

УДК 577.322.75

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ФИБРИНОГЕНА В РЕЗУЛЬТАТЕ ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ

© 2020 г. Л. В. Юрина^{1,*}, А. Д. Васильева¹, В. Л. Кононенко¹, А. Е. Бугрова¹, М. И. Индейкина^{1,3}, А. С. Кононихин², член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев⁴, М. А. Розенфельд¹

Поступило 11.02.2020 г.
После доработки 11.02.2020 г.
Принято к публикации 11.02.2020 г.

Исследовано влияние пероксид-индуцированного окисления фибриногена на модификацию его первичной структуры и функциональных свойств. Показано, что сайтами окисления являются остатки Met, Trp и His. Методом ДРС установлено, что окислительная модификация фибриногена вызывает изменение микрореологических характеристик фибриновой сетки. Окисление фибриногена обуславливает снижение его толерантности к плазминовому гидролизу и нарушает способность фактора XIIIa к стабилизации фибринового геля.

Ключевые слова: фибриноген, фибриновый гель, окисление, ВЭЖХ-МС/МС, окислительные сайты, микрореология, электрофорез

DOI: 10.31857/S2686738920020298

Фибриноген (ФГ) является одним из белков плазмы крови, наиболее подверженных окислительной модификации. ФГ играет важную роль в процессе свертывания крови, фибринолизе, клеточных и матричных взаимодействиях, воспалительных процессах, заживлении ран и неоплазии.

Окисление ФГ повреждает его структуру, а также влияет на функцию белка. Известно, что окислительная модификация молекул ФГ человека вызывает изменение процесса самосборки фибрина, что в конечном итоге приводит к аномальным сгусткам. Они характеризуются тонкими индивидуальными фибриновыми фибриллами, малой пористостью и низкой проницаемостью, то есть считается, что окисление влияет на самосборку фибрина преимущественно за счет ингибирования латеральной ассоциации протофибрилл [1].

Ранее нами были исследованы окислительные модификации молекулы при её озон- и гипохлорит-индуцированном окислении [2, 3]. Полученные данные демонстрировали возможность структуры ФГ сохранять функционально важные аминокислотные остатки при окислении, что является следствием, как мы полагаем, большого количества остатков метионинов, рассматриваемых в белках, как перехватчики АФК [4]. Это позволило нам сделать вывод о том, что структура ФГ адаптирована к действию АФК. Чтобы получить дополнительные доказательства этой гипотезы, в данной работе, исследовалась окислительная модификация ФГ под действием перекиси водорода (H₂O₂), являющейся одним из важнейших окислителей, вырабатывающихся в организме человека.

ФГ был выделен из цитратной плазмы крови доноров методом глицинового осаждения [5]. Окисление ФГ индуцировали раствором H₂O₂ (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 150, 300, 600 и 1000 мкМ. После окисления ФГ проводили электрофорез восстановленных образцов белка, а также его ковалентношитых полипептидных цепей под действием активированного коагуляционного фактора XIII (FXIIIa). Окислительные повреждения молекулы ФГ также оценивались по изменению накопления продуктов деградации плазминового гидролиза [6].

Окислительные сайты выявляли с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа (ВЭЖХ-МС/МС) на системе, состоящей из

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

² ФИЦ ИХФ им. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (государственный университет)”, Москва, Россия

⁴ АНОО ВПО “Сколковский институт науки и технологий”, Сколково, Московская обл., Россия

*e-mail: lyu.yurina@gmail.com

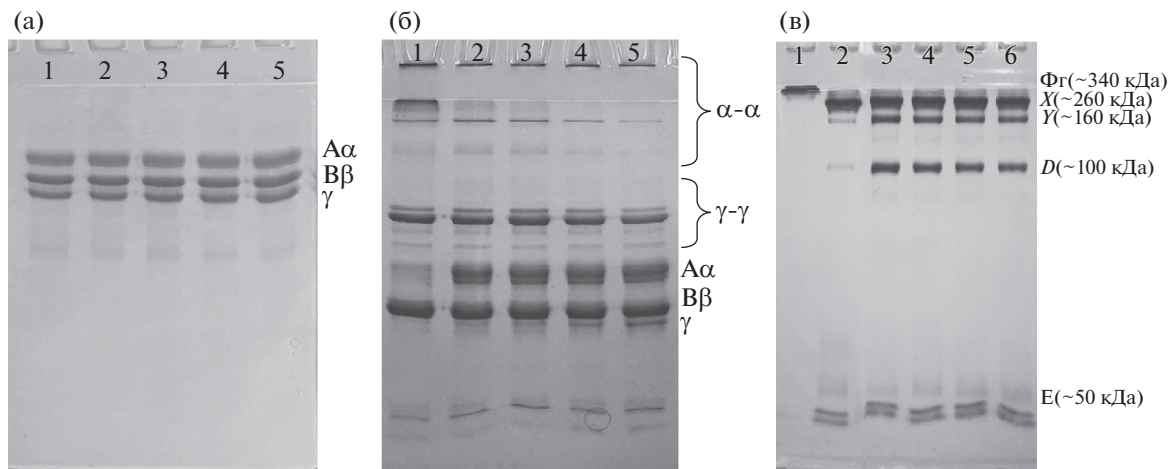


Рис. 1. Электрофорез различных образцов ФГ.

(а) Электрофорез полипептидных цепей ФГ в полиакриламидном геле (5% – концентрирующий гель, 12% – разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия: 1 – неокисленный ФГ, 2 – окисленный 150 мкМ H_2O_2 , 3 – окисленный 300 мкМ H_2O_2 , 4 – окисленный 600 мкМ H_2O_2 , 5 – окисленный 1000 мкМ H_2O_2 .

(б) Электрофорез продуктов реакции сшивания ФГ FXIIIa в полиакриламидном геле (4% – концентрирующий гель, 8% – разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия: 1 – продукты реакции FXIIIa с неокисленным ФГ, ФГ, окисленным 150 мкМ H_2O_2 (2); 300 мкМ H_2O_2 (3), 600 мкМ H_2O_2 (4), 1000 мкМ H_2O_2 (5).

(в) Электрофорез продуктов гидролиза молекулы ФГ под действием плазмина с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (4% – концентрирующий гель, 8% – разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS): 1 – негидролизованый ФГ; продукты гидролиза неокисленного ФГ (2), окисленного 150 мкМ H_2O_2 (3), окисленного 300 мкМ H_2O_2 (4), окисленного 600 мкМ H_2O_2 (5), окисленного 1000 мкМ H_2O_2 (6).

хроматографа Agilent 1100 с устройством автоматического отбора проб (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany) [7]. При подготовке проб образцы обрабатывались дитиотреитолом (DTT) для восстановления дисульфидных связей с последующим алкилированием йодоацетоамидом и гидролизом трипсином (Promega, USA). Триптические пептиды были идентифицированы с помощью программного обеспечения PEAKS Studio (V. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, On, Canada). Все эксперименты повторялись трижды. При сравнении результатов учитывались аминокислоты, не окисленные в контроле, а также те, уровень окисления которых по сравнению с контролем, возрос более чем на 1%.

Микрореологические характеристики фибриновых гелей, образованных под действием тромбина из нативного и окисленного ФГ изучали методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Malvern Zetasizer Nano S. Регистрировали корреляционные функции (КФ) $g^{(2)}(\tau)$ флуктуаций интенсивности излучения 633 нм, рассеиваемого фибриновым гелем под углом 173° , в диапазоне времени задержки $\tau = 0.5\text{--}4 \times 10^6$ мксек с помощью программы Zetasizer в форме $[g^{(2)}(\tau) - 1]$.

На рис. 1а представлены результаты электрофореза полипептидных цепей нативного и окисленного ФГ, которые свидетельствуют о том, что,

независимо от концентрации окислителя, не наблюдалось ни фрагментации белка, ни образования ковалентных сшивок его цепей.

В присутствии FXIIIa полипептидные цепи фибрина участвуют в ковалентном сшивании, что проявляется в образовании γ - γ -димеров и α - α полимеров [8]. С повышением концентрации окислителя количество образующихся α - α полимеров и γ - γ -димеров снижается, о чем свидетельствует также увеличение содержания исходных A α - и γ -цепей (рис. 1б). Очевидно, что это является следствием окислительной модификации структуры молекулы ФГ.

При оценке подверженности молекулы ФГ плазминовому гидролизу при окислении хорошо заметно, что даже при минимальном количестве окислителя (150 мкМ) значительно возрастает количество продуктов деградации (рис. 1в).

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы неокисленного и обработанного 300 мкМ H_2O_2 ФГ. Под воздействием H_2O_2 в молекуле ФГ наиболее подверженными окислению оказались остатки метионина, триптофана и гистидина. Среди модификаций, обнаруженных в этих аминокислотных остатках, имеются случаи образования метионин сульфоксида, 2-оксогистидина и гидрокситриптофана вследствие присоединения одного атома кислорода к боковой цепи (+15.99), окисления триптофана до кинуренина (+3.99) и отщепления метантиола от

боковой цепи Met (–48.00). Как видно из рис. 2, модифицированные в результате индуцированного окисления аминокислотные остатки были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы ФГ, за исключением E области.

В неокисленном образце также были обнаружены окислительные модификации следующих аминокислотных остатков: AαMet91, AαMet207, AαMet240, AαTrp276, AαMet476, AαMet517, AαMet584, BβMet118, BβMet190, BβMet305, BβMet314, BβMet367, γMet78, γTrp227, что может быть объяснено базовым окислением молекулы ФГ в плазме крови, а также дополнительным окислением в процессе его препаративного выделения, хранения и ввода пробы. Практически все аминокислотные остатки, модифицированные в контроле, демонстрируют умеренную степень окисления, которая существенно возрастает при индуцированном окислении.

Локализованные в E области аминокислотные остатки, которые участвуют в связывании тромбина (AαTrp33, AαPhe35, AαAsp38, AαGlu39, BβAla68, BβAsp69, γAsp27 и γSer30) [9], не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбин-связывающих сайтов ФГ при окислении. Содержащей наибольшее количество окислительных сайтов является αC-область (AαMet240, AαTrp276, AαTrp341, AαTrp391, AαMet476, AαMet517, AαHis544, AαHis545, AαMet584), что согласуется с ранее полученными нами ранее данными [2, 3] и подтверждает гипотезу о возможности данной области служить ловушкой для молекул АФК [10].

Для окисленного белка наблюдается замедление накопления α–α полимеров и γ–γ димеров, о чем свидетельствует также увеличение количества исходных Aα и γ цепей (рис. 16). FXIIIa образует ковалентные сшивки между γGin398/399 и γLys406 [11], продуцируя γ–γ димеры и, с более медленной скоростью, α–α полимеры между Aα-цепями в нескольких сайтах: AαGin328, AαGin336, AαLys508, AαLys556 и AαLys562 [12]. Все детектированные аминокислотные остатки (γGin398/399 и γLys406, AαGin336, AαLys508) оставались в нативной форме при окислении. Это может служить дополнительным доказательством того, что ингибирование реакции ковалентного сшивания цепей ФГ при окислении не является следствием нарушения структуры каталитических сайтов, а обусловлено конформационными перестройками в окисленном белке, делающие эти каталитические сайты менее доступными для FXIIIa. Среди участков молекулы, подверженных плазминовому гидролизу, также не обнаружены сайты окислительных модификаций. Это подтверждает ранее высказанное предположение, что окисленные белки, благодаря увеличению

своей гидрофобности, становятся более восприимчивыми к протеолитической деградации [13].

Полученные данные по перекисному окислению ФГ согласуются с полученными ранее результатами исследования озон- и гипохлорит-индуцированного окисления молекулы ФГ [2, 3, 10]. Гипохлорит и озон вызывали значительно большее повреждение молекулы ФГ, способствуя модификации более широкого ряда аминокислотных остатков и разнообразия типов окислительных модификаций [2, 3] по сравнению с H₂O₂, однако, в целом, не затрагивали функционально ключевых участков ФГ. Из 24 идентифицированных модифицированных аминокислотных остатков 18 являются метионинами, 12 из которых оказались окисленными даже в контрольном образце. В их числе находится и AαMet476, окисление которого в ряде исследований [1, 5] рассматривается как основной фактор, ответственный за нарушение способности αC-областей участвовать в латеральной агрегации протофибрилл. Однако преимущественное окисление AαMet476 (проявляющееся даже в контрольном образце в результате автоокисления молекулы ФГ) указывает на то, что остаток, по-видимому, экспонирован на поверхности молекулы. Известно, что экспонированные метионины в белках легко окисляемы, наделены антиоксидантной функцией и не оказывают влияния на биологическую активность [4].

Окисление исходного ФГ изменяет геометрические и механические характеристики формируемых фибрилл и, в конечном итоге, структуру и механические свойства фибриновых сгустков. В контексте протекающих в организме окислительных процессов изучение этих изменений имеет фундаментальное медико-биологическое значение. На рис. 3 показаны нормированные зависимости $[g^{(2)}(\tau) - 1]$ для гелей из нативного и окисленного ФГ.

Регистрация проведена через 43, 73 и 22 мин, соответственно, после приготовления геля. Форма КФ отражает динамику сверхдемпфированных колебаний упругой сетки из фибрилл в геле, характеризуемую, в первом приближении, временем затухания $\tau_{eff} \propto f/G$, где f и G – эффективные величины коэффициента трения фибрилл в окружающей жидкости и модуля упругости фибриновой сетки соответственно [14]. Величину τ_{eff} можно оценить интегрально по формуле: $\tau_{eff} = \int [g^{(2)}(\tau) - 1]^{1/2} d\tau$. Это дает величины $\tau_{eff} = 8.5, 7.8$ и 10.5 мсек для гелей из нативного ФГ и окисленного 300 и 500 мкМ H₂O₂ на 1 мкМ белка соответственно. Форма зарегистрированных КФ и полученные оценки τ_{eff} позволяют заключить, что окисление ФГ перекисью водорода в дозах порядка 500 мкМ H₂O₂ на 1 мкМ белка приводит

Аα цепь		1	11	21	31	41	51
MFSMRIVCLV	LSVVGTAWTA	DSGEGDFLAE	GGGVRGPRVV	ERHOSACKDS	DWPFCSDEDW	NYKCPSGCRM	
61	71	81	91	101	111	121	
KGLIDEVNQD	FTNRINKLKN	SLFEYQKNK	DSHSLTTNIM	EILRGDFSSA	NNRDNTYNRV	SEDLRSRIEV	
131	141	151	161	171	181	191	
LKRKVIKVO	HIQLLOKNVR	AQLVDMKRLE	VDDIKIRSC	RGSCSRALAR	EVDLKDYEDQ	OKOLEQVIK	
201	211	221	231	241	251	261	
DLLPSRDRQH	LPLIKMKPVP	DLVPGNFKSQ	LQKVPPEWKA	LTDMPOMRME	LERPGGNEIT	RGGSTSYGTG	
271	281	291	301	311	321	331	
SETESPRNPS	SAGSWNSGSS	GGSTGNRNP	GSSGTGGTAT	WKPGSSGPGS	TGSWNSGSSG	TGSTGNQNP	
341	351	361	371	381	391	401	
SPRPGSTGTW	NPGSSERGSA	GHWTSSESVS	GSTGQWHSSES	GSFRPDSPGS	GNARPNPDW	GTFEEVSGNV	
411	421	431	441	451	461	471	
SPGTRREYHT	EKLVTSKGDK	ELRTGKEKVT	SGSTTTTTRS	CSKTVTKTVI	GPDGHKEVTK	EVVTSDEGSD	
481	491	501	511	521	531	541	
CPEAMDGLTL	SGIGTLDFGR	HRHPDEAAFF	DTASTGKTFP	GGFSPMLGEF	VSETESRGSE	SGIFTNTKES	
551	561	571	581	591	601		
SSHHPGIAEF	PSRGKSSSYS	KQFTSSTSYN	RGDSTFESKS	YKMADEAGSE	ADHEGTHSTK	RGHAKSRPV	
Bβ цепь				10	20	30	40
MKRMVSWSFH	KLKTMKHL	LLLCVFLVKS	QGVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	PAPPPISGGG	
50	60	70	80	90	100	110	
YRARPAKAAA	TQKKVERKAP	DAGGCLHADP	DLGVLCPGTC	QLOEALLOQE	RPIRNSVDEL	NNNVEAVSQT	
120	130	140	150	160	170	180	
SSSSFOYMYL	LKDLWQKROK	QVKDNENVVN	EYSSELEKHQ	LYIDETVNSN	IPTNLRVLS	ILENLRSKIQ	
190	200	210	220	230	240	250	
KLESVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSQGE	CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	DMNTENGGWT	
260	270	280	290	300	310	320	
VIQNRQDGSV	DFGRKWDPIK	QGFQNVATNT	DGKNYCGLPG	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTTEL	LIEMEDWKGD	
330	340	350	360	370	380	390	
KVKAHYGGFT	VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	NALMDGASQL	MGENRTMTIH	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDP	
400	410	420	430	440	450	460	
RKQCSKEDGG	GWWYNRCHAA	NPNGRYWGG	QYTWDMAKHG	TDDGVVWMNW	KGSWYSMRKM	SMKIRPFFPO	
Q							
γ цепь		4	14	24	34	44	
MSWSLHPRNL	ILYFYALLFL	SSTCVAYVAT	RDNCCILDER	FGSYCPTTCG	IADFLSTYQT	KVDKDLQSL	
54	64	74	84	94	104	114	
DILHQVENKT	SEVKOLIKAI	QLTYPDESS	KPNMIDAATL	KSRKMLEIM	KYEASILTHD	SSIRYLOEII	
124	134	144	154	164	174	184	
NSNNQKIVNL	KEKVAOLEAQ	CQEPCKDTVQ	IHDITGKDCQ	DIANKGAKQS	GLYFIKPLKA	NQQLVYCEI	
194	204	214	224	234	244	254	
DGSGNGWTFE	QKRLDGSVDF	KKNWIQYKEG	FGHLSPTGTT	EFWLGNEKIH	LISTQSAIPY	ALRVELEDWN	
264	274	284	294	304	314	324	
GRTSTADYAM	FKVGPEADKY	RLTYAYFAGG	DAGDAFDGFD	FGDDPSDKFF	TSHNGMQFST	WDNDNDKFEF	
334	344	354	364	374	384	394	
NCAEQDGSW	WMNKCHAGHL	NGVYYQGGTY	SKASTPNGYD	NGIIWATWKT	RWYSMKKTTM	KIIPFNRLTI	
404							

Рис. 2. Первичная структура (последовательность аминокислотных остатков соответствует UniProt P02671 (FIBA_HUMAN), P02675 (FIBB_HUMAN) и P02679 (FIBG_HUMAN), <http://www.uniprot.org>) и экспериментально полученные методом ВЭЖХ-МС/МС последовательности пептидных фрагментов полипептидных цепей ФГ. Двойной линией подчеркнуты участки полипептидных цепей, детектированные и в контрольном, и в окисленном (300 мкМ H₂O₂) образцах, одинарное подчеркивание снизу – участки, детектированные только в окисленном образце (300 мкМ H₂O₂), одинарное подчеркивание сверху – участки, детектированные только в контрольном образце. Сайты модификации отмечены черными треугольниками сверху. Аминокислотные остатки на NH₂ – концевых участках полипептидных цепей, обозначенные серым цветом, являются сигнальным пептидом.

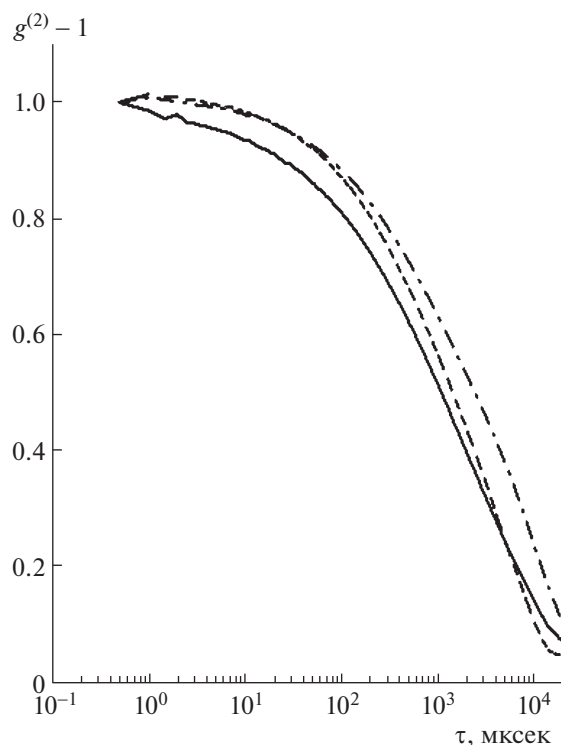


Рис. 3. Нормированные коррелограммы динамического светорассеяния в гелях из нативного (сплошная линия) и окисленного ФГ: пунктир – 300, штрих-пунктир – 500 мкМ H_2O_2 на 1 мкМ белка.

к заметному повышению жесткости фибриновой сетки свежее образованного геля. Это может быть обусловлено, как было показано ранее [15], следствием изменений структуры в связи с образованием массивных агрегатов фибрилл.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-01313. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 14-24-00114.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weigandt K.M., White N., Chung D., Ellingson E., Wang Y., Fu X., Pozzo D.C. // *Biophys. J.* 2012. V. 103. № 11. P. 2399–2407.
2. Юрина Л.И., Васильева А.Д., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А. // *ДАН.* 2019. Т. 484. № 3. С. 37–41.
3. Yurina L., Vasilyeva A., Indeykina M., Bugrova A., Biryukova M., Kononikhin A., Nikolaev E., Rosenfeld M. // *Free Radical Research.* 2019. V. 53. № 4. P. 430–455.
4. Luo S., Levine R.L. // *FASEB J.* 2009. V. 23. № 2. P. 464–472.
5. White N.J., Wang Y., Fu X., Cardenas J.C., Martin E.J., Brophy D.F., Wade C.E., Wang X., St John A.E., Lim E.B., Stern S.A., Ward K.R., López A., Chung D. // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 96. P. 181–189.
6. Rosenfeld M.A., Shchegolikhin A.N., Bychkova A.V., Leonova V.B., Biryukova M.I., Kostanova E.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 77. P. 106–120.
7. Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Adamska I. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. № 1. P. 184–190.
8. Lorand L., Chenoweth D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1969. V. 63. № 4. P. 1247–1252.
9. Pechik I., Madrazo J., Mosesson M.W., Hernandez I., Gilliland G.L., Medved L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 1. P. 2718–2723.
10. Rosenfeld M.A., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Bychkova A.V. // *Free Radic. Res.* 2018. V. 52. № 1. P. 14–38.
11. Chen R., Doolittle R.F. // *Biochemistry* 1971. V. 10. № 24. P. 4487–4491.
12. Sobel J.H., Gawinowicz M.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 32. P. 19288–19297.
13. Davies M.J. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 7. P. 805–825.
14. Tanaka T., Hocker L.O., Benedek G.B. // *J. Chem. Phys.* 1973. V. 59. № 9. P. 5151–5159.
15. Wang L., Li L., Wang H., Liu J. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 23. P. 4373–4384.

THE STRUCTURAL-FUNCTIONAL DAMAGE OF FIBRINOGEN OXIDIZED BY PEROXIDE HYDROGEN

**L. V. Yurina^{a,#}, A. D. Vasilyeva^a, V. L. Kononenko^a, A. E. Bugrova^a, M. I. Indeykina^{a,c},
A. S. Kononikhin^b, Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev^d, and M. A. Rosenfeld^a**

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

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

^c *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow, Russian Federation*

^d *Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation*

[#]*e-mail: lyu.yurina@gmail.com*

The effect of peroxide-induced oxidation of fibrinogen on modification to its primary structure and functional properties has been investigated. The oxidation sites have been shown to be residues of Met, Trp, and His. Using the DLS method, it was found that the oxidative modification of fibrinogen results in the change of microrheological characteristics of fibrin network. The fibrinogen oxidation diminishes its tolerance to plasmin hydrolysis and deteriorates the factor XIIIa ability to stabilize the fibrin gel.

Keywords: fibrinogen, fibrin gel, oxidation, HPLC-MS/MS, oxidation sites, microrheology, PAGE