на 5×10^6). На втором этапе пять наиболее интенсивных пиков с первого этапа подвергались фрагментации, индуцированной соударением, и спектры фрагментов регистрировались в линейной ионной ловушке (число ионов в LTQ было установлено 3×10^4). После фрагментации соответствующие родительские массы были динамически исключены из рассмотрения в течение следующих 30 с.

Полученные при ферментативном гидролизе пептиды FXIII были идентифицированы путем поиска в базе данных UniProtKB (UP000005640-9606 HUMAN, Homo sapiens) с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (v. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada).

Степень окисления для каждого типа модификации аминокислотного остатка рассчитывали, как сумму площадей пептидов, несущих определенную окислительную модификацию этого аминокислотного остатка, нормированную на общую площадь всех пептидных форм (окисленных и не окисленных), содержащих этот аминокислотный остаток. Общую степень окисления аминокислотного остатка рассчитывали, как сумму процентов всех типов модификации для конкретного аминокислотного остатка. Каждый из аминокислотных остатков, окисленных по меньшей мере на 1% (степень модификации $> 1\%$), считался модифицированным.

Все представленные в работе численные данные являются средними значениями, полученными как минимум из трех повторов экспериментов. Статистический анализ результатов, полученных методом ВЭЖХ-МС/МС, проводили с использованием программного обеспечения Peaks Studio 8.5 (Bioinformatic Solutions Inc., Canada) в рамках используемых программой алгоритмов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 4. Озон-индуцированное окисление FXIII

В Главе 4 рассмотрены последствия действия озона на первичную структуру каталитической субъединицы FXIII. Озон, не относящийся к семейству физиологических окислителей, генерирует гидроксильные радикалы, способные также модифицировать белки. Это подразумевает, что окисление белков озоном осуществляется системой – $O_3/HO\cdot$, в какой-то степени, имитирующей систему Фентона.

Окислительные модификации субъединицы FXIII-A были обнаружены для аминокислотных остатков Met, Trp, Tyr, Lys, Cys, Asp, Pro, His, Arg, Glu. Список обнаруженных окислительных модификаций аминокислотных остатков и их характеристики (изменение моноизотопной массы аминокислотного остатка и химический состав) представлены в Таблице 1. За исключением активационного пептида, окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных элементах субъединицы FXIII-A.

Независимо от стадии активации, наиболее окисленными доменами по количественным параметрам являются β -баррель 2 и β -сэндвич - $8,1 \pm 0,1\%$, $8,9 \pm 0,1\%$, $7,9 \pm 0,1\%$ и $4,4 \pm 0,1\%$, $7,8 \pm 0,1\%$, $7,9 \pm 0,1\%$ для образцов окисленного FXIII, FXIII+Ca²⁺ и FXIII+Ca²⁺/Thr, соответственно. Домен каталитического ядра имеет степень окисления - $2,4 \pm 0,1\%$, $3,4 \pm 0,1\%$, $5,5 \pm 0,1\%$ для окисленных образцов FXIII, FXIII+Ca²⁺ и FXIII+Ca²⁺/Thr, соответственно.

Таблица 1. Список окислительных модификаций, обнаруженных при обработке результатов, и количество этих модификаций в окисленных образцах.

Δm (моноизотопная масса)	Международное название (UNIMOD)	Изменения в химическом составе аминокислоты	FXIII	FXIII+C a ²⁺	FXIII+C a ²⁺ /Thr
+15.994915	Oxidation	O	+ (16)	+ (22)	+ (8)
+31.989828	Dioxidation	O(2)	+ (7)	+ (10)	+ (3)
+47.984745	Trioxidation	O(3)	+ (4)	+ (3)	+ (2)
+27.994915	Formylation	C O	+ (2)	+ (3)	+ (1)
+43.989829	Carboxylation	C O(2)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
+3.994915	Tryptophan oxidation to kynurenin	C(-1) O	+ (1)	+ (1)	+ (1)
-23.015984	Histidine oxidation to asparagine	H(-1) C(-2) N(-1) O	+ (3)	+ (3)	+ (1)
-22.031969	Histidine oxidation to aspartic acid	H(-2) C(-2) N(-2) O(2)	+ (4)	+ (4)	+ (4)
-48.003371	Dethiomethyl	H(-4) C(-1) S(-1)	-	-	+ (1)

Самые высокие значения как количества модифицированных аминокислотных остатков, так и степени их модификации среди различных образцов по отношению к МС-покрытию, соответствуют образцу FXIII+Ca²⁺/Thr, в то время как самые низкие значения характерны для образца окисленного профермента.

Обнаружено, что аминокислотные остатки в исследуемых образцах модифицируются до разных уровней окисления под воздействием окислителя. Таким образом, среди модификаций могут быть случаи с добавлением одного (+15,99), двух (+31,99) и трех (+47,98) атомов кислорода одновременно, а также некоторых других типов окислительной модификаций, специфичных для

определенных типов аминокислотных остатков. При сравнении образцов окисленного FXIII и FXIII+Ca²⁺/Thr наблюдается увеличение доли модификаций с добавлением двух или трех атомов кислорода, что, в свою очередь, также указывает на увеличение степени окисления в каталитической FXIII-A при полной активации FXIII.

При анализе сайтов окисления, выявленных в образце FXIII+Ca²⁺, обработанного озоном, можно увидеть, что набор аминокислотных остатков, чувствительных к окислительному воздействию, несколько увеличен по сравнению с образцом без Ca²⁺ и общая степень окисления для остатков в этих образцах различаются. Сайты окисления в FXIII с Ca²⁺ преимущественно имеют тенденцию к более выраженной модификации (Рисунок 1). Эти результаты могут быть объяснены влиянием Ca²⁺ на структуру FXIII. Физиологически ионы кальция необходимы для активации FXIII. При связывании кальция, взаимодействия между гетеро-субъединицами А и В в проферменте ослабляются, что сопровождается как увеличением размеров макромолекул, так и конформационными изменениями в димере FXIII-A₂.

Данные ВЭЖХ-МС/МС, касающиеся окисления полностью активированного FXIII+Ca²⁺/Thr, обработанного тромбином и Ca²⁺, ясно показывают, что в отличие от образцов не активированного FXIII или FXIII+Ca²⁺, МС-покрытие молекулы FXIII-A, а, следовательно, и количество участков окисления, существенно снижается. Уменьшение покрытия при окислении образцов можно объяснить несколькими факторами. Окисление боковых цепей Arg, Lys, Glu и Asp устраняет их как сайты узнавания для расщепления ферментами, увеличивая тем самым размер образующихся пептидов. Кроме того, может происходить перекрестное сшивание белков, что также снижает количество детектированных пептидов, поскольку образование дополнительных ковалентных связей ограничивает как гидролиз белка, так и идентификацию сшитых пептидов, имеющих несоответствующую последовательности молекулярную массу.

Причиной исчезновения ранее присутствующих (в контрольных образцах) пептидов из МС-покрытия является большое количество окислительных модификаций, поскольку в анализ включены определенные ограничения - для каждого пептида был запрограммирован поиск до 3 различных модификаций, чтобы избежать экспоненциального роста пространства поиска и уменьшить количество ложных случайных совпадений. Другая причина уменьшения или увеличения МС-покрытия в образцах может заключаться в конформационном состоянии нативной молекулы FXIII, в которой некоторые сайты недоступны для ферментативного расщепления.

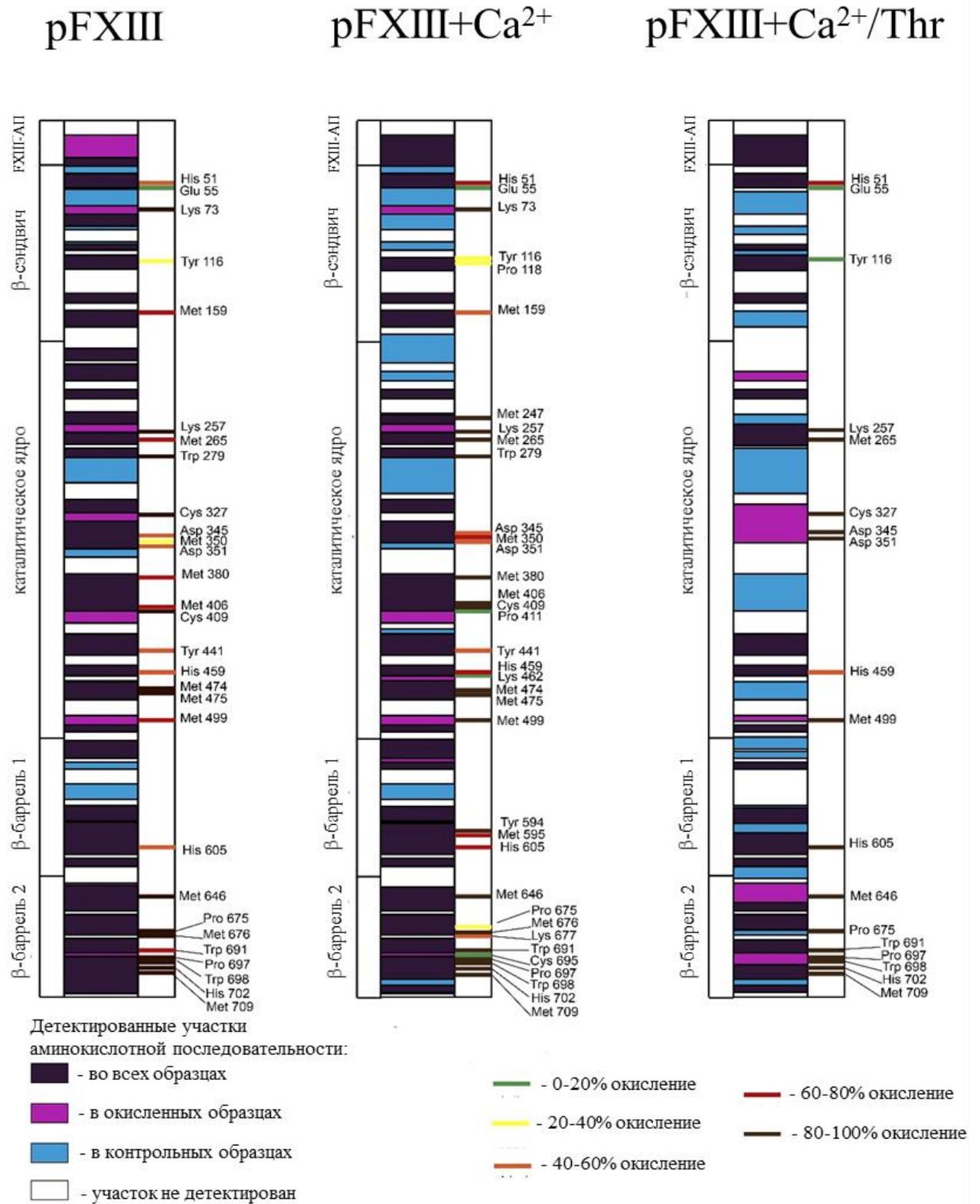


Рисунок 1. МС-покрытие последовательности (левые столбцы) и окислительные модификации в каталитической FXIII-A субъединице образцов FXIII, подвергнутых воздействию озона на разных стадиях активации FXIII. Цветовые обозначения МС-покрытия и степени окисления аминокислотных остатков (диапазоны процентов степени окисления) расшифрованы на рисунке.

Окисление может изменить конформацию белка, делая некоторые участки цепи, ранее не детектированные, доступными для гидролиза. В соответствии с данными ВЭЖХ-МС/МС, можно предположить, что в процессе превращения профермента в ферментативную форму новые, ранее не подвергшиеся воздействию аминокислотные остатки становятся доступными для действия АФК, в то время как некоторые из первоначально экспонированных на поверхности остатков могут мигрировать вглубь белковой глобулы.

Глава 5. Гипохлорит-индуцированная модификация FXIII

В главе описаны результаты окислительной модификации, полученные при обработке FXIII гипохлоритом, взятом в количествах, близких к физиологическим.

Окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных элементах субъединицы FXIII-A, за исключением N-концевого активационного пептида.

При сравнении окислительных модификаций всей молекулы FXIII на разных этапах ее активации можно отметить, что ферментативная форма FXIII (FXIII +Ca²⁺/Thr) является наиболее уязвимой к окислению. Для всех образцов, максимально чувствительными к окислению были структурные области субъединицы FXIII-A – β-баррель 2 и каталитическое ядро. При окислении различных образцов FXIII с помощью 50 и 150 мкМ гипохлорита относительное количество поврежденных аминокислотных остатков в β-баррель 2 составляло 4,4±0,1% для FXIII; 4,4±0,1% для FXIII+Ca²⁺; 5,9±0,1% и 5,4±0,1% для FXIII+Ca²⁺/Thr, соответственно. Для каталитического ядра, эти параметры для образцов не активированного FXIII, FXIII+Ca²⁺ и FXIII+Ca²⁺/Thr, обработанных 50 или 150 мкМ гипохлоритом, были равны 3,4±0,1%; 3,7±0,1%; 3,5±0,1% и 5,1±0,1%, соответственно.

Как и в случае каталитической субъединицы, результаты масс-спектрометрии показывают, что регуляторная субъединица претерпевает наибольшее изменение в образце FXIII, полностью активированного совместным действием ионов кальция и тромбина.

Наиболее легко окисляемой структурной областью в структуре FXIII-B субъединицы является восьмой суши-домен, в котором количество модифицированных аминокислотных остатков достигало максимальных значений в окисленном образце FXIII-Ca²⁺/Thr (13,0±0,5% для 50 мкМ HOCl/OCl⁻; 18,0±0,7% для 150 мкМ HOCl/OCl⁻, соответственно). Список обнаруженных окислительных модификаций приведен в Таблице 2.

Как следует из МС-данных, критически важные для функционирования FXIII аминокислотные остатки Tyr560 и Trp279 остаются в нативном виде для всех образцов. Однако резкая потеря активности FXIIIa при воздействии гипохлорита, может быть вызвана повреждением аминокислотных остатков, Trp130 и Cys695, а также Tyr311 и Trp315, расположенных в непосредственной близости от каталитического центра фермента (Рисунок 2). Из-за недостатка знаний о функциональности каждого из этих остатков можно предположить, что они наделены определенными функциями, которые в той или иной степени могут влиять на активность фермента.

Таблица 2. Список обнаруженных окислительных модификаций и их количество для окисленных 50 и 150 мкМ HOCl/OCl в субъединицах FXIII-A и FXIII-B.

Δm (изменение моноизотопно й массы)	Международное название (UNIMOD)	Изменения в химическом составе аминокисло ты	FXIII		FXIII+Ca ²⁺		FXIII+Ca ²⁺ /Thr	
			50 μM HOCl/ OCl	150 μM HOCl/ OCl	50 μM HOCl/ OCl	150 μM HOCl/ OCl	50 μM HOCl/ OCl	150 μM HOCl/ OCl
+15.994915	Oxidation	O	19	20	19	19	26	28
+31.989828	Dioxidation	O (2)			1		1	1
+ 47.984744	Trioxidation	O (3)	5	5	3	5	5	7
+27.994915	Formylation	C O	-	-	-	-	1	1
-48.003371	Prompt loss of side chain from oxidised Methionine	H (-4) C (-1) S (-1)	1	1	2	2	2	3
+3.994915	Tryptophan oxidation to kynurenin	C(-1) O	-	-	-	2	1	2
+13.979265	Tryptophan oxidation to oxolactone	H(-2) O	2	2	2	3	4	4
+19.989829	Tryptophan oxidation to hydroxykynurenin	C(-1) O(2)	1	-	1	-	-	-
+33.961028	Chlorination of tyrosine residues	H(-1) Cl	-	-	-	-	-	2
+14.9632	Lysine oxidation to α-aminoadipic acid	H(-3) N(-1) O(2)	1	1	1	1	-	-
-33,987721	Dehydroalanine (from Cysteine)	H(-2) S(-1)	2	2	2	3	1	3
-27.994915	Pyrrolidone from Proline	C(-1) O(-1)	-	-	-	-	1	1

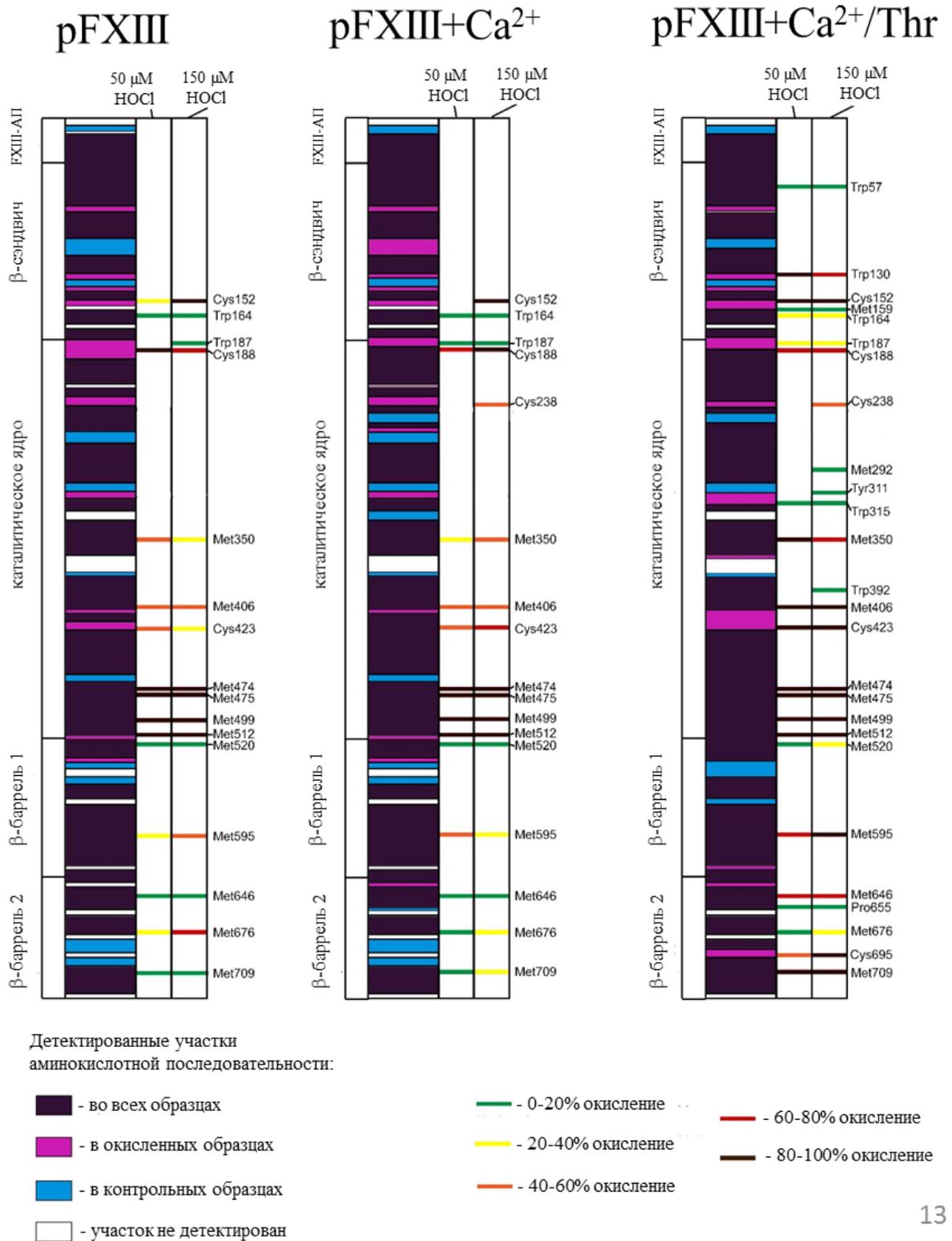


Рисунок 2. МС-покрытие последовательности (левые столбцы) и окислительные модификации в каталитической FXIII-A субъединице образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (средние столбцы) и 150 мкМ гипохлорита (правые столбцы) на разных стадиях активации FXIII. Цветовые обозначения МС-покрытия и степени окисления аминокислотных остатков (диапазоны процентов степени окисления) расшифрованы на рисунке.

Данные масс-спектрометрии показали значительный вклад серосодержащих остатков метионинов и цистинов субъединиц FXIII-B₂ в общее количество сайтов окисления FXIII (Рисунок 3) FXIII-B содержит много остатков цистина, которые обладают высокой реакционной способностью к гипохлориту. Важно отметить, что, как и каталитическая субъединица, уязвимость регуляторной субъединицы к индуцированному окислению увеличивается с активацией FXIII в следующем порядке: нативный FXIII < FXIII+Ca²⁺ < FXIII+Ca²⁺/Thr. Возникновение новых сайтов окисления в FXIII-B на последней стадии активации FXIII+Ca²⁺/Thr (Tyr 26, Cys 39 и Met 94) именно в суши-доменах 1 и 2, в основном ответственных за, взаимодействие между FXIII-A и FXIII-B согласуется с ранее полученными результатами, характеризующими поведение гетеротетрамера при активации.

Окисление гипохлоритом образцов FXIII не оказывало влияния на последующий процесс ковалентного сшивания фибриновой сети активированным из них FXIIIa. В сравнении с FXIIIa, образованным из окисленного профермента, FXIIIa, образованный из окисленных образцов FXIII+Ca²⁺, незначительно теряет свои свойства. В этом случае содержание образующихся γ - γ -димеров остается неизменным, в то время как содержание накопленных α - α -полимеров в фибрине незначительно уменьшается. Это указывает на то, что трансклутаминазная активность окисленного белка в образцах, частично активированных кальцием, практически полностью сохраняется при его инкубации с 50 или 150 мкМ гипохлоритом.

FXIII+Ca²⁺/Thr, обработанный 50 мкМ HOCl/OCl⁻, показал значительное снижение ферментативной активности, о чем свидетельствуют как умеренное содержание γ - γ -димеров, так и следовые количества α - α -полимеров. Окисление 150 мкМ гипохлорита привело к значительному сохранению исходных полипептидных цепей γ и α в фибриногене с небольшим приростом γ - γ -димеров. Эти данные показывают, что ферментативная активность сильно зависит от стадии активации FXIII, на которой проводилось окисление (Рисунок 4).

Значения трансклутаминазной активности, измеренные колориметрическим методом для различных образцов FXIII, также подтвердили этот вывод. Для не окисленного FXIII и окисленного (50 мкМ и 150 мкМ гипохлорита) FXIII значения трансклутаминазной активности не изменились в пределах ошибки измерения и составили 1836 ± 55 , 1830 ± 49 и 1790 ± 51 по Loewy U мг⁻¹, соответственно. Результаты колориметрического метода показали, что значение трансклутаминазной активности FXIII в образце FXIII + Ca²⁺ составляло 1841 ± 62 Loewy U мг⁻¹, а затем снижалось до 1804 ± 57 и 1710 ± 41 Loewy U мг⁻¹ при инкубации с 50 или 150 мкМ гипохлоритом.

При окислении FXIII + Ca²⁺/Thr трансклутаминазная активность существенно снижалась по сравнению с контрольным образцом даже при окислении 50 мкМ HOCl (с 1812 ± 61 до 886 ± 43 U mg⁻¹ по Loewy), тогда так при большем количестве окислителя, 150 мкМ HOCl, активность снижалась до 532 ± 31 U mg⁻¹ по Loewy.

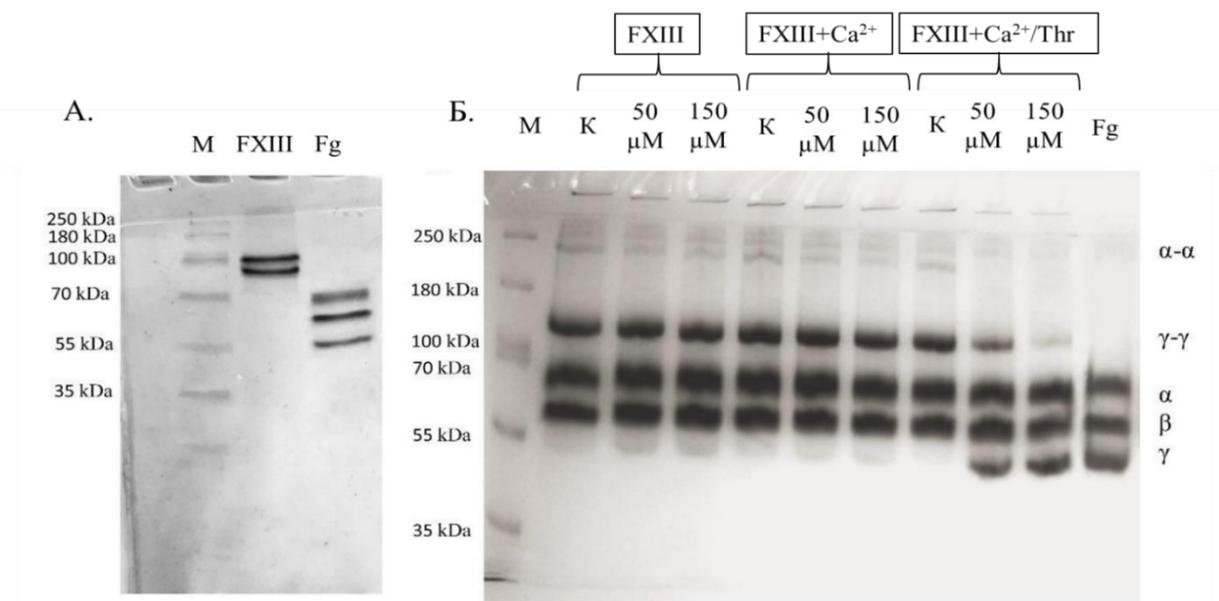


Рисунок 4. Электрофоретический анализ гомогенности выделенных белков (А) и способности FXIII к образованию шитых α-полимеров и γ-димеров (Б). А: слева направо - маркеры молекулярной массы, выделенные из плазмы крови человека FXIII и фибриноген. Б: слева направо – маркеры молекулярной массы, фибриновые цепи, шитые неокисленными (К) и окисленными (50 или 150 μМ гипохлорита) образцами FXIII на разных стадиях активации и образец необработанного FXIII фибриногена. Белковые полосы визуализировали окрашиванием Кумасси синим R250.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При патологических состояниях измененный окислительно-восстановительный баланс может вызвать дисфункцию в каскаде свертывания крови и повлиять на равновесие между прокоагулянтной, антикоагулянтной и фибринолитической системами, способствуя тромботическим заболеваниям. Нарушение функций FXIII при его окислении может способствовать возникновению дисбаланса между коагуляционной и фибринолитической системами. Однако, в этом отношении, FXIII, представляющий собой один из ключевых факторов свертывания крови, является наименее изученным белком.

В настоящей работе впервые было исследовано вызванное индуцированным окислением повреждение первичной структуры FXIII на различных стадиях его активации. Методом ВЭЖХ-МС/МС был выявлен набор модифицированных аминокислотных остатков, определена химическая природа этих модификаций, а

также процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков в контрольных и окисленных образцах FXIII на отдельных стадиях его активации. Степень уязвимости белка к окислению возрастала в последовательности: профермент, FXIII < FXIII+Ca²⁺ << FXIII+Ca²⁺/тромбин (FXIIIa). Результаты ВЭЖХ-МС/МС убедительно свидетельствует о том, что целый ряд модифицированных аминокислотных остатков является общим как при действии на белок озона/НО[•], так и гипохлорита. В первую очередь это можно отнести к остаткам метионина, которые, во-первых, в избыточном количестве присутствуют в первичной структуре белка, а во-вторых, наряду с остатками цистеина являются самыми высокорекрационными при взаимодействии с окислителями. Большое количество Met в субъединице FXIII-A, многие из которых экспонированы на поверхности белка, может способствовать первичной антиоксидантной защите профермента от окислительного повреждения. Это объясняет полное сохранение активности фермента, образованного из окисленного профермента в независимости от степени его окисления. Сохранение функциональной полноценности окисленного профермента свидетельствует также о том, что Cys152, Cys188 и Cys423 на FXIII-A субъединице также не являются функционально значимыми и служат дополнительными антиоксидантными ловушками, которые вместе с остатками Met способны защищать каталитический центр белка от окисления.

Другое интересное наблюдение состоит в том, что вне зависимости от типа окислителя, процент окисленных аминокислотных остатков возрастал не только при увеличении концентрации окислителя, но и коррелировал со степенью активации FXIII, на котором производилось окисление. Отражением этого является окислительная уязвимость активированного фермента в сравнении с проферментом. Это может быть обусловлено ослаблением стабилизирующей роли регуляторных FXIII-B субъединиц.

Известно, что в нативной конформации взаимодействия между всеми четырьмя субъединицами FXIII обеспечивают наиболее компактную глобулярную структуру мультимерного белкового комплекса. Вследствие этого вход в каталитический центр закрыт для любых веществ, в том числе для малых молекул, таких как молекулы озона и гипохлорита.

В целом, способность белков плазмы крови к антиоксидантной самозащите может быть одним из ведущих механизмов, в поддержании структуры и функции белков при окислении в среде, генерирующей АФК. В заключении стоит отметить, что в текущем исследовании результаты получены с использованием изолированного FXIII, в то время как в кровотоке FXIII циркулирует вместе с другими белками, превалирующими по концентрации. Каждый из белков плазмы

крови способен перехватывать АФК, тем самым, вероятно, ограничивая окисление FXIII в плазме крови здоровых людей. Поскольку FXIII циркулирует в плазме со средней концентрацией 21,6 мкг/мл, можно предположить, что белок остается либо не модифицированным, либо незначительно окисленным. В последнем случае окислению могут подвергаться только те аминокислотные остатки (например, остатки Met), которые не являются жизненно важными.

Однако в месте воспаления локальный уровень $\text{НОС1}^-/\text{ОС1}$ может достигать миллимолярных концентраций. В плазме крови FXIII, как известно, нековалентно связан с фибриногеном, который, в свою очередь, путем связывания с интегрином альфаМbeta2 (Mac-1), экспрессируемым на активированных лейкоцитах, обеспечивает ключевую связь между тромбозом и воспалением. Следовательно, влияние нейтрофильных окислителей на FXIII, скорее всего, является локальным. При высоких локальных концентрациях $\text{НОС1}^-/\text{ОС1}$ можно ожидать, что трансглутаминазная активность FXIIIa (наиболее уязвимой мишени для окислителей в сравнении с FXIII и $\text{FXIII}+\text{Ca}^{2+}$) будет снижена, что приведет к уменьшению количества α -полимеров в фибриновой сети. Это убедительно показано в текущем исследовании. Поскольку α -полимеры вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмином, их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда из фибриногена, поврежденного окислением, образуется устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой.

В дальнейшей работе особый интерес представляет выявление участков окислительных модификаций в FXIII и других белках, выделенных из плазмы крови пациентов с различными патологиями, ассоциированными с воспалением и гиперпродукцией окислителей.

ВЫВОДЫ

1. Методом ВЭЖХ-МС/МС показано, что группы контрольных и индуцировано окисленных образцов FXIII на отдельных стадиях его активации отличаются набором модифицированных аминокислотных остатков и типом модификаций, а также МС-покрытием последовательности молекулы. Наибольшее количество и процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков (по отношению к количеству аминокислотных остатков, входящих в МС-покрытие), наблюдалось в окисленных образцах активированной формы FXIIIa.

2. Модифицированные аминокислотные остатки в окисленных образцах обнаруживаются во всех структурных элементах FXIII-A, за исключением активационного пептида, а также в 1,2,6,7,8 и 10-м суши-доменах FXIII-B.

Наиболее подверженными окислительной модификации структурными элементами оказались β -баррель 2 каталитической субъединицы (FXIII-A) и 8-й суши-домен регуляторной субъединицы (FXIII-B).

3. Методом ПААГ-электрофореза показано, что наибольшую трансклутаминазную активность по сравнению с контрольным образцом сохраняет FXIIIa, образованный из окисленного профермента (FXIII). Для образцов, которые были обработаны окислителем в полностью активированной форме (FXIII+Ca²⁺/Thr), было установлено резкое снижение трансклутаминазной активности.

4. Обнаруженное в проферменте FXIII большое количество окисленных остатков метионина и цистеина, способных выполнять функции перехватчиков свободных радикалов, плотная упаковка тетрамерной структуры профермента, а также защитная функция субъединиц FXIII-B, представляют собой основные три фактора, которые обеспечивают резистентность белка к действию окислителей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Розенфельд, М.А. Окислительная модификация клеточного фибринстабилизирующего фактора / М. А. Розенфельд, А. Н. Щеголихин, В. Б. Леонова, Е. А. Костанова, М. И. Бирюкова, А. В. Бычкова, М. Л. Константинова, **А. Д. Васильева** // Доклады академии наук. - 2016. - Т. 467, № 4. - С. 488–491.

2. **Васильева, А.Д.** Модификация каталитической субъединицы плазменного фибринстабилизирующего фактора при его индуцированном окислении / **А.Д. Васильева**, А.В. Бычкова, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.П. Чикунова, В.Б. Леонова, Е.А. Костанова, М.И. Бирюкова, М. Л. Константинова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Доклады академии наук. - 2017. - Т. 472, № 4 - С. 471–474 .

3. **Васильева, А.Д.** Окислительная модификация коагуляционного фактора XIII: структурно-функциональные аспекты / **А. Д. Васильева**, Л. В. Юрина, В. Б. Леонова, Д. Ю. Азарова, А. Е. Бугрова, Т. С. Константинова, М. И. Индейкина, А. С. Кононихин, Е. Н. Николаев, М. А. Розенфельд // Химическая физика биологических процессов. - 2020. - Т. 39, №6. - С. 24–35.

4. Rosenfeld, M.A. Oxidation of proteins: is it a programmed process? / M.A. Rosenfeld, **A.D. Vasilyeva**, L.V. Yurina, A.V. Bychkova // Free Radic. Res. - 2018. - V. 52, № 1. - P. 14–38.

5. **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 // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. - 2018. - V. 1866, № 8. - P. 875–884.

6. **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. - V. 10, 914.

Тезисы конференций:

Результаты работы были опубликованы в сборнике статей Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и XII съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, 2016); сборнике тезисов XI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2016); в материалах Международного семинара 2nd International Factor XIII Workshop (Венгрия, 2016); в сборнике тезисов Международного конгресса 3rd Congress on Controversies in Thrombosis & Hemostasis (CiTH), (г. Москва, 2016); в сборнике тезисов Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (г. Москва, 2017); в сборнике тезисов Международной школы-конференции «Биология - наука XXI века», (г. Пущино, 2017); в сборнике тезисов Международного симпозиума Debrecen University Symposium „Transglutaminases in Medicine”(Венгрия, 2017); в материалах Международного симпозиума 31st Annual Symposium of The Protein Society, (Канада, 2017); в сборнике тезисов Международной конференции The Annual Scientific Meeting «Clinical proteomics. Postgenome medicine», (г.Москва, 2017); в сборнике статей Международного конгресса The FEBS Congress (Чехия, 2018); в сборнике тезисов Международной конференции 22-International mass spectrometry conference (IMSC), (Италия, 2018); в сборнике тезисов Международной конференции 12th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”, (г. Санкт-Петербург, 2019).