

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

*На правах рукописи*

**Васильева  
Александра Дмитриевна**

**Индукцированное окисление коагуляционного фактора XIII:  
структурно-функциональные нарушения**

**Специальность 03.01.02 – биофизика**

**ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук**

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

**Москва – 2020**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>11</b>
<b>Глава 1. Белки – уязвимая мишень для активных форм кислорода (АФК).....</b>	<b>11</b>
1.1 Различные виды АФК и их воздействие на белки.....	11
1.2 Окисление внутриклеточных белков.....	13
1.3 Окисление внеклеточных белков.....	16
1.4 Антиоксидантная роль метионинов в белках.....	18
1.5 Окисление белков озоном – высокотоксичным природным окислителем.....	21
1.6 Гипохлорит как сильный физиологический окислитель белков.....	23
<b>Глава 2. Современные представления о структуре коагуляционного фактора XIII (FXIII) и его роли в гемостазе.....</b>	<b>27</b>
2.1 Общая структура FXIII.....	28
2.2 Структура каталитической субъединицы FXIII-A.....	29
2.3 Структура некаталитической субъединицы FXIII-B .....	29
2.4 Превращение плазменного профермента FXIII в активную форму (FXIIIa).....	32
2.5 Ковалентная стабилизация фибрина.....	34
2.6. FXIII как потенциальная мишень для атаки АФК.....	35
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>38</b>
<b>Глава 3. Материалы и методы.....</b>	<b>38</b>
3.1 Материалы.....	38
3.2 Методы.....	39
3.2.1 Выделение FXIII из плазмы крови человека.....	39
3.2.2 Выделение фибриногена из плазмы крови человека.....	41
3.2.3 Подготовка образцов к окислению.....	42

3.2.4 Окисление образцов озоном.....	42
3.2.5 Окисление образцов гипохлоритом.....	43
3.2.6 Анализ изменения активности FXIII при окислении.....	43
3.2.7 Анализ сохранения каталитической активности FXIII методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез).....	44
3.2.8 Подготовка образцов и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС .....	45
3.2.9 Биоинформатический анализ результатов ВЭЖХ-МС/МС с помощью программного алгоритма PEAKS Studio v. 8.5.....	47
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>50</b>
<b>Глава 4. Озон-индуцированное окисление FXIII.....</b>	<b>50</b>
4.1 Особенности МС-покрытия первичной структуры каталитической субъединицы FXIII-A.....	50
4.2 Анализ окислительных модификаций FXIII-A нативного и окисленного озоном FXIII методом ВЭЖХ-МС/МС.....	54
4.3 Окислительные модификации и конформационные перестройки FXIII.....	65
<b>Глава 5. Гипохлорит-индуцированная модификация FXIII.....</b>	<b>68</b>
5.1 Анализ модификаций при гипохлорит-индуцированном окислении FXIII методом ВЭЖХ-МС/МС .....	68
5.2 Влияние окисления на ферментативную активность FXIII.....	79
<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>91</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>97</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>99</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>125</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	<b>127</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

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 [Droge, 2002; Thannickal, Fanburg, 2000]. 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* [Gu, Stevens, Lentz, 2015], так и *in vivo* [Harutyunyan, 2017; White и др., 2016], 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 трансклутаминазной 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 [Martinez, Weisel, Ischiropoulos, 2013].

**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+Ca<sup>2+</sup>) и в) при полной активации (ионами кальция и тромбином) FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr.

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

3) Определить трансклутаминазную 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,  $FXIII < FXIII+Ca^{2+} \ll FXIII+Ca^{2+}/\text{тромбин}$  (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 трансклутаминазной 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.

### **Научно-практическое значение**

В условиях окислительного стресса, локальный уровень  $\text{НОС1}^-/\text{ОС1}$  при воспалении может достигать миллимолярных концентраций [Stief и др., 2000]. Связываясь с активированными лейкоцитами через фибриноген [Byrnes и др., 2016; Lishko и др., 2004; Souri, Osaki, Ichinose, 2015], FXIII оказывается в очаге воспаления, что приводит к повреждению структуры FXIIIa и образованию физиологически неполноценного, слабо сшитого фибрина.

Поскольку образующиеся  $\alpha$ -полимеры, ковалентное сшивание которых катализируется FXIIIa, вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмином [Rijken, Uitte De Willige, 2017], их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда из фибриногена, поврежденного окислением, образуется устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой [Martinez, Weisel, Ischiropoulos, 2013]. 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  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров и  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 (ВЭЖХ-МС/МС)) выполнялись в соавторстве с к.ф.-м.н. Кононихиным А.С., к.б.н. Бугровой А.Е., н.с. Индейкиной М.И., д.ф.-м.н. Николаевым Е.Н.

**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.

### **Объем и структура 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.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. Белки – уязвимая мишень для активных форм кислорода

Способность белков к функционированию в среде, генерирующей активные формы кислорода (АФК), остается до сих пор одним из наиболее важных аспектов свободнорадикальной биологии медицины. Белки и пептиды являются основными функциональными компонентами живой клетки и плазмы крови. Они участвуют во всех аспектах поддержания жизни. Они могут действовать самостоятельно или в сочетании с другими белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами, мембранами, малыми молекулами и ионами на различных этапах жизни. Потеря функциональной активности белков и пептидов может привести к развитию различных патологических состояний и заболеваний. Одним из важнейших факторов, воздействующих на структуру и функцию белков, являются АФК, вовлекающие белки в различные окислительные модификации, в конечном итоге, вызывающие их дисфункцию. В данном разделе будут рассмотрены только некоторые аспекты этой проблемы, наиболее близкие к теме диссертационной работы.

#### 1.1. Различные виды активных форм кислорода и их воздействие на белки

АФК являются короткоживущими и высокореактивными молекулами. При низких концентрациях АФК служат сигнальными молекулами, воздействующими на рецепторы клеточных мембран [Ray, Huang, Tsuji, 2012]. Однако при высоких концентрациях АФК могут выполнять как полезные, так и нежелательные функции. В последнем случае АФК могут не только разрушать вторгающиеся патогены и микробы, но и повреждать компоненты клетки, включая белки, липиды, углеводы и ДНК [Ahire и др., 2013]. Подавляющее количество данных указывает на то, что окислительный стресс вовлечен в патофизиологию широкого ряда заболеваний человека, включая рак [Glasauer, Chandel, 2014], сердечно-сосудистые

заболевания [Sumandea, Steinberg, 2011], СПИД [Porter, Sutliff, 2012], сахарный диабет [Abe и др., 2014] и возрастные нейродегенеративные расстройства (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.) [Abe, Kimura, 1996; Kiyoshima и др., 2012].

В организме человека более 95% свободных радикалов относятся к соединениям кислорода, которые могут играть важную роль в контроле функций клеток и передаче сигнала [Droge, 2002; Thannickal, Fanburg, 2000]. Свободные радикалы кислорода включают супероксидный анион ( $\text{O}_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $\text{HO}^\bullet$ ), пергидроксильный радикал ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), алкоксильный радикал ( $\text{RO}^\bullet$ ), алкилпероксидный радикал ( $\text{ROO}^\bullet$ ) и т. д. Среди них  $\text{O}_2^-$  является очень нестабильным и способным самопроизвольно реагировать с самим собой с образованием перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и молекулярного кислорода ( $\text{O}_2$ ) [Fridovich, 1983].  $\text{O}_2^-$  выступает как стартер цепной реакции свободных радикалов кислорода.  $\text{HO}^\bullet$  является наиболее реакционноспособным свободным радикалом кислорода и может реагировать с любой биологической молекулой [Cheng, Jen, Tsai, 2002].  $\text{HO}_2^\bullet$  является протонированной формой супероксидного аниона и обладает более высокой реакционной способностью, чем супероксидный анион [Bielski, Cabelli, 1991]. Кроме того, другие реактивные метаболиты кислорода, такие как  $\text{H}_2\text{O}_2$  и синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), также могут рассматриваться как свободные радикалы кислорода, хотя они не являются истинными разновидностями свободных радикалов.  $\text{H}_2\text{O}_2$  может диффундировать через биологические мембраны и является одним из источников высоко реактивного  $\text{HO}^\bullet$  [Kehrer, 2000]. Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) также обладает высокой реакционной способностью [Epe, 1991] и может образовываться непосредственно из молекулярного кислорода под воздействием ультрафиолета.

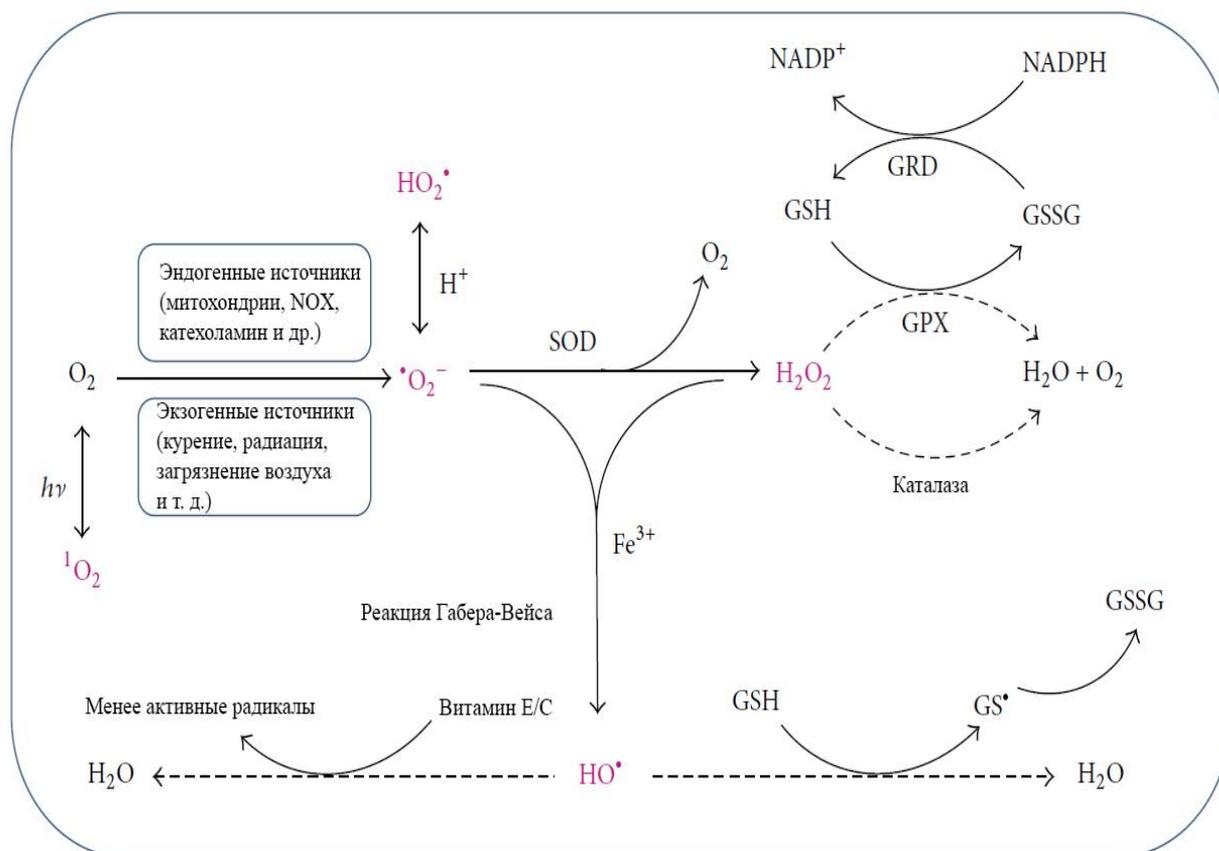
Радикалы участвуют в различных реакциях, включая перенос электронов (окисление или восстановление субстрата), отрыв атома водорода, фрагментация и перегруппировка, димеризация, диспропорционирование и замещение. Результатом взаимодействия радикала с пептидом является образование пептидного радикала. Свойства радикалов, образующихся на пептидах и белках, зависят от природы и реакционной способности атакующего радикала. Таким

образом, электрофильные радикалы (например,  $\text{HO}^\bullet$  и алкоксильные радикалы) преимущественно окисляют сайты, богатые электронами, тогда как нуклеофильные частицы (такие как фенил и многие другие углерод-центрированные радикалы) атакуют электрон-дефицитные сайты [Hawkins, Davies, 2001].

АФК широко распространены в живых организмах. Фактически, они непрерывно производятся *in vivo*, и многие из них необходимы для участия в определенных клеточных и биологических реакциях [Droge, 2002]. Когда происходит избыточное производство АФК, может произойти повреждение клеток [Atalay, Laaksonen, 2002; Turrens, 2003]. Свободные радикалы кислорода могут генерироваться экзогенно или эндогенно. Экзогенные источники в основном обусловлены такими стимулирующими факторами как курение, алкоголь, некоторые наркотики, загрязнение воздуха, ионизирующее излучение и гипербарическое отравление кислородом. По сравнению с экзогенными источниками, эндогенные источники играют несравнимо более важную роль в генерации АФК. Основные пути генерации и утилизации активных форм кислорода в организме представлены на **Рисунке 1**.

## **1.2. Окисление внутриклеточных белков**

Известно, что белки являются одними из основных мишеней для окислителей. Это связано с их обилием в биологических системах и высокими константами скорости для многих реакций белков с рядом окислителей. Окисление белков нарушает функциональность ферментов, рецепторов, антител, транспортных и структурных белков. Накопление окисленных белков является характерной чертой стареющих клеток [Levine, Stadtman, 2001]. Возрастное накопление окисленных белков зависит от баланса между образованием окислительно модифицированных белков и их элиминацией с помощью систем деградации и восстановления белков.



**Рисунок 1.** Основные пути генерации и ликвидации АФК. (1) Различные виды АФК (включая  $\cdot O_2^-$ ,  $HO_2\cdot$ ,  $HO\cdot$ ,  $^1O_2$  и  $H_2O_2$ ) могут генерироваться экзогенным путем (например, за счет курения, загрязнения воздуха и т. д.) и эндогенными стимулирующими факторами (например, митохондрии, катехоламины, NOX и т. д.).  $\cdot O_2^-$  может дополнительно реагировать с  $H_2O_2$  с образованием  $HO\cdot$  посредством реакции Хабера-Вейсса в присутствии двухвалентного железа (показано стрелками сплошной линией). (2) Избыток  $\cdot O_2^-$  устраняется SOD путем катализования реакции дисмутации  $\cdot O_2^-$  в  $H_2O_2$  и  $O_2$ .  $H_2O_2$  может быть далее каталитически удален с помощью CAT или GPx. GPx нуждается в GSH в качестве кофактора, а GSH окисляется до GSSG. GSSG может быть снова восстановлен в исходную форму GSH с помощью GR, используя NADPH. GSH также может напрямую реагировать со свободным радикалом кислорода и образовывать тиольный радикал ( $GS\cdot$ ), а затем GSSG. Витамин E и витамин C могут реагировать со свободными радикалами кислорода и образовывать менее реактивные радикалы (показаны пунктирными стрелками). Используемые сокращения: CAT – каталаза; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; NOX – NADPH оксидаза; XO – ксантиноксидаза; SOD – супероксиддисмутаза; GSH – глутатион; GSSG – глутатион дисульфид; GPx – глутатионпероксидаза; GR – глутатионредуктаза [Xie, Liu, Bian, 2016].

Увеличение количества окисленных белков, измеряемое в основном накоплением карбонильных групп и продуктов окисления тирозина, было описано во многих экспериментальных моделях старения [Grune и др., 2001]. Многие факторы влияют на уровень повреждения белка, включая природу и концентрацию окислителя, а также присутствие и функциональную активность антиоксидантных ферментов и соединений [Grune, 2000]. Окислительное повреждение белка играет значительную роль в жизнедеятельности клеток, поскольку окисленные белки частично или полностью утрачивают выполняемые функции.

Митохондрии являются основным источником внутриклеточных АФК. Более 90% кислорода используется для производства АТФ в митохондриях, и около 2% кислорода превращается в АФК в качестве побочных продуктов дыхательной цепи [Turrens, 2003]. Ферменты NADPH оксидаза, миелопероксидаза, циклооксигеназа и др. являются одними из основных источников внутриклеточной генерации АФК, которые играют огромную роль в процессах окисления белка. Известно, что ряд ферментов использует радикальные частицы для ферментативных реакций [Pedersen, Finazzi-Agrò, 1993].

Защита от АФК-опосредованного окислительного повреждения у всех организмов осуществляется различными системами антиоксидантной защиты, которые могут предотвращать образование АФК, превращать наиболее реактивные метаболиты в менее активные, либо полностью их инактивировать. Эти системы включают ряд ферментов в качестве основных компонентов антиоксидантной защиты (**Рисунок 1**), такие как супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатионпероксидаза (GPx), редуктазы и глутатион-S-трансферазы (GST); и ряд других тиол-специфических ферментов, метионинсульфоксидредуктазы (MSR) и тиоредоксин (Trx) редуктазы [Stadtman, Levine, 2000; Донцов и др., 2006].

Долгое время предполагалось, что окисление многих белков является случайным процессом. Однако некоторые белки или белковые домены представляют собой более уязвимую для АФК мишень и, таким образом, способны легко накапливаться в окисленной форме. В последнее время существование сайт-специфических процессов окисления белков становится наиболее обоснованной

концепцией [Grune, Catalgol, Jung, 2012]. Это подтверждается также данными о том, что некоторые ферменты накапливаются в окисленной форме во время старения [Oliver и др., 1987; Oliver, Levine, Stadtman, 1987], например, глутаминсинтетаза [Aksenova и др., 1998; Carney и др., 1991], *митохондриальная аконитаза* [Yan, Levine, Sohal, 1997], аденин нуклеотид транслоказа [Yan, Sohal, 1998], кальциневрин [Agbas, Zaidi, Michaelis, 2005], тирозингидроксилаза [De La Cruz и др., 1996], и некоторые другие ферменты антиоксидантной защитной системы [Beier, Völkl, Fahimi, 1993; Tian, Cai, Wei, 1998].

Накопление окисленных белков является сложным процессом, зависящим от скоростей образования различных видов АФК, функционирования многочисленных антиоксидантных систем и скоростей деградации окисленных белков множеством протеаз, уровень которых снижается при старении [Stadtman, 2006]. Интересно, что некоторые процессы окисления цистеина, Cys и метионина, Met являются обратимыми из-за существования, как указывалось ранее, специфических ферментативных систем, которые могут вернуть эти модификации в восстановленную форму. Необратимые продукты окисления других аминокислот являются наиболее часто производными гидроксилированных и карбонилированных аминокислот. Окисленные белки, как правило, менее активны, менее термостабильны и имеют экспонированные гидрофобные аминокислоты на своей поверхности [Ahmed и др., 2007].

### **1.3. Окисление внеклеточных белков**

По сравнению с количеством антиоксидантных ферментов во внутриклеточном пространстве, их концентрация в крови намного ниже, и они не способны обеспечивать адекватную защиту белков от воздействия метаболитов кислорода [Bruschi и др., 2013; Hampton, Kettle, Winterbourn, 1998]. При этом концентрация АФК в крови, по крайней мере, не меньше внутриклеточной [Bruschi и др., 2013]. Кроме того, накопление окислительно поврежденных белков в кровообращении может происходить из-за крайне неэффективного восстановления

поврежденных аминокислотных остатков ферментами. На сегодняшний день описаны лишь единичные примеры репарации белков по механизму тиол-дисульфидного обмена, происходящие в жидкой фазе [Wang и др., 2013]. Однако до настоящего времени не имеется никаких сообщений, касающихся возможности обратимого окисления метионинов в плазме крови [Griffiths и др., 2014].

В плазме крови некоторые металлсвязывающие белки такие как, церулоплазмин, ферритин и трансферрин рассматриваются одними из главных факторов неферментативной антиоксидантной защиты, наряду с небелковыми компонентами, которые включают глутатион, тиоредоксин, аскорбат,  $\alpha$ -токоферол, мочевую и липоевую кислоты, билирубин, а также некоторые диетические компоненты (витамины С и Е) и микроэлементы ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  или  $Zn^{2+}$ ) [Atalay, Laaksonen, 2002].

Доминирующий белок плазмы человека – сывороточный альбумин (HSA), на долю которого приходится ~70% от общего белкового содержимого плазмы, рассматривается основной внеклеточной молекулой, ответственной за поддержание окислительно-восстановительного статуса плазмы [Iwao и др., 2006]. Сообщалось, что более 70% поглощения АФК в сыворотке было обусловлено сывороточным альбумином и его единственной тиольной группой, остатком Cys 34, который является перехватчиком АФК, составляя ~80% тиоловых групп в крови [Anraku и др., 2001; Das и др., 2017; Fanali и др., 2012; Maciążek-Jurczyk, Sułkowska, 2015]. Примечательно, что альбумин существует как в восстановленной, так и в окисленной форме в системном кровообращении. У здоровых взрослых людей около 70–80% молекул HSA имеют остаток Cys 34 со свободной сульфгидрильной группой, в то время как около 25–30% молекул HSA имеют Cys 34, образуя смешанный дисульфид с цистеином, гомоцистеином или GSH, что влияет на окислительно-восстановительный потенциал Cys 34 [Kawakami и др., 2006]. Тиольная группа может реагировать с различными окисляющими веществами, такими как  $H_2O_2$ , гидроксильный радикал, супероксидный анионный радикал и  $HOCl$  [Roche и др., 2008; Silva, Hider, 2009] и обратимо окисляться до сульфеновой (SOH) или сульфиновой ( $SO_2H$ ) и необратимо до сульфокислоты ( $SO_3H$ ) [Silva,

Hider, 2009]. В дополнение к Cys 34, остатки метионина также представляют чувствительную к окислению мишень в альбумине.

#### 1.4. Антиоксидантная роль метионинов в белках

В белках метионин является легко окисляемым остатком по отношению ко всем разновидностям АФК. Широкое распространение во внутриклеточном пространстве метионинсульфоксидредуктаз, способных восстанавливать как свободный, так и связанный с белком метионинсульфоксид обратно до метионина, способствовало возникновению гипотезы о том, что остатки метионина могут функционировать в качестве антиоксидантной системы защиты белков «последнего шанса» [Levine и др., 1996]. В 1975 году Шехтер и его коллеги сообщили, что только остатки поверхностно-расположенных метионинов в белках были способны окисляться хлорамином-Т или N-хлорсукцинимидом [Shechter, Burstein, Patchornik, 1975]. Позднее была детально изучена окислительная инактивация  $\alpha 2$ -макроглобулина [Reddy и др., 1994] и полученные результаты полностью поддерживали гипотезу о том, что остатки метионинов в белках могут служить перехватчиками АФК и, таким образом, защищать другие важные в функциональном отношении аминокислотные остатки от окисления. Потребление восьми эквивалентов хлорамина вызвало модификацию восьми остатков метионина до метионинсульфоксида без какой-либо потери функциональной активности белка. Увеличение количества окислителя вызвало окисление шести дополнительных остатков метионина и одного ключевого остатка триптофана. Частичная модификация остатка триптофана приводила к пропорциональной инактивации  $\alpha 2$ -макроглобулина. Эти результаты согласуются с предположением, что окисление остатков метионина удаляет окислители, которые в противном случае могли бы воздействовать на остаток функциональный остаток триптофана. Также было исследовано влияние воздействия перекиси водорода на глутаминсинтетазу из *E. coli* в модельных условиях [Levine и др., 1999]. Оказалось, что восемь из 16 остатков метионина были окислены с небольшим влиянием на активность. Было обнаружено, что окисляемые остатки метионина локализованы

на поверхности белковой глобулы и, поэтому, пространственно доступны молекулам окислителя, тогда как неповрежденные остатки, как правило, скрыты в ядре белка. Кроме того, остатки метионинов, склонные к окислительным модификациям, были физически скомпанованы в виде массива, защищающего подход к активному центру. Все это дало основание предположить, что окислительно-восстановительные реакции остатков метионина в белках могут выполнять важную антиоксидантную функцию [Levine и др., 1996].

Окислительная уязвимость метионинового остатка обычно коррелирует с его пространственным расположением, хотя другие остатки, находящиеся вблизи этого метионина, могут модулировать его реакционную способность [Eckardstein Von и др., 1991].

В другой работе [Hsu и др., 1996] изучали окисление перекисью водорода рекомбинантного фактора стволовых клеток человека, который содержит пять остатков метионина. Два расположенных на поверхности, Met1 и Met 159, были полностью окислены, но с незначительным влиянием на биологическую активность белка. Met 27 был окислен примерно у трети молекул, опять же с небольшим влиянием на активность. Оставшиеся два остатка, Met 36 и Met 48, были гораздо менее подвержены окислению, и модификация любого из этих остатков сопровождалась значительной потерей биологической активности. Точно так же было установлено, что окисление Met 111 в интерфероне  $\alpha$ -2b не изменяет его биологическую активность [Gitlin и др., 1996]. Исследования окисления перекисью водорода двух метионинов гормона парашитовидной железы человека [Nabuchi и др., 1995], позволило установить, что окисление Met 8 незначительно влияло на функциональность белка, тогда как окисление Met 18 существенно снижало его активность. Было также убедительно показано, что два расположенных на поверхности метионина в молекуле интерферона и три метионина молекулы тканевого активатора плазминогена окислялись без потери биологической активности [Keck, 1996]. Подобный результат был получен также для фактора роста кератиноцитов [Glomb, Monnier, 1995].

Помимо того, что остатки метионина на поверхности белковых молекул могут перехватывать молекулы окислителей, остатки в активных центрах (или рядом) могут защищать ферменты от «автоокисления» субстратами или кофакторами. Например, окисление единственного метионина в 15-липоксигеназе кролика, опосредованное субстратами или продуктами, коррелирует с потерей каталитической активности. Однако замена метионина на лейцин не предотвращает инактивацию субстратами, демонстрируя, что образование метионинсульфоксида не является причиной инактивации [Gan и др., 1995]. Таким образом, окисление метионина, входящего в активный центр белка, может фактически замедлять инактивацию липоксигеназы. Значительное количество метиониновых остатков в глутаминсинтетазе может быть окислено без увеличения гидрофобности поверхности белка или его протеолитической восприимчивости. Интересно, что содержание метионинсульфоксида в каждом коллагене человека увеличивается с 4% у молодых до 12% в возрасте 80 лет [Wells-Knecht и др., 1997].

В **Таблице 1** суммированы данные о влиянии окисления остатков метионина на функционирование некоторых других белков, относящихся к сердечно-сосудистой и коагуляционной системам [Gu, Stevens, Lentz, 2015].

**Таблица 1.** Перечень белков, чувствительных к окислению остатков метионина и характеризующихся присутствием более чем одного остатка метионина с потенциальной регуляторной функцией или патологическим эффектом в сердечнососудистой биологии или тромбозах [Gu, Stevens, Lentz, 2015].

Белок	Чувствительные к окислению метионины	Влияние окисления метионина на функционирование белка
аМКП	Met281, Met282 [Erickson и др., 2008; He и др., 2011]	↑
Аполипопротеин А-I	Met86, Met112, Met148 [Garner и др., 1998; Shao и др., 2006; Shao и др., 2008]	↓
Актин	Met46, Met49 [Hung и др., 2013; Lee и др., 2013]	↓

IkBa	Met45 [Kanayama и др., 2002; Midwinter и др., 2006]	↑
p53	Met340 [Nomura и др., 2009]	↓
S100A9	Met63, Met83 [Sroussi, Berline, Palefsky, 2007]	↓
Белки, участвующие в гемостазе и тромбозе		
Тромбомодулин	Met388 [Glaser и др., 1992; Wood и др., 2003]	↓
Активированный белок C	Met59 [Nalian, Iakhiaev, 2008]	↓
VWF	Met1606 [Chen и др., 2010; Lancellotti и др., 2010]	↑
ADAMTS13	Met249, Met331, Met496 [Wang и др., 2015]	↓
Фибриноген	Met78, Met367, Met476 [Burney, White, Pfaendtner, 2014; Weigandt и др., 2012]	↔
α-2-Антиплазмин	10 Met residues [Stief, Aab, Heimbürger, 1988]	НЭ
Антитромбин III	Met314, Met315 [Van Patten и др., 1999; Stief, Aab, Heimbürger, 1988]	НЭ
Фактор VII	Met298, Met306 [Kornfelt, Persson, Palm, 1999]	↓
Ингибитор активатора плазминогена-1	Met347 [Lawrence, Loskutoff, 1986; Strandberg и др., 1991]	НЭ
Тканевый активатор плазминогена	Met207 [Stief и др., 1991]	НЭ

Примечание: относительное изменение функции как следствие окисления остатков метионинов обозначено как: ↑- усиленное; ↓ - подавленное; ↔ - измененная структура; НЭ - нет эффекта.

### **1.5. Окисление белков озоном – высокотоксичным природным окислителем**

Так как в диссертационной работе озон был использован как один из окислителей, данный раздел посвящен особенностям окисления белков под

действием этого агента. Озон является одной из самых токсичных примесей в атмосфере и вместе с вдыхаемым воздухом постоянно попадает в организм. В воде озон имеет период полураспада в диапазоне от нескольких секунд до часов в зависимости от наличия в воде тех или иных субстратов окисления. Хорошо известно, что  $O_3$  нейтрализует низкомолекулярные антиоксиданты, окисляет белки, вызывает перекисное окисление липидов и активирует клеточные ответы в различных тканях [Lim и др., 2006].

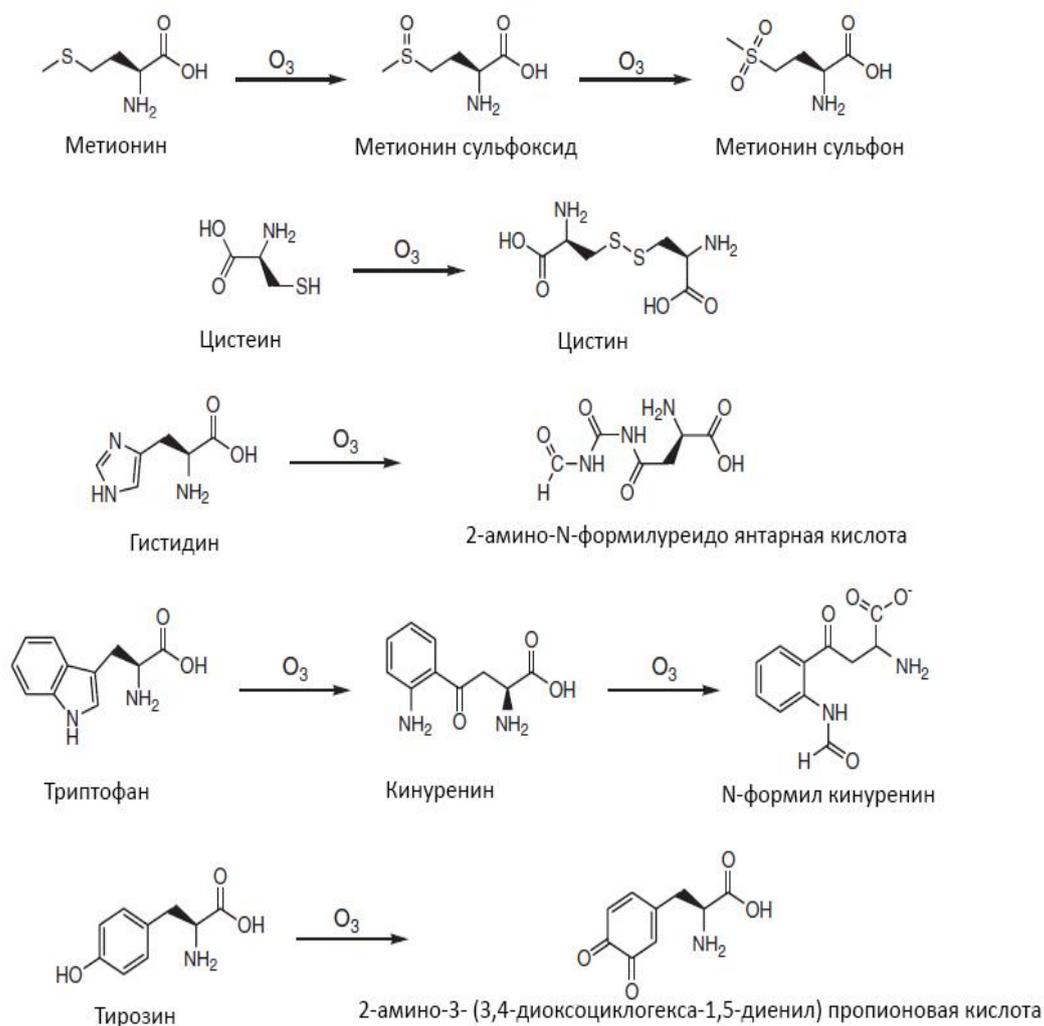
Из-за его выраженной цитотоксичности внимание многих исследователей привлекала его способность запускать образование ряда других активных форм кислорода, включая  $HO^\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $^{\bullet}O_2^-$ ,  $RCOO^\bullet$ ,  $^{\bullet}O_3^-$  и синглетный кислород [Berlett, Levine, Stadtman, 1996; Kanofsky, Sima, 1991; Pryor, 1994; Whiteside, Hassan, 1988].

Относительно недавно было установлено [Rosenfeld и др., 2014; Розенфельд и др., 2015], что в водных растворах белков при их озон-индуцированном окислении, генерируемые из озона супероксидные радикалы быстро реагировали с молекулами озона с образованием  $O_3^{\bullet-}$  радикалов, которые подвергались разложению с образованием радикалов  $HO^\bullet$ . Таким образом, реакции модификации белков при их взаимодействии с озоном происходят как путем молекулярного присоединения озона, так и свободнорадикальным способом.

В ряде работ было показано, что озон активно реагирует с сульфосодержащими и циклическими аминокислотными остатками, образуя продукты окисления, представленные на **Рисунке 2**. Реактивность других аминокислотных остатков по отношению к озону существенно ниже [Sharma, Graham, 2010].

Что касается гидроксильных радикалов, возникающих в водной среде из озона, электрофильное присоединение  $HO^\bullet$  к ароматическому кольцу Tyr, Phe или Trp, а также к N-гетероциклическому фрагменту гистидина образует различные продукты окисления, такие как гидроксирование в случае ароматических аминокислот и образование 2-оксогистидина [Villamena, 2017]. Образование 3,3'-дитиروزина является результатом отщепления водородного атома с образованием

углерод-центрированных тирозильных радикалов и их последующим бимолекулярным связыванием (**Рисунок 2**).



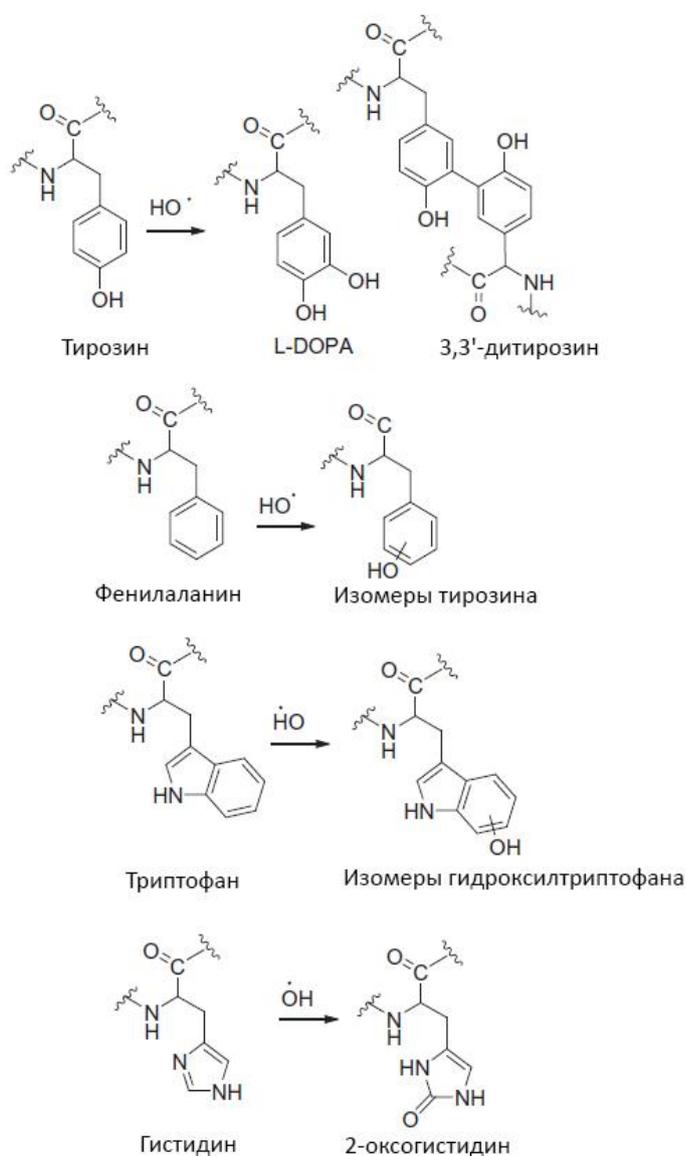
**Рисунок 2.** Реакции озона с остатками метионина цистеина, тирозина, гистидина, триптофана и тирозина [Villamena, 2017].

Окисление других неароматических аминокислот приводит к образованию реакционноспособных альдегидов из лизина, аргинина и пролина; кетона из треонина; расщеплению пептидного остова в случае окисления пролина; и образованию акриламида из аспарагина [Houglund, Darling, Flynn, 2013].

## 1.6. Гипохлорит как сильный физиологический окислитель белков

В качестве физиологического окислителя в работе использовали гипохлорит ( $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ ). Гипохлорит считается одним из основных бактерицидных факторов *in vivo* и, следовательно, важным защитником от патогенов во время иммунного ответа [Spalteholz, Panasenko, Arnhold, 2006].

Продукты реакций гипохлорита с биологическими соединениями были обнаружены при многих патологических состояниях, таких как атеросклероз, инфекционные заболевания и др. [Sroussi, Verline, Palefsky, 2007; Woods, Linton, Davies, 2003] (**Рисунок 3**).



**Рисунок 3.** Примеры опосредованного гидроксильными радикалами окисления боковых цепей аминокислот [Pattison, Davies, 2001].

Тем не менее, было накоплено множество доказательств того, что чрезмерное образование гипохлорита может привести к повреждениям тканей хозяина. Полученный *in vivo* в результате реакции перекиси водорода и  $\text{Cl}^-$  с помощью фермента миелопероксидазы, высвобождаемой из нейтрофилов при их активации, гипохлорит считается важным патофизиологическим фактором окислительного стресса [Loria и др., 2008]. Было обнаружено, что активированные нейтрофилы могут генерировать до 425 мкМ  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  [Klebanoff, 2005], в то время как локальная концентрация  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  вблизи активированных нейтрофилов *in vivo* может быть намного выше [Nicholls, Hazen, 2005]. Следовательно, сильное окисление циркулирующих белков высокими концентрациями  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  может потенциально способствовать повреждению белков плазмы и нарушению механизма их функционирования [Gugliucci, 2008; Loria и др., 2008; Nicholls, Hazen, 2005; Woods, Linton, Davies, 2003].

Основным маркером присутствия  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  является хлорированный тирозин (3- и 3,5-дихлортирозин) [Siddiqui и др., 2018]. N-хлораминокислоты являются нестабильными продуктами реакций гипохлорита с белками. Их образование обычно рассматривается как защитная реакция против токсичности  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ . Однако они могут способствовать реакциям окисления и хлорирования, являясь вторичными посредниками токсичности гипохлорита.

В белках остатки Cys и Met преимущественно подвергаются атаке N-хлораминокислот [Hazen, Heinecke, 1997], хотя со скоростью ниже на несколько порядков, чем для  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  [Pattison, Davies, 2001]. Белковые агрегаты, образованные при обработке белков  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , могут быть стабилизированы как ковалентными, так и нековалентными связями. В последнем случае, агрегаты могут образовываться вследствие изменения укладки полипептидной цепи и воздействия гидрофобных областей [Winterbourn, Kettle, 2000].

Реакция гипохлорита с белками может привести к расщеплению пептидных связей и образованию белковых фрагментов. Этот процесс может вовлекать азот-центрированные радикалы, образующиеся при разложении промежуточных частиц хлорамида или нерадикальном дегидрохлорировании и гидролизе иминов

[Chapman и др., 2003]. Также, расщепление полипептидного остова, вызванное  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , может быть усилено присутствием супероксидного аниона [Hawkins, Davies, 1998].

Воздействие  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  на белок вызывает в первую очередь снижение содержания триптофана. Было показано, что инкубация липопротеинов низкой плотности с  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  приводит к потере триптофана более чем на 35% и полному окислению Cys в аполипопротеине В [Carr, Tijerina, Frei, 2000].

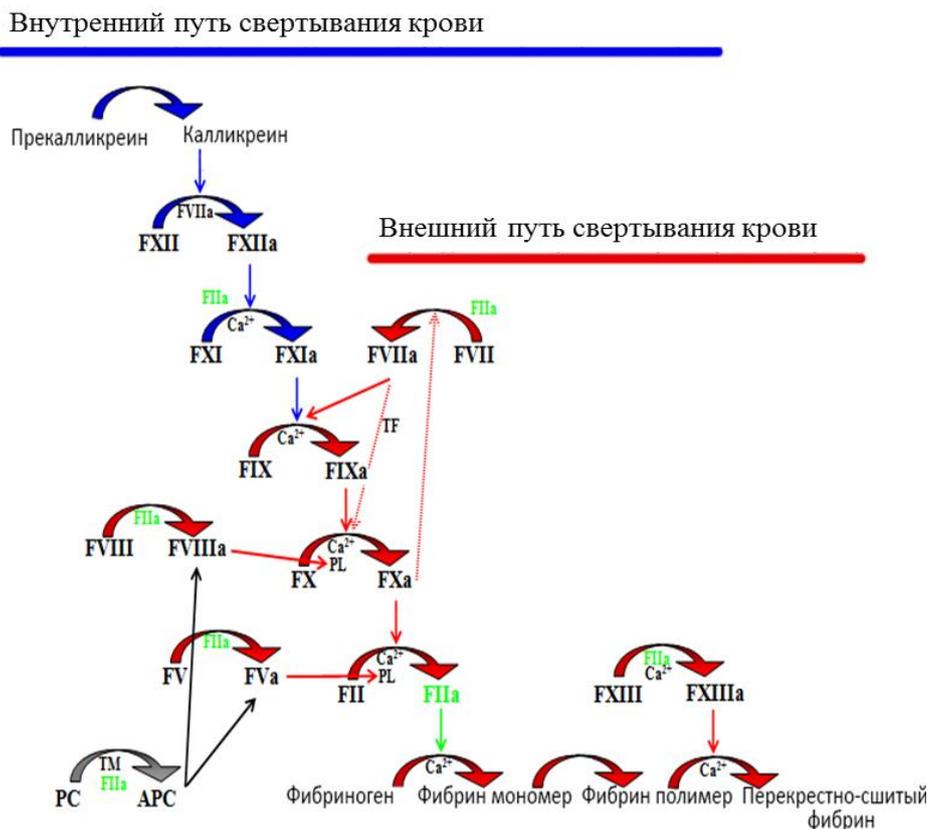
Снижение количества триптофана, вызванное хлорсодержащими соединениями, сопровождается образованием формилкинуруенина. Под влиянием  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  индольное кольцо триптофана может подвергаться либо хлорированию, либо окислению в зависимости от соседних аминокислот, что приводит к появлению различных продуктов модификации триптофана, моно- или диоксигенированных производных триптофана, таких как 2-гидроксииндол [Fu и др., 2006; Pattison, Davies, 2006]. Э

Исследования реакций  $\text{HOCl}$  со всеми потенциальными реакционноспособными участками в белке [Pattison, Davies, 2001] при прямо сопоставимых физиологических условиях (то есть в водном растворе при pH около 7,4) показали, что реакционная способность различных боковых цепей уменьшается в следующем порядке: Cys ~ Met >> Cystine ~ His > Trp > Lys >> Tyr ~ Arg > Gln ~ Asn.

Таким образом, будучи мощным физиологическим окислителем, гипохлорит способен активно взаимодействовать с молекулами белков, модифицировать их химическую и пространственную структуру и, таким образом быть причиной нарушения их функциональности.

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

Гемостаз – система, которая предназначена поддерживать кровь в организме в жидком состоянии и ликвидировать повреждения стенок сосудов. Плазменное звено гемостаза представляет собой каскад активирующих друг друга белков, относящихся к сериновым протеиназам, конечным результатом которых является образование нерастворимого фибринового сгустка. Каскад реакций активации белков системы свертывания крови, протекающий по внутреннему (только с участием плазменных факторов) и внешнему пути, (т.е. при участии тканевого фактора VII) показан на **Рисунке 4**.



**Рисунок 4.** Схема каскада реакций активации белков системы свертывания крови, направленных на образование фибринового сгустка. Красные стрелки показывают степени активации прокоагулянтных белков; синие стрелки – степени активации белков контактной фазы; Черные стрелки указывают на инактивацию FVIIIa и FVa под действием активированного протеина C (APC), одного из компонентов антикоагулянтного пути [Calcaterra, 2010].

Коагуляционный фактор XIII (FXIII) относится к семейству белков-трансглутаминаз. FXIII находится как в плазме крови, так и в тромбоцитах в соотношении, которое может варьировать между 1:1 и 5:1, однако активность FXIII распределяется поровну между плазмой и тромбоцитами [McDonagh и др., 1969]. Концентрация FXIII в плазме здоровых людей находится в интервале 14–28 мг/л [Katona и др., 2000]. Главной функцией этого белка является ковалентная стабилизация фибрина, делающая его резистентным к действию плазмина, а также сшивание фибрина с рядом белков фибринолитической системы. Дефицит FXIII приводит к гемофилии, которая характеризуется рецидивирующими кровотечениями.

### **2.1. Общая структура FXIII**

Плазменный FXIII обладает гетеротетрамерной структурой FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, которая состоит из двух идентичных одноцепочечных каталитических субъединиц А (FXIII-A<sub>2</sub>), каждая из которых имеет молекулярную массу ~ 83 кДа, и двух идентичных одноцепочечных регуляторных субъединиц В (FXIII-B<sub>2</sub>) с молекулярной массой ~ 80 кДа. Субъединицы скреплены между собой слабыми нековалентными связями [Komáromi, Vagoly, Muszbek, 2011; Muszbek и др., 2011].

Образование комплекса между двумя гетеросубъединицами играет важную роль в поддержании гемостаза, так как полагают, что основная роль FXIII-В заключается в защите каталитических субъединиц от протеолитической деградации, продлевая тем самым «время жизни» FXIII-А в кровеносном русле [Rodeghiero и др., 1991].

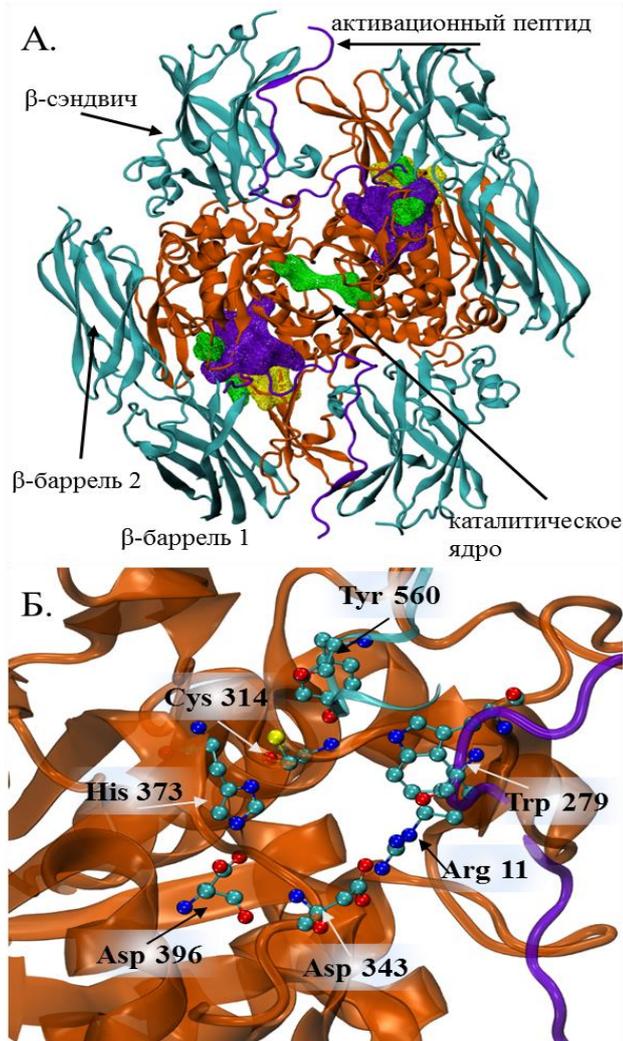
Другая функция субъединиц FXIII-В обусловлена их способностью прикрепляться к молекуле фибриногена, доставляя, таким образом, каталитические субъединицы к белку-мишени [Muszbek и др., 2011]. В отличие от плазменного коагуляционного фактора FXIII, клеточный FXIII является димером и состоит только из двух каталитических субъединиц FXIII-А, структура которых полностью идентична таковой в плазменном белке.

## 2.2. Структура каталитической субъединицы FXIII-A

Каталитическая субъединица FXIII-A представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 731 аминокислотного остатка (исключая остаток инициаторного Met1), в том числе девяти остатков цистеина, не образующих ни одной дисульфидной связи. Третичная структура FXIII-A характеризуется наличием пяти различных структурных доменов: N-концевой активационный пептид (FXIII-АП), включающий 37 аминокислотных остатков,  $\beta$ -сэндвич домен (Gly38-184Phe), каталитический домен (Asn185-515Arg), разделенный на NH<sub>2</sub>- (189–332) и COOH-терминальные (333–515) субдомены,  $\beta$ -баррель 1 (Ser516-628Thr) и  $\beta$ -баррель 2 (Phe629-731Met) домены [Bagoly и др., 2012; Biswas и др., 2014] (**Рисунок 5**). Активный сайт состоит из остатков Cys314, His373 и Asp396, свойственных каталитической триаде других цистеиновых протеаз. Когда FXIII находится в форме тетрамера, активационный пептид FXIII-АП одной субъединицы FXIII-A защищает каталитический Cys314 другой субъединицы FXIII-A. Эта конформация обеспечивается водородными связями и солевыми мостиками [Ahvazi и др., 2002; Handrkova, Schroeder, Kohler, 2015].

## 2.3. Структура некаталитической субъединицы FXIII-B

Некаталитическая субъединица FXIII-B, состоящая из 641 аминокислоты, представляет собой мозаичный белок, состоящий из десяти коротких тандемных структур, обозначаемых как суши-домены [Ichinose и др., 1986a]. Каждый суши-домен образован примерно 60 аминокислотными остатками, не имеющих свободных групп цистеина. Суши-домен имеет консервативную структуру ядра с четырьмя каноническими остатками цистеина, образующими две дисульфидные связи [Norman и др., 1991]. Симметричное расположение образованных цистеиновых связей в отдельном суши-доме дает специфическую внутреннюю топологию и уникальность своеобразной вторичной структуры, складки типа  $\beta$ -сэндвича и общую шаровидную форму.



**Рисунок 5.** Пространственная структура FXIII-A<sub>2</sub>: **А.** Структура димера субъединицы А коагуляционного фактора XIII. Домены субъединицы А: β-сэндвич, β-баррель 1 и β-баррель 2 показаны бирюзовым цветом, каталитическое ядро молекулы окрашено оранжевым цветом, активационный пептид окрашен фиолетовым цветом. Функционально значимые области каталитического ядра: фиолетовым цветом показана область, содержащая каталитическую триаду молекулы: Cys 314, His 373 и Asp 396; желтым цветом окрашена область, ответственная за связывание ионов Ca<sup>2+</sup>: Ala 457, Asp 438, Asn 436, Glu 485, Glu 490; зеленым – участки цепи, ответственные за взаимодействие между собой субъединиц А-А в димере и А-В в тетрамере (предположительно с Sushi 1 и 2): Arg 260, Tyr 283, Glu 562. **Б.** Структура каталитического центра молекулы. Отмечено положение аминокислотных остатков каталитической триады и аминокислот, ответственных за поддержание её закрытой структуры в проферменте, в том числе Tyr 560, принадлежащий к β-баррель 1 и Arg 11 активационного пептида. Атомы кислорода показаны красным цветом, азота – синим, углерода – бирюзовым, серы – желтым.

Изображение было сделано в программе VMD1.9.3. University of Illinois at Urbana-Champaign, USA с использованием модели кристаллической структуры PDB ID: 1F13. Рисунок разработан автором.

Кроме того, аллостерические дисульфидные мостики позволяют суши доменам складываться в компактное гидрофобное ядро, окруженное бета-нитями [Singh и др., 2019a].

Установлено, что FXIII-B способны взаимодействовать друг с другом, образуя гомодимер за счет возникающих связей между четвертым и девятым суши-доменами, в то время как тетрамерная структура белка обусловлена взаимодействиями первого и второго суши-доменов с каталитическими субъединицами [Souri, Kaetsu, Ichinose, 2008]. Предполагается, что субъединица FXIII-B может существовать в равновесии между мономерным и димерным состояниями в зависимости от локальной ионной среды [Singh и др., 2019a]. FXIII-B служит в качестве белка-носителя, который необходим для стабилизации FXIII-A, а также играет важную роль в ускорении сшивания фибриновых цепей, способствуя образованию тройного комплекса между проэнзимом FXIII, фибриногеном и тромбином [Souri, Osaki, Ichinose, 2015].

Особенности строения и функции каталитической FXIII-A и регуляторной FXIII-B субъединиц представлены в сводной **Таблице 2**.

**Таблица 2.** Структурные, функциональные и генетические различия между полипептидными цепями FXIII-A и FXIII-B.

Характеристики	FXIII-A субъединица	FXIII-B субъединица
Молекулярная масса (кДа) [Grundmann и др., 1986; Souri, Kaetsu, Ichinose, 2008]	82	76.5
Количество аминокислотных остатков [Ichinose и др., 1986a; Ichinose, Davie, 1988]	731	641
Локализация [Bottenus, Ichinose, Davie, 1990]	Плазма, тромбоциты, плацента	Плазма
Структура [Takahashi, Takahashi, Putnam, 1986]	Глобулярная	Изогнутая нить
Содержание углеводов [Ashcroft, Grant, Ariens, 2000; Bohn, Haupt, Kranz, 1972; Carrell, Erickson, McDonagh, 1989; Schwartz и др., 1971]	Нет	~8.5% от общей массы

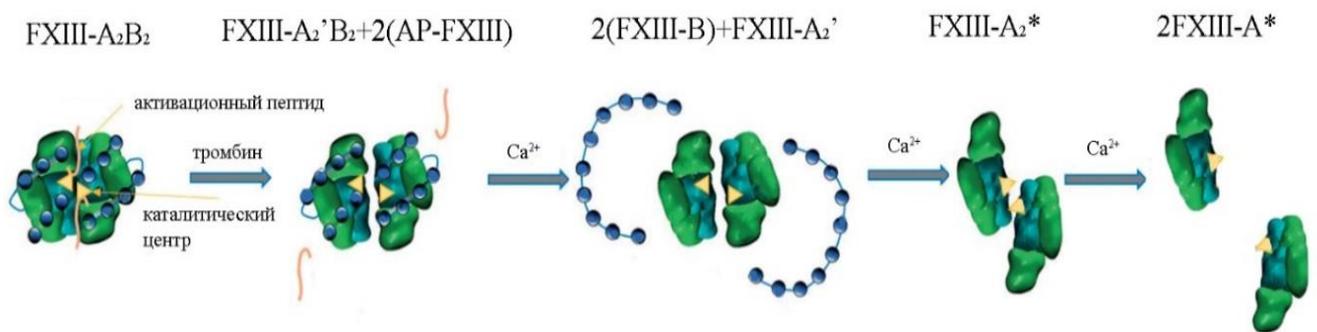
Количество дисульфидных мостиков [Ashcroft, Grant, Ariens, 2000; Grundmann и др., 1986; Takahashi, Takahashi, Putnam, 1986]	Нет	20
Синтезируется в [Bohn, Haupt, Kranz, 1972; McDonagh и др., 1969; Muszbek и др., 1988; Weisberg и др., 1987]	Гепатоциты	Моноциты, мегакарициты, гепатоциты
Функция [McDonagh, 1994; Nagy, Kradin, McDonagh, 1988]	Фермент: трансглутаминаза	Ингибиторная, транспортная
Домены [Ariëns и др., 2002; Ashcroft, Grant, Ariens, 2000; Weiss, Metzner, Hilgenfeld, 1998; Yee и др., 1996]	$\beta$ -сэндвич, каталитическое ядро, баррель-1 и баррель-2	Десять $\beta$ гликопротеинов-1 (Суши-домены)
Локализация в хромосомах [Board и др., 1988; Yee и др., 1994]	6p24-p25	1q32-q32.1
Килобазы (кБ) [Grundmann и др., 1986; Ichinose, Davie, 1988]	160	28
Экзоны [Ichinose и др., 1986a; Nagy, Kradin, McDonagh, 1988]	15	12

#### 2.4. Превращение плазменного профермента FXIII в активную форму (FXIIIa)

В отличие от быстрой активации тромбоцитарного FXIII [Webb и др., 1989] активация FXIII в плазме происходит значительно медленнее, что обусловлено лимитирующей скоростью диссоциации FXIII-A и FXIII-B-цепей [Chung, Lewis, Folk, 1974; Greenberg, Achyuthan, Fenton, 1987]. Это, как полагают, регулирует активацию FXIII в плазме [McDonagh, 1994].

Превращение FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> в активную форму фермента (EC 2.3.2.13) является многоступенчатым процессом, который физиологически индуцируется в заключительной фазе каскада свертывания крови при совместном действии тромбина и Ca<sup>2+</sup> (**Рисунок 6**). На первой стадии процесса активации происходит катализируемое тромбином протеолитическое расщепление связи Arg37-Gly38 на NH<sub>2</sub>-концевой части субъединицы FXIII-A. Это приводит к высвобождению активационного пептида FXIII-AP и превращению гетеротетрамера FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> в гетеротетрамер FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub>, который, по-прежнему, не обладает ферментативной

активностью. Вторая стадия активации требует ионов кальция, необходимых для диссоциации гетеротетрамера FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub> на субъединицы FXIII-A<sub>2</sub>' и FXIII-B<sub>2</sub>. На последнем этапе в присутствии ионов кальция субъединицы FXIII-A<sub>2</sub>' претерпевают существенные конформационные перестройки, обуславливающие переход на поверхность остатков Cys314, His373 и Asp396, что приводит к образованию активной формы фермента FXIII-A<sub>2</sub>\* (FXIIIa) [Bagoly, Muszbek, 2019; Schroeder, Kohler, 2016].



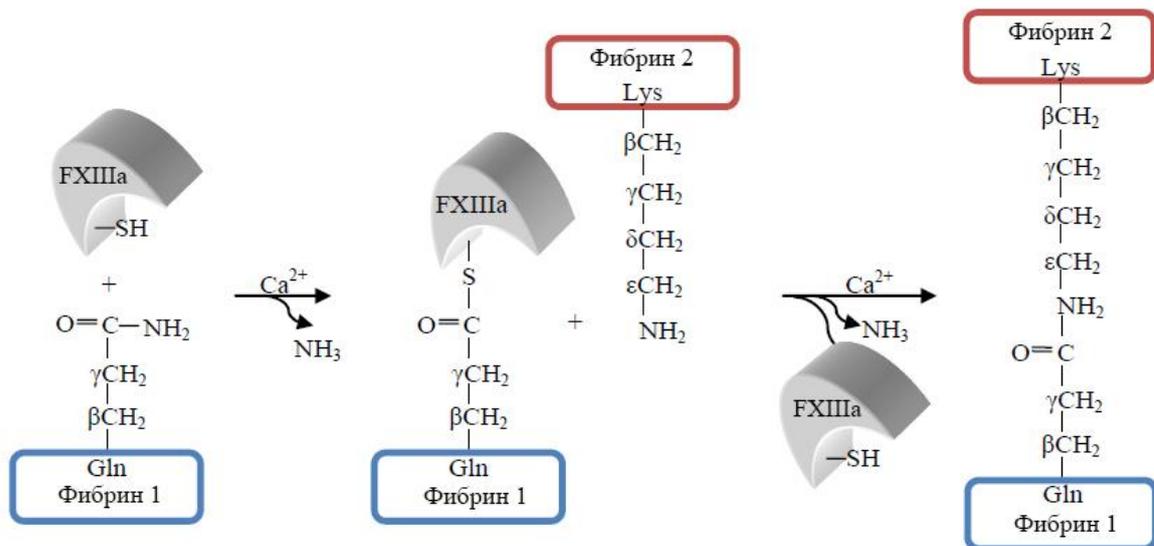
**Рисунок 6.** Схематическое изображение ступеней активации плазменного коагуляционного фактора FXIII [Rosenfeld, 2018]. Протеолитическое высвобождение активационного пептида FXIII-AP превращает молекулу FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> в молекулу FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub>, которая благодаря конформационным изменениям становится менее компактной. Связывание ионов кальция ведет к диссоциации гетеросубъединиц и последующему экспонированию каталитического центра в ферменте FXIII-A<sub>2</sub>\*. Область активного центра в структуре FXIII-A отображена в виде желтого треугольника; активационный пептид изображен в виде оранжевой волнистой линии; суши-домены субъединицы FXIII-B показаны в виде синих кружков.

Совсем недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что димерная молекула FXIII-A<sub>2</sub>\* склонна разделяться на два мономера FXIII-A\* с сохранением трансклутаминазной активности у каждого [Anokhin и др., 2017; Protodorova и др., 2019]. Кроме того, была предложена альтернативная модель активации плазменного FXIII, согласно которой переход гетеротетрамерной структуры зимогена в активную открытую форму мономерного FXIII-A\* включает образование промежуточного гетеродимера FXIII-AB, в котором субъединицы

FXIII-A еще не полностью насыщены ионами кальция и поэтому все еще слабо связаны с одним из мономеров FXIII-B [Singh и др., 2019].

## 2.5. Ковалентная стабилизация фибрина

FXIII является необходимым компонентом системы гемостаза, играя ключевую роль на заключительной стадии коагуляции. На этой стадии тромбин превращает фибриноген в мономерный фибрин, который полимеризуется, образуя фибриновый сгусток. В свою очередь, как упоминалось, активированный тромбином и ионами кальция FXIIIa сшивает ковалентными связями полимеры фибрина, создавая межмолекулярный  $\gamma$ -глутамил- $\epsilon$ -лизиновый мостик между боковыми цепями двух соседних молекул [Chen, Doolittle, 1971; Cottrell и др., 1979; Matačić, Loewy, 1968] (**Рисунок 7**).



**Рисунок 7.** Схема образования межмолекулярный  $\gamma$ -глутамил- $\epsilon$ -лизиновый связи между двумя молекулами фибрина. FXIIIa создает тиоэфирную связь со специфическим глутаминовым остатком молекулы фибрина, выделяя аммиак. Этот тиоэфир реагирует с первичным амином остатка лизина другой молекулы рядом с каталитическим центром FXIIIa, образуя амидную связь [Logand и др., 1966].

В присутствии FXIIIa, как  $\gamma$ -, так и  $\alpha$ -полипептидные фибриновые цепи подвергаются ковалентному сшиванию. FXIIIa сначала сшивает  $\gamma$ Glu398 или  $\gamma$ Glu399 одной молекулы фибрина с  $\gamma$ Lys406 другой молекулы фибрина, что

приводит к образованию  $\gamma$ - $\gamma$  димеров. Ковалентные сшивки с участием  $\alpha$ -полипептидных цепей появляются позже, и они образуют  $\alpha$ - $\alpha$ -димеры,  $\gamma$ - $\alpha$ -гибриды и высокомолекулярные  $\alpha$ -полимеры [Chen, Doolittle, 1971; Cottrell и др., 1979; Doolittle и др., 1977; Logand и др., 1966].

Поскольку область  $\alpha$ C фибриногена содержит несколько реакционноспособных глутаминов (Q221 и/или Q223, Q237, Q328 и Q366) и множественные реактивные лизины (Lys418, Lys448, Lys508, Lys539, Lys556, Lys563, Lys580 и Lys601) [Sobel, Gawinowicz, 1996],  $\alpha$ -полимеры содержат более пяти  $\alpha$ -полипептидных цепей фибрина [McKee, Mattock, Hill, 1970]. Показано, что именно образующиеся  $\alpha$ -полимеры вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмином [Rijken и др., 2016; Rijken, Uitte De Willige, 2017].

В дополнение к фибрину и фибриногену, FXIIIa играет важную роль в сшивании  $\alpha$ 2-антиплазмина [Valnickova, Enghild, 1998], фибронектина [Mosher, Schad, Vann, 1980; Procyk и др., 1985]; коллагена [Mosher, Schad, Vann, 1980]; фактора Виллебранда [Bockenstedt, McDonagh, Handin, 1986; Hada и др., 1986]; фактора V [Francis, McDonagh, Mann, 1986; Huh и др., 1988] и многих других субстратов, необходимых для стабилизации сгустка, прилипания сгустка к стенке сосуда, устойчивости сгустка к лизису и заживления ран. FXIIIa также непосредственно связывается с тромбоцитами [Greenberg, Shuman, 1984], (Таблица 3).

## **2.6. FXIII как потенциальная мишень для атаки АФК**

В процессе циркуляции в кровотоке коагуляционный фактор XIII, как и другие белки плазмы крови, может служить мишенью для постоянной атаки различными активными формами кислорода. Было показано, что озон-индуцированное окисление FXIII нарушало транслугутиназную активность белка и его пространственную структуру [Rosenfeld и др., 2013]. Окислитель вызывал также увеличение размеров молекулы вследствие нарушения упаковки полипептидных цепей при окислении.

**Таблица 3.** Субстраты для FXIII, сайты и молекулы, участвующие в перекрестном сшивании и их функции [Greenberg, Shuman, 1984].

Субстрат	Сайты сшивки	Перекрестно-сшитые	Функции
$\gamma$ -цепь фибриногена [Purves, Purves, Brandt, 1987; Spraggon, Everse, Doolittle, 1997; Weisel и др., 1993]	Gln398, Gln399 и Lys406	Другая $\gamma$ -цепь и $\alpha$ -цепи	Стабилизация сгустка
Фибриноген $\alpha$ -цепь [Cottrell и др., 1979; Fretto и др., 1978; Lorand, 2006; Matsuka и др., 1996; Sobel, Gawinowicz, 1996]	Gln221, Gln237, Gln328, Gln366 и 15 потенциальных лизинов от Lys208 до Lys606	Другие $\alpha$ -цепи	Стабилизация сгустка
$\alpha$ 2-Антиплазмин [Valnickova, Enghild, 1998]	Gln2	$\alpha$ -цепи фибрина; Lys303	Устойчивость к фибринолизу
TAFI [Valnickova, Enghild, 1998]	Gln2, Gln5, Gln292	фибрин и TAFI	Устойчивость к фибринолизу
PAI-2 [Ritchie и др., 2000; Ritchie и др., 2006]	-	$\alpha$ -цепь фибрина Lys148, Lys230, Lys413	Устойчивость к фибринолизу
Фибронектин [Mosher, Schad, Vann, 1980; Procyk и др., 1985]	Gln3	Фибронектин, фибрин, коллаген	Миграция клеток в сгусток; заживление раны
Коллаген [Mosher, Schad, 1979; Mosher, Schad, Vann, 1980]	-	Фибронектин, фибрин	Стабилизация внеклеточного матрикса
Фактор Виллебранда [Bockenstedt, McDonagh, Handin, 1986; Nada и др., 1986]	-	Фибрин, коллаген	Адгезия тромбоцитов к сгустку
Витронектин [Sane и др., 1988; Skorstengaard и др., 1990]	Gln93	-	-
Тромбоспондин [Bale, Westrick, Mosher, 1985]	-	Фибрин	-
Фактор V [Francis, McDonagh, Mann, 1986; Huh и др., 1988]	-	Фибрин, тромбоциты	Увеличение выработки тромбина на поверхности сгустка
Актин [Cohen и др., 1980; Mui, Ganguly, 1977]	-	Фибрин	Ретракция сгустка,
Миозин [Cohen и др., 1979]	-	Миозин	
Винкулин [Asijee и др., 1988]	-	Фибрин	
$\alpha$ IIb $\beta$ 3 [Cohen и др., 1985]	-	Фибрин	Стабилизация тромбоцитов и фибринового сгустка

Тем не менее, на момент начала данного исследования, коагуляционный фактор XIII оставался неисследованным в отношении: идентификации сайтов белка, вовлекаемых в модификацию при индуцированном окислении; роли некоторых сайтов в поддержании нативной конформации белка и сохранения функциональной активности, а также тех сайтов, которые наиболее вероятно ответственны за повреждение структуры и снижение транскламиназной активности. Все эти аспекты исследований нашли отражение в настоящей диссертационной работе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 3. Материалы и методы

#### 3.1. Материалы

В работе были использованы следующие материалы и реагенты:

DEAE-ToyoPearl M650, Tosoh Bioscience (USA) – анионообменный сорбент для очистки биомолекул (в данном случае для очистки коагуляционного фактора FXIII). Сорбент состоит из гранул гидроксильированного метакрилового полимера, функционализированных диэтиламиноэтильными (DEAE) группами.

Trypsin Gold (mass spectrometry grade, V5280) and Glu-C (sequencing grade, V1651), Promega (USA) – ферменты для гидролиза белковых молекул. Использовались при проведении подготовки образцов к анализу методом ВЭЖХ-МС/МС.

Дитиотреитол (DTT, 1,4-дитиотреитол), Merck (Darmstadt, Germany) - восстанавливающий агент, способный формировать шестичленное кольцо путём образования внутримолекулярной дисульфидной связи. Используется для восстановления дисульфидных связей в молекулах белков.

Йодацетамид, Merck (Darmstadt, Germany) представляет собой алкилирующий агент, используется для ковалентного связывания с тиольной группой цистеина, поэтому белок не может образовывать дисульфидные связи.

Тромбин человеческий ( $\geq 2,000$  NIH units/mg белка), Sigma-Aldrich (Germany) - является фактором свертывания крови IIa, служит прокоагулянтным фактором при превращении фибриногена в нерастворимый фибриновый сгусток, используется для активации FXIII.

Гирудин ( $\geq 1,500$  ATU/mg protein (ATU = антитромбиновых единиц)), Sigma-Aldrich (Germany) - природный пептид, обладающий антикоагулянтным свойством в крови, ингибитор тромбина.

HEPES (H3375, >99.5% (titration), Sigma-Aldrich (Germany) - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, цвиттер-ионный органический буферный агент.

Раствор гипохлорита натрия NaOCl (6-14%), Sigma-Aldrich (Germany).

Chromogenix S-2238™, Diapharma (UK) – хромогенный субстрат для определения активности тромбина.

The BioVision Colorimetric FXIIIa Activity Assay Kit, BioVision (USA) – хромогенный субстрат для определения активности коагуляционного фактора XIII.

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, (26619), Thermo Fisher scientific (USA) – смесь белков-маркеров молекулярного веса.

Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad (USA) – концентрат для приготовления реактива Бредфорда (для определения концентрации белков в растворе).

Amicon Ultra-0.5 mL (10 kDa, UFC501096), Merck (Germany) – центрифужные ультрафильтры для концентрирования и обессоливания белковых растворов.

Все реактивы для проведения электрофореза в полиакриламидном геле получены из Amresco (USA). Все остальные реагенты и соли для буферных растворов были приобретены в Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

## **3.2 Методы**

### **3.2.1 Выделение FXIII из плазмы крови человека**

Коагуляционный фактор XIII выделяли модифицированным методом фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-ToyoPearl M650 (Tosoh, Япония), впервые описанным Л. Лорандом [Lorand, Credo, Janus, 1981].

1) Подготовка анионообменника:

1. 55 мл сорбента DEAE-650M Toyopearl переносили в стакан, декантировали и перенесли на стеклянный фильтр.

2. Сорбент промывали 0,5 л воды, затем 0,2 л буфера 0,05M Tris-HCl 1mM EDTA; pH 7,5 и заполняли колонку.

2) Фракционное осаждение фибриногена сульфатом аммония.

1. Размораживали 1,7 л человеческой цитратной плазмы.

2. При 0° и постоянном перемешивании (2 часа) проводили осаждение фракции фибриногена 0,425 л насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM EDTA pH 7,0 (1/5 V плазмы).

3. Центрифугировали при 2°С на 14000 g, 20мин.

4. Отмывали осадок 25% раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM EDTA pH 7,0 при 0°С.

5. Центрифугировали при 2°С на 14000 g, 10мин.

6. Растворили осадок в 1/10 исходного объема плазмы в 0,15 KCl 1mM EDTA; pH 7,0.

7. Довели pH полученного раствора до 5,4, медленно добавляя 1N HCl.

8. При 0° и постоянном перемешивании осадили фракцию фибриногена 36 мл насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM EDTA pH 5,5 на 100 мл раствора.

9. Центрифугировали при 14000 g 20 мин при 2°С.

10. Растворили осадок в 1/20 исходного объема плазмы, т.е. в 85 мл 0,5 KCl 1mM EDTA pH 7,0.

11. Центрифугировали при 14000 g при 0°С 20 мин.

12. При 0° и постоянном перемешивании осадили фракцию фибриногена 18,2 мл насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM EDTA pH 7,0.

13. Центрифугировали при 14000 g 20 мин.

14. Осадок растворили в 1/20 исходного объема плазмы, т.е. в 85 мл 0,15 KCl 1mM EDTA; pH 7,0.

15. Для отделения фибриногена термостатировали полученный раствор 5 мин при 56°С, затем сразу охладили до 0°С.

3) Очистка и концентрирование FXIII

1. Центрифугировали при 14000 g при 0°С в течение 40 мин.

2. При 0° и постоянном перемешивании осадили супернатант сухой солью  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  из расчета 20,8 г соли на 100 мл супернатанта.

3. Центрифугировали при 14000 g 40 минут при 2°C.
4. Растворили осадок в 3,5 мл 0,05M Tris-HCl 1mM EDTA; pH 7,5.
5. Фильтровали полученный раствор при 2°C на ультрацентрифужных фильтрах Amicon Ultra-0.5 mL (10 kDa, UFC501096) при 14000 g.
6. Нанесли раствор белка на колонку с DEAE-650M Toyopearl и промыли колонку 2 объемами 0,05M Tris-HCl 1mM EDTA; pH 7,5 (110 мл – для снятия неспецифической сорбции).

Затем установили градиент для элюции белков. Градиент: основной буфер 0,05M Tris-HCl 1mM EDTA pH 7,5 (110 мл); элюирующий 0,05M Tris-HCl 1mM EDTA 0,2M NaCl; pH 7,5 (110 мл).
7. По графику элюции белков определили основные пики и проанализировали активность FXIIIa с помощью BioVision Colorimetric FXIIIa Activity Assay Kit.
8. Сконцентрировали полученный белок с помощью ультрацентрифугирования на Amicon Ultra-0.5 mL (10 kDa, UFC501096).
9. Проверили гомогенность полученного белка методом ПААГ-электрофореза.

### **3.2.2 Выделение фибриногена из плазмы крови человека**

- 1) Осаждение фибриногена глицином.
  1. При 0°C и постоянном перемешивании к 160 мл плазмы добавили 25 г глицина (соотношение 15.6 мг глицина (сухого) на 0.1 мл плазмы). Инкубировали 1 час при 4°C и постоянном перемешивании.
  2. Центрифугировали на 14000g 30 мин при 2°C.
  3. Растворили полученный осадок в 50mM Tris-HCl, 0,15M NaCl pH 7,4. Процедуры повторяли четыре раза [Blombäck и др., 1956].
- 2) Обессоливание и концентрирование фибриногена провели на ультрацентрифужных фильтрах Amicon Ultra-0.5 mL (10 kDa, UFC501096).

### 3.2.3 Подготовка образцов к окислению

FXIII перед обработкой окислителем частично и полностью активировали с помощью ионов кальция, а также тромбина в присутствии ионов кальция при 37°C, соответственно, по методике, описанной ранее [Schroeder и др., 2007].

Для инактивации тромбина гирудин добавляли к активированному тромбином FXIII перед инкубацией с окислителем или в буфере (контрольный образец). Полная инактивация тромбина была протестирована с хромогенным субстратом S-2238 по методике производителя [Svendsen и др., 1972]. Тромбин, предварительно инактивированный гирудином, добавляли к образцам окисленного и контрольного профермента и FXIII, обработанных 5 мМ Ca<sup>2+</sup>.

Группы образцов имели одинаковый состав: FXIII (1мг/мл) CaCl<sub>2</sub> (5mM) тромбин (10NIH/мл) с эквивалентным количеством гирудина, однако отличались очередностью добавления реагентов. Образцы профермента (FXIII) (1мг/мл) инкубировали 15 минут без добавления Ca<sup>2+</sup>, и инактивированного тромбина. Затем, непосредственно перед обработкой окислителем в образец профермента добавляли все вышеперечисленные реагенты. Частично активированные Ca<sup>2+</sup> образцы (FXIII+Ca<sup>2+</sup>) инкубировали 15 минут в присутствии ионов кальция, с последующим добавлением инактивированного тромбина. Полностью активированные образцы (FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr) инкубировали в присутствии Ca<sup>2+</sup> и активного тромбина 15 минут, после чего к ним было добавлено эквивалентное содержанию тромбина количество гирудина.

### 3.2.4 Окисление образцов озоном

Образцы FXIII в Трис-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 [Rosenfeld и др., 2013]. Количество окислителя было равно 50 мкМ.

### 3.2.5 Окисление образцов гипохлоритом

Обработку образцов гипохлоритом осуществляли в буферном растворе, содержащем 44 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) и 0,15 M NaCl с pH 7,4. Окисление образцов FXIII проводили раствором гипохлорита натрия 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).

### 3.2.6 Анализ изменения активности FXIII при окислении

Колориметрический набор для анализа активности BioVision FXIIIa (BioVision, Milpitas, CA, USA) использовали для определения удельной трансглутаминазной активности активированного FXIII, выделенного из плазмы человека, нормализованной по концентрации белка, определенной при  $\lambda = 280$  нм ( $\epsilon_{0,1\%} = 1,38$  для FXIII). Набор для анализа активности BioVision's Factor XIIIa определяет трансглутаминазную активность FXIIIa путем поперечной сшивки аминсодержащего субстрата с глутамин-содержащим субстратом, что приводит к потере аммиака, который можно количественно измерить колориметрическим анализом при 340 нм согласно инструкции производителя [BioVision].

Активированный FXIII в образцах до окисления имел удельную активность  $1836 \pm 79$  по Loewy U мг<sup>-1</sup>. (Для всех образцов FXIIIa измерения трансглутаминазной активности проводили в трех повторях). Loewy U ml<sup>-1</sup> представляет собой самое высокое разведение фермента, способного образовывать нерастворимый сгусток в условиях, описанных Loewy et al. [Loewy и др., 1961] или 17 PEU, плазменные эквивалентные единицы на децилитр (PEU / дл), 1 PEU = 108 по Loewy U.

### 3.2.7 Контроль сохранения каталитической активности окисленного FXIII методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез)

Электрофорез – это разделение заряженных макромолекул в пространстве при движении их под действием электрического поля. Ключевой характеристикой, определяющей возможность разделения макромолекул, является их подвижность в среде. В общем случае подвижность зависит от физического размера молекулы, ее заряда и характеристики внешней неподвижной среды, в которой молекула движется. В описываемых экспериментах использовали вертикальный ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола по модифицированной методике Лэммли [Laemmli, 1970].

FXIIIa получали активацией FXIII в различных образцах в 0,05 М трис-HCl-буфере с pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Для ковалентного сшивания фибриновых цепей 50 мкл тромбина (0,25 единиц NIH) и 0,01 мл FXIIIa добавляли к 1 мл фибриногена 2 мг/мл. Сшивание фибрина прекращали через 45 минут добавлением электрофорезного буфера для образцов, содержащего 1%  $\beta$ -меркаптоэтанол, с последующим термостатированием образца при 95°C 5 мин.

Для анализа образцов использовали градиентный способ заливки геля с диапазоном концентраций геля 8-23%. Для приготовления градиентного геля использовали специальную установку с двумя сообщающимися резервуарами Bio-Rad Gradient former model 485 согласно инструкции производителя [Bio-Rad]. Стекла с полимеризованными гелями закрепляли в электродном модуле, который помещали в электрофоретическую камеру Bio-Rad Mini Protean Tetra cell и заливали электродный буфер в «верхнее» и «нижнее» отделения, согласно протоколу производителя [Bio-Rad].

В лунки геля вносили подготовленные образцы. Камеру подключали к блоку питания Bio-Rad PowerPack HC и проводили разделение белков при

постоянном напряжении 200V в течение 40-60 мин. Разделение заканчивали сразу после выхода красителя бромфенолового синего из геля.

Гели фиксировали и окрашивали в 0,05% растворе кумасси бриллиантового синего (Coomassie G250), содержащем 20% этиловый спирт и 2% трихлоруксусную кислоту. В качестве маркеров молекулярной массы использовали смесь белков PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Fisher scientific (USA).

### **3.2.8 Подготовка образцов и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС**

Для предварительного анализа эффективности использования трипсина и Glu-C для гидролиза образцов FXIII использовали программный алгоритм PeptideCutter (<http://www.expasy.org/tools/peptidocutter/>), который предсказывает сайты расщепления в аминокислотной последовательности протеазами или химическими веществами.

Используя полученный список пептидов и принимая во внимание высокую вероятность того, что пептиды с менее чем 5 аминокислотными остатками идентифицируются только в случае пропущенного расщепления, а пептиды с составом выше 30-40 остатков, вероятно, будут иметь низкую интенсивность, поскольку они менее ионизированы и, следовательно, могут не детектироваться при МС анализе в экспериментальных условиях, был получен список пептидов, которые теоретически должны быть детектированы.

Для подготовки образцов к анализу методом ВЭЖХ-МС/МС, их подвергали ферментативному гидролизу трипсином или последовательно ферментами Glu-C и трипсином. Реакции проводили в соответствии с протоколом производителя [Promega]. Образец переводили в буфер 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), содержащий 0,15 М NaCl, и для гидролиза добавляли фермент в количестве 1 мкг на 50 мкг FXIII (или пропорционально). Гидролиз проводили 16 часов при 37°C. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до 0,1%. Полученные пептиды

затем концентрировали и обессоливали на картриджах ZipTip (Millipore) с обращенной фазой C18 согласно стандартному протоколу [Millipore].

Анализ ВЭЖХ-МС/МС проводили с использованием nano-LC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), соединенным с масс-спектрометром ионного циклотронного резонанса (ИЦР) 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия) совмещенного с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров столкновительно индуцированной фрагментации (МС/МС) ионов.

Для хроматографического разделения 1 мкл каждого образца наносили на колонку 75 мкм × 12 см с фазой Reprosil-Pur Basic C18, 3 мкм (Dr. Maisch HPLC GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленную в лаборатории по методике Манна и др. [Ishihama и др., 2002]. Для создания градиента подвижной фазы использовали 2 раствора: 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (раствор А) и ацетонитрил (раствор В). Хроматографию проводили с линейным градиентом, увеличивая относительное содержание раствора В с 3% до 50% в течение 60 минут.

Напряжение ионного распыления было установлено на 2,3 кВ. МС 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 измеряли в ячейке ИЦР в диапазоне  $m/z = 300-1600$  с разрешением  $R = 50000$  при  $m/z = 400$  (количество ионов в ячейке ИЦР было установлено на  $5 \times 10^6$ ).

На втором этапе пять наиболее интенсивных пиков с первого этапа подвергались столкновительно индуцированной фрагментации, и спектры фрагментов регистрировались в линейной ионной ловушке (число ионов в LTQ было установлено  $3 \times 10^4$ ). После фрагментации соответствующие родительские массы были динамически исключены из рассмотрения в течение следующих 30 с [Galetskiy и др., 2011; Petrushanko и др., 2016].

Каждая серия образцов была получена в трех повторах, каждый из которых был проанализирован в трех технических повторах.

### 3.2.9 Биоинформатический анализ результатов ВЭЖХ-МС/МС с помощью программного алгоритма PEAKS Studio v. 8.5

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) с трипсином/Glu-C и трипсином в качестве фермента и допустимым односторонним неспецифическим расщеплением; точность массы иона-предшественника была установлена равной 15 ч/млн (ppm); точность определения массы МС/МС фрагментов до 0,50 Да. Уровень допустимого ложного обнаружения false discovery rate (FDR) для пептидов был установлен на уровне <0,1%. Максимально допустимое количество модификаций на пептид было равно трем, в соответствии с рекомендациями приведенными в других исследованиях [Han и др., 2011; Kim, Zhong, Pandey, 2016; Silva и др., 2013; Verrastro и др., 2015; Zhang и др., 2012].

Программный алгоритм PEAKS studio используют для определения последовательности de novo для каждого входящего спектра. Параметры (массовая погрешность и PTM), указанные для поиска в базе данных, также используют для секвенирования de novo. Для каждого спектра используется только первый пептид секвенирования de novo, обнаруженный PEAKS. Алгоритм PEAKS также вычисляет достоверность для каждой аминокислоты в последовательности de novo, что в результатах является процентным значением. Выходные данные PEAKS преобразуются в сиквенс последовательности путем замены аминокислот с низкой достоверностью их значениями массы. Более конкретно, каждый участок соседних аминокислотных остатков с доверительной вероятностью <30% заменяется «массовым сегментом», который равен общей массе остатков.

Идентификация алгоритмом подпрограммы PEAKS Post-Translational modifications (PEAKS PTM) достигается путем интеграции результатов алгоритма поиска в базе данных PEAKS Data Base (PEAKS DB) и результатов секвенирования de novo. При поиске в базе данных PEAKS DB в качестве переменных может быть

указано только ограниченное число часто встречающихся РТМ. Алгоритм базы данных PEAKS DB используется для идентификации белков. В этом этапе указано несколько очень частых РТМ, чтобы максимизировать чувствительность к окислению: окисление (+15,99); диокисление (+31,99); хлорирование тирозина (+33,96) и др. Алгоритм PEAKS РТМ используется для определения большего количества модификаций. В этом этапе уже идентифицированные белки сопоставляются со спектрами, имеющими высокий показатель достоверности *de novo*, но не отнесенные к другим белкам при поиске в базе данных. На этом этапе можно расширить список модификаций до 650 известных модификаций базы данных UNIMOD.

Точные сайты модификации определяются при наличии сайт-определяющих фрагментов ионов. Определение достоверно модифицированных аминокислот было достигнуто с использованием показателя *Ascore* - доверительной оценки модификации пептида в конкретной позиции, рассчитанной с помощью программного обеспечения PEAKS, как  $-10 \log$  вероятности того, что модификация произошла в сообщенной позиции, по сравнению с другими возможными позициями. Те модификации, для которых достоверно не определено положение в аминокислотной последовательности, исключаются из расчёта путем установки желаемого порога показателя *Ascore*. В этой работе использовался порог  $Ascore > 100$ .

Как было предложено ранее [Vasilyeva и др., 2018], степень окисления для каждого типа модификации аминокислотного остатка рассчитывали как сумму площадей МС-пигов пептидов, несущих определенную окислительную модификацию этого аминокислотного остатка, нормированную на общую площадь МС-пигов 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. Количество аминокислотных остатков, вовлеченных в окислительную модификацию, определяли путем деления количества модифицированных

остатков на общее количество остатков в покрытой МС-анализом части соответствующей последовательности (МС-покрытие) с последующим пересчетом в процент. Каждый из аминокислотных остатков, окисленных по меньшей мере на 1% (степень модификации > 1%), считался модифицированным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 4. Озон-индуцированное окисление FXIII

В данной главе рассмотрены последствия действия озона на первичную структуру каталитической субъединицы FXIII. Озон, не относясь к семейству физиологических окислителей, генерирует гидроксильные радикалы, способные атаковать целевые белки. Это подразумевает, что окисление белков озоном осуществляется системой –  $O_3/HO^\bullet$ , в какой-то степени, имитирующей систему Фентона.

#### 4.1 Особенности MS-покрытия первичной структуры каталитической субъединицы FXIII

Для предварительного анализа эффективности использования трипсина и Glu-C для гидролиза образцов FXIII была использована программа PeptideCutter (<http://www.expasy.org/tools/pepticutter/>), которая предсказывает сайты расщепления протеаз или химических веществ в последовательности белка (См. Главу 3). Ожидаемое MS-покрытие FXIII должно было составить 80,8%. Тем не менее, экспериментально полученное MS-покрытие во всех случаях было ниже, чем ожидалось. Для FXIII-A в образцах FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup>, FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr величина MS-покрытия последовательности составила 62,2%, 66,4% и 53,2%, соответственно. Для окисленных образцов FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup>, FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr покрытие составило 59,5%, 54,2% и 38,9% соответственно [Vasilyeva и др., 2018].

Следует отметить, что при окислении профермента почти во всех случаях MS-покрытие последовательности в структурных областях сохранялось или снижалось незначительно (от 58,5% до 46,3% в  $\beta$ -сендвич, от 60,7% до 58,3% в каталитическом ядре, от 78% до 54,9% в  $\beta$ -баррель 1 и от 78,6% до 83,5% в  $\beta$ -баррель 2). При окислении образца FXIII+Ca<sup>2+</sup> уменьшение детектируемых участков последовательности FXIII наблюдалось преимущественно в  $\beta$ -сендвич, но

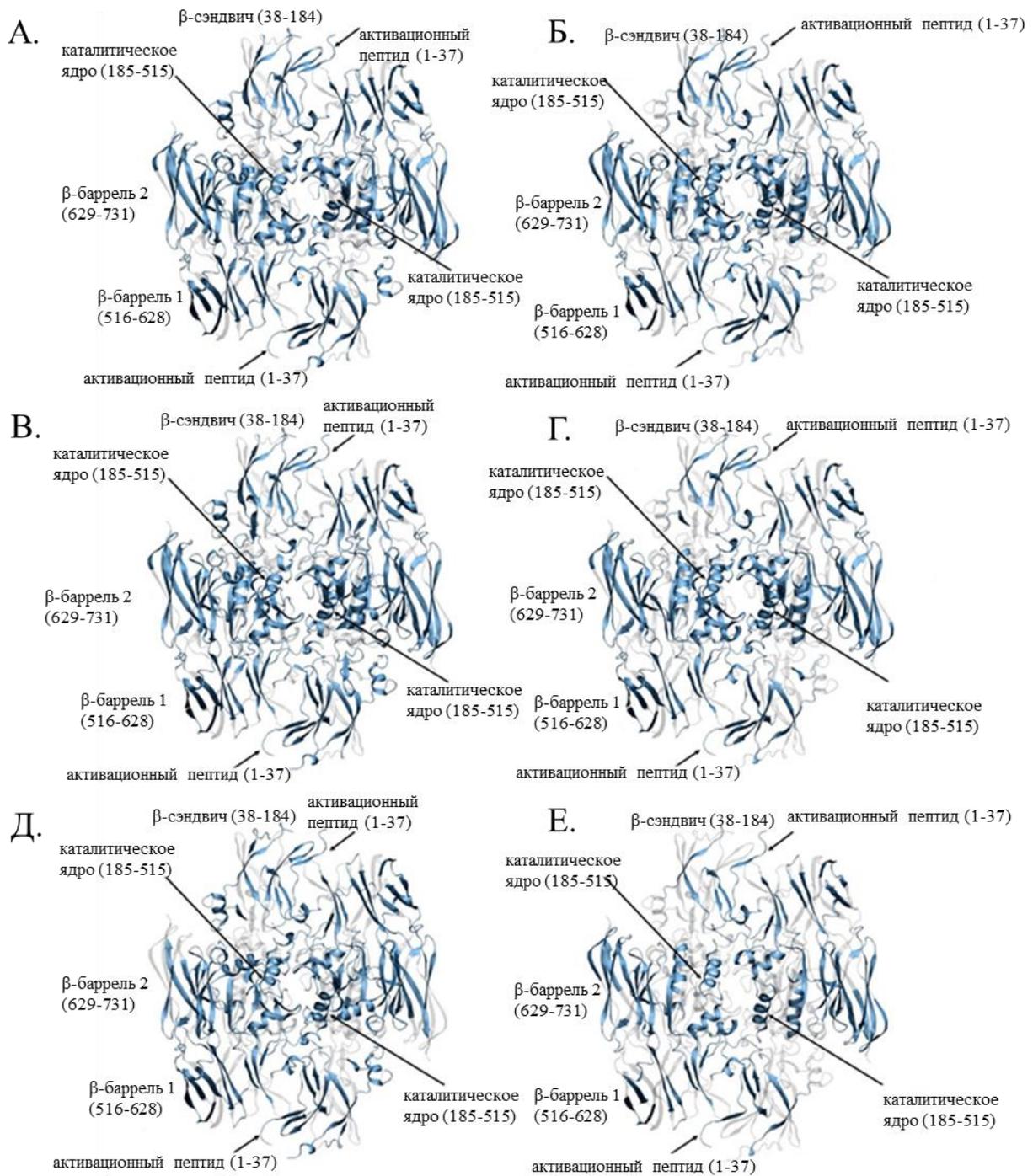
также наблюдалось в небольшом количестве в других доменах (с 62,6% до 34,7% в  $\beta$ -сэндвич, с 62,2% до 52% в каталитическом ядре, от 71% до 60,1% в  $\beta$ -баррель 1, от 78,6 до 76,7% в  $\beta$ -баррель 2). Наиболее значительное уменьшение количества детектируемых участков последовательности молекулы наблюдалось при окислении FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr (с 50,3% до 25,9% в  $\beta$ -сэндвич, с 45,9% до 29,9% в каталитическом ядре, с 66,4% до 39,8% в  $\beta$ -баррель 1, с 60,2% до 73,8% в  $\beta$ -баррель 2). Изменение покрытия в окисленной и не окисленной молекуле FXIII на разных стадиях активации показано на **Рисунке 8**.

Согласно полученным результатам, во всех образцах наблюдаются довольно значительные различия в экспериментально полученном диапазоне обнаруживаемых пептидов по сравнению с ожидаемым покрытием, причем самые сильные различия наблюдаются в окисленных образцах [Vasilyeva и др., 2018].

Участки детектирования в контрольных образцах не полностью идентичны. Это может быть связано с конформационными изменениями в молекуле в процессе активации. Участки детектирования контрольных образцов активной формы FXIII отличаются от таковых профермента и частично активированного FXIII наиболее заметно. Этот результат согласуется с ранее опубликованными результатами [Protopopova и др., 2019], в которых показано, что наиболее масштабные конформационные изменения в молекуле FXIII происходят именно при отщеплении активационного пептида, при воздействии тромбина и ионов кальция.

По сравнению с соответствующими контрольными образцами, у всех окисленных образцов снижается количество детектированных пептидов в большинстве случаев, однако на некоторых участках пептиды детектируются только в окисленных образцах.

При сравнении детектированных участков в окисленных образцах наблюдается резкое снижение показателя в FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, особенно в тех участках, в которых наблюдалось окисление в проферменте и частично активированной форме [Vasilyeva и др., 2017].



**Рисунок 8.** Кристаллическая структура молекулы FXIII-A<sub>2</sub> с нанесенным МС-покрытием, которое получено для контрольных (А, В, Д) и окисленных озонем образцов (Б, Г, Е) FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr соответственно. Участки аминокислотной последовательности, входящие в МС-покрытие отмечены голубым цветом, отсутствие МС-покрытия обозначено серым [Vasilyeva и др., 2018]. Изображение было сделано в программе VMD 1.9.3, University of Illinois at Urbana–Champaign, USA с использованием структуры FXIII-A<sub>2</sub> PDB ID: 1F13.

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. Напротив, увеличение MS-покрытия возможно, когда детектируются ранее являвшиеся слишком короткими пептиды, из-за пропущенных сайтов расщепления, вследствие окисления аминокислотных остатков, специфичных для гидролиза [Mirzaei, Regnier, 2005].

Кроме того, может происходить перекрестное сшивание белков, что также снижает количество детектированных участков, поскольку образование дополнительных ковалентных связей ограничивает как гидролиз белка, так и идентификацию сшитых пептидов, имеющих несоответствующую последовательности молекулярную массу.

Другой возможной причиной исчезновения ранее присутствующих (в контрольных образцах) пептидов из MS-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 [Han и др., 2011].

Увеличение MS-покрытия в определенных участках последовательности может быть обусловлено неспецифическими разрывами цепей крупных пептидов. Для реализации возможности детектировать фрагменты пептидов, образовавшиеся таким образом, в настройках программы при анализе результатов было разрешено неспецифическое расщепление с одного конца пептида.

Другая причина уменьшения или увеличения MS-покрытия в образцах может заключаться в конформационном состоянии нативной молекулы FXIII, в которой некоторые сайты недоступны для ферментативного расщепления. Окисление, в свою очередь, может изменить конформацию белка, делая некоторые участки цепи, ранее не детектированные, доступными для гидролиза [Guedes и др., 2009].

Таким образом, несмотря на многочисленность эффектов, которые могут повлиять как на количество, так и на расположение в аминокислотной последовательности детектированных пептидов, в модельной системе, в которой выполнены эксперименты, наличие контрольных неокисленных образцов для каждого из обработанных озоном образцов, значительное количество воспроизведенных экспериментов и измерений при одинаковых условиях, а также обработка полученных результатов при фиксированных настройках программы, позволяет в некоторой степени интерпретировать результаты МС-покрытия молекулы.

#### **4.2 Анализ окислительных модификаций FXIII-A нативного и окисленного озоном FXIII методом ВЭЖХ-МС/МС**

Окислительные модификации субъединицы FXIII-A были обнаружены для аминокислотных остатков Met, Trp, Tyr, Lys, Cys, Asp, Pro, His, Arg, Glu (**Таблица А.1**). Обнаруженные модификации перечисленных типов аминокислотных остатков подтверждены в базе данных UNIMOD (<http://www.unimod.org>) и представлены в литературных источниках [Guedes и др., 2009; Sharma, Graham, 2010; Stadtman, Levine, 2003].

Список обнаруженных окислительных модификаций аминокислотных остатков и их характеристики (изменение моноизотопной массы аминокислотного остатка и химический состав) представлены в **Таблице 4**.

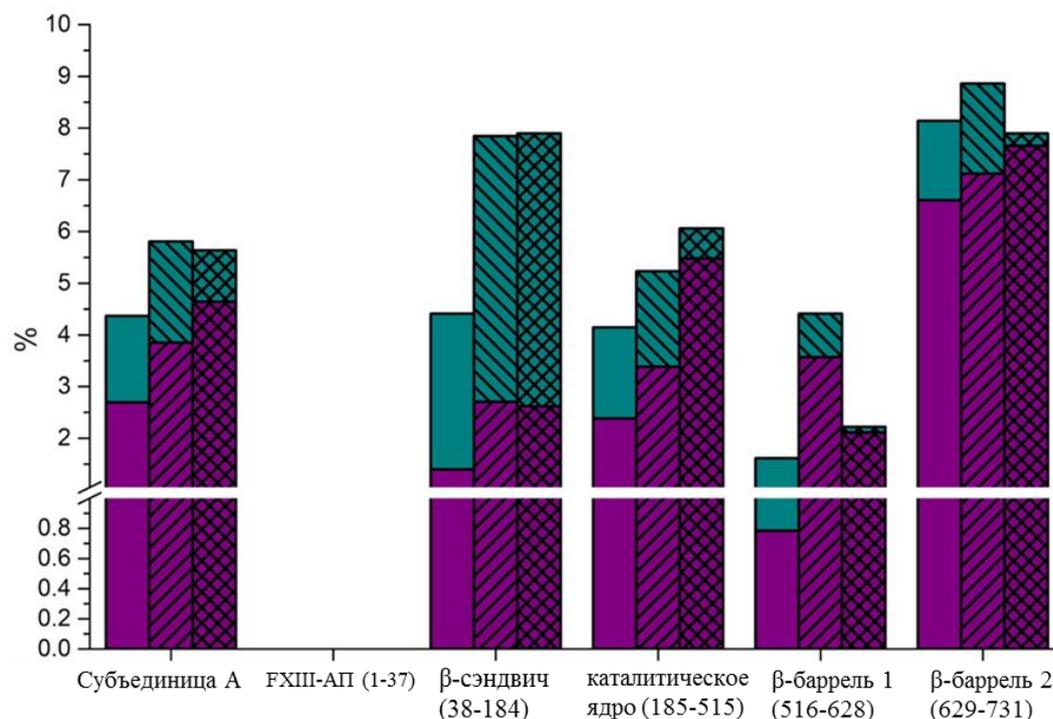
За исключением активационного пептида, окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных элементах субъединицы FXIII-A. Для всей молекулы FXIII наблюдается количество/процент окисленных аминокислотных остатков: для окисленных образцов FXIII, равные 4,4%/2,7%; для окисленного образца FXIII+Ca<sup>2+</sup> - 5,8%/3,9% и для окисленного образца FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr - 5,6%/4,6%, соответственно [Vasilyeva и др., 2018].

**Таблица 4.** Список окислительных модификаций, обнаруженных при обработке результатов, и количество этих модификаций в окисленных образцах.

$\Delta m$ (моноизотопная масса)	Международное название (UNIMOD)	Изменения в химическом составе аминокислоты	FXIII	FXIII+Ca <sup>2+</sup>	FXIII+Ca <sup>2+</sup> /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)

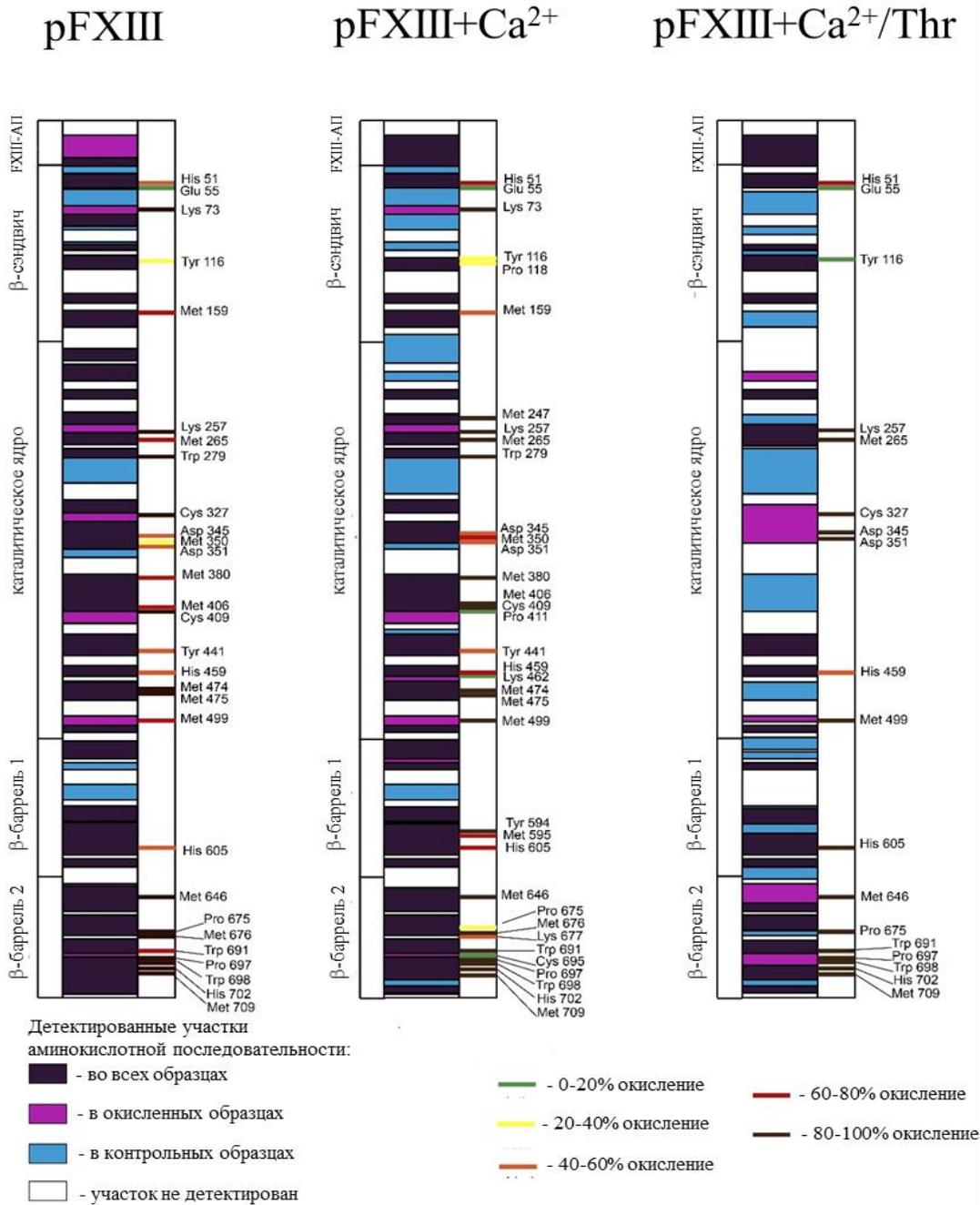
Независимо от стадии активации, наиболее окисленными доменами по количественным параметрам являются  $\beta$ -баррель 2 и  $\beta$ -сэндвич -  $8,1 \pm 0,1\%$ ,  $8,9 \pm 0,1\%$ ,  $7,9 \pm 0,1\%$  и  $4,4 \pm 0,1\%$ ,  $7,8 \pm 0,1\%$ ,  $7,9 \pm 0,1\%$  для образцов окисленного FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, соответственно. Домены  $\beta$ -баррель 1 и каталитического ядра имеют максимальную степень окисления -  $6,6 \pm 0,1\%$ ,  $7,1 \pm 0,1\%$ ,  $7,7 \pm 0,2\%$  и  $2,4 \pm 0,1\%$ ,  $3,4 \pm 0,1\%$ ,  $5,5 \pm 0,1\%$  для окисленных образцов FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, соответственно (**Рисунок 9**). Важно отметить, что степень окисления структурной области, необходимой для функционирования фермента - домена каталитического ядра, значительно возрастает при окислении FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr.

Самые высокие значения как количества модифицированных аминокислотных остатков, так и степени их модификации среди различных образцов по отношению к МС-покрытию, соответствуют образцу FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, в то время как самые низкие значения характерны для образца окисленного профермента.



**Рисунок 9.** Количество окисленных аминокислотных остатков (бирюзовые столбцы) и степень окисления (фиолетовые столбцы) для структурных областей каталитической FXIII-A субъединицы в образцах окисленного FXIII (левые столбцы, без штриховки) и образцов окисленного FXIII+Ca<sup>2+</sup> (средний столбцы, диагональная штриховка) и окисленного FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr (правые столбцы, перекрестная штриховка). Все столбцы показывают параметры, рассчитанные в процентах относительно МС-покрытия соответствующей последовательности структурных элементов [Vasilyeva и др., 2018]. Изображение было сделано в программе OriginPro 9.1.

Это означает, что в окисленных образцах частично или полностью активированного профермента при рассмотрении одной и той же модифицированной аминокислоты во многих случаях процент её окисления возрастал по сравнению с образцом окисленного FXIII (**Рисунок 10**). Возможные причины этих результатов будут обсуждаться ниже.



**Рисунок 10.** MS-покрытие последовательности (левые столбцы) и окислительные модификации в каталитической FXIII-A субъединице образцов FXIII, подвергнутых воздействию озона на разных стадиях активации FXIII [Vasilyeva и др., 2017]. Цветовые обозначения MS-покрытия и степени окисления аминокислотных остатков (диапазоны процентов степени окисления) расшифрованы на рисунке.

Следует отметить, 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 модификации, специфичных для определенных типов аминокислотных остатков. При сравнении образцов окисленного FXIII и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr часто 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 (**Таблица 5**).

На все эти результаты непосредственно влияет МС-МС идентификация пептида, а также площадь его пика на хроматограмме. Поэтому, важно учитывать эту сторону результатов.

**Таблица 5.** Окислительные модификации аминокислотных остатков и процент содержания пептидов с данной модификацией по отношению ко всем пептидам, содержащим конкретный аминокислотный остаток, а также сайты локализации в аминокислотной последовательности в образцах, выявленные методом ВЭЖХ-МС/МС.

Окисленные аминокислотные остатки	Международное название модификаций (UNIMOD)	FXIII			Пептиды	Структурные области
		FXIII	FXIII+Ca2+	FXIII+Ca2+/Thr		
H51	Histidine oxidation to asparagine (-23.02)	15	17	22	FLNVTSVN(-23.02)LFK FLNVTSVN(-23.02)LFKE	β-сэндвич
	Histidine oxidation to aspartic acid (-22.03)	44	60	48	FLNVTSD(-22.03)LFK FLNVTSD(-22.03)LFKE VTSVD(-22.03)LFK	
K54	Carboxylation(+43.99)	n/m	n/m	11	FLNVTSVN(-23.02)LFKE(+43.99)	
E55	Formylation (+27.99)	8	6	n/m	FLNVTSD(-22.03)LFK(+27.99)E	
K73	Formylation (+27.99)	100	100	n/d	NNK(+27.99)LIVR	
Y116	Oxidation (+15.99)	28	25	18	NKGT(+15.99)IPVPIVSE	
					GT(+15.99)IPVPIVSE	
P118	Oxidation (+15.99)	n/m	29	n/m	NKGTIP(+15.99)VPIVSE	
M159	Oxidation (+15.99)	75	50	n/d	M(+15.99)YVAVWTPYGVLR	
M247	Oxidation (+15.99)	n/m	70	n/d	AQM(+15.99)DLSSGRGNPIKVS AQM(+15.99)DLSSGRGNPIKVSR AQM(+15.99)D(+21.98)LSGR AQM(+15.99)DLSSGR	
					AQM(+31.99)DLSSGR(-.98) AQM(+31.99)DLSSGRGNPIKVSR AQM(+31.99)D(+21.98)LSGR AQM(+31.99)DLSSGR	
K257	Dioxidation (+31.99)	n/m	65	n/d	AQM(+31.99)DLSSGR	
	Formylation (+27.99)	100	100	100	GNPIK(+43.99)VSR	

M265	Oxidation (+15.99)	77	87	65	VGSAM(+15.99)VNAK
	Dioxidation (+31.99)	2	3	1	VGSAM(+31.99)VNAK
M265 W279	Dethiomethyl (-48.00)	n/m	n/m	27	VGSAM(-48.00)VNAK
	Dioxidation (+31.99)	100	100	n/d	GVLVGSW(+31.99)D
C327	Cysteine oxidation to cysteic acid (+47.98)	n/q	n/q	n/q	C(+47.98)LGIPAR
D345	Oxidation (+15.99)	45	56	100	IVTNYFSAHDND(+15.99)ANLQMDIFLEEDGNVNSK
M350	Oxidation (+15.99)	34	67	n/m	SAHDNDANLQM(+15.99)DIFLEEDGNVNSK IVTNYFSAHDNDANLQM(+15.99)D
D351	Oxidation (+15.99)	45	56	100	SAHDNDANLQMD(+15.99) IVTNYFSAHDNDANLQMD(+15.99)
M380	Oxidation (+15.99)	n/m	100	n/m	AWM(+15.99)TRPDLVPG AWM(+15.99)TRPDLVPGFG AWM(+15.99)TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM YR
R382	Oxidation (+15.99)	79	n/m	n/d	AWMTR(+15.99)PDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM YR
M406	Oxidation (+15.99)	n/q	n/q	n/q	AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR
R408	Oxidation (+15.99)	79	n/m	n/d	AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM YR(+15.99) TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGM YR(+15.99)
C409	Dioxidation (+31.99)	n/q	n/q	n/q	C(+31.99)GP(+15.99)ASVQAIK C(+31.99)GP(-30.01)ASVQAIK(+27.99)
C409 P411	Cysteine oxidation to cysteic acid (+47.98)	n/q	n/q	n/q	C(+47.98)GPASVQAIK
	Oxidation (+15.99)	n/m	14	n/d	C(+31.99)GP(+15.99)ASVQAIK
Y441	Oxidation (+15.99)	45	49	n/m	VFAEVNSDLIY(+15.99)ITAK AEVNSDLIY(+15.99)ITAK
H459	Histidine oxidation to asparagine (-23.02)	13	19	n/m	NVDATN(-23.02)IGK

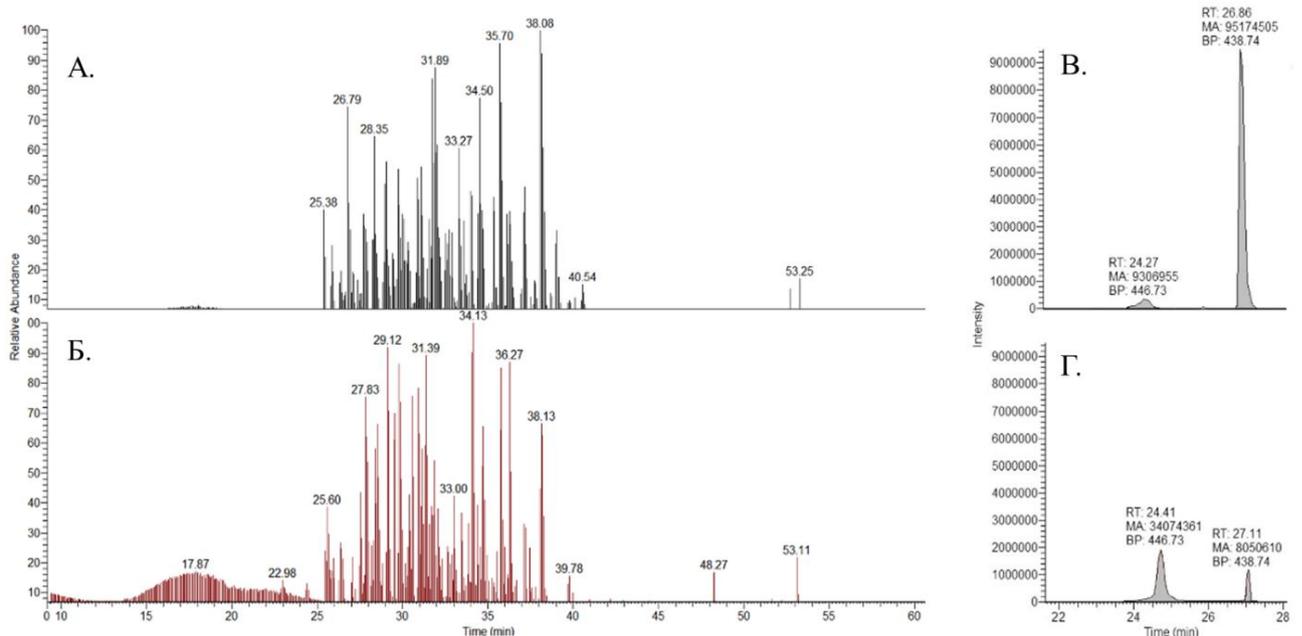
H459 K462	Histidine oxidation to aspartic acid (-22.03)	28	51	49	NVDATD(-22.03)IGK	
H459 K462 M474	Formylation (+27.99)	n/m	4	n/m	NVDATN(-23.02)IGK(+27.99)LIVTK NVDATD(-22.03)IGK(+27.99)LIVTK	
M474	Oxidation (+15.99)	45	54	n/m	QIGGDGM(+15.99)MDITDTYK	
M474 M475	Dioxidation (+31.99)	45	46	n/m	QIGGDGM(+31.99)MDITDTYK	
M474 M475 M475 M499	Oxidation (+15.99)	45	54	n/m	QIGGDGMM(+15.99)DITDTYK	
M475 M499	Dioxidation (+31.99)	45	46	n/m	QIGGDGMM(+31.99)DITDTYK	
M475 M499 Y594	Oxidation (+15.99)	71	90	100	TALM(+15.99)YGAK	
M595	Oxidation (+15.99)	n/m	100	n/m	EAVLIQAGEY(+15.99)MGQLLE EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLE AVLIQAGEY(+15.99)M(+15.99)GQLLE	
M595 H605	Dioxidation (+31.99)	n/m	44	n/m	AVLIQAGEYM(+31.99)GQLLE	
M595 H605 H605 M646	Histidine oxidation to asparagine (-23.02)	10	11	n/m	QASLN(-23.02)FFVTAR	
H605 M646 P675	Histidine oxidation to aspartic acid (-22.03)	38	60	95	QASLD(-22.03)FFVTAR GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQFTNPLKE GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQ	β-баррель 1
M676	Oxidation (+15.99)	100	27	100	GPGVTRP(+15.99)MK GPGVTRP(+15.99)M(+15.99)KK NVVHLDGPGVTRP(+15.99)MK	
K677	Oxidation (+15.99)	100	100	n/d	NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99)K LDGPGVTRPM(+15.99)K	
W691	Oxidation (+15.99)	n/m	45	n/d	NVWVHLDGPGVTRPMK(+15.99)K	
W691 C695	Dioxidation (+31.99)	68	79	84	IRPNSTVQW(+31.99)EE IRPNSTVQW(+31.99)E	β-баррель 2
W691 C695	Tryptophan oxidation to kynurenin (+3.99)	5	5	4	IRPNSTVQW(+3.99)EE	

W691 C695 P697	Cysteine oxidation to cysteic acid (+47.98)	56	2	n/m	VC(+47.98)RPWVSGHR
W691 C695 P697 W698	Dioxidation (+31.99)	89	98	100	VCRP(+31.99)WVSGHR
	Trioxidation (+47.98)	85	98	100	VCRP(+31.99)W(+47.98)VSGD(-22.03)R
D702	Histidine oxidation to aspartic acid (-22.03)	85	98	100	PWVSGD(-22.03)R
M709	Dioxidation (+31.99)	1	4	n/m	LIASM(+31.99)SSDSL LIASM(+31.99)SSD
M709	Oxidation (+15.99)	79	79	94	IASM(+15.99)SSDSL
M709					
M709					

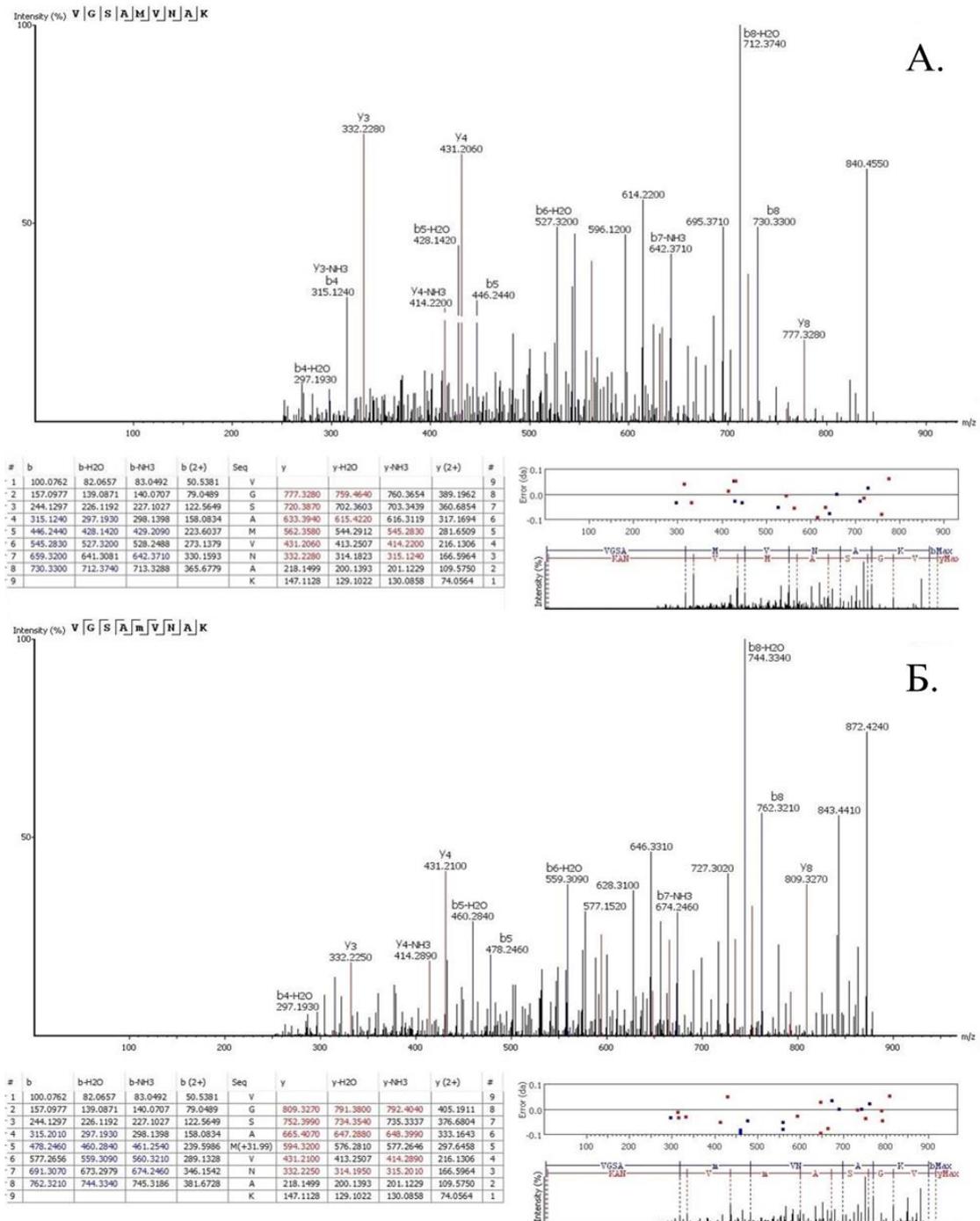
Обозначения: n/d - не детектирован в последовательности (не покрывается МС-анализом); n/m - модификации для этого аминокислотного остатка не найдены; n/q - нет количественных данных для этой модификации.

На **рисунке 11А** (контрольный образец FXIII) и **Рисунке 11Б** (окисленный образец FXIII) представлены полученные хроматограммы.

В качестве примера анализа пептидных фракций FXIII на рисунке отображены ионные хроматограммы для пептида с  $m/z$  438,73 (соответствует 4+ заряженному неокисленному пептиду 262-270 субъединицы FXIII-A) и с  $m/z$  446,73 (окисленный пептид с увеличением массы на +31,99, соответствующей добавлению двух атомов кислорода к массе исходного пептида), которые сравниваются на рисунках **11В** и **11Г** для контрольного и окисленного образцов FXIII, соответственно.



**Рисунок 11.** Общий вид хроматограмм образцов неокисленного (А) и окисленного FXIII (Б), а также сравнение экстрагированных ионных хроматограмм (XIC) для  $m/z$  446,73, соответствующего окисленному пептиду и  $m/z$  438,74 для неокисленной формы пептида 262-270 субъединицы FXIII-A в неокисленном образце FXIII (В) и обработанном озоном образце FXIII (Г) [Vasilyeva и др., 2018]. Пики на рисунках (В, Г) обозначены временем удерживания (RT),  $m/z$  (BP) и площадью пика (МА).



**Рисунок 12.** MS/MS спектры иона-предшественника при 876,46  $m/z$  для не окисленного (A) и 908,46  $m/z$  для окисленного (B) пептида 262-270 субъединицы FXIII-A [Vasilyeva и др., 2018]. Наблюдаемые в спектрах ионы b- и y-фрагментов помечены. Пример секвенирования de novo, подтверждающего количественную оценку и идентификацию гипохлорит-модифицированных пептидов. MS/MS спектра двухзарядного иона при  $m/z$  876,46 идентифицированного как VGSAMVNAK (A) и при  $m/z$  908,46 идентифицированного как VGSAM(+15.99)VNAK (B). Триптический пептид содержал сайт окисления (Met+15,99) соответствующий сдвигу массы 165,2 Да (149,21 Да для не окисленного метионина и 15,99 Да благодаря присоединению одного атома кислорода).

Увеличение содержания (площади) окисленного пептида (в 3,7 раза) и уменьшение площади неокисленного пептида (в 11,8 раза) наблюдали в окисленном образце FXIII (**Рисунок 11Г**) по сравнению с контрольным образцом FXIII (**Рисунок 11В**). Значительная разница в изменении содержания окисленного и не окисленного пептида в образцах может быть обусловлена вкладом других модификаций или общей деградацией пептидов в результате процесса окисления.

Спектры MS/MS, полученные при фрагментации активированной соударением (CID) соответствующих пептидных форм, измеренные в ионной ловушке, показаны на **Рисунке 12**. Основные ионы b и y помечены на спектрах, а все наблюдаемые фрагменты ионов отмечены на соответствующей последовательности.

#### **4.3 Окислительные модификации и конформационные перестройки FXIII**

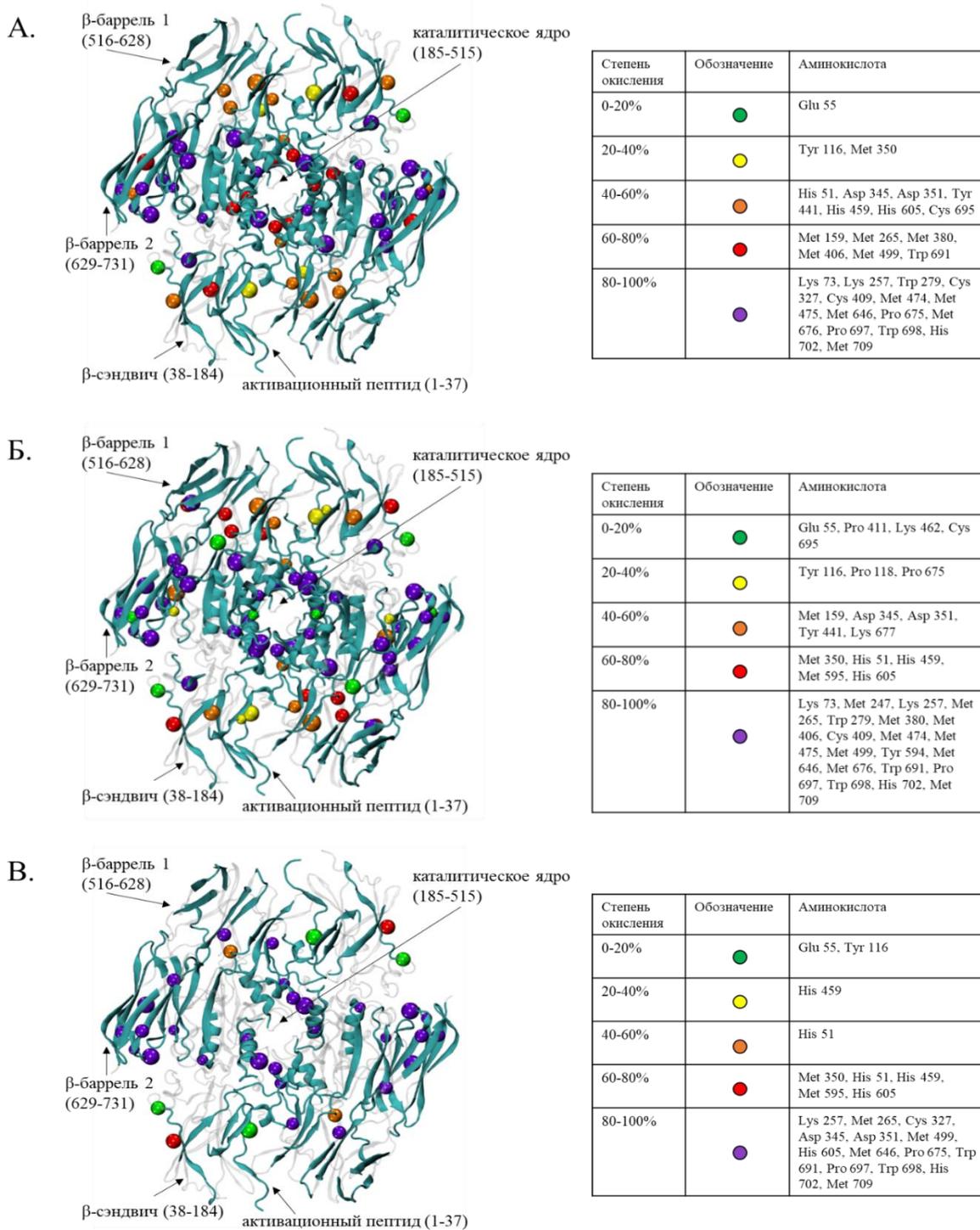
Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что из 18 остатков метионина, присутствующих в первичной структуре белка, 14 остатков были идентифицированы в нативном образце FXIII, и 9 из них оказались модифицированными в образце FXIII, обработанном озоном. Эти остатки локализованы в  $\beta$ -сэндвич-домене (Met 159), каталитическом ядре (Met 265, Met 350, Met 474, Met 475 и Met 499), и  $\beta$ -баррель 2 домене (Met 646, Met 676, Met 709) [Vasilyeva и др., 2018]. Поскольку эти остатки проявляют повышенную восприимчивость к окислению, они могут быть легко доступными для озона, т.е. располагаться на поверхности белковой глобулы профермента [Yan, Levine, Sohal, 1997]. Другие пять остатков метионина, Met 247, Met 380, Met 406, Met 520 и Met 595, которые гораздо менее уязвимы для окисления, вероятно, находятся внутри белковой глобулы и становятся доступными для действия озона во время конформационных перегруппировок молекулы в результате ее активации.

В этом исследовании были идентифицированы несколько остатков цистеина, Cys 327 и Cys 409, расположенные в домене каталитического ядра, и Cys

695 в домене  $\beta$ -баррель 2 [Vasilyeva и др., 2018]. Известно, что Cys 327, Cys 409 и Cys 695 вместе с Cys 314 первоначально локализованы внутри их доменов и становятся доступны только после активации белка совместном действием тромбина и  $\text{Ca}^{2+}$  [Sabo, Brasher, Maurer, 2007; Turner и др., 2004]. В окисленном образце профермента эти остатки были модифицированы, что указывает на их пространственную доступность для молекул озона не только в активированном FXIII+ $\text{Ca}^{2+}$ /Thr, но также и в проферменте, т.е. в не активированной белковой форме, что может свидетельствовать о влиянии окислителя на конформационное состояние молекулы.

Среди многочисленных сайтов окисления, обнаруженных в настоящей работе, важно отметить, что функционально значимый остаток Trp 279, который взаимодействует с Cys 314 [Pedersen и др., 1994] оказался полностью окисленным. Точная роль в функционировании белка других аминокислотных остатков, которые были вовлечены в окислительные модификации, остается неясной и должна быть исследована в дальнейших работах.

При анализе участков окисления, выявленных в образце FXIII+ $\text{Ca}^{2+}$ , обработанного озоном, можно увидеть, что набор аминокислотных остатков, чувствительных к окислительному воздействию, несколько увеличен по сравнению с образцом без  $\text{Ca}^{2+}$  и общая степень окисления для остатков в этих образцах различаются. Сайты окисления в FXIII с  $\text{Ca}^{2+}$  преимущественно имеют тенденцию к более выраженной модификации [Vasilyeva и др., 2018] (**Рисунок 13**). Эти результаты могут быть объяснены влиянием  $\text{Ca}^{2+}$  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 [Rosenfeld и др., 2013], так и конформационными изменениями в димере FXIII- $\text{A}_2$  [Bagoly, Muszbek, 2019; Muszbek и др., 2011]. Структура становится более уязвимой для разрушительного действия метаболитов кислорода.



**Рисунок 13.** Кристаллическая структура димера FXIII-A<sub>2</sub> с выявленными окислительными модификациями, обнаруженными в окисленных озонном образцах; FXIII (А), FXIII+Ca<sup>2+</sup> (Б) и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr (В). Участки аминокислотной последовательности, входящие в МС-покрытие отмечены бирюзовым цветом, отсутствие МС-покрытия обозначено серым. Окислительные модификации изображены шариками с разной окраской в зависимости от степени окисления аминокислотных остатков. Изображение было сделано в программе VMD 1.9.3, University of Illinois at Urbana–Champaign, USA с использованием структуры FXIII-A<sub>2</sub> PDB ID: 1F13. Рисунок разработан автором.

Данные ВЭЖХ-МС/МС, касающиеся окисления полностью активированного FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, обработанного тромбином и Ca<sup>2+</sup>, ясно показывают, что в отличие от образцов не активированного FXIII или FXIII+Ca<sup>2+</sup>, МС-покрытие молекулы FXIII-А, а, следовательно, и количество участков окисления, существенно снижается. Результат, вероятно, объясняется резкой перестройкой пространственной структуры FXIII-А, вызванной как расщеплением активационного пептида, так и диссоциацией FXIII на отдельные субъединицы. 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.

### **5.1 Анализ модификаций при гипохлорит-индуцированном окислении FXIII методом ВЭЖХ-МС/МС**

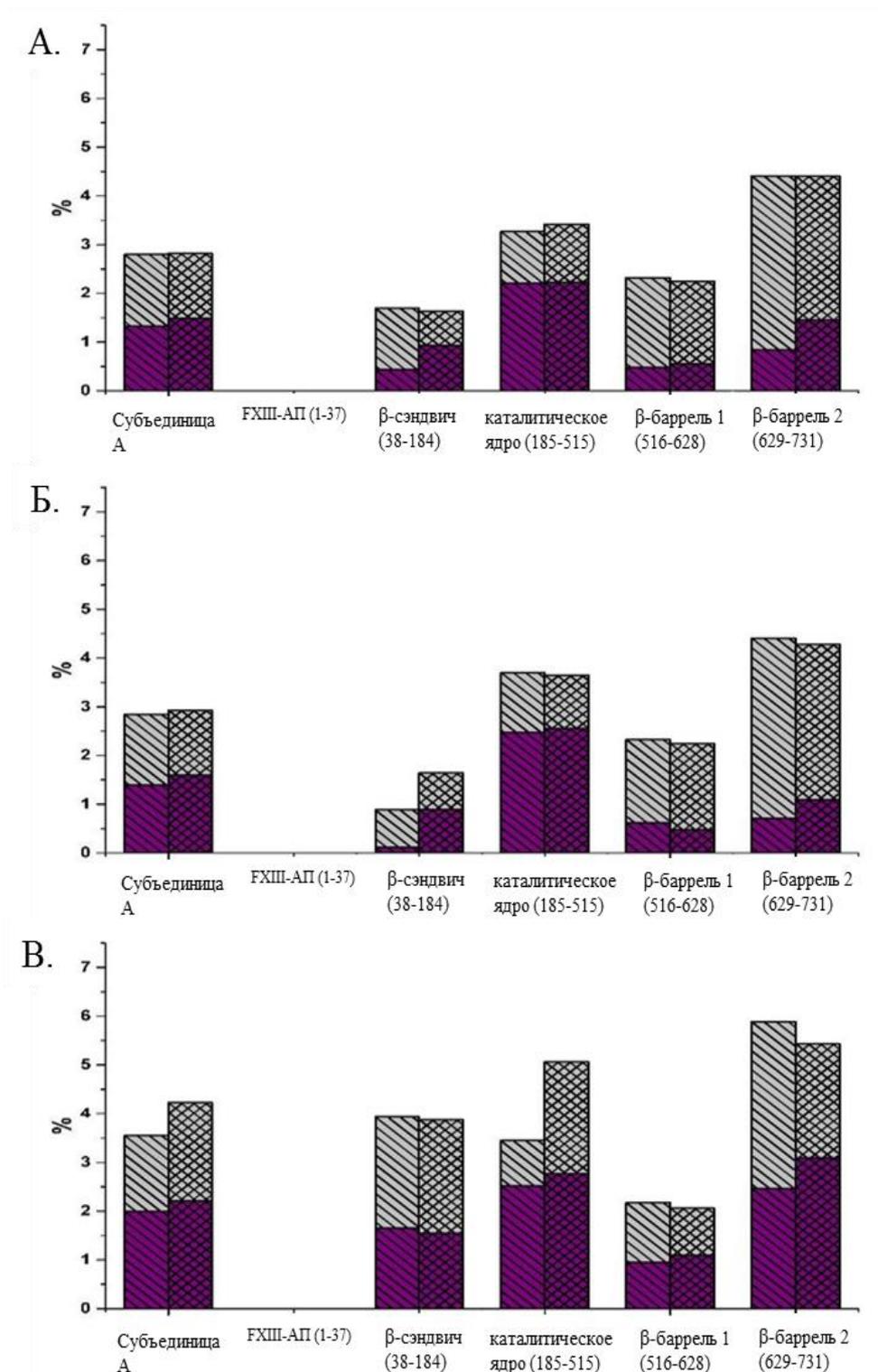
Окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных элементах субъединицы FXIII-А, за исключением N-концевого активационного пептида. Для субъединицы FXIII-А, относительное количество аминокислотных остатков, участвующих в окислительных модификациях, было равным 2,8% в FXIII, окисленном как 50 мкМ, так и 150 мкМ HOCl<sup>-</sup>OCl; для FXIII+Ca<sup>2+</sup>, окисленного 50 мкМ гипохлорита, эти значения были равны 2,8%, тогда как для образца, обработанного 150 мкМ HOCl<sup>-</sup>OCl, они оказались равными 2,9%, соответственно. Для каталитической FXIII-А\* субъединицы в образцах FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, обработанных 50 или 150 мкМ HOCl<sup>-</sup>OCl, количество

модифицированных аминокислотных остатков по отношению к МС-покрытию, составляло 3,6% и 4,2%, соответственно [Vasilyeva и др., 2020].

При сравнении окислительной модифицированности всей молекулы FXIII на разных этапах ее активации можно отметить, что ферментативная форма FXIII (FXIII +Ca<sup>2+</sup>/Thr) является наиболее уязвимой к окислению (**Рисунок 14**). 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 составляло 4,4± 0,1% для FXIII; 4,4± 0,1% и 4,3± 0,1% для FXIII+Ca<sup>2+</sup>; 5,9%± 0,1 и 5,4± 0,1% для FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, соответственно (**Рисунок 14**). Для каталитического ядра, эти параметры для образцов не активированного FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/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.

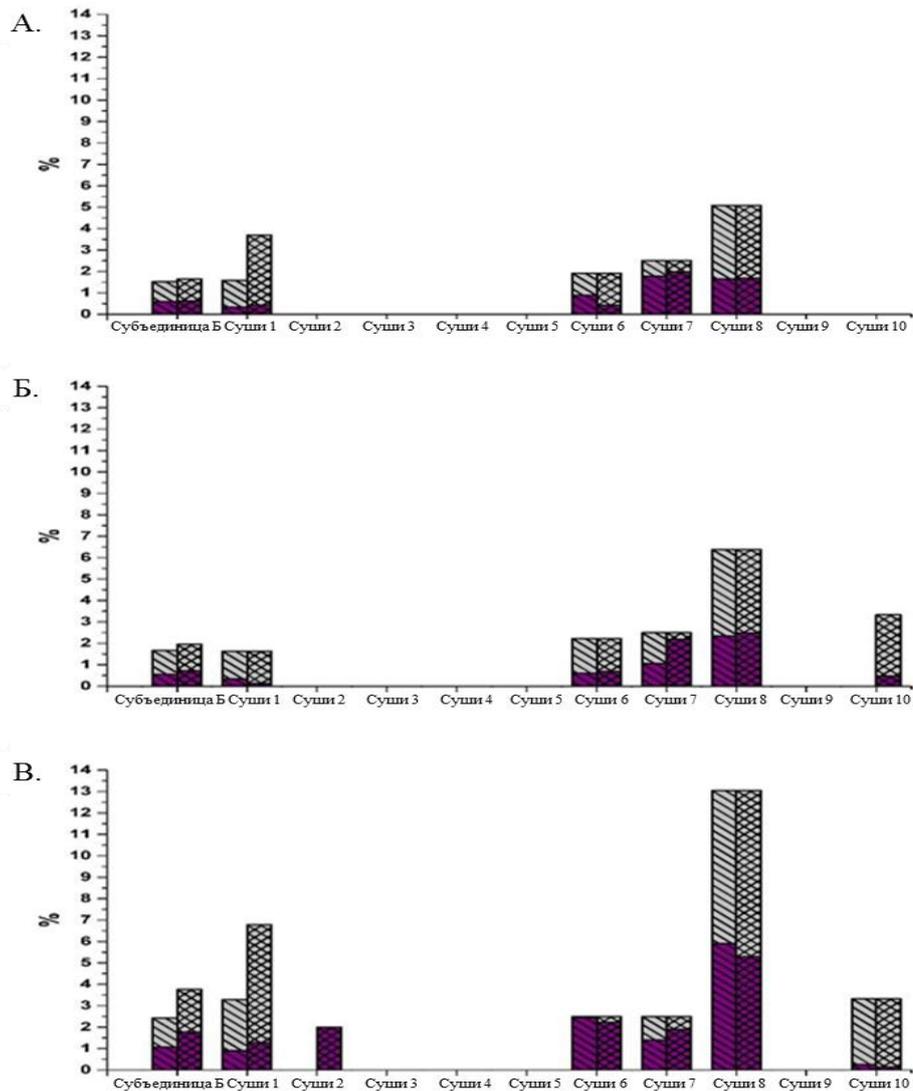
Для FXIII-B субъединицы относительное количество поврежденных аминокислотных остатков было равно: 1,5± 0,1% для FXIII, окисленного 50 мкМ HOCl<sup>-</sup>OCl, и 1,7± 0,1% для FXIII, окисленного 150 мкМ; 1,7± 0,1% для FXIII+Ca<sup>2+</sup>, окисленным 50 мкМ и 2,0± 0,1%, окисленным 150 мкМ HOCl<sup>-</sup>OCl соответственно (**Рисунок 15**). Для некаталитической FXIII-B субъединицы FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, обработанной 50 и 150 мкМ гипохлоритом, эти значения были равны 2,4± 0,1% и 3,8± 0,2%, 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 [Vasilyeva и др., 2020].



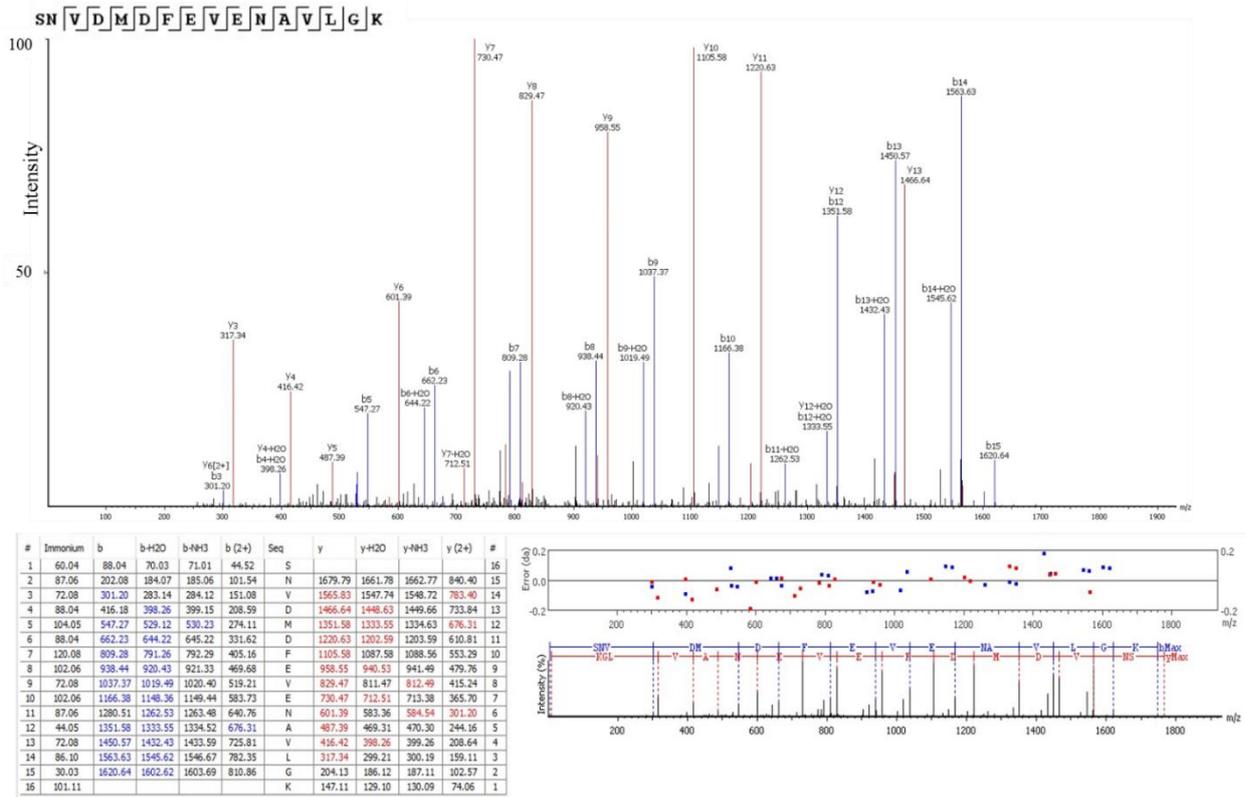
**Рисунок 14.** Содержание модифицированных аминокислотных остатков (серые столбцы) и общая степень окисления (фиолетовые столбцы) по отношению в каталитической субъединице FXIII, полученной для различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (левые столбцы) и 150 мкМ (правые столбцы) гипохлорита – FXIII (А); FXIII + Ca<sup>2+</sup> (Б); FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Thr (В) соответственно. Все значения были рассчитаны относительно МС-покрытия соответствующей последовательности структурных областей.

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-Ca<sup>2+</sup>/Thr (13,0± 0,5% для 50 мкМ HOCl/OCl<sub>2</sub>; 18,0± 0,7% для 150 мкМ HOCl/OCl<sub>2</sub>, соответственно) [Vasilyeva и др., 2020] (**Рисунок 15**).



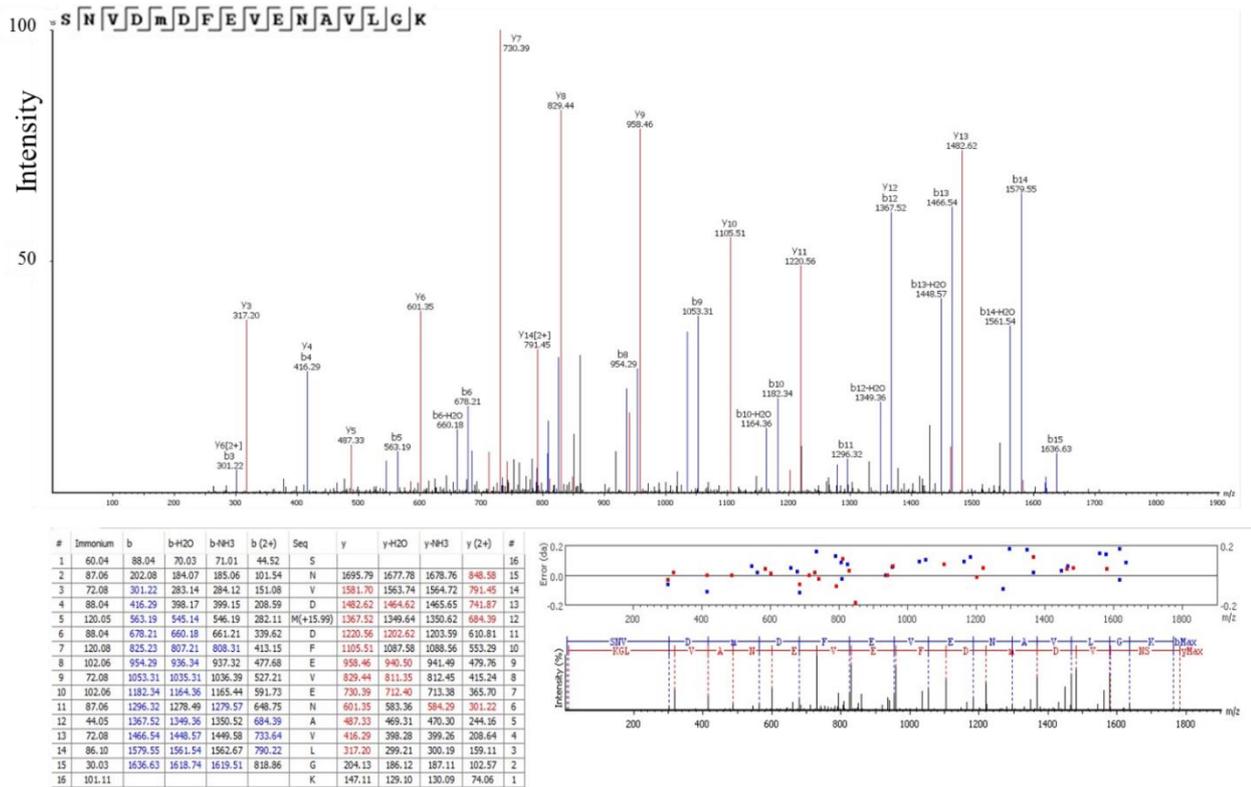
**Рисунок 15.** Относительное содержание модифицированных аминокислотных остатков (серые столбцы) и общее значение степени окисления (фиолетовые столбцы) в некаталитической FXIII-B субъединице, полученных для различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (левые столбцы) и 150 мкМ (правые столбцы) гипохлорита: FXIII (А); FXIII + Ca<sup>2+</sup> (Б) и FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Thr (В) соответственно. Все значения были рассчитаны относительно МС-покрытия соответствующей последовательности структурных областей.

На **Рисунке 16 и 17** представлены полученные спектры МС/МС, на основе которых были получены списки молекулярных масс пептидов для определения вызванных гипохлоритом изменений уровня окисления молекулы FXIII. Список обнаруженных окислительных модификаций приведен в **Таблице 6**.



**Рисунок 16.** Репрезентативный пример секвенирования de novo, подтверждающего количественную оценку и идентификацию модифицированных гипохлоритом пептидов. МС/МС спектр двухзарядного иона при  $m/z$  883,92, идентифицированный как SNVDMDFEVENAVLGK [Vasilyeva и др., 2020]. Ион  $y_1$ , наблюдаемый при  $m/z$  147,11, был отнесен к С-концевому остатку К и использован для определения оставшихся аминокислотных остатков путем расчета разницы масс соседних у-ионов.

Сравнение данных масс-спектрометрии, полученных для нативных и окисленных гипохлоритом образцов FXIII, убедительно демонстрирует, что каталитическая субъединица претерпевает значительные структурные изменения. Как и в других ранее описанных белках [Hawkins, Pattison, Davies, 2003; Komáromi, Bagoly, Muszbek, 2011], Cys и Met в каталитической субъединице оказались основными мишенями для атаки гипохлоритом.



**Рисунок 17.** Репрезентативный пример секвенирования de novo, подтверждающего количественную оценку и идентификацию гипохлорит-модифицированных пептидов. MS/MS спектра двухзарядного иона при  $m/z$  891,92, идентифицированного как SNVDM (+15,99) DFEVENAVLGK [Vasilyeva и др., 2020]. Ион  $y_1$ , наблюдаемый при  $m/z$  147,11, был отнесен к C-концевому остатку К и использован для идентификации оставшихся аминокислотных остатков путем расчета разницы в массе соседних у-ионов.

Триптический пептид содержал сайт окисления, соответствующий Met383 в субъединице FXIII-B. Окисленный метионин (Met+15,99) соответствовал сдвигу массы 165,2 Да (149,21 Да для не окисленного метионина и 15,99 Да благодаря присоединению одного атома кислорода).

Данные ВЭЖХ-МС MS/MS показывают, что из 19 остатков Met, присутствующих в первичной структуре белка, 14 Met остатков были идентифицированы в исходном образце FXIII, тогда как только пять Met остатков, Met136, Met247, Met380, Met679 и Met 731 остались недетектированными при MS-анализе. Для образца FXIII, не обработанного HOCl/OCl, остатки 12 метионинов оказались окислительно поврежденными [Васильева и др., 2020]. В FXIII-A эти аминокислотные остатки принадлежат домену каталитического ядра (Met242, Met350, Met406, Met474, Met475, Met499 и Met512), домену  $\beta$ -баррель 1 (Met520, Met595) и домену  $\beta$ -баррель 2 (Met646, Met676 и Met709).

**Таблица 6.** Список обнаруженных окислительных модификаций и их количество для окисленных 50 и 150 мкМ HOCl<sup>-</sup>/OCI в субъединицах FXIII-A и FXIII-B.

Δm (изменение моноизотопн ой массы)	Международное название (UNIMOD)	Изменения в химическо м составе аминокисл оты	FXIII		FXIII+Ca <sup>2+</sup>		FXIII+Ca <sup>2+</sup> /Thr	
			50 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI	150 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI	50 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI	150 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI	50 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI	150 μM HOCl <sup>-</sup> / OCI
+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 Metionine	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

Тот факт, что вышеуказанные метионины проявляют повышенную восприимчивость к окислению, указывает на то, что они могут располагаться на поверхности белковой глобулы [Lim, Kim, Levine, 2019]. Аминокислотные остатки метионина окисляются с незначительным воздействием на биологическую активность и служат в качестве пула мишеней для удаления АФК и защиты функционально важных остатков [Luo, Levine, 2009]. Два других не окисленных остатка метионина, Met159 и Met265, вероятно, могут находиться внутри белковой глобулы и способны перемещаться к поверхности во время конформационных перестроек молекулы в процессе ее активации.

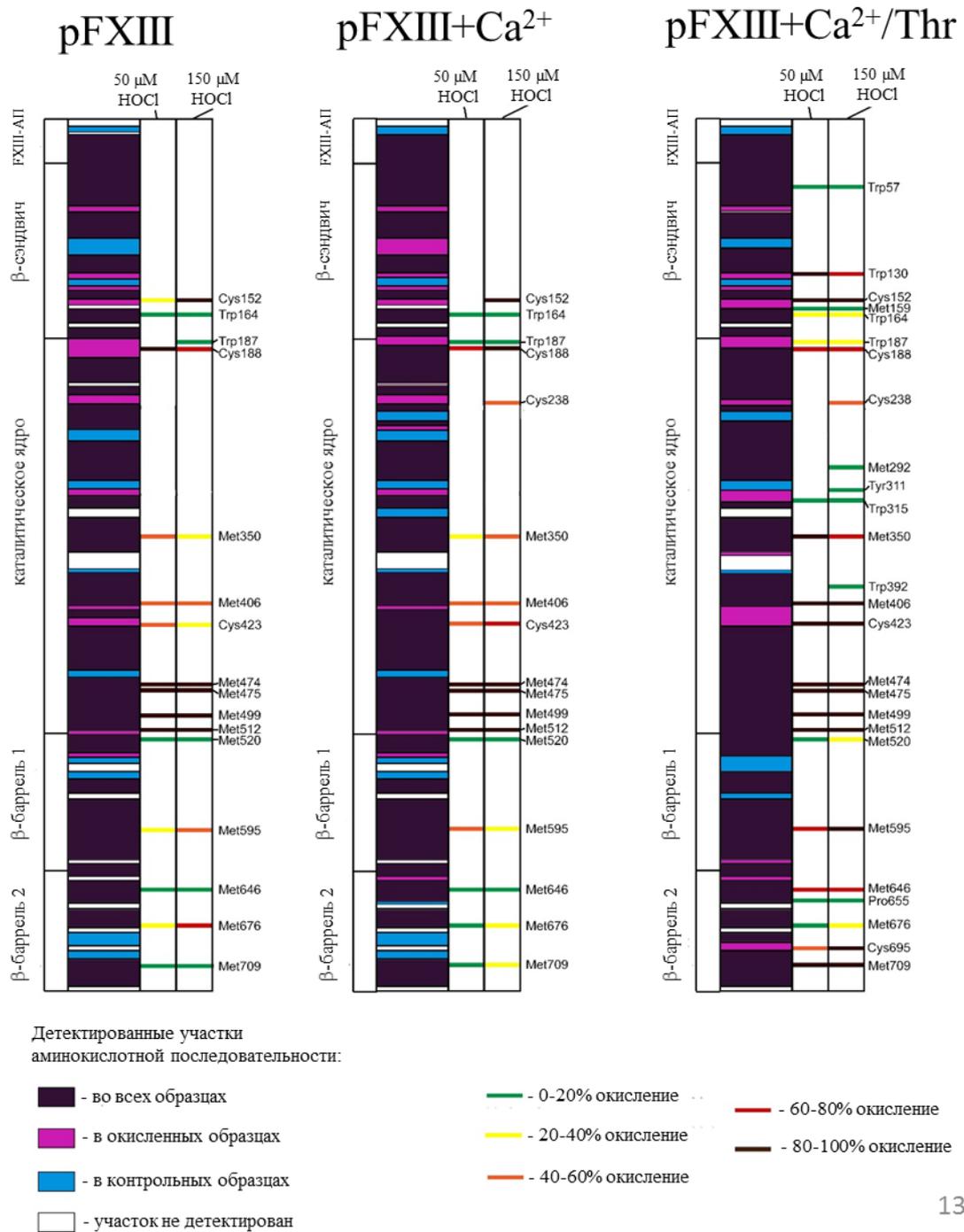
Несколько аминокислотных остатков триптофана, Trp 57, Trp 130, Trp 315 и Trp 392, не поврежденные гипохлоритом в окисленных образцах FXIII и FXIII+Ca<sup>2+</sup>, становятся модифицированными в окисленном FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr [Vasilyeva и др., 2020]. Однако, как следует из данных масс-спектрометрии, функционально важные остатки, Tyr 560 и Trp 279 остаются нативными во всех образцах, что указывает на то, что они локализованы в белковой глобуле и менее доступны для окисления (**Рисунок 18**).

В окисленных образцах FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr некоторые из остатков цистеина также являются мишенями для окислителя. Аминокислотный остаток Cys 238 в FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr модифицируется только после обработки белка 150 мкМ HOCl. Считается, что Cys 238 локализован на поверхности в полностью активированной молекуле [Muszbek и др., 2011]. Тем не менее тот факт, что остаток остается незатронутым при умеренном окислении, противоречит этому выводу. Скорее всего, когда активируется FXIII, остаток, первоначально локализованный в ядре белка, начинает мигрировать в гидрофильную область, оставаясь при этом пространственно недоступным. Что касается остатка Cys 423, он оказался не идентифицированным в контрольных образцах FXIII и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr.

Поскольку остаток Cys 423 покрывается МС-анализом и не окислен для контрольного образца FXIII+Ca<sup>2+</sup>, это позволяет предположить, что этот остаток не подвергается окислительной модификации в контрольном образце FXIII. При слабом и сильном индуцированном окислении, остаток Cys 423 модифицируется во всех окисленных образцах. Кроме того, процент окисления остатка Cys 423 (подобно остаткам метионина) в основном имеет тенденцию к росту при переходе от окисления FXIII к FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr.

Известно, что легко окисляемые остатки цистеина могут быть локализованы внутри глобулы и потому не испытывают воздействия АФК [Davies, Truscott, 2001]. Окисление остатков Cys 238 и Cys 423 указывает на то, что они становятся доступными для HOCl/OCl благодаря конформационным перегруппировкам

FXIII, FXIII+Ca<sup>2+</sup> и FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, возникающим в результате активации или окисления.

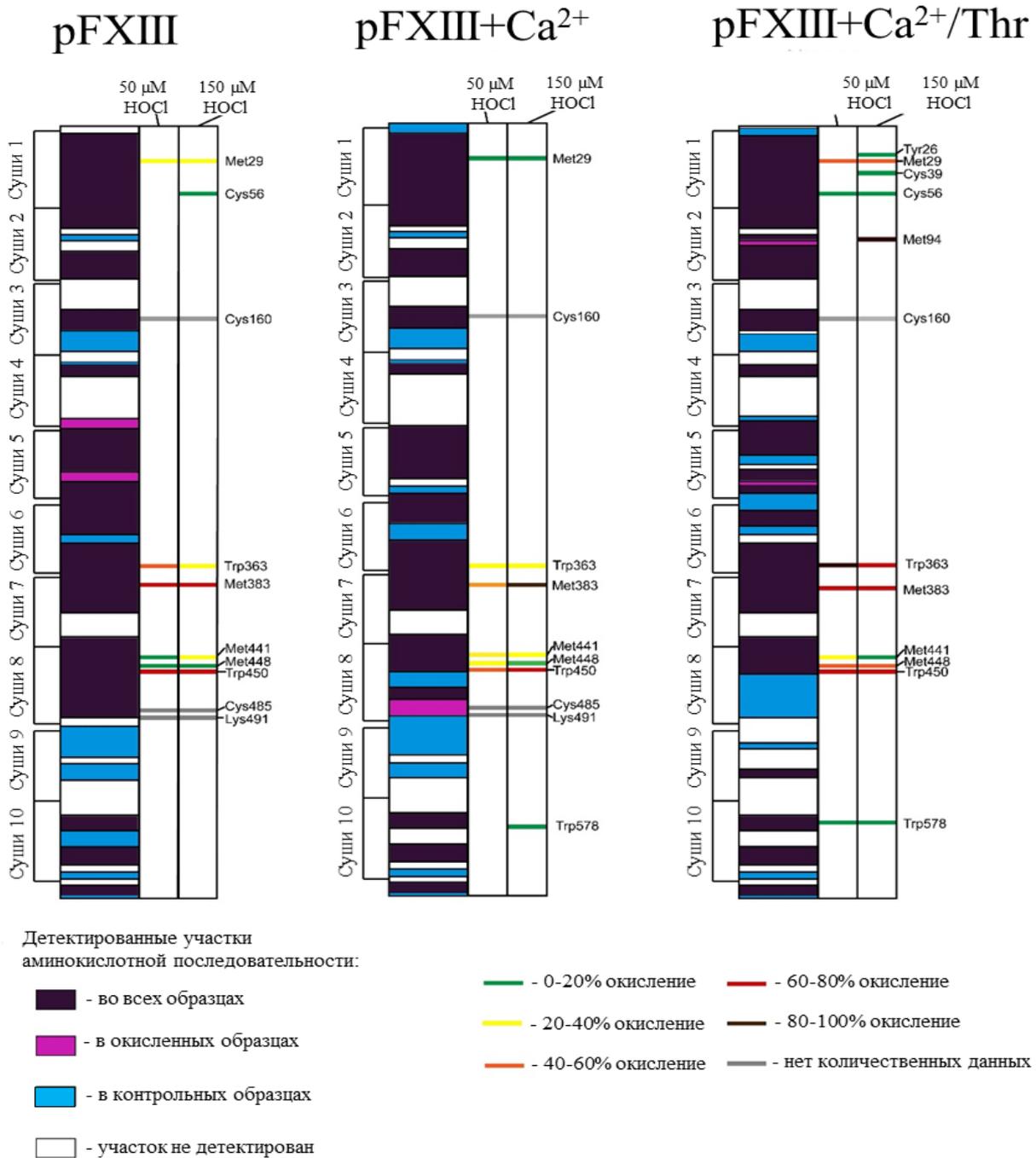


**Рисунок 18.** MS-покрытие последовательности (левые столбцы) и окислительные модификации в каталитической FXIII-A субъединице образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (средние столбцы) и 150 мкМ гипохлорита (правые столбцы) на разных стадиях активации FXIII [Vasilyeva и др., 2020]. Цветовые обозначения MS-покрытия и степени окисления аминокислотных остатков (диапазоны процентов степени окисления) расшифрованы на рисунке.

В нашем исследовании мы не обнаружили химического превращения ряда аминокислотных остатков, например, гистидинов. Известно, что эти остатки обладают реакционной способностью по отношению к HOCl/OCl [Hawkins, Pattison, Davies, 2003]. Это может быть связано в том числе с тем, что остатки гистидина, очевидно, находятся в недоступных для гипохлорита областях молекулы FXIII при том, что HOCl/OCl, являясь менее реактивным окислителем, чем озон, не меняет столь сильно конформацию молекулы при окислении.

Как следует из MS-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. 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.

Данные масс-спектрометрии показали значительный вклад серосодержащих остатков метионинов и цистинов субъединиц FXIII-B<sub>2</sub> в общее количество сайтов окисления FXIII (**Рисунок 19**) FXIII-B содержит много остатков цистина [Ichinose и др., 1986b], которые обладают высокой реакционной способностью к гипохлориту [Winterbourn, 1985]. Важно отметить, что, как и каталитическая субъединица, уязвимость регуляторной субъединицы к индуцированному окислению увеличивается с активацией FXIII в следующем порядке: нативный FXIII < FXIII+Ca<sup>2+</sup> < FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr. Кроме того, возникновение новых сайтов окисления в FXIII-B на последней стадии активации FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr (Tyr 26, Cys 39 и Met 94) имел место в доменах Суши 1 и 2, в основном ответственных за взаимодействие между FXIII-A и FXIII-B согласуется с ранее полученными результатами [Protopopova и др., 2019], характеризующими поведение гетеротетрамера при активации.



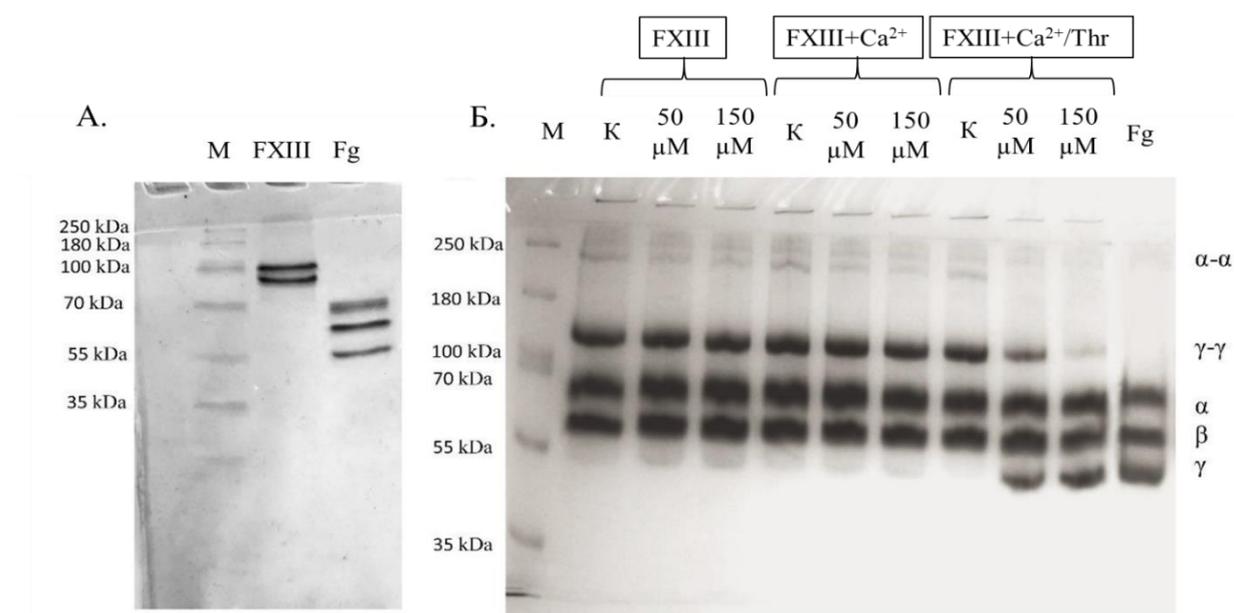
**Рисунок 19.** МС-покрытие последовательности (левые столбцы) и окислительные модификации в каталитической FXIII-V субъединице образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (средние столбцы) и 150 мкМ гипохлорита (правые столбцы) на разных стадиях активации FXIII [Vasilyeva и др., 2020]. Цветовые обозначения МС-покрытия и степени окисления аминокислотных остатков (диапазоны процентов степени окисления) расшифрованы на рисунке.

В **Таблице 7.** представлен список идентифицированных пептидов, содержащих окислительно модифицированные аминокислотные остатки в

каталитической и регуляторной субъединицах FXIII, дающий общее представление о последствиях действия различных концентраций гипохлорита на белок.

## 5.2 Влияние окисления на ферментативную активность FXIII

Как видно из профиля электрофореза (**Рисунок 20Б**), в присутствии FXIIIa полипептидные фибриновые цепи подвергаются ковалентному сшиванию с образованием  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров [Chen, Doolittle, 1971] и полидисперсных  $\alpha$ - $\alpha$ -полимеров [Cottrell и др., 1979].



**Рисунок 20.** Электрофоретический анализ гомогенности выделенных белков (А) и способности FXIII к образованию сшитых  $\alpha$ -полимеров и  $\gamma$ -димеров (Б). А: слева направо - маркеры молекулярной массы, выделенные из плазмы крови человека FXIII и фибриноген. Б: слева направо – маркеры молекулярной массы, фибриновые цепи, сшитые неокисленными (К) и окисленными (50 или 150  $\mu$ M гипохлорита) образцами FXIII на разных стадиях активации и образец необработанного FXIII фибриногена [Васильева и др., 2020]. Белковые полосы визуализировали окрашиванием Кумасси синим R250.

**Таблица 7.** Список идентифицированных пептидов, содержащих окислительно модифицированные остатки в субъединицах FXIII [Vasilyeva и др., 2020]. Показаны различные модификации аминокислотных остатков, характеризующихся определенной массой. Модификации с низким (<100) значением Ascore, а также модификации, имеющие количественные значения менее 1%, не рассматриваются в Таблице 7. Степень окисления (%) модифицированных пептидов, нормализованная по отношению к общей площади пиков немодифицированных и модифицированных пептидов (оцененные уровни модификации), выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение для различных типов модификаций специфических аминокислотных остатков для контроля (не окисленный FXIII), образцов FXIII окисленных 50 и 150 мкМ  $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ . Для каждой серии образцов, как указывалось выше, были выполнены три биологических повтора, для каждого из которых измерения были выполнены в трехкратно, чтобы гарантировать, что полученные данные являются надежными и воспроизводимыми.

Модифицированный пептид	Окисленная аминокислота	Международное название модификации (UNIMOD)	Процент пептидов, имеющих определенный тип модификации									Структурный элемент	
			FXIII	50 $\mu\text{M}$ oxFX III	150 $\mu\text{M}$ oxFX III	FXI II + $\text{Ca}^{2+}$	50 $\mu\text{M}$ oxFX III + $\text{Ca}^{2+}$	150 $\mu\text{M}$ oxFX III + $\text{Ca}^{2+}$	FXIII + $\text{Ca}^{2+}/\text{Thr}$	50 $\mu\text{M}$ FXIII + $\text{Ca}^{2+}/\text{Thr}$	150 $\mu\text{M}$ FXIII + $\text{Ca}^{2+}/\text{Thr}$		
<b>FXIII-A</b>													
K.ERW(+13.98)DTNKVDHHTDKYENNK.L	Trp 57	Tryptophan oxidation to oxolactone	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	<b><math>\beta</math>-сэндвич</b>
K.ERW(+3.99)DTNK(+42.01)VDHHTDKYENNK.L		Tryptophan oxidation to kynurenin	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m		1-20%	
K.GTYIPVPIVSELQSGKW(+15.99)GAK.I I.PVPIVSELQSGKW(+15.99)GAK.I V.PIVSELQSGKW(+15.99)GAK.I	Trp 130	Oxidation	n/c	n/c	n/m	n/c	n/c	n/m	n/c	n/c	80-100%	60-80%	

R.LSIQSSPKC(+47.98)IVGK.F	Cys 152	Trioxidation	n/c	40-60%	80-100%	n/c	n/c	80-100%	n/c	n/c	60-80%	Каталитическое ядро
R.LSIQSSP(+31.99)KC(+15.99)IVGK.F R.LSIQSSPK(+31.99)C(+15.99)IVGK.F		Oxidation	n/c	n/m	n/m	n/c	n/c	n/m	n/c	20-40%	1-20%	
R.LSIQSSP(+15.99)KC(+15.99)IVGK.F												
R.M(+15.99)YVAVWTPYGVL.R.T R.M(+15.99)YVAVW(+15.99)TPYGVL.R.T	Met 159	Oxidation	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	
R.MYVAVW(+15.99)TPYGVL.R.T R.M(+15.99)YVAVW(+15.99)TPYGVL.R.T R.MY(-2.02)VAVW(+15.99)TPYGVL.R.T R.MY(+15.99)VAVW(+15.99)TPYGVL.R.T	Trp 164	Oxidation	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	20-40%	
R.NPETDTYILFNP(+31.99)W(+15.99)CEDDAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNP(+31.99)W(+15.99)CEDDAVYLDNEKER.E R.NPETDTYILFNP(+15.99)W(+15.99)C(+15.99)EDDAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNPW(+15.99)C(+31.99)EDDAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNPW(+15.99)C(+15.99)ED(+15.99)DAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNPWC(+47.98)EDDAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNPWC(+47.98)EDDAVYLDNEKER.E R.NPETDTYILFNPWC(+47.98)EDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIK.T Y.ILFNPWC(+47.98)EDDAVYLDNEK.E	Trp 187	Oxidation	n/c	n/m	1-20%	n/c	1-20%	1-20%	n/c	20-40%	20-40%	
R.NPETDTYILFNPWC(+15.99)ED(+15.99)DAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNP(+31.99)WC(+15.99)EDDAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNP(+15.99)WC(+15.99)ED(+15.99)DAVYLDNEK.E R.NPETDTYILFNPW(+31.99)C(+15.99)EDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIK.T R.NPETDTYILFN(+15.99)P(+15.99)WC(+15.99)EDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIK.T R.NPETDTYILFNPWC(+15.99)EDDAVYLDNEK(+31.99).E R.NPETDTYILFN(+15.99)PWC(+15.99)EDD(+15.99)AVYLDNEK.E	Cys 188	Trioxidation	n/c	60-80%	60-80%	n/c	40-60%	60-80%	n/c	20-40%	60-80%	
		Oxidation	n/c	1-20%	1-20%	n/c	1-20%	1-20%	n/c	20-40%	n/m	
R.SWSYGQFEDGILDTC(+47.98)LYVMD(+15.99)R.A R.SWSYGQFEDGILDTC(+47.98)LYVMDR(+15.99).A R.SWSY(+15.99)GQFEDGILDTC(+47.98)LYVMD(+15.99)R.A R.SWSYGQFEDGILDTC(+47.98)LY(-2.02)VMDR.A R.SW(+15.99)SYGQFEDGILDTC(+47.98)LYVMDR(+15.99).A R.SWSYGQFEDGILDTC(+47.98)LYVM(+15.99)DR.A R.SWSYGQFEDGILDTC(-33.99)LYVM(+15.99)DR.A R.SWSY(+31.99)GQFEDGILDTC(-33.99)LY.V R.SWSYGQFEDGILDTCCLYVM(+31.99)D(+15.99)RA.Q	Cys 238	Trioxidation	n/c	n/m	n/c	n/c	n/m	n/m	n/c	n/m	40-60%	
		Dehydroalanine (from Cysteine)	n/c	n/m	n/c	n/c	n/m	40-60%	n/c	n/m	1-20%	
R.SWSYGQFEDGILDTC(+47.98)LYVM(+15.99)DR.A R.SWSYGQFEDGILDTC(-33.99)LYVM(+15.99)DR.A	Met 242	Dioxidation	n/m	n/m	n/c	n/m	80-100%	n/c	n/m	n/m	n/m	
		Oxidation			n/c		n/m	n/c	n/m	n/m		



F.GGW(+15.99)QAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C		Dioxidation	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m
M.TRPDLPVGF GGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C	Trp 392	Oxidation	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%
M.T(-2.02)RPDLPVGF GGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C R.PDLPVGF GGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C G.FGGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C F.GGWQAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C F.GGW(+15.99)QAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C G.W(+31.99)QAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C W.QAVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C Q.AVDSTPQENS DGM(+15.99)YR.C V.DSTPQENS DGM(+15.99)YR.C D.STPQENS DGM(+15.99)YR.C T.PQENS DGM(+15.99)YR.C	Met 406	Oxidation	1-20%	40-60%	40-60%	1-20%	40-60%	40-60%	1-20%	80-100%	80-100%
K.HGHVC(+47.98)FQFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.HGH(+15.99)VC(+47.98)FQFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.HGHVC(+47.98)FQFDAPFVFAEVN.S K.H(+15.99)GHVC(+47.98)FQFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.HGHVC(+47.98)FQFDAPFVFAEVN.A	Cys 423	Trioxidation	n/c	40-60%	20-40%	n/m	40-60%	60-80%	n/c	80-100%	80-100%
K.H(+15.99)GHVC(+15.99)FQFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.H(+15.99)GHVC(+15.99)F(+31.99)QFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.HGHVC(+15.99)F(+31.99)QFDAPFVFAEVNSDLIYITAK.K K.HGHVC(+15.99)FQFD(+15.99)APFVFAEVNSDLIYITAK.K		Oxidation	n/c	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	n/c	1-20%	n/m
K.LIVTKQIGGDGM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F K.QIGGDGM(+31.99)M(+31.99)DITDTYK.F K.QIGGDGM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F K.QIGGDGM(+15.99)M(+15.99)DITDTY(+33.96)K.F Q.IGGDGM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F I.GGDGM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F G.DGM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F D.GM(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F G.M(+15.99)M(+15.99)DITDTYK.F	Met 474 Met 475	Oxidation	1-20%	80-100%	80-100%	1-20%	80-100%	80-100%	1-20%	80-100%	80-100%
R.LALETALM(+15.99)YGAK.K R.LALETALM(+15.99)Y(+33.96)GAK.K R.LALETALM(+15.99)YGAKKPLNTEGVM(+15.99)K.S R.LALETALM(+15.99)YGA.K R.LALETALM(+15.99)Y.G R.LALETALM(+15.99).Y L.ALETALM(+15.99)YGAK.K A.LETALM(+15.99)YGAK.K	Met 499	Oxidation	20-40%	80-100%	80-100%	20-40%	80-100%	80-100%	1-20%	80-100%	80-100%

T.ALM(+15.99)YGAK.K												
R.LALETALM(+31.99)YGAK.K R.LALETALM(+31.99).Y	Dioxidation	1-20%	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m		
K.KPLNTEGVM(+15.99)K.S												
K.KPLNTEGVM(+15.99).K K.KPLNTEGVM(+15.99)KSR.S K.KPLN(+.98)TEGVM(+15.99)K.S K.KPLNTEGVM(+15.99)K(+27.99)SR.S K.KPLNTEGVM(+15.99)K(-1.03)SR.S K.KP(+31.99)LNTEGVM(+15.99)K.S K.PLNTEGVM(+15.99)K.S K.PLN(+.98)TEGVM(+15.99)K.S K.PLNTEGVM(+15.99)KSR.S P.LNTEGVM(+15.99)K.S	Met 512	Oxidation	40-60%	80-100%	80-100%	40-60%	80-100%	80-100%	40-60%	80-100%	80-100%	
K.KPLNTEGVM(+31.99)K.S K.KPLNTEGVM(+31.99).K K.KPLN(+.98)TEGVM(+31.99)K.S		Dioxidation	1-20%	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	
K.KPLNTEGVM(-48.00)K.S K.KPLN(+.98)TEGVM(-48.00)K.S K.KPLNTEGVM(-48.00)K(+15.99).S K.KPLNTEGVM(-48.00)K(+31.99)SR(+31.99).S K.PLNTEGVM(-48.00)K.S		Prompt loss of side chain from oxidised Metionine	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	
R.SNVDM(+15.99)DFEVENAVLGK.D R.SNVDM(+15.99)DFEVENAVLGKDFK.L R.SNVDM(+15.99)DF.E	Met 520	Oxidation	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	20-40%	<b>β-баррель 1</b>
K.KEAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHF.F K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLH.F K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFF.V K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQA.S K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVT.A K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASL.H K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLE.Q K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTA.R K.EAVLIQAGEY(+33.96)M(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I K.EAVLIQ(+.98)AGEYM(+15.99)GQLLEQASLH.F K.EAVLIQAGEYM(+15.99)GQLLEQ.A K.EAVLIQ(+.98)AGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I V.LIQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I L.IQAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I	Met 595	Oxidation	n/m	20-40%	40-60%	n/m	40-60%	20-40%	n/m	60-80%	80-100%	

I.QAGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I I.Q(+.98)AGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I Q.AGEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I A.GEYM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I E.YM(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I Y.M(+15.99)GQLLEQASLHFFVTAR.I												
R.GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQFTNPLK.E R.GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQ(+.98)FTNPLK.E R.GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQFTN(+.98)PLK.E R.GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQFTNP(-27.99)LK(+42.01).E R.GTQVVGSDMTVTVQFTNP(-27.99)LK(+42.01).E	Met 646	Oxidation	1-20%	1-20%	1-20%	1-20%	1-20%	1-20%	n/m	60-80%	60-80%	<b>β-баррель 2</b>
R.NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99)K.K	Pro 655	Pyrrolidone from Proline	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	
R.NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99).K R.NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M R.NVW(+15.99)VHLDGPGVTRPM(+15.99)K.K R.NVW(+15.99)VHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M R.NVW(+31.99)VHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M R.N(+15.99)VW(+15.99)VHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M V.WVHLDGPGVTRPM(+15.99)K.K V.WVHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M W.VHLDGPGVTRPM(+15.99)K.K W.VHLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M V.HLDGPGVTRPM(+15.99)K.K V.HLDGPGVTRPM(+15.99)KK.M H.LDGPGVTRPM(+15.99)K.K L.DGPGVTRPM(+15.99)KK.M D.GPGVTRPM(+15.99)K.K G.PGVTRPM(+15.99)K.K	Met 676	Oxidation	1-20%	20-40%	60-80%	1-20%	1-20%	20-40%	1-20%	1-20%	20-40%	
V.HLDGPGVTRPM(-48.00)KK.M V.HLDGPGVTRPM(-48.00)K.K		Prompt loss of side chain from oxidised Metionine	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	n/m	n/m	n/m	
R.EIRPNSTVQWEEVC(+47.98)RPWVSGHR.K												
N.STVQWEEVC(+47.98)RPWVSGHR.K N.STVQWEEVC(+47.98)RP(+15.99)WVSGHR.K	Cys 695	Trioxidation	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	40-60%	60-80%	
N.STVQWEEVC(+15.99)R(+31.99)PW(+15.99)VSGHR.K N.STVQW(+15.99)EEVC(+15.99)R(+31.99)PWVSGHR.K		Oxidation	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c	n/m	1-20%	
R.KLIASM(+15.99)SSDSLR.H K.LIASM(+15.99)SSDSLR.H L.IASM(+15.99)SSDSLR.H I.ASM(+15.99)SSDSLR.H	Met 709	Oxidation	1-20%	1-20%	1-20%	1-20%	1-20%	20-40%	1-20%	80-100%	80-100%	

A.SM(+15.99)SSDSLR.H												
R.KLIASM(+31.99)SSDSLR.H K.LIASM(+31.99)SSDSLR.H		Dioxidation	1-20%	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	
K.LIASM(-48.00)SSDSLR.H												
A.SM(-48.00)SSDSLR.H		Prompt loss of side chain from oxidised Metionine	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	
<b>FXIII-B</b>												
<b>K.SFY(+33.96)FPMSIDK.K</b>												
K.SFY(+33.96)FPM(+15.99)SIDKK.L K.SFY(+33.96)FPM(+15.99)SIDK.K K.SFY(+33.96)FP(+15.99)MSIDK.K	Tyr 26	Chlorination of tyrosine residues	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	<b>Суши 1</b>
K.SFYFPM(+15.99)SIDKK.L K.SFYFPM(+15.99)SIDK.K K.SFY(+67.92)FPM(+15.99)SIDK.K K.SFY(+33.96)FPM(+15.99)SIDKK.L K.SFY(+33.96)FPM(+15.99)SIDK.K S.FYFPM(+15.99)SIDK.K F.YFPM(+15.99)SIDK.K	Met 29	Oxidation	1-20%	20-40%	20-40%	1-20%	20-40%	1-20%	20-40%	40-60%	40-60%	
K.SFYFPM(+31.99)SIDKK.L K.SFYFPM(+31.99)SIDK.K		Dioxidation	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	
K.LSFF(+31.99)C(-33.99)LAGYTTESGR.Q												
R.QEEQTTC(-33.99)TTEGW(+31.99)SPEPR.C	<b>Cys 39</b>	Dehydroalanine (from Cysteine)	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	
K.I(+27.99)QEN(+.98)M(-48.00)RYGCASGYK.T	<b>Cys 56</b>	Dehydroalanine (from Cysteine)	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	1-20%	
K.VKD(+79.97)KVQYEC(-33.99)ATGYTAGGK.K	Met 94	Prompt loss of side chain from oxidised Metionine	n/m	n/c	n/c	n/m	n/c	n/c	n/m	n/c	80-100%	<b>Суши 2</b>
K.VKD(+43.99)KVQY(+67.92)EC(-33.99)ATGYTAGGK.K K.VK(+43.99)DKVQY(+67.92)EC(-33.99)ATGYTAGGK.K K.VKD(+79.97)KVQY(+44.99)EC(-33.99)ATGYTAGGK.K K.VKDK(+43.99)VQY(+67.92)EC(-33.99)ATGYTAGGK.K K.VKDKVQY(+79.97)EC(-33.99)ATGYTAGGK.K K.VQYEC(-33.99)ATGYTAGGK.K	Cys 160	Dehydroalanine (from Cysteine)	n/c	n/q	n/q	n/c	n/q	n/q	n/c	n/q	n/q	<b>Суши 3</b>
K.VKD(+43.99)K(-1.03)VQYEC(+47.98)ATGYTAGGK.K K.VK(+14.96)DK(+27.99)VQYEC(+47.98)ATGYTAGGK.K		Trioxidation	n/c	n/q	n/q	n/c	n/q	n/q	n/c	n/q	n/q	



R.NNIEM(+15.99)KW(+15.99)K.Y R.NNIEMK(+15.99)W(+15.99)K.Y R.NNIEM(+31.99)KW(+15.99)KYEGK.V R.NNIEM(+15.99)KW(+15.99)K(+15.99)YEGK.V R.NNIEMKW(+15.99)K(+15.99)YEGK.V			1-20%	40-60%	60-80%	1-20%	40-60%	40-60%	1-20%	60-80%	60-80%	
R.NNIEM(+15.99)KW(+13.98)K.Y R.NNIEM(+15.99)K(+42.01)W(+3.99)KYEGK.V		Tryptophan oxidation to oxolactone	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	
R.NNIEMK(+42.01)W(+3.99)KYEGK.V R.NNIEMK(+42.01)W(+19.99)KYEGK.V		Tryptophan oxidation to kynurenin	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	
K.QGYDLSPLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y S.PLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y K.QGYDLSPLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y		Tryptophan oxidation to hydroxykynurenin	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	n/m	n/m	n/m	
S.PLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y K.QGYDLSPLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y	Cys 485	Dehydroalanine (from Cysteine)	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	
S.PLTPLSELSVQC(-33.99)NRGEVK(+14.96).Y K.NNLLLKW(+13.98)DFDNRPH.I	Lys 491	Lysine oxidation to $\alpha$ -aminoadipic acid	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	n/q	
K.NNLLLK(+42.01)W(+3.99)DFDNRPH.I	Trp 578	Tryptophan oxidation to oxolactone	n/m	n/m	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	1-20%	1-20%	Суши 10
		Tryptophan oxidation to kynurenin	n/m	n/c	n/m	n/m	n/m	1-20%	n/m	1-20%	n/m	

*Сокращения:*

- n/c — не выявленные в последовательности (отсутствует покрытие);
- n/m — модификация не обнаружена для аминокислотного остатка;
- n/q — нет количественных данных для идентификации модификации

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+Ca<sup>2+</sup>, незначительно теряет свои свойства. В этом случае содержание образующихся  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров остается неизменным, в то время как содержание накопленных  $\alpha$ - $\alpha$ -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.

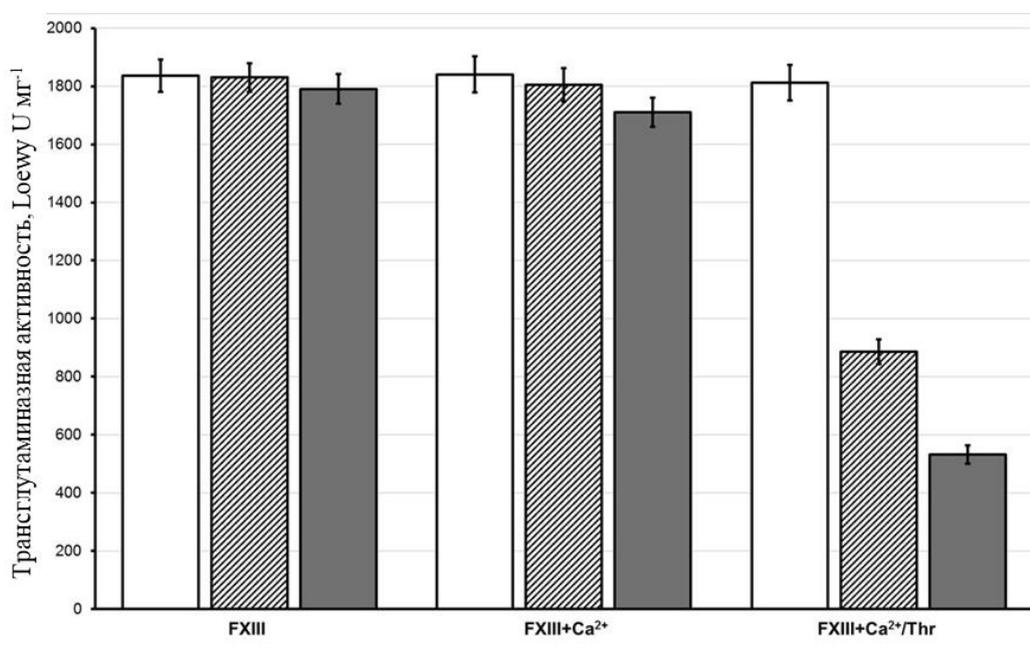
FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr, обработанный 50 мкМ HOCl/OCl<sup>-</sup>, показал значительное снижение ферментативной активности, о чем свидетельствуют как умеренное содержание  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров, так и следовые количества  $\alpha$ - $\alpha$ -полимеров. Окисление 150 мкМ гипохлорита привело к значительному сохранению исходных полипептидных цепей  $\gamma$  и  $\alpha$  в фибриногене с небольшим приростом  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров. Эти данные показывают, что ферментативная активность сильно зависит от стадии активации FXIII, на которой проводилось окисление.

Значения трансклутаминазной активности, измеренные колориметрическим методом для различных образцов FXIII, также подтвердили этот вывод (**Рисунок 21**). Для не окисленного FXIII и окисленного (50 мкМ и 150 мкМ гипохлорита) FXIII значения трансклутаминазной активности не изменились в пределах ошибки измерения и составили  $1836 \pm 55$ ,  $1830 \pm 49$  и  $1790 \pm 51$  по Loewy U мг<sup>-1</sup>, соответственно.

Результаты колориметрического метода показали, что значение трансклутаминазной активности FXIII в образце FXIII + Ca<sup>2+</sup> составляло  $1841 \pm 62$  Loewy U мг<sup>-1</sup>, а затем снижалось до  $1804 \pm 57$  и  $1710 \pm 41$  Loewy U мг<sup>-1</sup> при инкубации с 50 или 150 мкМ гипохлоритом.

При окислении FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Thr трансклутаминазная активность существенно снижалась по сравнению с контрольным образцом даже при

окислении 50 мкМ  $\text{HOCl}$  (с  $1812 \pm 61$  до  $886 \pm 43$   $\text{U mg}^{-1}$  по Loewy), тогда так при большем количестве окислителя, 150 мкМ  $\text{HOCl}$ , активность снижалась до  $532 \pm 31$   $\text{U mg}^{-1}$  по Loewy.



**Рисунок 21.** Значения трансклутаминазной активности (Loewy  $\text{U mg}^{-1}$ ) для различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (заштрихованные колонки), 150 мкМ (серые колонки) гипохлорита и для не окисленного FXIII (белые колонки) [Vasilyeva и др., 2020]. Активность трансклутаминазы выражена как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение,  $n = 6$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущих главах были представлены результаты исследования озон- и гипохлорит индуцированного повреждения коагуляционного фактора XIII на разных стадиях его активации.

Особенности индуцированного окисления FXIII на различных этапах его активации выявило много общего при использовании различных окислителей – озона/ $\text{HO}^{\bullet}$  [Rosenfeld и др., 2014; Розенфельд и др., 2015] и гипохлорита (**Рисунок 23**).

Было показано, что сайты окисления локализованы во всех структурных областях субъединицы FXIII-A, за исключением ее активационного пептида; в процессе превращения профермента в ферментативную форму новые, ранее не находящиеся на поверхности белковой глобулы аминокислотные остатки, становятся мишенями для окислителей. Последнее положение прямо доказывает структурную подвижность молекулы FXIII-A не только при активации FXIII в FXIIIa, но также и при окислительной модификации аминокислотных остатков.

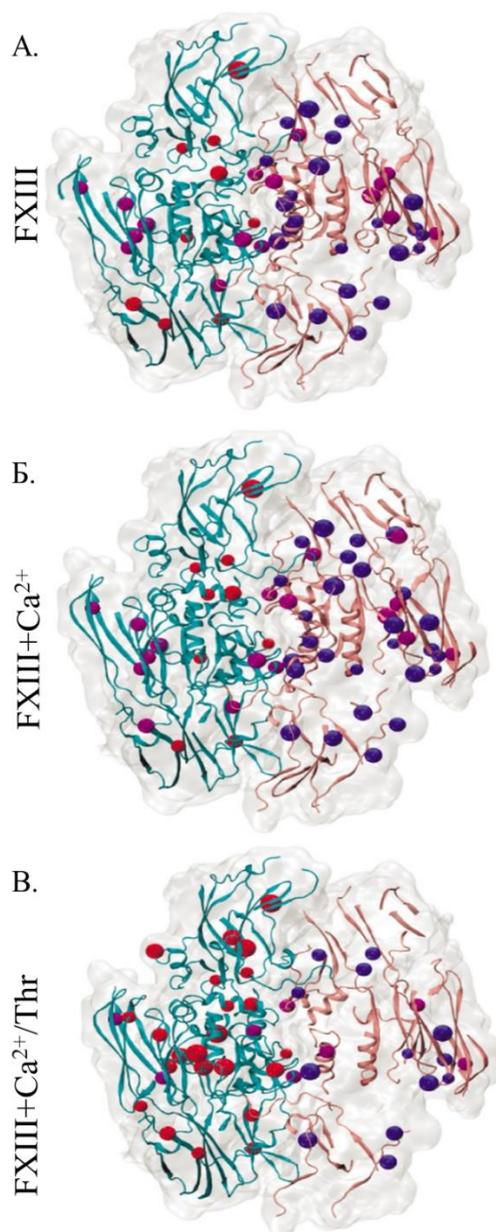
Результаты ВЭЖХ-МС/МС убедительно свидетельствует о том, что целый ряд модифицированных аминокислотных остатков является общим как при действии на белок озона/ $\text{HO}^{\bullet}$ , так и гипохлорита. В первую очередь это можно отнести к остаткам метионина, которые, во-первых, в большом количестве присутствует в первичной структуре белка [Muszbek и др., 2011], а во-вторых, наряду с остатками цистеина являются самыми высокореакционными при взаимодействии с окислителями [Drozd, Naskalski, Sznajd, 1988; Sharma, Graham, 2010]. Met350, Met406, Met474, Met475, Met495, Met499 в каталитическом домене, Met520 and Met 595 в  $\beta$ -баррель 1 домене и Met646, Met676 и Met709 в  $\beta$ -баррель 2 домене оказались модифицированными в проферменте, обработанном разными АФК.

Способность экспонированных метионинов перехватывать различные формы АФК, защищая тем самым критические аминокислотные остатки от окисления, была продемонстрирована для некоторых белков плазмы таких, как  $\alpha 2$ -

макроглобулин [Levine и др., 1999], антиромбин III [Van Patten и др., 1999], иммуноглобулинов [Kornfelt, Persson, Palm, 1999; Shah и др., 2018] и некоторых других. Окисление всех этих белков характеризуется тем, что поверхностно-локализованные остатки метионина первыми вовлекаются в окислительные реакции без потери функциональных свойств целевых белков. Другими словами, остатки метионина, встроенные в первичную структуру белков плазмы, могут служить врожденными перехватчиками АФК [Lim, Kim, Levine, 2019].

Следовательно, чрезвычайно большое количество Met в субъединице FXIII-A и расположение многих из них на поверхности белка, может способствовать первичной антиоксидантной защите профермента от окислительного повреждения. Это объясняет полное сохранение активности фермента в независимости от степени окисления профермента, из которого он образовался. 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.

Как следует из данных ВЭЖХ-МС/МС, функционально важные остатки Tyr 560 и Trp 279 FXIII-A субъединицы оставались в нативном виде во всех образцах. Однако резкая потеря активности FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr при воздействии гипохлорита может быть связана с повреждением аминокислотных остатков Trp130 и Cys695 (также модифицируемых озоном), а также Tyr311 и Trp315, расположенных в непосредственной близости от каталитического центра фермента [Vasilyeva и др., 2020]. Из-за нехватки информации о функциональности каждого из этих остатков можно предположить, что их функции связаны с активностью фермента. Другое интересное наблюдение состоит в том, вне зависимости от типа окислителя, процент окисленных аминокислотных остатков возрастал не только при увеличении концентрации окислителя, но и в зависимости от степени активации FXIII, на котором производилось окисление [Vasilyeva и др., 2018; Vasilyeva и др., 2020].



**Рисунок 23.** Изображение кристаллической структуры димера FXIII-A<sub>2</sub> с окислительными модификациями, обнаруженными в окисленных образцах FXIII на разных стадиях активации: FXIII (А), FXIII+Ca<sup>2+</sup> (Б,) FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr (В) [Vasilyeva, 2020]. Левый мономер представляет собой структуру каталитической субъединицы FXIII, обработанную 150 мкМ гипохлорита. Покрытые последовательности структурных элементов окрашены в синий цвет; непокрытые последовательности не показаны. Аминокислотные остатки, поврежденные гипохлоритом, нарисованы красными шариками. Правый мономер – отражает структуру каталитической субъединицы FXIII (окрашена в розовый цвет), обработанную 50 мкМ озона/1мг белка. Аминокислотные остатки, поврежденные озоном, показаны голубыми шариками. Фиолетовые шарiki в левом и правом мономерах представляют положения общих остатков, вовлеченных в окислительное повреждение, при воздействии любого из окислителей.

Отражением этого является окислительная уязвимость активированного фермента в сравнении с проферментом. Это может быть обусловлено ослаблением стабилизирующей роли регуляторных FXIII-B субъединиц. Хорошо известно, что в нативной конформации взаимодействия между всеми четырьмя субъединицами FXIII обеспечивают поддержку наиболее компактной глобулярной структуры мультимерного белкового комплекса. Вследствие этого вход в каталитический центр закрыт для любых веществ, в том числе для малых молекул [Muszbek и др., 2011], таких как молекулы озона и гипохлорита.

В недавнем исследовании [Protopopova и др., 2019] предполагается частичное закручивание FXIII-B субъединиц вокруг центрального ядра FXIII-A<sub>2</sub>, что обеспечивает дополнительную защиту каталитического центра от окисления. Данные масс-спектрометрии показали значительный вклад серосодержащих остатков метионинов и цистинов субъединиц FXIII-B<sub>2</sub> в общее количество сайтов окисления FXIII. FXIII-B содержит много остатков цистина [Ichinose и др., 1986], которые обладают высокой реакционной способностью к гипохлориту [Winterbourn, 1985]. Важно отметить, что, как и в FXIII-A, уязвимость регуляторной субъединицы к индуцированному окислению увеличивается с активацией FXIII в следующем порядке: нативный FXIII < FXIII+Ca<sup>2+</sup> < FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr.

Наличие множественных сайтов окисления в FXIII-B субъединице свидетельствует о ее способности перехватывать часть молекул окислителей и снижать «окислительную нагрузку» на каталитическую FXIII-A субъединицу. На это же указывает резкое снижение стабильности FXIII-A в плазме при отсутствии субъединиц FXIII-B [Saito и др., 1990; Schroeder, Kohler, 2016]. Кроме того, для клеточного FXIII, состоящего только из двух каталитических субъединиц FXIII (сFXIII), при аналогичных условиях окисления были показаны глубокие структурные изменения, приводящие к гораздо большей потере трансклутаминазной активности, чем у окисленного FXIIIa плазмы [Rosenfeld и др., 2016].

Похожая (аналогичная) антиоксидантная функция отдельных структурных областей была детально рассмотрена и для других белков плазмы [Rosenfeld и др., 2018]. В частности,  $\alpha$ 2-макроглобулин, состоящий, как и FXIII, из четырех субъединиц, при обработке гипохлоритом в близких к использованным нами молярных соотношениях белок/окислитель полностью утрачивал антипротеолитическую активность [Levine и др., 1999]. Хотя четвертичные структуры белков не являются идентичными, принципиально различающиеся эффекты действия окислителя на белки могут указывать на высокую антиоксидантную способность структуры профермента FXIII.

Таким образом, плотная упаковка тетрамерной структуры профермента FXIII, экспонированные остатки Met и Cys на субъединицах FXIII-A и защитная функция субъединиц FXIII-B представляют собой основные три фактора, которые обеспечивают высокую устойчивость белка к окислителям.

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.

Так или иначе, каждый из белков плазмы крови способен перехватывать АФК, тем самым, вероятно, ограничивая окисление FXIII в плазме крови здоровых людей. Совсем недавно было показано, что в образцах плазмы, взятых у здоровых добровольцев, добавление 500 мкМ  $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$  не изменяло ферментативную активность FXIII [Misztal и др., 2019], что тем не менее, по крайней мере отчасти, могло быть связано и с тем, что FXIII находился в неактивной форме, окисление которой не влияет на активность фермента после его активации, как установлено в настоящем исследовании.

Как показано в данной работе, профермент обладает максимальной устойчивостью к действию гипохлорита. Поскольку FXIII циркулирует в плазме со средней концентрацией 21,6 мкг/мл [Yorifuji и др., 1988], можно предположить, что

белок остается либо немодифицированным, 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 [Stief и др., 2000]. В плазме крови FXIII, как известно, нековалентно связан с фибриногеном [Byrnes и др., 2016], который, в свою очередь, путем связывания с интегрином альфаMbeta2 (Mac-1), экспрессируемым на активированных лейкоцитах, обеспечивает ключевую связь между тромбозом и воспалением [Lishko и др., 2004]. 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  $\alpha$ -полимеров в фибриновой сети. Это убедительно показано в нашем текущем исследовании. Поскольку  $\alpha$ -полимеры вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмином [Rijken, Uitte De Willige, 2017], их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда из фибриногена, поврежденного окислением, образуется устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой [Martinez, Weisel, Ischiropoulos, 2013].

Пока что эти рассуждения носят чисто теоретический характер. В дальнейшем особый интерес представляет выявление участков окислительных модификаций в FXIII, выделенном из плазмы крови пациентов с различными тромботическими патологиями, ассоциированными с воспалением и гиперпродукцией окислителей.

## 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+Ca<sup>2+</sup> << FXIII+Ca<sup>2+</sup>/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<sup>\*</sup>, 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 высокореакционными при взаимодействии с окислителями. Большое количество Met в субъединице FXIII-A и расположение многих из них 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, вне зависимости от типа окислителя, процент окисленных аминокислотных остатков возрастал не только при увеличении концентрации окислителя, но и в зависимости от степени 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 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  $\beta$ -баррель 2 каталитической субъединицы (FXIII-A) и 8-й суши-домен регуляторной субъединицы (FXIII-B).

3. Методом ПААГ-электрофореза показано, что наибольшую трансглутаминазную активность по сравнению с контрольным образцом сохраняет FXIIIa, образованный из окисленного профермента (FXIII). Для образцов, которые были обработаны окислителем в полностью активированной форме (FXIII+Ca<sup>2+</sup>/Thr), было установлено резкое снижение трансглутаминазной 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 ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 .

2. 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.

3. Донцов, В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / Донцов В. И., Крутько В. Н., Мрикаев Б. М., Уханов С. В // Труды ИСА РАН. - 2006. - Т. 19. - С. 50–69.

4. Розенфельд, М.А. Природа промежуточных частиц, сформированных при озон-индуцированном окислении / М.А Розенфельд, С.Д. Разумовский, А.Н. Щеголихин, М.Л. Константинова, Н.В. Сульимова, Л.Г. Козаченко, Н. Г. Наглер, А.В. Бычкова, В.Б. Леонова // Доклады академии наук. - 2015. - Т. 461, №. 6. - С. 729–732.

5. Розенфельд, М.А. Окислительная модификация клеточного фибринтабилизирующего 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.

6. Abe, C. Evaluation of the in vivo antioxidative activity of redox nanoparticles by using a developing chicken egg as an alternative animal model / C.Abe, Y. Uto, A. Kawasaki, C. Noguchi, R. Tanaka, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki, Y. Endo, H. Hori // J. Control. Release. - 2014. - V. 182. - P. 67–72.

7. Abe K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // *J. Neurosci.* - 1996. - V. 16, № 3. - P. 1066–1071.

8. Agbas, A. Decreased activity and increased aggregation of brain calcineurin during aging / A. Agbas, A. Zaidi, E. Michaelis // *Brain Res.* - 2005. - V. 1059, № 1. - P. 59–71.

9. Ahire, J. J. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6 / J. J. Ahire, N. U. Mokalhe, H. J. Patil, B. L. Chaudhari // *J. Food Sci. Technol.* - 2013. - V. 50, № 1. - P. 26–34.

10. Ahmed, E. K. Protein oxidative modifications and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts / E. K. Ahmed, C. R. Picot, A. L. Bulteau, B. Friguet // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2007. - V. 1119. - P. 88–96.

11. Ahvazi, B. Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: Binding of calcium ions changes structure for activation / B. Ahvazi, H. C. Kim, S. H. Kee, Z. Nemes, P. M. Steinert // *EMBO J.* - 2002. - V. 21, № 9. - P. 2055–2067.

12. Aksenova, M. V. Protein oxidation and enzyme activity decline in old brown Norway rats are reduced by dietary restriction / M. V. Aksenova, M. Y. Aksenov, J. M. Carney, D. A. Butterfield // *Mech. Ageing Dev.* - 1998. - V. 100, № 2. - P. 157–168.

13. Anokhin, B. A. Activation of factor XIII is accompanied by a change in oligomerization state / B. A. Anokhin, V. Stribinskis, W. L. Dean, M. C. Maurer // *FEBS J.* - 2017. - V. 284, № 22. - P. 3849–3861.

14. Anraku, M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin / M. Anraku, K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri // *Pharm. Res.* - 2001. - V. 18, № 5. - P. 632–639.

15. Ariëns, R.A. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms / R.A. Ariëns, T.S. Lai, J.W. Weisel, C.S. Greenberg, P.J. Grant // *Blood.* - 2002. - V. 100, № 3. - P. 743–754.

16. Ashcroft, A.E. A study of human coagulation factor XIII A-subunit by electrospray ionisation mass spectrometry / A.E. Ashcroft, P.J. Grant, R.A. Ariens // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* - 2000. - V. 14, № 17. - P. 1607–1611.

17. Asijee, G M. Platelet vinculin: a substrate of activated Factor XIII / G M Asijee, L Muszbek, J Kappelmayer, J Polgár, A Horváth, A Sturk // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* - 1988. - V. 954. - P. 303–308.
18. Atalay, M. Diabetes, oxidative stress and physical exercise / M. Atalay, D.E. Laaksonen // *J. Sport. Sci. Med.* - 2002. - V. 1, № 1. - P. 1–14.
19. Bagoly, Z. Factor XIII, clot structure, thrombosis / Z. Bagoly, J. Koncz, L. Hársfalvi, L. Muszbek // *Thromb. Res.* - 2012. - V. 129, № 3. - P. 382–387.
20. Bagoly, Z. Factor XIII: What does it look like? / Z. Bagoly, L. Muszbek // *J. Thromb. Haemost.* - 2019. - V. 17, № 5. - P. 714–716.
21. Bale, M.D. Incorporation of thrombospondin into fibrin clots / M.D. Bale, L.G. Westrick, D.F. Mosher // *J. Biol. Chem.* - 1985. - V. 260, № 12. - P. 7502–7508.
22. Beier, K. The impact of aging on enzyme proteins of rat liver peroxisomes: quantitative analysis by immunoblotting and immunoelectron microscopy / K. Beier, A. Völkl, H.D. Fahimi // *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* - 1993. - V. 63, № 3. - P. 139–146.
23. Berlett, B.S. Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin / B.S. Berlett, R.L. Levine, E.R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* - 1996. - V. 271, № 8. - P. 4177–4182.
24. Bielski, B.H. Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions / B.H. Bielski, D.E. Cabelli // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1991. - V. 59, № 2. - P. 291–319.
25. Biswas, A. Coagulation factor XIII deficiency: Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms / A. Biswas, V. Ivaskevicius, A. Thomas, J. Oldenburg // *Hamostaseologie.* - 2014. - V. 34, № 2. - P. 160–166.
26. Blombäck, B. B. Purification of bovine and human fibrinogen / B. B. Blombäck, M. Blombäck // *Acta Chem. Scand.* - 1956. - V. 10. - P. 147–147.
27. Board, P.G. A Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24→p25 / P.G. Board, G.C. Webb, J. McKee, A. Ichinose // *Cytogenet. Genome Res.* - 1988. - V. 48, № 1. - P. 25–27.

28. Bockenstedt, P. Binding and covalent cross-linking of purified von Willebrand factor to native monomeric collagen / P. Bockenstedt, J. McDonagh, R.I. Handin // *J. Clin. Invest.* - 1986. - V. 78, № 2. - P. 551–556.
29. Bohn, H. Molecular structure of human fibrin stabilizing factors / H. Bohn, H. Haupt, T. Kranz // *Blut Zeitschrift für die Gesamte Blutforsch.* - 1972. - V. 25, № 4. - P. 235–248.
30. Bottenus, R.E. Nucleotide sequence of the gene for the B subunit of human factor XIII / R.E. Bottenus, A. Ichinose, E.W. Davie // *Biochemistry.* - 1990. - V. 29, № 51. - P. 11195–11209.
31. Bruschi, M. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function / M. Bruschi, G. Candiano, L. Santucci, G.M. Ghiggeri // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 2013. - V. 1830, № 12. - P. 5473–5479.
32. Burney, P.R. Structural effects of methionine oxidation on isolated subdomains of human fibrin D and  $\alpha$ C regions / P.R. Burney, N. White, J. Pfaendtner // *PLoS One.* - 2014. - V. 9, № 1. - P. e86981.
33. Byrnes, J.R. The interaction between fibrinogen and zymogen FXIII-A2B2 is mediated by fibrinogen residues  $\gamma$ 390-396 and the FXIII-B subunits / J.R. Byrnes, C. Wilson, A.M. Boutelle, C.B. Brandner, M.J. Flick, H. Philippou, A. S. Wolberg // *Blood.* - 2016. - V. 128, № 15. - P. 1969–1978.
34. Calcaterra, J. Recombinant factors for hemostasis: Doctoral dissertation / Jennifer Calcaterra. ETD collection for University of Nebraska - Lincoln. - 2010. - AAI3412913.
35. Carney, J. M. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron / J. M. Carney, P. E. Starke-Reed, C. N. Oliver, R. W. Landum, M. S. Cheng, J. F. Wu, R. A. Floyd // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1991. - V. 88, № 9. - P. 3633–3636.
36. Carr, A.C. Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein / A.C. Carr, T. Tijerina, B. Frei // *Biochem. J.* - 2000. - V. 346. - P. 491–499.

37. Carrell, N.A. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits / N.A. Carrell, H.P. Erickson, J. McDonagh // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264, № 1. - P. 551–556.

38. Chapman, A. L. Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid / A. L. Chapman, C. C. Winterbourn, S. O. Brennan, T. W. Jordan, A. J. Kettle // *Biochem. J.* - 2003. - V. 375. - P. 33–40.

39. Chen, J. Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13 / J. Chen, X. Fu, Y. Wang, M. Ling, B. McMullen, J. Kulman, D.W. Chung, J.A. López // *Blood*. 2010. - V. 115. - № 3. -P. 706–710.

40. Chen, R.  $\gamma$ - $\gamma$  Cross-linking sites in human and bovine fibrin / R. Chen, R.F. Doolittle // *Biochemistry.* - 1971. - V. 10, № 24. - P. 4486–4491.

41. Cheng, F.C. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods / F.C. Cheng, J.F. Jen, T.H. Tsai // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* - 2002. - V. 781, № 1–2. - P. 481–496.

42. Chung, S.I. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures / S.I. Chung, M.S. Lewis, J.E. Folk // *J. Biol. Chem.* - 1974. - V. 249, № 3. - P. 940–950.

43. Cohen, I. Fibrinolytic-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle / I. Cohen, L. Young-Bandala, T.A. Blankenberg, G.E. Siefring, J. Bruner-Lorand // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1979. - V. 192, № 1. - P. 100–111.

44. Cohen, I. Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of platelet and muscle actin regulation by nucleotides / I. Cohen, T.A. Blankenberg, D. Borden, D.R. Kahn, A. Veis // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 1980. - V. 628. - P. 365–375.

45. Cohen, I. Disulfide-linked and transglutaminase-catalyzed protein assemblies in platelets / I. Cohen, C.T. Lim, D.R. Kahn, T. Glaser, J.M. Gerrard, J.G. White // *Blood*. - 1985. - V. 66, № 1. - P. 143–151.

46. Cottrell, B. A. Amino acid sequence studies on the alpha chain of human fibrinogen. Exact location of crosslinking acceptor sites / B. A. Cottrell, D. D. Strong, K. W. Watt, R. F. Doolittle // *Biochemistry*. - 1979. - V. 18, № 24. - P. 5405–5410.

47. Das, S. Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis / S. Das; J.S. Maras, M.S. Hussain, S. Sharma, P. David, S. Sukriti, S.M. Shasthry, R. Maiwall, N. Trehanpati, T.P. Singh, S.K. Sarin // *Hepatology*. - 2017. - V. 65, № 2. - P. 631–646.

48. Davies, M.J. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis / M.J. Davies, R.J. Truscott // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* - 2001. - V. 63, № 1–3. - P. 114–125.

49. Doolittle, R. F. Amino acid sequence studies on the  $\alpha$  chain of human fibrinogen. Isolation and characterization of two linked  $\alpha$ -chain cyanogen bromide fragments from fully cross-linked fibrin / R. F. Doolittle, K. G. Cassman, B. A. Cottrell, S. J. Friezner // *Biochemistry*. - 1977. - V. 16, № 8. - P. 1715–1719.

50. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // *Physiol. Rev.* - 2002. - V. 82, № 1. - P. 47–95.

51. Drozd, R. Oxidation of amino acids and peptides in reaction with myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide / R. Drozd, J.W. Naskalski, J. Sznajd // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* - 1988. - V. 957, № 1. - P. 47–52.

52. Eckardstein, A. Site-specific methionine sulfoxide formation is the structural basis of chromatographic heterogeneity of apolipoproteins A-I, C-II, and C-III / A. Eckardstein, M. Walter, H. Holz, A. Benninghoven, G. Assmann, // *J. Lipid Res.* - 1991. - V. 32, № 9. - P. 1465–1476.

53. Epe, B. Genotoxicity of singlet oxygen / B. Epe // *Chem. Biol. Interact.* - 1991. - V. 80, № 3. - P. 239–260.

54. Erickson, J. R. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation / J.R. Erickson, M.A. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C.V. Oddis, R.K. Bartlett, J.S. Lowe, S.E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M.C.

Zimmerman, K. Zimmerman, A.L. Ham, R.M. Weiss, D.R. Spitz, M.A. Shea, R.J. Colbran, P.J. Mohler, M. Anderson // *Cell*. - 2008. - V. 133, № 3. - P. 462–474.

55. Fanali, G. Human serum albumin: From bench to bedside / G. Fanali, A. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi // *Mol. Aspects Med.* - 2012. - V. 33, № 3. - P. 209–290.

56. Francis, R.T. Factor V is a substrate for the transamidase factor XIIIa / R.T. Francis, J. McDonagh, K.G. Mann // *J. Biol. Chem.* - 1986. - V. 261, № 21. - P. 9787–9792.

57. Fretto, L.J. Localization of the alpha-chain cross-link acceptor sites of human fibrin / L.J. Fretto, E.W. Ferguson, H.M. Steinman, P.A. McKee // *J. Biol. Chem.* - 1978. - V. 253, № 7. - P. 2184–2195.

58. Fridovich, I. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant / I. Fridovich // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1983. - V. 23, № 1. - P. 239–257.

59. Fu, X. Specific sequence motifs direct the oxygenation and chlorination of tryptophan by myeloperoxidase / X. Fu, Y. Wang, J. Kao, A. Irwin, A. d'Avignon, R. P. Mecham, W. C. Parks, J.W. Heinecke // *Biochemistry*. - 2006. - V. 45, № 12. - P. 3961–3971.

60. Galetskiy, D. Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes / D. Galetskiy, J.N. Lohscheider, A.S. Kononikhin, I.A. Popov, E.N. Nikolaev, I. Adamska, // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* - 2011. - V. 25, № 1. - P. 184–190.

61. Gan, Q. F. Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxygenase which is oxygenated by the enzyme product 13-HPODE: dissociation of sulfoxide formation from self-inactivation / Q. F. Gan, G. L. Witkop, D. L. Sloane, K. M. Straub, E. Sigal, // *Biochemistry*. - 1995. - V. 34, № 21. - P. 7069–7079.

62. Garner, B. Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by  $\alpha$ -tocopherol / B. Garner, P.K. Witting, A.R. Waldeck, J.K. Christison, M. Raftery, R. Stocker // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273, № 11. - P. 6080–6087.

63. Gitlin, G. Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon  $\alpha$ -2b / G. Gitlin, A. Tsarbopoulos, S.T. Patel, W. Sydor, B.N. Pramanik, S. Jacobs, L. Westreich, S. Mittelman, J. Bausch // *Pharm. Res.* - 1996. - V. 13, № 5. - P. 762–769.
64. Glasauer, A. Targeting antioxidants for cancer therapy / A. Glasauer, N.S. Chandel // *Biochem. Pharmacol.* - 2014. - V. 92, № 1. - P. 90–104.
65. Glaser, C. B. Light Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity: A potential rapid mechanism for modulation of coagulation / C. B. Glaser, J. Morser, J. H. Clarke, E. Blasko, K. McLean, I. Kuhn, R. J. Chang, J. H. Lin, L. Vilander, W. H. Andrews // *J. Clin. Invest.* - 1992. - V. 90, № 6. - P. 2565–2573.
66. Glomb, M.A. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction / M.A. Glomb, V.M. Monnier // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V. 270, № 17. - P. 10017–10026.
67. Greenberg, C.S. Factor XIIIa formation promoted by complexing of  $\alpha$ -thrombin, fibrin, and plasma factor XIII / C.S. Greenberg, K.E. Achyuthan, J.W. Fenton // *Blood.* - 1987. - V. 69, № 3. - P. 867–871.
68. Greenberg, C.S. Specific binding of blood coagulation factor XIIIa to thrombin-stimulated platelets / C.S. Greenberg, M.A. Shuman // *J. Biol. Chem.* - 1984. - V. 259, № 23. - P. 14721–14727.
69. Griffiths, H.R. Redox regulation of protein damage in plasma / H.R. Griffiths, I.H. Dias, R.S. Willetts, A. Devitt // *Redox Biol.* - 2014. - V. 2. - P. 430–435.
70. Grundmann, U. Characterization of cDNA coding for human factor XIIIa / U. Grundmann, E. Amann, G. Zettlmeissl, H.A. Kupper // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1986. - V. 83, № 21. - P. 8024–8028.
71. Grune, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system / T. Grune // *Biogerontology.* - 2000. - V. 1, № 1. - P. 31–40.
72. Grune, T. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells / T. Grune, R. Shringarpure, N. Sitte, K. Davies // *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* - 2001. - V. 56, № 11. - P. B459–B467.

73. Grune, T. Protein Oxidation and Aging / T. Grune, B. Catalgol, T. Jung // Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. - 2012. - 524 p.

74. Gu, S.X. Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation / S.X. Gu, J.W. Stevens, S.R. Lentz // Blood. - 2015. - V. 125, № 25. - P. 3851–3859.

75. Guedes, S. Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications / S. Guedes, R. Vitorino, R. Domingues, F. Amado, P. Domingues // Rapid Commun. Mass Spectrom. - 2009. - V. 23, № 15. - P. 2307–2315.

76. Gugliucci, A. Hypochlorous acid is a potent inactivator of human plasminogen at concentrations secreted by activated granulocytes / A. Gugliucci // Clin. Chem. Lab. Med. - 2008. - V. 46, № 10. - P. 1403–1409.

77. Hada, M. Covalent crosslinking of von Willebrand factor to fibrin / M. Hada, M. Kaminski, P. Bockenstedt, J. McDonagh // Blood. - 1986. - V. 68, № 1. - P. 95–101.

78. Hampton, M.B. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing / M.B. Hampton, A.J. Kettle, C.C. Winterbourn // Blood. - 1998. - V. 92, № 9. - P. 3007–3017.

79. Han, X. PeaksPTM: mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications / X. Han, L. He, L. Xin, B. Shan, B. Ma // J. Proteome Res. - 2011. - V. 10, № 7. - P. 2930–2936.

80. Handrkova, H. The activation peptide of coagulation factor XIII is vital for its expression and stability / H. Handrkova, V. Schroeder, H.P. Kohler // J. Thromb. Haemost. - 2015. - V. 13, № 8. - P. 1449–1458.

81. Harutyunyan, H.A. Prothrombin and fibrinogen carbonylation: How that can affect the blood clotting / H.A. Harutyunyan // Redox Rep. - 2017. - V. 22, № 4. - P. 160–165.

82. Hawkins, C.L. Hypochlorite-induced damage to proteins: Formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation / C.L. Hawkins, M.J. Davies // Biochem. J. 1998. - V. 332. - P. 617–625.

83. Hawkins, C.L. Generation and propagation of radical reactions on proteins / C.L. Hawkins, M.J. Davies // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2001. - V. 1504, № 2–3. - P. 196–219.

84. Hawkins, C.L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.J. Davies // *Amino Acids.* - 2003. - V. 25, № 3–4. - P. 259–274.

85. Hazen, S.L. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima / S.L. Hazen, J.W. Heinecke // *J. Clin. Invest.* - 1997. - V. 99, № 9. - P. 2075–2081.

86. He, B.J. Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone / B.J. He, M.A. Joiner, M.V. Singh, E.D. Luczak, P.D. Swaminathan, O.M. Koval, W. Kutschke, C. Allamargot, J. Yang, X. Guan, K. Zimmerman, I.M. Grumbach, R.M. Weiss, D.R. Spitz, C.D. Sigmund, W.M. Blankesteyn, S. Heymans, P.J. Mohler, M.E. Anderson // *Nat. Med.* - 2011. - V. 17, № 12. - P. 1610–1618.

87. Hougland, J.L. Post-translational protein modification during oxidative stress / J.L. Hougland, J. Darling, S. Flynn // *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. - 2013. - 420 p.

88. Hsu, Y. R. In vitro methionine oxidation of escherichia coli-derived human stem cell factor: Effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization / Y. R. Hsu, L. O. Narhi, C. Spahr, K. E. Langley, H. S. Lu // *Protein Sci.* - 1996. - V. 5, № 6. - P. 1165–1173.

89. Huh, M.M. Covalent crosslinking of human coagulation factor V by activated factor XIII from guinea pig megakaryocytes and human plasma / M.M. Huh, B.P. Schick, P.K. Schick, R.W. Colman // *Blood.* - 1988. - V. 71, № 6. - P. 1693–1702.

90. Hung, R.J. Selr reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics / R.J. Hung, C.S. Spaeth, H.G. Yesilyurt, J.R. Terman // *Nat. Cell Biol.* - 2013. - V. 15, № 12. - P. 1445–1454.

91. Ichinose, A. Amino acid sequence of the a subunit of human factor XIII / A. Ichinose, L.E. Hendrickson, K. Fujikawa, E.W. Davie // *Biochemistry*. - 1986. - V. 25, № 22. - P. 6900–6906.
92. Ichinose, A. Amino acid sequence of the B subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments / A. Ichinose, B. A. McMullen, K. Fujikawa, E. W Davie // *Biochemistry*. - 1986. - V. 25, № 16. - P. 4633–4638.
93. Ichinose, A. Characterization of the gene for the A subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor / A. Ichinose, E.W. Davie // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1988. - V. 85, № 16. - P. 5829–5833.
94. Ishihama, Y. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics / Y. Ishihama, J. Rappsilber, J. S. Andersen, M. Mann // *J. Chromatogr. A.* - 2002. - V. 979, № 1–2. - P. 233–239.
95. Iwao, Y. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP) / Y. Iwao, M. Anraku, M. Hiraike, K. Kawai, K. Nakajou, T. Kai, A. Suenaga, M. Otagiri // *Drug Metab. Pharmacokinet.* - 2006. - V. 21, № 2. - P. 140–146.
96. Kanayama, A. Oxidation of I $\kappa$ B $\alpha$  at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF- $\kappa$ B activation / A. Kanayama, J. Inoue, Y. Sugita-Konishi, M. Shimizu, Y. Miyamoto // *J. Biol. Chem.* - 2002. - V. 277, № 27. - P. 24049–24056.
97. Kanofsky, J.R. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules / J.R. Kanofsky, P. Sima // *J. Biol. Chem.* - 1991. - V. 266, № 14. - P. 9039–9042.
98. Katona, E. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2) / E. Katona; G. Haramura; L. Karpati; J. Fachel; L. Muszbek // *Thromb. Haemost.* - 2000. - V. 83, № 2. - P. 268–273.
99. Kawakami, A. Identification and characterization of oxidized human serum albumin: A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions / A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama // *FEBS J.* - 2006. - V. 273, № 14. - P. 3346–3357.

100. Keck, R.G. The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins / R.G. Keck // *Anal. Biochem.* - 1996. - V. 236, № 1. - P. 56–62.

101. Kehrer, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity / J.P. Kehrer // *Toxicology.* 2000. - V. 149, № 1. - P. 43–50.

102. Kim, M.S. Common errors in mass spectrometry-based analysis of post-translational modifications / M.S. Kim, J. Zhong, A. Pandey // *Proteomics.* - 2016. - V. 16, № 5. - P. 700–714.

103. Kiyoshima, T. Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts / T. Kiyoshima, N. Enoki, I. Kobayashi, T. Sakai, K. Nagata, H. Wada, H. Fujiwara, Y. Ookuma, H. Sakai // *Int. J. Mol. Med.* - 2012. - V. 30, № 5. - P. 1007–1012.

104. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe / S.J. Klebanoff // *J. Leukoc. Biol.* - 2005. - V. 77, № 5. - P. 598–625.

105. Komáromi, I. Factor XIII: Novel structural and functional aspects / I. Komáromi, Z. Bagoly, L. Muszbek // *J. Thromb. Haemost.* - 2011. - V. 9, № 1. - P. 9–20.

106. Kornfelt, T. Oxidation of methionine residues in coagulation factor VIIa / T. Kornfelt, E. Persson, L. Palm // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1999. - V. 363, № 1. - P. 43–54.

107. de La Cruz, C.P. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat / C.P. de La Cruz, E. Revilla, J.L. Venero, A. Ayala, J. Cano, A. Machado // *Free Radic. Biol. Med.* - 1996. - V. 20, № 1. - P. 53–61.

108. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* - 1970. - V. 227, № 5259. - P. 680–685.

109. Lancellotti, S. Formation of methionine sulfoxide by peroxyxynitrite at position 1606 of von Willebrand factor inhibits its cleavage by ADAMTS-13: A new prothrombotic mechanism in diseases associated with oxidative stress / S. Lancellotti, V. de Filippis, N. Pozzi, F. Peyvandi, R. Palla, B. Rocca, S. Rutella, D. Pitocco, P. M. Mannucci, R. de Cristofaro // *Free Radic. Biol. Med.* - 2010. - V. 48, № 1. - P. 446–456.

110. Lawrence, D.A. Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants / D.A. Lawrence, D.J. Loskutoff // *Biochemistry.* - 1986. - V. 25, № 21. - P. 6351–6355.

111. Lee, B.C. MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation / B.C. Lee, Z. Peterfi, F.W. Hoffmann, R.E. Moore, A. Kaya, A. Avanesov, L. Tarrago, Y. Zhou, E. Weerapana, D.E. Fomenko, P.R. Hoffmann, V.N. Gladyshev // *Mol. Cell.* - 2013. - V. 51, № 3. - P. 397–404.

112. Levine, R.L. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins / R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1996. - V. 93, № 26. - P. 15036–15040.

113. Levine, R.L. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage / R. L. Levine, B. S. Berlett, J. Moskovitz, L. Mosoni, E. R. Stadtman // *Mech. Ageing Dev.* - 1999. - V. 107, № 3. - P. 323–332.

114. Levine, R.L. Oxidative modification of proteins during aging / R.L. Levine, E.R. Stadtman // *Exp. Gerontol.* - 2001. - V. 36, № 9. - P. 1495–1502.

115. Lim, J.M. Methionine in proteins: it's not just for protein initiation anymore / J.M. Lim, G. Kim, R.L. Levine // *Neurochem. Res.* - 2019. - V. 44, № 1. - P. 247–257.

116. Lim, Y. Modulation of cutaneous wound healing by ozone: Differences between young and aged mice / Y. Lim, A.D. Phung, A.M. Corbacho, H.H. Aung, E. Maioli, A.Z. Reznick, C.E. Cross, P.A. Davis, G. Valacchi // *Toxicol. Lett.* - 2006. - V. 160, № 2. - P. 127–134.

117. Lishko V.K. Multiple binding sites in fibrinogen for integrin  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1) / V.K. Lishko, N.P. Podolnikova, V.P. Yakubenko, S. Yakovlev, L. Medved, S.P. Yadav, T.P. Ugarova // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279, № 43. - P. 44897–44906.

118. Loewy, A.G. Fibrinase I. Purification of substrate and enzyme. / A.G. Loewy, K. Dunathan, R. Kriel, H.L. Wolfinger // *J. Biol. Chem.* - 1961. - V. 236. - P. 2625–33.

119. Lorand, L. Lysine as amine donor in fibrin crosslinking / L. Lorand, H.H. Ong, B. Lipinski, N.G. Rule, J. Downey, // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1966. - V. 25, № 6. - P. 629–637.

120. Lorand, L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin / L. Lorand // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2006. - V. 936, № 1. - P. 291–311.

121. Lorand, L. Factor XIII (fibrin-stabilizing factor) / L. Lorand, R.B. Credo, T.J. Janus // *Methods Enzymol.* - 1981. - V. 80. - P. 333–341.

122. Loria, V. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes / V. Loria, I. Dato, F. Graziani, L.M. Biasucci // *Mediators Inflamm.* - 2008. - V. 2008. - P. 135625.

123. Luo, S. Methionine in proteins defends against oxidative stress / S. Luo, R.L. Levine // *FASEB J.* - 2009. - V. 23, № 2. - P. 464–472.

124. Maciążek-Jurczyk, M. Spectroscopic analysis of the impact of oxidative stress on the structure of human serum albumin (HSA) in terms of its binding properties / M. Maciążek-Jurczyk, A. Sułkowska // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2015. - V. 136. - P. 265–282.

125. Martinez, M. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots / M. Martinez, J.W. Weisel, H. Ischiropoulos // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. - V. 65. - P. 411–418.

126. Matačić, S. The identification of isopeptide crosslinks in insoluble fibrin / S. Matačić, A.G. Loewy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968. T. 30. № 4. C. 356–362.

127. Matsuka, Y.V. Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of recombinant  $\alpha$ C fragments of human fibrinogen / Y.V. Matsuka, L.V. Medved, M.M. Migliorini, K.C. Ingham // *Biochemistry.* - 1996. - V. 35, № 18. - P. 5810–5816.

128. McDonagh, J. Factor XIII in human plasma and platelets / J. McDonagh, R.P. McDonagh, J.M. Delage, R.H. Wagner // *J. Clin. Invest.* - 1969. - V. 48, № 5. - P. 940–946.

129. McDonagh, J. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice / J. McDonagh // R.W. Colman Amber, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. - 1994. - 1713 p.

130. McKee, P.A. Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin / P.A. McKee, P. Mattock, R.L. Hill // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1970. - V. 66, № 3. - P. 738–744.

131. Midwinter, R.G. I $\kappa$ B is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by glycine chloramine through methionine

oxidation / R.G. Midwinter, F.C. Cheah, J. Moskovitz, M.C. Vissers, C.C. Winterbourn // *Biochem. J.* 2006. - V. 396, № 1. - P. 71–78.

132. Mirzaei, H. Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry / H. Mirzaei, F. Regnier // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77, № 8. - P. 2386–2392.

133. Misztal, T. The myeloperoxidase product, hypochlorous acid, reduces thrombus formation under flow and attenuates clot retraction and fibrinolysis in human blood / T. Misztal, A. Golaszewska, M.M. Tomasiak-Lozowska, M. Iwanicka, N. Marcinczyk, A. Leszczynska, E. Chabielska, T. Rusak // *Free Radic. Biol. Med.* - 2019. - V. 141. - P. 426–437.

134. Mosher, D.F. Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa / D.F. Mosher, P.E. Schad // *J. Clin. Invest.* - 1979. - V. 64, № 3. - P. 781–787.

135. Mosher, D.F. Cross-linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa. Localization of participating glutaminy residues to a tryptic fragment of fibronectin / D.F. Mosher, P.E. Schad, J.M. Vann // *J. Biol. Chem.* - 1980. - V. 255, № 3. - P. 1181–1188.

136. Mui P.T.K. Cross-linking of actin and fibrin by fibrin-stabilizing factor / P.T.K. Mui, P. Ganguly // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* - 1977. - V. 233, № 3. - P. H346–H349.

137. Muszbek, L. Monocytes of Patients Congenitally Deficient in Plasma Factor XIII Lack Factor XIII Subunit A Antigen and Transglutaminase Activity / L. Muszbek, R. Adany, M. Kawai, Z. Boda, S. Lopaciuk // *Thromb. Haemost.* - 1988. - V. 59, № 2. - P. 231–235.

138. Muszbek L. Factor XIII: A coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions / L. Muszbek, Z. Bereczky, Z. Bagoly, I. Komaromi, E. Katona // *Physiol. Rev.* - 2011. - V. 91, № 3. - P. 931–972.

139. Nabuchi, Y. Oxidation of Recombinant Human Parathyroid Hormone: Effect of Oxidized Position on the Biological Activity / Y. Nabuchi, E. Fujiwara, K. Ueno, H. Kuboniwa, Y. Asoh, H. Ushio // *Pharm. Res.* - 1995. - V. 12, № 12. - P. 2049–2052.

140. Nagy, J.A. Biosynthesis of Factor XIII A and B Subunits / J.A. Nagy, R.L. Kradin, J. McDonagh // *Advances in Post-Translational Modifications of Proteins and Aging*. Boston, MA: Springer US. - 1988. - 250 p.

141. Nalian, A. Possible mechanisms contributing to oxidative inactivation of activated protein C: Molecular dynamics study / A. Nalian, A. V. Iakhiaev // *Thromb. Haemost.* - 2008. - V. 100, № 1. - P. 18–25.

142. Nicholls, S.J. Myeloperoxidase and cardiovascular disease / S.J. Nicholls, S.L. Hazen // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2005. - V. 25, № 6. - P. 1102–1111.

143. Nomura, T. Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure / T. Nomura, R. Kamada, I. Ito, Y. Chuman, Y. Shimohigashi, K. Sakaguchi // *Biopolymers*. - 2009. - V. 91, № 1. - P. 78–84.

144. Norman, D. G. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution / D. G. Norman, P. N. Barlow, M. Baron, A. J. Day, R. B. Sim, I. D. Campbell // *J. Mol. Biol.* - 1991. - V. 219, № 4. - P. 717–725.

145. Oliver, C. N. Age-related changes in oxidized proteins / C. N. Oliver, B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein, E. R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* - 1987. - V. 262, № 12. - P. 5488–5491.

146. Oliver, C.N. A Role of Mixed-Function Oxidation Reactions in the Accumulation of Altered Enzyme Forms During Aging / C.N. Oliver, R.L. Levine, E.R. Stadtman // *J. Am. Geriatr. Soc.* - 1987. - V. 35, № 10. - P. 947–956.

147. Van Patten, S.M. Oxidation of methionine residues in antithrombin: Effects on biological activity and heparin binding / S.M. Van Patten, E. Hanson, R. Bernasconi, K. Zhang, P. Manavalan, E.S. Cole, J.M. McPherson, T. Edmunds // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274, № 15. - P. 10268–10276.

148. Pattison, D. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases / D. Pattison, M. Davies // *Curr. Med. Chem.* - 2006. - V. 13. - P. 3271–3290.

149. 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 // *Chem. Res. Toxicol.* - 2001. - V. 14, № 10. - P. 1453–1464.

150. Pedersen, J. Protein-radical enzymes / J. Pedersen, A. Finazzi-Agrò // FEBS Lett. - 1993. - V. 325, № 1–2. - P. 53–58.

151. Pedersen, L.C. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules / L.C. Pedersen, V.C. Yee, P.D. Bishop, I. Le Trong, D.C. Teller, R.E. Stenkamp // Protein Sci. - 1994. - V. 3, № 7. - P. 1131–1135.

152. Petrushanko, I.Y. Oxidation of Ca<sup>2+</sup>-binding domain of NADPH oxidase 5 (NOX5): toward understanding the mechanism of inactivation of NOX5 by ROS / I.Y. Petrushanko, V.M. Lobachev, A.S. Kononikhin, A.A. Makarov, F. Devred, H. Kovacic, A.A. Kubatiev, P. O. Tsvetkov // PLoS One. - 2016. - V. 11, № 7. - P. e0158726.

153. Porter, K.M. HIV-1, reactive oxygen species, and vascular complications / K.M. Porter, R.L. Sutliff // Free Radic. Biol. Med. - 2012. - V. 53. - P. 143–159.

154. Procyk, R. Factor XIII catalyzed formation of fibrinogen-fibronectin oligomers — A thiol enhanced process / R. Procyk, L. Adamson, M. Block, B. Blomback // Thromb. Res. - 1985. - V. 40, № 6. - P. 833–852.

155. Protopopova, A. D. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy / A.D. Protopopova, A. Ramirez, D.V. Klinov, R.I. Litvinov, J.W. Weisel // J. Thromb. Haemost. - 2019. - V. 17, № 5. - P. 737–748.

156. Pryor, W.A. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung / W.A. Pryor // Free Radic. Biol. Med. - 1994. - V. 17, № 1. - P. 451–465.

157. Purves, L. Cleavage of fibrin-derived D-dimer into monomers by endopeptidase from puff adder venom (*Bitis arietans*) acting at cross-linked sites of the  $\gamma$ -chain. Sequence of carboxy-terminal cyanogen bromide  $\gamma$ -chain fragments / L. Purves, M. Purves, W. Brandt // Biochemistry. - 1987. - V. 26, № 15. - P. 4640–4646.

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

159. Reddy V.Y. Oxidative dissociation of human  $\alpha$ 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers / V.Y. Reddy // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 269, № 6. - P. 4683–4691.
160. Rijken, D.C. Compaction of fibrin clots reveals the antifibrinolytic effect of factor XIII / D.C. Rijken, S. Abdul, J.J. Malfliet, F.W. Leebeek, S. Uitte de Willige // *J. Thromb. Haemost.* - 2016. - V. 14, № 7. - P. 1453–1461.
161. Rijken, D.C. Inhibition of Fibrinolysis by Coagulation Factor XIII / D.C. Rijken, S. Uitte De Willige // *Biomed Res. Int.* - 2017. - V. 2017. - P. 1209676.
162. Ritchie, H. Cross-linking of Plasminogen Activator Inhibitor 2 and  $\alpha$  2 - Antiplasmin to Fibrin(ogen) / H. Ritchie, L.C. Lawrie, P.W. Crombie, M.W. Mosesson, N.A. Booth // *J. Biol. Chem.* 2000. - V. 275, № 32. - P. 24915–24920.
163. Ritchie, H. Characterization of crosslinking sites in fibrinogen for plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) / H. Ritchie, L.C. Lawrie, M.W. Mosesson, N.A. Booth // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2006. - V. 936, № 1. - P. 215–218.
164. Roche, M. The antioxidant properties of serum albumin / M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon // *FEBS Lett.* - 2008. - V. 582, № 13. - P. 1783–1787.
165. Rodeghiero F. Clinical pharmacokinetics of a placenta-derived factor XIII concentrate in type I and type II factor XIII deficiency / F. Rodeghiero, A. Toso, E. Di Bona, G. Castaman // *Am. J. Hematol.* - 1991. - V. 36, № 1. - P. 30–34.
166. Rosenfeld, M. A. Ozone-induced oxidative modification of plasma fibrin-stabilizing factor / M.A. Rosenfeld, A.V. Bychkova, A.N. Shchegolikhin, V.B. Leonova, M.I. Biryukova, E.A. Kostanova // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* - 2013. - V. 1834, № 12. - P. 2470–2479.
167. Rosenfeld, M.A. Ozone-induced oxidative modification of fibrinogen: role of the D regions / M.A. Rosenfeld, A.N. Shchegolikhin, A.V. Bychkova, V.B. Leonova, M.I. Biryukova, E.A. Kostanova // *Free Radic. Biol. Med.* - 2014. - V. 77, № 1. - P. 106–120.

168. 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.

169. Sabo, T.M. Perturbations in factor XIII resulting from activation and inhibition examined by solution based methods and detected by MALDI-TOF MS / T.M. Sabo, P.B. Brasher, M.C. Maurer // *Biochemistry.* - 2007. - V. 46, № 35. - P. 10089–10101.

170. Saito, M. A familial factor XIII subunit B deficiency / M. Saito, H. Asakura, T. Yoshida, K. Ito, K. Okafuji, T. Matsuda // *Br. J. Haematol.* - 1990. - V. 74, № 3. - P. 290–294.

171. Sane, D.C. Vitronectin is a substrate for transglutaminases / D.C. Sane, T.L. Moser, A.M. Pippen, C.J. Parker, K.E. Achyuthan, C.S. Greenberg // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1988. - V. 157, № 1. - P. 115–120.

172. Schroeder, V. Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form / V. Schroeder, J.-M. Vuissoz, A. Caflisch, H. Kohler // *Thromb. Haemost.* - 2007. - V. 97, № 6. - P. 890–898.

173. Schroeder, V. Factor XIII: structure and function / V. Schroeder, H. Kohler // *Semin. Thromb. Hemost.* - 2016. - V. 42, № 4. - P. 422–428.

174. Schwartz, M.L. The subunit structures of human plasma and platelet factor XIII (fibrin-stabilizing factor) / M.L. Schwartz, S.V. Pizzo, R.L. Hill, P.A. McKee // *J. Biol. Chem.* - 1971. - V. 246, № 18. - P. 5851–5854.

175. Shah D.D. Effect of photo-degradation on the structure, stability, aggregation, and function of an IgG1 monoclonal antibody / D.D. Shah; J. Zhang; H. Maity; K.M.G. Mallela // *Int. J. Pharm.* - 2018. - V. 547, № 1–2. - P. 438–449.

176. Shao, B. Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I / B. Shao, M.N. Oda, C. Bergt, X. Fu, P.S. Green, N. Brot, J.F. Oram, J.W. Heinecke // *J. Biol. Chem.* - 2006. - V. 281, № 14. - P. 9001–9004.

177. Shao, B. Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I / B. Shao, G. Cavigliolo, N. Brot, M.N. Oda, J.W. Heinecke // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - V. 105, № 34. - P. 12224–12229.

178. Sharma, V.K. Oxidation of Amino Acids, Peptides and Proteins by Ozone: A Review / V.K. Sharma, N.J.D. Graham / *Ozone Sci. Eng.* - 2010. - V. 32, № 2. - P. 81–90.

179. Shechter, Y. Selective oxidation of methionine residues in proteins / Y. Shechter, Y. Burstein, A. Patchornik / *Biochemistry.* - 1975. - V. 14, № 20. - P. 4497–4503.

180. Siddiqui, T. Insight into the interactions of proteinase inhibitor- alpha-2-macroglobulin with hypochlorite / T. Siddiqui, M.K. Zia, S.S. Ali, H. Ahsan, F.H. Khan // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 117. - P. 401–496.

181. Silva, A.M.N. Post-translational modifications and mass spectrometry detection / A.M.N. Silva, R. Vitorino, M.R.M. Domingues, C.M. Spickett, P. Domingues // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. - V. 65. - P. 925–941.

182. Silva, A.M.N. Influence of non-enzymatic post-translation modifications on the ability of human serum albumin to bind iron. Implications for non-transferrin-bound iron speciation / A.M.N. Silva, R.C. Hider / *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* - 2009. - V. 1794, № 10. - P. 1449–1458.

183. Singh, S. Disruption of structural disulfides of coagulation FXIII B subunit; functional implications for a rare bleeding disorder / S. Singh, M.S. Akhter, J. Dodt, A. Sharma, S. Kaniyappan, H. Yadegari, V. Ivaskevicius, J. Oldenburg, A. Biswas // *Int. J. Mol. Sci.* - 2019. - V. 1956, № 4. - P. 1–17.

184. Singh, S. The plasma factor XIII heterotetrameric complex structure: Unexpected unequal pairing within a symmetric complex / S. Singh, A. Nazabal, S. Kaniyappan, J. L. Pellequer, A.S. Wolberg, D. Imhof, J. Oldenburg, A. Biswas // *Biomolecules.* - 2019. - V. 9, № 12. - P. 765.

185. Skorstengaard, K. Sequence location of a putative transglutaminase cross-linking site in human vitronectin / K. Skorstengaard, T. Halkier, P. Hojrup, D. Mosher // *FEBS Lett.* - 1990. - V. 262, № 2. - P. 269–274.

186. Sobel, J.H. Identification of the  $\alpha$  chain lysine donor sites involved in factor XIIIa fibrin cross-linking / J.H. Sobel, M.A. Gawinowicz // *J. Biol. Chem.* - 1996. - V. 271, № 32. - P. 19288–19297.

187. Souri, M. Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly / M. Souri, H. Kaetsu, A. Ichinose // *Biochemistry.* - 2008. - V. 47, № 33. - P. 8656–8664.

188. Souri, M. The non-catalytic B subunit of coagulation factor XIII accelerates fibrin cross-linking / M. Souri, T. Osaki, A. Ichinose // *J. Biol. Chem.* - 2015. - V. 290, № 19. - P. 12027–12039.

189. Spalteholz, H. Formation of reactive halide species by myeloperoxidase and eosinophil peroxidase / H. Spalteholz, O.M. Panasenko, J. Arnhold // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2006. - V. 445, № 2. - P. 225–234.

190. Spraggon, G. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin / G. Spraggon, S.J. Everse, R.F. Doolittle // *Nature.* - 1997. - V. 389, № 6650. - P. 455–462.

191. Sroussi, H.Y. Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro / H.Y. Sroussi, J. Berline, J.M. Palefsky // *J. Leukoc. Biol.* - 2007. - V. 81, № 3. - P. 818–824.

192. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging / E.R. Stadtman // *Free Radic. Res.* - 2006. - V. 40, № 12. - P. 1250–1258.

193. Stadtman, E.R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2000. - V. 899. - P. 191–208.

194. Stadtman, E.R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Amino Acids.* - 2003. - V. 25, № 3–4. - P. 207–218.

195. Stief, T.W. Effect of oxidants on proteases of the fibrinolytic system: Possible role for methionine residues in the interaction between tissue type plasminogen activator and fibrin / T.W. Stief, E. Mart'ın, J. Jimenez, J. Dig'on, J.M. Rodriguez // *Thromb. Res.* - 1991. - V. 61, № 3. - P. 191–200.

196. Stief, T.W. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood / T.W. Stief, J. Kurz, M.O. Doss, J. Fareed // *Thromb. Res.* - 2000. - V. 97, № 6. - P. 473–480.

197. Stief, T.W. Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor / T.W. Stief, A. Aab, N. Heimburger // *Thromb. Res.* - 1988. - V. 49, № 6. - P. 581–589.

198. Strandberg, L. The oxidative inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 results from a conformational change in the molecule and does not require the involvement of the P1' methionine / L. Strandberg, D.A. Lawrence, L.B. Johansson, T. Ny // *J. Biol. Chem.* - 1991. - V. 266, № 21. - P. 13852–13858.

199. Sumandea, M.P. Redox signaling and cardiac sarcomeres / M.P. Sumandea, S.F. Steinberg // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286, № 12. - P. 9921–9927.

200. Svendsen, L. Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes / L. Svendsen, B. Blombäck, M. Blombäck, P.I. Olsson // *Thromb. Res.* - 1972. - V. 1, № 3. - P. 267–278.

201. Takahashi, N. Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta / N. Takahashi, Y. Takahashi, F.W. Putnam // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1986. - V. 83, № 21. - P. 8019–8023.

202. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* - 2000. - V. 279, № 6. - P. L1005–L1028.

203. Tian L. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging / L. Tian, Q. Cai, H. Wei // *Free Radic. Biol. Med.* - 1998. - V. 24, № 9. - P. 1477–84.

204. Turner, B.T. Mapping of factor XIII solvent accessibility as a function of activation state using chemical modification methods / B.T. Turner, T.M. Sabo, D. Wilding, M.C. Maurer // *Biochemistry.* - 2004. - V. 43, № 30. - P. 9755–65.

205. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens // *J. Physiol.* - 2003. - V. 552, № 2. - P. 335–344.

206. Valnickova, Z. Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases / Z. Valnickova, J.J. Enghild // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273, № 42. - P. 27220–27224.

207. 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.

208. 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.

209. Verrastro, I. Mass spectrometry-based methods for identifying oxidized proteins in disease: advances and challenges / I. Verrastro, P.S. Jensen, A.R. Pitt, C.M. Spickett // *Biomolecules.* - 2015. - V. 5, № 2. - P. 378–411.

210. Villamena, F.A. Reactive Species Detection in Biology / F.A. Villamena // *Chemistry of Reactive Species.* Amsterdam: Elsevier. - 2017. - 510 p.

211. Wang, P. Thioredoxin and thioredoxin reductase control tissue factor activity by thiol redox-dependent mechanism / P. Wang, Y. Wu, X. Li, X. Ma, L. Zhong // *J. Biol. Chem.* - 2013. - V. 288, № 5. - P. 3346–3358.

212. Wang, Y. Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: an oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation / Y. Wang, J. Chen, M. Ling, J.A. L'opez, D.W. Chung, X. Fu // *J. Biol. Chem.* - 2015. - V. 290, № 3. - P. 1422–1431.

213. Webb, G.C. Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus / G.C. Webb, M. Coggan, A. Ichinose, P.G. Board // *Hum. Genet.* - 1989. - V. 81, № 2. - P. 157–160.

214. 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 // *Biophys. J.* - 2012. - V. 103, № 11. - P. 2399–2407.

215. Weisberg, L.J. Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain / L.J. Weisberg, D.T. Shiu, P.R. Conkling, M.A. Shuman // *Blood.* - 1987. - V. 70, № 2. - P. 579–582.

216. Weisel, J.W. Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments / J.W. Weisel, C.W. Francis, C. Nagaswami, V.J. Marder // *J. Biol. Chem.* - 1993. - V. 268, № 35. - P. 26618–24.

217. Weiss, M.S. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function / M.S. Weiss, H.J. Metzner, R. Hilgenfeld // *FEBS Lett.* - 1998. - V. 423, № 3. - P. 291–296.

218. Wells-Knecht, M.C. Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes - Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes / M.C. Wells-Knecht, T.J. Lyons, D.R. McCance, S.R. Thorpe, J.W. Baynes // *J. Clin. Invest.* - 1997. - V. 100, № 4. - P. 839–846.

219. 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 Radic. Biol. Med.* - 2016. - V. 96. - P. 181–189.

220. Whiteside, C. Role of oxyradicals in the inactivation of catalase by ozone / C. Whiteside, H.M. Hassan // *Free Radic. Biol. Med.* - 1988. - V. 5, № 1. - P. 305–312.

221. Winterbourn, C.C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite / C.C. Winterbourn // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 1985. - V. 840, № 2. - P. 204–210.

222. Winterbourn, C.C. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid / C.C. Winterbourn, A.J. Kettle // *Free Radic. Biol. Med.* - 2000. - V. 29. - P. 403–409.
223. Wood, M.J. NMR Structures reveal how oxidation inactivates thrombomodulin / M.J. Wood, L.A. Becvar, J.H. Prieto, G. Melacini, E.A. Komives // *Biochemistry.* - 2003. - V. 42, № 41. - P. 11932–11942.
224. Woods, A.A. Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques / A.A. Woods, S.M. Linton, M.J. Davies // *Biochem. J.* - 2003. - V. 370. - P. 729–735.
225. Xie, Z.Z. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis / Z.Z. Xie, Y. Liu, J.S. Bian // *Oxid. Med. Cell. Longev.* - 2016. - V. 2016. - P. 6043038.
226. Yan, L.J. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase / L.J. Yan, R.L. Levine, R.S. Sohal // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - V. 94, № 21. - P. 11168–11172.
227. Yan, L.J. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging / L.J. Yan, R.S. Sohal // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1998. - V. 95, № 22. - P. 12986–12901.
228. Yee, V.C. Structure and function studies of factor XIIIa by X-ray crystallography / V.C. Yee, I. Le Trong, P.D. Bishop, L.C. Pedersen, R.E. Stenkamp, D.C. Teller // *Semin. Thromb. Hemost.* - 1996. - V. 22, № 5. - P. 377–384.
229. Yee, V.C. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII / V.C. Yee, , L.C. Pedersen, I. Le Trong, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, D.C. Teller // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1994. - V. 91, № 15. - P. 7296–7300.
230. Yorifuji, H. B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B / H. Yorifuji, K. Anderson, G.W. Lynch, L. van de Water, J. McDonagh // *Blood.* - 1988. - V. 72, № 5. - P. 1645–1650.
231. 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 // *Mol. Cell. Proteomics.* - 2012. - V. 11, № 4. - P. M111.010587.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**CID** – фрагментация, индуцированная соударением

**CAT** – каталаза

**DTT** – дитиотреитол

**EDTA** - этилендиаминтетрауксусная кислота

**GSH** – глутатион

**GSSG** – глутатион дисульфид

**GPx** – глутатионпероксидаза

**GR** – глутатионредуктаза

**FDR** – уровень допустимого ложного обнаружения

**FXIII** – коагуляционный фактор свертывания крови XIII

**HEPES** – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота

**HPLC** – высокоэффективная жидкостная хроматография

**HSA** – человеческий сывороточный альбумин

**MSR** – метионинсульфоксидредуктаза

**NADPH** – никотинамидадениннуклеотидфосфат

**NOX** - никотинамидадениннуклеотидфосфат оксидаза

**PDB** – банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот

**PTM** – посттрансляционные модификации

**SOD** – супероксиддисмутаза

**UNIMOD** – банк данных посттрансляционных модификаций белков

**XO** – ксантинооксидаза

**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

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(Рекомендуемое)

Таблица П.1. Общий перечень пептидов с окислительными модификациями аминокислотных остатков наблюдающийся при исследовании методом ВЭЖХ-МС/МС образцов FXIII на разных стадиях активации обработанных и не обработанных озоном. Показаны различные модификации конкретных аминокислотных остатков, характеризующихся определенной массой и общая площадь пиков для проанализированных пептидов.

Peptide	PTM	Start	End	-10lgP	Mass	Length	m/z	z	RT	Scan	Total peak area for samples:					
											FXIII	FXIII_ox	FXIII+Ca <sup>2+</sup>	FXIII+Ca <sup>2+</sup> /T <sub>hr_ox</sub>	FXIII+Ca <sup>2+</sup> /T <sub>hr</sub>	FXIII+Ca <sup>2+</sup> /T <sub>hr_ox</sub>
RAVPPNNSNAEDDLPTVE		13	31	44.14	2007.9497	19	1004.9866	2	32.33	2704		8.4E+06	1.7E+06	5.7E+06	9.1E+06	4.8E+06
AVPPNNSNAEEDD(+21.98)LPTVE	Sodium adduct	14	31	32.5	1873.8306	18	937.9234	2	32.82	2736			3.1E+06			
AVPPNNSNAEDDLPTVE		14	31	39.8	1851.8486	18	926.9349	2	32.94	2740		1.3E+06		1.7E+06		
LQGVVPR		32	38	35.23	767.4653	7	768.476	1	29.07	2363	1.3E+07	6.2E+06	1.4E+07	1.0E+07	3.3E+06	6.1E+06
GVNLQE		39	44	23.95	658.3286	6	659.3375	1	28.63	2332	6.4E+06		1.1E+07			
FLNVTSVH		45	52	27.97	915.4814	8	458.7488	2	32.7	2721	5.2E+05		1.3E+06		8.1E+05	
FLNVTSVD(-22.03)LFK	Mutation	45	55	54.8	1281.6969	11	641.8574	2	35.8	2986		2.8E+06		3.8E+06		5.5E+05
FLNVTSVHLFK		45	55	59.3	1303.7289	11	652.8737	2	33.77	2997	1.8E+07	4.4E+06	2.1E+07	3.4E+06	1.3E+06	8.0E+05
FLNVTSVHL		45	53	32.95	1028.5654	9	515.2916	2	36.33	3053	4.9E+05		2.0E+06		6.9E+05	
FLNVTSVHLFKE		45	56	60.56	1432.7714	12	717.3959	2	35.78	3124	9.8E+06	4.4E+06	4.8E+06	8.7E+05	1.7E+07	3.1E+06
FLNVTSVN(-23.02)LFK	Mutation	45	55	49.92	1280.7129	11	641.3652	2	35.61	3160		9.7E+05		8.9E+05		
FLNVTSVN(-23.02)LFKE	Mutation	45	56	49.96	1409.7554	12	705.8875	2	37.96	3200		9.7E+05		4.1E+05		1.0E+06

FLNVTSVN(-23.02)LFK(+43.99)	Carboxylation (DKW); Mutation	45	55	30.7	1322.7186	11	662.3696	2	37.99	3205						1.4E+06
FLNVTSVN(-23.02)LFKE(+43.99)	Carboxylation (E); Mutation	45	56	31.42	1451.7612	12	726.8903	2	38.14	3225		9.9E+05		8.2E+05		
FLNVTSVD(-22.03)LFKE	Mutation	45	56	55.57	1410.7395	12	706.3783	2	37.55	3284		8.3E+06		7.7E+06		5.8E+06
FLNVTSVHLF		45	54	44.52	1175.6339	10	588.8259	2	38.55	3360	2.1E+06	1.3E+05	2.1E+06	2.7E+04	2.2E+06	
NVTSVHLFK		47	55	42.08	1043.5764	9	522.7982	2	28.79	2372	1.1E+05					
NVTSVHLFKE		47	56	36.79	1172.6189	10	587.3183	2	32.46	2697	8.8E+04					
SVHLFK		50	55	31.87	729.4174	6	365.7179	2	27.42	2226	2.4E+05		6.4E+05			
SVHLFKE		50	56	24.71	858.4599	7	430.2382	2	30.8	2542			1.5E+05		9.5E+05	
VHLFKE		51	56	28.23	771.4279	6	386.7222	2	26.98	2191					2.2E+05	
RWDTNK		57	62	25.88	818.4035	6	410.2107	2	18.79	1490			1.1E+06			
WDTNKVDHHTDKYE		58	71	39	1786.791	14	894.4056	2	28.08	2274	3.8E+04					
TNKVDHHTDKYE		60	71	38.92	1485.6848	12	743.8511	2	23.92	1923					8.7E+04	
VDHHTDKYE		63	71	28.63	1142.4993	9	572.2595	2	15.88	1177			6.0E+05			
N(+.98)NKLIVR	Deamidation (NQ)	72	78	25.76	856.513	7	429.2648	2	28.33	2365					4.1E+05	
NN(+.98)KLIVR	Deamidation (NQ)	72	78	23.97	856.513	7	429.2647	2	28.38	2379					2.5E+05	
NNK(+27.99)LIVR	Formylation	72	78	25.81	883.5239	7	442.7704	2	30.34	2484		1.7E+05		4.1E+05		
RGQSFYVQID		79	88	32.19	1211.5935	10	606.8054	2	33.9	2825	7.9E+05	6.0E+05	1.1E+06			
GQSFYVQIDFSR		80	91	48.39	1445.6938	12	723.8594	2	40.57	3281	1.2E+05		9.4E+05			
VEYVIGR		102	108	42.28	834.4599	7	418.2385	2	28.48	2368	1.4E+06		6.3E+05			
YVIGR		104	108	27.25	606.3489	5	607.3574	1	28.53	2323	4.7E+06	1.9E+06	5.8E+06			1.8E+06
YVIGRYPQE		104	112	26.28	1132.6855	9	567.3518	2	29.41	2504					1.8E+06	
NKGTIIP(+15.99)VPIVSE	Oxidation or Hydroxylation	113	125	23.58	1431.7609	13	716.8898	2	34.96	2948				3.3E+05		

NKGTYPVPIVSE		113	125	45.36	1415.7 66	13	708.8928	2	33.49	3005	6.9E+0 5	7.3E+0 5			9.1E+0 6	1.6E+0 6
NKGTY(+15.99)IPVPIVSE	Oxidation or Hydroxyla tion	113	125	40.22	1431.7 609	13	716.8907	2	34.63	3017		7.5E+0 5				3.8E+0 5
GTY(+15.99)IPVPIVSE	Oxidation or Hydroxyla tion	115	125	38.23	1189.6 23	11	1190.637 8	1	34.76	2905				2.4E+05		
GTYPVPIVSE		115	125	44.37	1173.6 281	11	1174.638 9	1	37.88	3176	4.3E+0 6	1.1E+0 6	6.8E+0 6	4.0E+05	8.1E+0 5	1.7E+0 5
GTYPVPIVSE(+21.98)	Sodium adduct	115	125	30.13	1195.6 101	11	598.8146	2	37.84	3184	5.4E+0 5		4.9E+0 5			
IPVPIVSE		118	125	31.47	852.49 56	8	853.5049	1	35.33	2955		8.4E+0 4	2.7E+0 5	2.5E+05		
LSIQSSPK		145	152	37.71	858.48 11	8	430.2496	2	25.86	2143	6.0E+0 6	7.1E+0 6	7.1E+0 6	7.3E+06	1.9E+0 6	4.1E+0 6
M(+15.99)YVAVWTPYGVLR	Oxidation (M)	160	172	45.09	1569.8 014	13	785.9118	2	34.95	2900	1.5E+0 5	1.0E+0 6		1.1E+05		
MYVAVWTPYGVLR		160	172	53.29	1553.8 064	13	777.9127	2	39.24	3298	1.5E+0 6	4.4E+0 5	2.7E+0 6	1.1E+05	8.5E+0 5	
DDAVYLDNEK		191	200	37.48	1180.5 248	10	591.2709	2	29.08	2369	7.3E+0 5		1.8E+0 6			
AVYLDNEKER		193	202	38.65	1235.6 146	10	618.816	2	27.84	2249			6.3E+0 4			
AVYLDNEKE		193	201	26.43	1079.5 134	9	540.7659	2	28.67	2326			1.4E+0 5			
EYVLND		204	209	25	751.33 88	6	752.3481	1	30.5	2500	9.6E+0 5	3.1E+0 5				
IGVIFYGE		210	217	27.96	896.46 44	8	897.4768	1	38.84	3267	2.0E+0 7	5.6E+0 6	1.2E+0 6			1.8E+0 6
SWSYGQFE		225	232	39.9	1002.4 083	8	1003.418 6	1	34.55	2896	2.6E+0 6	4.6E+0 5	3.3E+0 6	2.5E+05	1.6E+0 6	1.6E+0 5
RAQMDLSGR		245	253	42.34	1032.5 134	9	517.2654	2	27.66	2239	8.0E+0 5		2.0E+0 5			
AQM(+15.99)DLSGR	Oxidation (M)	246	253	43.82	892.40 72	8	447.2117	2	19.27	1538				1.8E+05		
AQM(+31.99)DLSGR	Dioxidatio n (M)	246	253	48.44	908.40 22	8	455.2122	2	24.04	1825				5.4E+04		
AQMDLSGR		246	253	48.37	876.41 24	8	439.2155	2	26.62	2016	5.5E+0 6	1.2E+0 5	3.8E+0 6		6.3E+0 5	
GNPIKVSR		254	261	48	869.50 83	8	870.5175	1	24.53	1713					3.0E+0 6	
GNPIK(+27.99)VSR	Formylatio n	254	261	37.38	897.50 32	8	449.7614	2	25.91	2065		2.0E+0 5		2.6E+05		9.4E+0 4
RVGSAMVNAK		261	270	40.3	1031.5 546	10	516.7859	2	26.83	2161	1.2E+0 5		5.4E+0 5			

VGSAM(+31.99)VNAK	Dioxidation (M)	262	270	52.35	907.44 33	9	454.731	2	21.94	1733		9.1E+0 4		1.6E+05		2.1E+0 4
VGSAM(+15.99)VNAK	Oxidation (M)	262	270	53.46	891.44 84	9	446.7326	2	22.84	1811	6.5E+0 5	3.4E+0 6	6.9E+0 5	5.3E+06		1.4E+0 6
VGSAM(-48.00)VNAK(+21.98)	Dethiomethyl; Sodium adduct	262	270	29.48	849.44 26	9	850.46	1	24.23	1956						6.2E+0 5
VGSAM(+15.99)VNAKDDE	Oxidation (M)	262	273	40.56	1250.5 448	12	626.2819	2	24.85	1965		7.0E+0 5				1.0E+0 5
VGSAMVNAK		262	270	55.36	875.45 35	9	438.7366	2	25.07	2064	1.1E+0 7	1.0E+0 6	1.0E+0 7	6.3E+05	1.4E+0 6	1.6E+0 5
VGSAMVNAKDDE		262	273	48.94	1234.5 499	12	618.2842	2	25.29	2068			7.2E+0 4		7.0E+0 6	
VGSAMVN(+.98)AK	Deamidation (NQ)	262	270	38.52	876.43 75	9	439.2274	2	27.3	2199	5.3E+0 4		8.5E+0 4			
SAMVNAK		264	270	27.4	719.36 36	7	720.3732	1	24.19	1927	4.2E+0 5		4.9E+0 5			
GVLVGSW(+31.99)D	Dihydroxy	274	281	30.95	863.40 25	8	864.4132	1	34.53	2895		1.8E+0 5		1.6E+05		
GVLVGSWDN		274	282	27.35	945.45 56	9	946.4665	1	34.74	2902			6.1E+0 5			
GVLVGSWD		274	281	33.42	831.41 27	8	832.4234	1	35.57	2987			3.4E+0 5			
GVLVGSWD(+21.98)NIYAYG	Sodium adduct	274	287	37.74	1534.7 068	14	768.3635	2	36.6	3093			7.9E+0 5		3.9E+0 5	
GVLVGSWDNIY		274	284	27.28	1221.6 03	11	611.8109	2	38.25	3208			4.4E+0 5			
GVLVGSWDNIYA		274	285	35.76	1292.6 401	12	647.3285	2	38.43	3234	3.3E+0 5		1.2E+0 6			
GVLVGSWDNIYAYG		274	287	30.45	1512.7 249	14	757.3721	2	39.19	3296	3.1E+0 6		2.8E+0 6		1.0E+0 6	
VPPSAWTGSVD		288	298	41.14	1114.5 294	11	1115.539 9	1	33.02	2755	1.4E+0 5		4.9E+0 5			
VPPSAWTGSVD(+21.98)ILLE	Sodium adduct	288	302	40.88	1604.8 062	15	803.4141	2	38	3101	6.1E+0 6		3.3E+0 6			
VPPSAWTGSVDILLE(+21.98)	Sodium adduct	288	302	36.54	1604.8 062	15	803.4141	2	38.61	3150	6.8E+0 6					
VPPSAWTGSVDILLE		288	302	36.32	1582.8 242	15	792.4226	2	50.85	4186	2.1E+0 7		2.2E+0 7		4.9E+0 6	
YRSSENPVR		303	311	51.26	1106.5 469	9	554.2822	2	23.3	1939					8.7E+0 4	
SSENPVR		305	311	40.7	787.38 24	7	394.7007	2	17.25	1360			2.0E+0 5			
VFAGVFNTFLR		317	327	39.28	1269.6 87	11	635.8556	2	38.41	3080		1.1E+0 5	1.2E+0 5	1.2E+05		
AGVFNTFLR		319	327	36.6	1023.5 501	9	512.7854	2	33.44	2810	1.3E+0 5	1.2E+0 5		2.7E+05		

<b>GVFNTFLR</b>		320	327	36.29	952.51 3	8	477.2661	2	33.75	2753				1.1E+05		9.6E+0 4
<b>C(+47.98)LGIPAR</b>	<b>Cysteine oxidation to cysteic acid</b>	328	334	33.82	776.38 51	7	389.2024	2	28.98	2412		1.1E+0 7				6.8E+0 6
<b>IVTNYFSAHDND</b>		335	346	53.05	1394.6 102	12	698.315	2	29.77	2445			2.7E+0 5			
<b>IVTNYFSAHDNDANLQM(+15.99)D</b>	<b>Oxidation (M)</b>	335	352	52.95	2082.8 953	18	1042.459 8	2	33.08	2757		8.8E+0 5		4.2E+05		
<b>IVTNYFSAHDNDANLQMD(+15.99)</b>	<b>Oxidation or Hydroxylation</b>	335	352	61.49	2082.8 953	18	1042.461 2	2	32.69	2825		9.2E+0 5	3.8E+0 5	4.1E+05		3.2E+0 5
<b>IVTNYFSAHDNDANLQMD</b>		335	352	47.29	2066.9 004	18	1034.461 8	2	34.32	2865	1.7E+0 6	8.8E+0 5	5.3E+0 6	2.6E+05	1.0E+0 6	
<b>IVTNYFSAHDNDANLQM</b>		335	351	38.39	1951.8 734	17	976.9482	2	34.97	2933			3.5E+0 5			
<b>IVTNYFSAHDNDANLQM(+15.99)DIFLEE</b>	<b>Oxidation (M)</b>	335	357	31.63	2714.2 17	23	1358.126	2	37.95	3199		3.1E+0 5				
<b>IFLEEDGNVN(+.98)SK(-.98)</b>	<b>Deamidation (NQ); Amidation</b>	353	364	42.29	1363.6 619	12	682.8434	2	29.22	2410	3.4E+0 5					
<b>IFLEEDGNVNSK</b>		353	364	30.58	1363.6 619	12	682.8398	2	32.2	2670	2.9E+0 5					
<b>AWM(+15.99)TRPDLVPG</b>	<b>Oxidation (M)</b>	379	389	27.34	1257.6 176	11	629.8184	2	31.15	2563	1.3E+0 6		2.6E+0 5		3.9E+0 5	
<b>AWMTRPDLVPG</b>		379	389	34.88	1241.6 227	11	621.8211	2	32.45	2750	9.2E+0 6		5.5E+0 6		3.9E+0 6	
<b>AWMTRPDLP</b>		379	387	24.08	1085.5 328	9	543.7753	2	34.27	2967					1.8E+0 5	
<b>AWM(+15.99)TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DG MYR</b>	<b>Oxidation (M)</b>	379	409	53.52	3483.5 613	31	1162.200 3	3	37.32	3138	2.2E+0 6		3.2E+0 6			
<b>AWMTR(+15.99)PDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DG MYR</b>	<b>Oxidation or Hydroxylation</b>	379	409	47.05	3483.5 613	31	1162.203 1	3	37.47	3159		1.0E+0 6				
<b>AWMTRPDLVPGFG</b>		379	391								1.1E+0 6		1.7E+0 6		6.5E+0 5	
<b>AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DGMYR</b>		379	409	59.24	3467.5 662	31	1156.865 5	3	37.91	3181	4.3E+0 6	2.8E+0 5	9.7E+0 6		1.8E+0 6	
<b>AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENS DG M(+15.99)YR</b>	<b>Oxidation (M)</b>	379	409	55.01	3483.5 613	31	1162.198	3	37.96	3183	1.7E+0 6		2.7E+0 6	8.4E+04		

AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENSDGMYR(+15.99)	Oxidation or Hydroxylation	379	409	38.84	3483.5613	31	1162.199	3	37.86	3184			3.2E+06		
AWMTRPDLVPGF		379	390	37.99	1388.691	12	695.356	2	38.05	3199			4.8E+05		
AWMTRPDLVPGFGGWQ(+.98)AVDSTPQENSDGMYR	Deamidation (NQ)	379	409	24.08	1085.5328	9	543.7753	2	34.27	2967				1.3E+05	
AWMTRPDLVPGFGGWQAVD		379	397	40.22	2102.0044	19	1052.0154	2	39.39	3310			3.3E+05		1.6E+04
AWMTRPDLVPGFGGWQAVDSTPQE		379	402	50.09	2644.238	24	1323.1293	2	38.6	3370			2.7E+05		7.3E+04
TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENSDGMYR(+15.99)YR	Oxidation (M)	382	409	56.65	3095.4043	28	1032.8213	3	33.09	2677			5.5E+04		
TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQENSDGMYR		382	409	58.23	3079.4094	28	1027.4863	3	33.85	2765	6.4E+05		1.4E+06		
TRPDLVPGFGGWQAVDSTPQE		382	402	41.75	2256.0811	21	1129.0549	2	36.97	3108			1.7E+05		
FGGWQAVDSTPQENSDGMYR(+15.99)YR	Oxidation (M)	390	409	51.1	2259.949	20	1130.9852	2	33.04	2745	1.5E+06		5.8E+05		
FGGWQAVDSTPQENSD(+15.99)GMYR	Oxidation or Hydroxylation	390	409	36.01	2259.949	20	1130.9868	2	33.17	2768			7.4E+05		
FGGWQAVDSTPQENSDGMYR		390	409	54.25	2243.9541	20	1122.9889	2	33.92	2827	5.7E+06		3.8E+06		1.8E+06
FGGWQAVD		390	397	25.22	878.3922	8	879.4028	1	33.79	2922					3.1E+05
GGWQAVDSTPQENSDGMYR		391	409	52.93	2096.8857	19	1049.452	2	32.21	2682			2.3E+05		
GWQAVDSTPQENSDGMYR		392	409	47.66	2039.8643	18	1020.9413	2	32.04	2654	7.9E+05		5.1E+05		
AVDSTPQENSDGMYR		395	409	28.96	1668.705	15	835.363	2	28.82	2350			1.4E+05		
STPQENSDGMYR		398	409	45.05	1383.5725	12	692.7952	2	27.2	2189	2.8E+05		4.3E+05		
NSDGMYR		403	409	26.74	841.3389	7	842.3501	1	24.02	1912			3.4E+05		
C(+31.99)GP(+15.99)ASVQAIK	Dihydroxy ; Oxidation or Hydroxylation	410	419	43.46	1020.491	10	511.2564	2	27.9	2254				1.0E+05	

C(+47.98)GPASVQAIK	Cysteine oxidation to cysteic acid	410	419	44.61	1020.491	10	1021.5054	1	28.12	2335		3.7E+05		6.6E+05		
FQFDAPFVFAE		425	435	23.12	1316.6077	11	659.3129	2	39.18	3195			3.0E+04			
APFVFAE		429	435	29.58	779.3854	7	780.3954	1	36.21	3048	5.7E+06	8.8E+06	7.3E+06	8.2E+06	3.6E+06	5.7E+06
VNSDLIY(+15.99)ITAK	Oxidation or Hydroxylation	436	446	45.41	1251.671	11	626.8448	2	30.92	2585		1.9E+06		2.4E+06		
VNSDLIYITAK		436	446	52.63	1235.6761	11	618.8473	2	31.74	2804	1.7E+07	2.3E+06	9.7E+06	1.0E+06	2.8E+06	9.5E+05
VN(+.98)SDLIYITAK	Deamidation (NQ)	436	446	41.54	1236.6602	11	619.3372	2	34.43	2874	3.4E+05		1.1E+04			
LIYITAK		440	446	31.61	820.5058	7	821.5135	1	32.22	2672	4.2E+06		7.3E+06	1.5E+06	2.6E+06	
NVDATHIGK		455	463	48.46	953.493	9	477.7551	2	24.16	1911	1.5E+07	2.4E+06	1.3E+07	1.1E+06	5.9E+06	7.4E+05
NVDATN(-23.02)IGK	Mutation	455	463	45.08	930.4771	9	466.2472	2	25.1	1971		5.2E+05		6.3E+05		
NVDATD(-22.03)IGK	Mutation	455	463	45.49	931.4611	9	466.739	2	25.51	2057		1.1E+06		1.7E+06		7.1E+05
NVD(+21.98)ATHIGK	Sodium adduct	455	463	29.08	975.475	9	488.7462	2	27.14	2184	9.4E+04					
NVDATN(-23.02)IGK(+27.99)LIVTK	Formylation; Mutation	455	468	27.38	1512.8511	14	757.4338	2	35.68	3011				9.3E+04		
NVDATD(-22.03)IGK(+27.99)LIVTK	Formylation; Mutation	455	468	28.41	1466.798	14	734.4077	2	39.22	3310				1.8E+05		
VDATHIGK		456	463	40.81	839.4501	8	420.7334	2	26.67	2146	3.1E+04					
ATHIGK		458	463	27.73	625.3547	6	313.6855	2	13.69	1078			8.4E+05			
KQIGGDGMMDITDTYK		468	483	54.63	1771.812	16	886.918	2	33.2	2760	1.6E+05		5.3E+05			
QIGGDGM(+31.99)MDITDTYK	Dioxidation (M)	469	483	44.64	1675.7069	15	838.8656	2	27.8	2281	1.1E+06	8.3E+05	4.3E+05	4.3E+05		
QIGGDGMM(+31.99)DITDTYK	Dioxidation (M)	469	483	44.26	1675.7069	15	838.8642	2	27.99	2288			5.2E+05	6.2E+05		
QIGGDGM(+15.99)MDITDTYK	Oxidation (M)	469	483	45.77	1659.712	15	830.8708	2	30.62	2489	8.5E+05	8.4E+05	3.3E+06	6.1E+05	1.1E+06	
QIGGDGMMDITDTYK		469	483	57.3	1643.717	15	822.8737	2	31.72	2629	1.8E+07	4.0E+05	1.1E+07		2.7E+06	
QIGGDGMM(+15.99)DITDTYK	Oxidation (M)	469	483	33.05	1659.712	15	830.8662	2	32.99	2741	5.2E+06				9.8E+05	

QIGGDGMMD(+15.99)ITDTYK	Oxidation or Hydroxyla tion	469	483	24.57	1659.7 12	15	830.8618	2	33.69	F1:2812	5.2E+0 6						
ITDTYK		478	483	31.12	739.37 52	6	370.6961	2	23.31	1778			3.6E+0 5			7.0E+0 4	
TYKFQE		481	486	31.94	814.38 61	6	815.3947	1	28.58	2391						1.1E+0 6	
TALM(+15.99)YGAK	Oxidation (M)	497	504	36.25	869.43 17	8	435.7241	2	28.06	2260		1.8E+0 6		9.4E+05			7.7E+0 5
TALMYGAK		497	504	31.71	853.43 68	8	427.7267	2	29.92	2441		7.3E+0 5		2.3E+05			
AKKPLNTE		503	510	34.95	899.50 76	8	450.7626	2	22.51	1789	2.6E+0 6		3.9E+0 6			5.2E+0 6	
KPLNTE		505	510	26.96	700.37 55	6	701.3859	1	21.94	1755		1.6E+0 6	9.1E+0 5	1.4E+06			1.2E+0 6
SRSNVDMDFE		515	524	33.62	1198.4 924	10	600.2554	2	31.05	2661						1.5E+0 6	
SNVDMDFE		517	524	30.47	955.35 93	8	956.3702	1	32.69	2718	3.8E+0 6	6.2E+0 5	3.3E+0 6	2.5E+05		1.8E+0 6	
NAVLGK		527	532	33.22	600.35 95	6	301.1877	2	22.14	1682	8.6E+0 6	4.2E+0 6	7.5E+0 6	4.6E+06		1.1E+0 6	
NAVLGKDFK		527	535	40.42	990.54 98	9	496.284	2	26.35	2198						8.0E+0 5	
NAVLGKDFKLSITFR		527	541	30.59	1707.9 672	15	570.3307	3	66.46	5534				1.4E+03			
LSITFR		536	541	35.71	735.42 79	6	368.723	2	30.63	2535	3.5E+0 6		3.4E+0 6	2.4E+06		6.5E+0 5	1.0E+0 6
LSANITFYTGVPK		554	566	46.33	1409.7 554	13	705.89	2	32.83	2688	2.4E+0 6		3.1E+0 6				
ANITFYTGVPK		556	566	27.71	1209.6 394	11	605.8281	2	33.66	2804			1.0E+0 5				
ITFYTGVPK		558	566	27.57	1024.5 593	9	513.288	2	33.29	2769	6.4E+0 5		6.8E+0 5				
ETFDVTLEPLSFK		572	584	51.55	1524.7 711	13	763.3973	2	36.43	2964	1.9E+0 6		1.0E+0 6				
ETFDVTLEPLSFKK		572	585	32.97	1652.8 661	14	827.4412	2	36.57	3065	2.7E+0 5						
TFDVTLEPLSFKK		573	585	57.76	1523.8 235	13	762.9213	2	33.51	2816	2.2E+0 6						3.3E+0 5
TFDVTLE		573	579	27.45	823.39 64	7	824.4067	1	34.79	2936	1.6E+0 6		2.9E+0 6	2.3E+06			
TFDVTLEPLSFKKE		573	586	47.96	1652.8 661	14	827.4404	2	35.88	3120		2.1E+0 5				1.7E+0 7	1.3E+0 6
TFDVTLEPLSFK		573	584	57.54	1395.7 285	12	698.8732	2	37.62	3290	5.5E+0 7	1.7E+0 7	2.1E+0 7	1.5E+07		9.7E+0 6	5.0E+0 6
VTLEPLSFKKE		576	586	38.54	1289.7 23	11	645.8707	2	33.13	2857						1.0E+0 6	1.7E+0 5
VTLEPLSFK		576	584	41.01	1032.5 854	9	517.3015	2	35.48	2969	1.5E+0 6	1.7E+0 6	2.6E+0 6	1.6E+06		4.6E+0 5	7.1E+0 5
PLSFKKE		580	586	30.62	847.48 03	7	424.7484	2	27.85	2316						1.0E+0 6	

EAVLIQAGE		586	594	35.25	928.48 65	9	929.4962	1	32.41	2691	1.1E+0 6		3.4E+0 5			
EAVLIQAGEYMGQLE		586	601	44.01	1762.8 811	16	882.4515	2	41.26	3449	7.8E+0 5		3.7E+0 4			
EAVLIQAGE(+21.98)YMGQLE	Sodium adduct	586	601	47.15	1784.8 63	16	893.4418	2	41.51	3466	7.5E+0 4					
AVLIQAGE		587	594	27.43	799.44 4	8	800.452	1	31.71	2623	1.9E+0 7				1.6E+0 7	
AVLIQAGEYM(+31.99)GQLE	Dioxidatio n (M)	587	601	34.84	1665.8 284	15	833.9235	2	36.08	3047				5.8E+05		
AVLIQAGE(+21.98)Y(+15.99)M(+15.99)GQLE	Sodium adduct; Oxidation or Hydroxyla tion; Oxidation (M)	587	601	35.25	1687.8 103	15	844.9171	2	36.21	3062				1.8E+05		
AVLIQAGEYM(+15.99)GQLE	Oxidation (M)	587	601	49.68	1649.8 334	15	825.9268	2	34.84	3091	1.6E+0 5					
AVLIQAGE(+21.98)YMGQLE	Sodium adduct	587	601	38.4	1655.8 204	15	828.9207	2	40.08	3355	6.2E+0 5		6.0E+0 4			
AVLIQAGEYMGQLE		587	601	47.36	1633.8 385	15	817.9305	2	39.93	3361	4.9E+0 6	8.5E+0 4	6.5E+0 5		1.5E+0 5	
AVLIQAGEYMGQLE(+21.98)	Sodium adduct	587	601	29.66	1655.8 204	15	828.9214	2	40.22	3378	6.1E+0 5					
YMGQLE		595	601	27	852.40 52	7	853.4136	1	34.45	2876	1.5E+0 7		1.9E+0 7	7.4E+05		2.4E+0 5
QASLHFFVTAR		602	612	52.21	1275.6 724	11	638.8456	2	31.36	2581	2.5E+0 7	2.4E+0 6	1.1E+0 7	6.3E+05	2.0E+0 6	8.3E+0 4
QASLD(-22.03)FFVTAR	Mutation	602	612	51.87	1253.6 404	11	627.8288	2	33.07	2658		3.8E+0 6		4.6E+06		1.6E+0 6
QASLN(-23.02)FFVTAR	Mutation	602	612	46.31	1252.6 564	11	627.3372	2	33.92	2837		1.0E+0 6		8.8E+05		
LHFFVTAR		605	612	29.34	989.54 47	8	495.7807	2	33.85	2820	5.7E+0 4					
LD(-22.03)FFVTAR	Mutation	605	612	30.14	967.51 27	8	484.7653	2	35.39	2985				3.6E+04		
FFVTAR		607	612	32.72	739.40 17	6	370.7092	2	29.46	2412	2.3E+0 5	4.6E+0 5	7.1E+0 5	5.2E+05		2.9E+0 5
TRDVLAK		616	622	32.35	801.47 08	7	401.7439	2	22.95	1826	2.6E+0 6	2.9E+0 6	2.5E+0 6	1.7E+06	3.4E+0 6	2.5E+0 6
QKSTVLTPIE		623	632	25.83	1114.6 234	10	558.3207	2	30.84	2531					1.1E+0 6	
VRGTQVVGSDM(+15.99)TVTVQ(+.98)	Oxidation (M); Deamidati on (NQ)	637	652	39.92	1692.8 352	16	847.4287	2	66.13	5637		2.6E+0 5				2.5E+0 5

GTQVVGSDM(+15.99)TVTVQFTNPLKE	Oxidation (M)	639	659	54.87	2266.1 15	21	1134.072 4	2	33.59	2979		1.4E+0 5		4.6E+05		
GTQVVGSDMTVTVQFTNPLKE		639	659	48.19	2250.1 201	21	1126.075	2	65.74	5409	4.1E+0 5		4.8E+0 5			
GTQVVGSDMTVTVQFTNPLK		639	658	54.19	2121.0 776	20	1061.552 5	2	65.81	5418	1.3E+0 5					
FTNPLK		653	658	24.76	718.40 14	6	719.4116	1	28.27	2267			6.1E+0 5			
FTNPLKE		653	659	30.05	847.44 4	7	424.73	2	31.11	2659	5.8E+0 6	5.8E+0 6	7.9E+0 6		2.7E+0 6	3.5E+0 6
NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99)KK	Oxidation (M)	663	679	36.6	1820.9 355	16	607.9891	3	30.04	2449			1.9E+0 6			
NVWVHLDGPGVTRPMK(+15.99)K	Oxidation or Hydroxylation	663	679	36	1949.0 305	17	650.689	3	29.26	2383	1.7E+0 6			1.2E+06	1.8E+0 6	
NVWVHLDGPGVTR		663	675	48.09	1448.7 524	13	725.3915	2	31.62	2388	6.3E+0 6	2.2E+0 5	1.2E+0 7	2.9E+05		
NVWVHLDGPGVTRP(+15.99)MKK	Oxidation or Hydroxylation	663	679	34.28	1949.0 305	17	650.6888	3	29.82	2420						1.1E+0 6
NVWVHLDGPGVTRPMK(+15.99)	Oxidation or Hydroxylation	663	678	37.93	1820.9 355	16	607.9905	3	29.44	2426	2.3E+0 6					
NVWVHLDGPGVTRP(+15.99)MK	Oxidation or Hydroxylation	663	678	41.69	1820.9 355	16	607.9892	3	30.13	2443	2.7E+0 6	9.8E+0 5		7.4E+05		
NVWVHLDGPGVTRPM(+15.99)K	Oxidation (M)	663	678	36.6	1820.9 355	16	607.9891	3	30.04	2449		9.3E+0 5	2.3E+0 6	6.0E+05		
NVWVHLDGPGVTRPMKK		663	679	29.83	1933.0 356	17	645.3542	3	32.21	2768	1.3E+0 6		3.6E+0 5		3.7E+0 6	
NVWVHLDGPGVTRPMK		663	678	51.9	1804.9 407	16	903.4794	2	33.6	2798	1.1E+0 7		1.3E+0 7	5.9E+05	2.7E+0 6	
NVWVHLD		663	669	29.76	881.43 96	7	882.4484	1	34.02	2836	1.3E+0 5	4.9E+0 4	1.7E+0 5			
NVWVHLDGPGVTRPM		663	677	55.14	1676.8 457	15	839.4319	2	34.61	3002	4.0E+0 5		6.8E+0 5		1.8E+0 6	
LDGPGVTRPM(+15.99)KK	Oxidation (M)	668	679	23.25	1313.7 125	12	657.8655	2	26.79	2135		1.0E+0 5				
LDGPGVTRPM(+15.99)K	Oxidation (M)	668	678	29.78	1185.6 176	11	593.8181	2	27.43	2230				1.2E+05		
GPGVTRPM(+15.99)K	Oxidation (M)	670	678	44.5	957.50 66	9	479.762	2	22.78	1843		2.7E+0 4		4.3E+04		

<b>GPGVTRPMK</b>		670	678	49.88	941.51 17	9	471.7644	2	26.58	2133	7.6E+0 4		2.2E+0 5		1.0E+0 5	
<b>EIRPNSTVQWEE</b>		683	694	44.32	1486.7 052	12	744.3632	2	29.46	2333	6.1E+0 6	2.0E+0 5	5.4E+0 6	1.0E+05		
<b>EIRPNSTVQWE</b>		683	693	24.06	1357.6 626	11	679.8392	2	32.24	2675	3.5E+0 5					
<b>IRPNSTVQW(+31.99)E</b>	<b>Dihydroxy</b>	684	693	39.41	1260.6 099	10	631.3143	2	27.74	2221		6.2E+0 5		5.3E+05		4.2E+0 6
<b>IRPNSTVQWEE</b>		684	694	44.47	1357.6 626	11	679.8422	2	28.59	2312	8.6E+0 6	4.1E+0 6	1.1E+0 7	2.2E+06	8.7E+0 6	1.7E+0 6
<b>IRPNSTVQW(+31.99)EE</b>	<b>Dihydroxy</b>	684	694	44.68	1389.6 525	11	695.8351	2	28.43	2364		1.1E+0 7	1.7E+0 5	1.1E+07		7.1E+0 6
<b>IRPNSTVQW(+3.99)EE</b>	<b>Tryptophan oxidation to kynurenin</b>	684	694	39.06	1361.6 575	11	681.8386	2	29.77	2426		8.3E+0 5		7.4E+05		5.7E+0 5
<b>IRPN(+.98)STVQWEE</b>	<b>Deamidation (NQ)</b>	684	694	40.3	1358.6 466	11	680.332	2	31.73	2635		4.7E+0 5	9.9E+0 4			
<b>IRPNSTVQWE</b>		684	693	39.26	1228.6 2	10	615.3196	2	31.01	2650	4.0E+0 5	2.2E+0 5	3.8E+0 5	7.8E+04	4.5E+0 5	
<b>VCRP(+31.99)W(+47.98)VSGD(-22.03)R</b>	<b>Dihydroxy ; Trioxidation (W); Mutation</b>	695	704	25.91	1253.5 458	10	627.7817	2	28.53	2334		1.9E+0 6		3.1E+06		1.9E+0 6
<b>VCRP(+31.99)WVSGHR</b>	<b>Dihydroxy</b>	695	704	23.86	1227.5 931	10	410.2061	3	28.92	2343		6.8E+0 4				
<b>VC(+47.98)RPWVSGHR</b>	<b>Cysteine oxidation to cysteic acid</b>	695	704	32.06	1243.5 88	10	622.804	2	28.99	2350		2.5E+0 5		7.8E+04		
<b>PWVSGHR</b>		698	704	36.73	837.42 46	7	419.7227	2	25.18	1913	4.4E+0 4		1.0E+0 5			
<b>KLIASM(+15.99)SSDSLRL</b>	<b>Oxidation (M)</b>	705	716	55.19	1322.6 864	12	662.3575	2	26.92	2040	1.9E+0 5	2.6E+0 6		1.7E+06	2.5E+0 5	2.8E+0 6
<b>KLIASMSSDSLRL</b>		705	716	59.47	1306.6 914	12	654.3583	2	29.36	2221	4.1E+0 6	8.5E+0 5	3.5E+0 6	1.0E+05	6.2E+0 6	
<b>LIASM(+15.99)SSD</b>	<b>Oxidation (M)</b>	706	713	32.9	838.37 42	8	839.386	1	24.7	1935		2.6E+0 5		4.0E+05		
<b>LIASM(+31.99)SSDSLRL</b>	<b>Dioxidation (M)</b>	706	716	51.29	1210.5 863	11	606.3047	2	27.19	2173		2.1E+0 5		2.9E+05		
<b>LIASM(+15.99)SSDSLRL</b>	<b>Oxidation (M)</b>	706	716	42.88	1194.5 914	11	598.3058	2	26.86	2181	1.8E+0 6	1.0E+0 7	2.0E+0 6	6.1E+06	4.0E+0 5	7.9E+0 6
<b>LIASMSSDSLRL</b>		706	716	52.03	1178.5 966	11	590.3097	2	30.03	2438	1.1E+0 7	2.3E+0 6	2.1E+0 7	9.5E+05	4.1E+0 6	6.8E+0 5
<b>LIASMSSD</b>		706	713	34.92	822.37 93	8	823.3881	1	30.38	2491	1.5E+0 6	7.4E+0 4	2.1E+0 6			
<b>SMSSDSLRL</b>		709	716	34.56	881.39 13	8	441.7036	2	25.61	2040			3.9E+0 4			

<b>HVYGE</b>		717	721	34.05	603.26 53	5	604.274	1	21.1	1595	2.2E+0 6	6.1E+0 5	3.9E+0 6		1.7E+0 6	
<b>HVYGELD</b>		717	723	29.96	831.37 63	7	832.3856	1	29.98	2452	4.0E+0 4					
<b>LDVQQR</b>		722	728	38	870.49 23	7	436.2545	2	29.79	2525	7.2E+0 6	5.8E+0 6	9.1E+0 6	6.1E+06	3.7E+0 6	3.5E+0 6