

УДК 577.322.75

ПРИРОДА РЕЗИСТЕНТНОСТИ СТРУКТУРЫ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ XIII К ГИПОХЛОРИТ-ИНДУЦИРОВАННОМУ ОКИСЛЕНИЮ

© 2020 г. А. Д. Васильева^{1,*}, Л. В. Юрина¹, А. Е. Бугрова¹,
М. И. Индейкина^{1,3}, А. С. Кононихин², А. Н. Щеголихин¹, В. С. Иванов¹,
член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев⁴, М. А. Розенфельд¹

Поступило 02.06.2020 г.
После доработки 09.06.2020 г.
Принято к публикации 09.06.2020 г.

Изучено повреждение фактора свертывания крови XIII (FXIII) на отдельных этапах его ферментативной активации при действии различных физиологических количеств гипохлорит-иона. Результаты ВЭЖХ-МС/МС, ДСН-ПААГ электрофореза и колориметрии показали, что в процессе превращения профермента FXIII в фермент FXIIIa уязвимость FXIII к окислению гипохлорит-ионами возрастала. FXIII, окисленный 150 мкМ гипохлорита, полностью сохранял свою ферментативную активность, присущую неповрежденному белку, в то время как FXIIIa, окисленный 50 мкМ гипохлорита, демонстрировал резко сниженную ферментативную активность. Показано, что ряд остатков метионина и цистеина на каталитической субъединице наделен антиоксидантной функцией. Регуляторные субъединицы FXIII-B дополнительно способствуют антиоксидантной защите каталитического центра субъединицы FXIII-A, что вместе с плотной упаковкой тетрамерной структуры профермента FXIII, являются тремя факторами, которые обеспечивают высокую устойчивость белка к окислителю.

Ключевые слова: фактор свертывания крови XIII, окисление, ВЭЖХ-МС/МС, окислительные модификации, электрофорез, транслугуаминазная активность

DOI: 10.31857/S2686738920050236

Фактор свертывания крови XIII (FXIII) играет ключевую роль в поддержании гемостаза благодаря ковалентной стабилизации полимеров фибрина, делаая их устойчивыми к лизису плазмином, и сшиванию фибрина с белками фибринолитической системы. Подобно большинству факторов свертывания, FXIII циркулирует в крови как неактивный профермент. FXIII обладает гетеротетрамерной структурой, состоящей из двух каталитических субъединиц А (FXIII-A) и двух регуляторных субъединиц В (FXIII-B), которые

удерживаются вместе нековалентными связями [1]. Физиологическая активация профермента FXIII, осуществляемая при последовательном действии тромбина и ионов кальция в присутствии фибрина, обуславливает диссоциацию каталитических и регуляторных субъединиц с экспонированием активного центра в каталитической субъединице и образование активной формы фермента FXIIIa [1].

Хорошо известно, что белки, в том числе белки, циркулирующие в плазме крови, являются основными мишенями для различных окислителей, которые могут изменять структуру белков и их функции. В настоящее время исследования по окислительным модификациям FXIII крайне немногочисленны [2–4]. Ранее было показано, что вызванное озоном окисление FXIII влияет на транслугуаминазную активность FXIIIa, которая в значительной степени зависит от стадии превращения FXIII в FXIIIa, на которой проводилось окисление белка [2]. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было показано, что набор многочисленных сайтов окисления (включая остатки метионина) в каталитической субъединице, обнаруженных при озонировании FXIII, FXIII, частично активированного только

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

² ФИЦ ИХФ им. Семенова Российской академии наук, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской академии наук, 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: ms.kadaver@mail.ru

Ca^{2+} , и полностью активированного FXIII (т.е. после обработки белка тромбином и Ca^{2+}) значительно различался [4].

В отличие от озона, гипохлорит, который был выбран в настоящем исследовании, является физиологическим окислителем. Образованный *in vivo* в результате реакции перекиси водорода и Cl^- с помощью фермента миелопероксидазы, высвобождаемой из нейтрофилов при их активации, гипохлорит рассматривается как важный патофизиологический фактор при окислительном стрессе [5]. В настоящем исследовании впервые будут представлены доказательства того, что: 1) профермент FXIII является наименее чувствительной мишенью для гипохлорита по сравнению с его активированной формой; 2) полностью активированный FXIII (FXIIIa) проявляет максимальную уязвимость к действию гипохлорита; 3) часть остатков Met и Cys каталитической субъединицы наделена антиоксидантами свойствами; 4) регуляторные субъединицы способствуют дополнительной антиоксидантной защите каталитического домена.

FXIII выделяли из плазмы крови человека методом фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-ToyoPearl M650. Превращение FXIII в FXIIIa осуществлялось совместным действием тромбина и ионов кальция [2]. Фибриноген был изолирован из плазмы фракционным осаждением глицином. Наличие перекрестно-сшитых цепей в фибрине, катализируемых FXIIIa, анализировалось методом ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях.

Каждая серия образцов фактора XIII (неактивированный FXIII, FXIII, частично активированный Ca^{2+} , и FXIIIa) обрабатывалась 50 и 150 мкМ HOCl/OCl^- , соответственно, при температуре 37°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Реакцию с HOCl/OCl^- останавливали добавлением десятикратного молярного избытка L-метионина. Для избавления от избытка L-метионина образцы затем центрифугировали с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra с размером пор 3 кДа (Millipore, Ирландия).

Трансглутаминовая активность различных образцов FXIIIa оценивалась колориметрическим методом, используя коммерческий набор (BioVision K522, USA). Набор для анализа активности BioVision's Factor XIIIa определяет трансглутаминовую 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. Для всех образцов FXIIIa измерения трансглутаминовой активности проводили в трех повторах.

Окисляемые сайты выявляли с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа (ВЭЖХ-МС/МС), используя хроматограф Agilent 1100 nano-LC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), соединенным с масс спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany), как было детально описано ранее [4]. Полученные 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 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.

Идентификация PEAKS Post-Translational modifications (PEAKS PTM) достигается путем интеграции результатов 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 ПТМ. Алгоритм базы данных PEAKS DB используется для идентификации белков. В этом этапе указано несколько очень частых модификаций, чтобы максимизировать чувствительность к окислению: окисление (+15.99); диокисление (+31.99); хлорирование тирозина (+33.96) и др. Алгоритм PEAKS PTM используется для определения большего количества ПТМ. 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 640 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 — достоверной 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 расчета путем установки желаемого порога показателя Ascore. В этой работе использовался порог $\text{Ascore} > 100$.

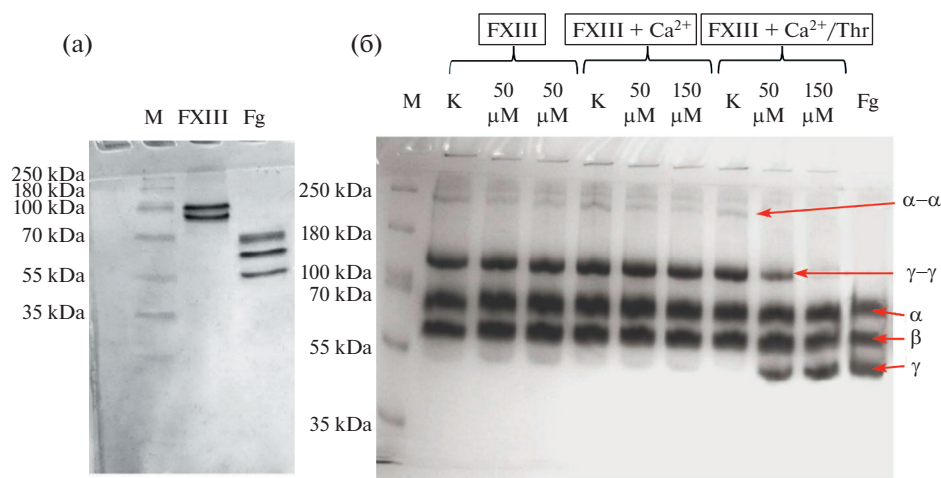


Рис. 1. Электрофоретический анализ гомогенности выделенных белков (а) и способности FXIII к образованию сшитых α -полимеров и γ -димеров (б). (а) Слева направо – маркеры молекулярной массы, выделенные из плазмы крови человека FXIII и фибриноген (Fg). (б) Слева направо – маркеры молекулярной массы, фибриновые цепи, сшитые неокисленными (К) и окисленными (50 или 150 мкМ гипохлорита) образцами FXIII на разных стадиях активации и образец необработанного FXIII фибриногена. Белковые полосы визуализировали окрашиванием Кумасси синим R250.

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 модификаций для конкретного аминокислотного остатка. Каждый из аминокислотных остатков, окисленных по меньшей мере на 1% (степень модификации >1%), считался модифицированным. Представленные результаты (рис. 3 и 4) являются средними показателями общей степени окисления аминокислотного остатка, полученными при анализе 9 повторностей (3 биологических повторности, каждая из которых была отдельно обработана окислителем и подготовлена к анализу методом ВЭЖХ-МС/МС, трижды проанализированных методом ВЭЖХ-МС/МС), которые для удобства были отнесены к пяти диапазонам уровня окисления, с учетом стандартного отклонения.

Как видно из электрофореграмм (рис. 1), в присутствии FXIIIa полипептидные фибриновые цепи подвергаются ковалентному сшиванию с образованием γ - γ -димеров [6] и полидисперсных α - α -полимеров [7]. Окисление нативного FXIII (дорожки 3, 4), также, как и частично активированного Ca^{2+} образца, не оказывало влияния на последующий процесс ковалентного сшивания фибриновой сети. Это указывает на то, что трансглютаминазная активность окисленного белка

практически полностью сохраняется при его инкубации с 50 или 150 мкМ гипохлорита. FXIIIa, обработанный 50 мкМ HOCl/OCl^- , показал снижение ферментативной активности, о чем свидетельствуют как умеренное содержание γ - γ -димеров, так и наличие только незначительных количеств α - α -полимеров (дорожка 9). Окисление фермента 150 мкМ гипохлорита привело к кардинальному снижению участия γ полипептидных цепей в сшивании и практически полному отсутствию α - α -полимеров (дорожка 10).

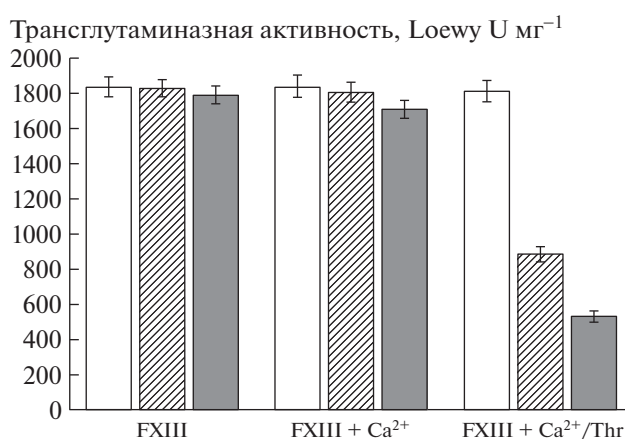


Рис. 2. Значения трансглютаминазной активности FXIIIa (Loewy U/mg), образованного из различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (заштрихованные колонки), 150 мкМ (серые колонки) гипохлорита и не окисленного FXIII (белые колонки). Трансглютаминазная активность выражена как среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 6$.

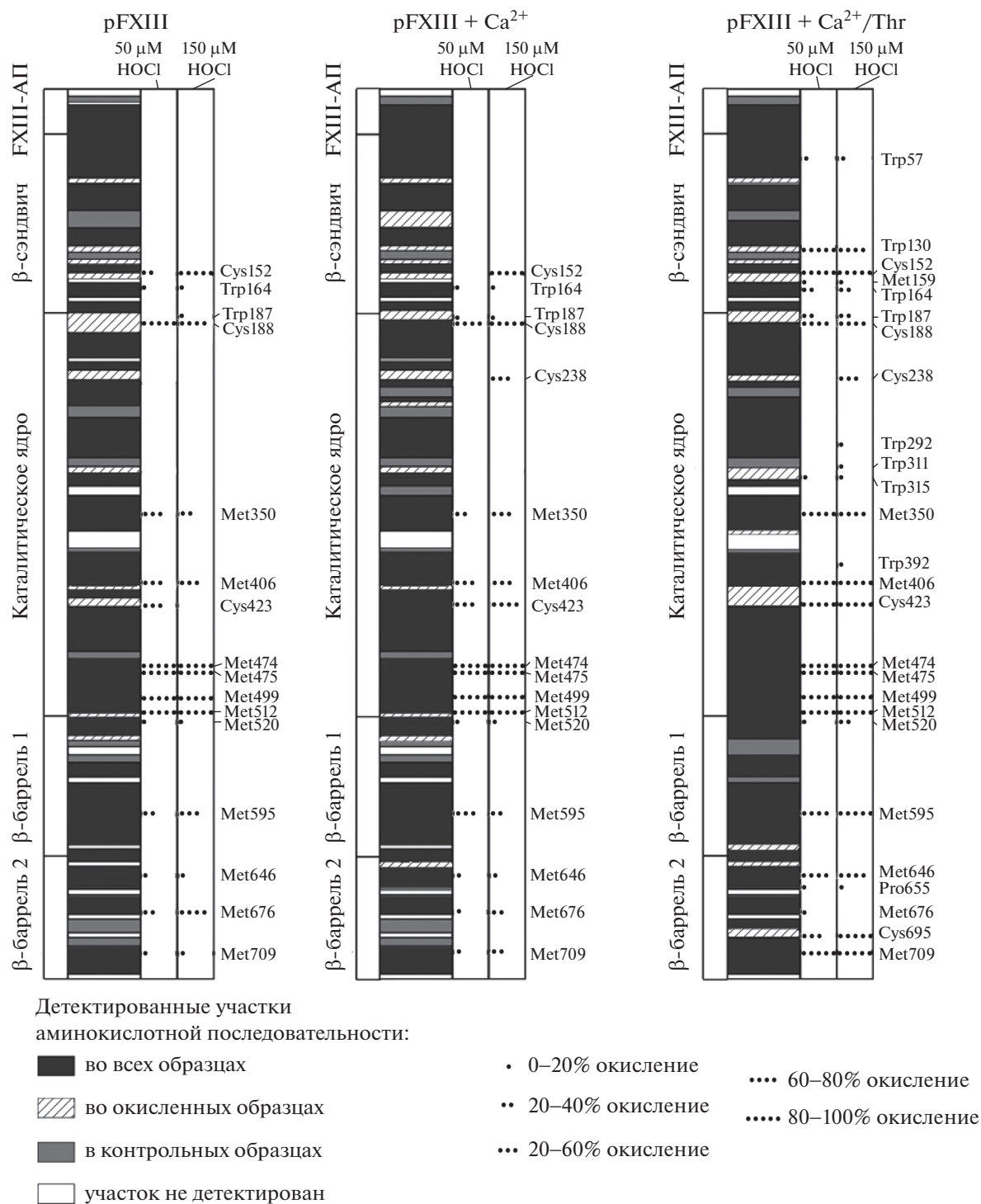


Рис. 3. Покрытие первичной структуры (левые столбцы) и окислительные модификации каталитической субъединицы FXIII-A различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (средние колонки) и 150 мкМ гипохлорита (правые колонки). FXIII, FXIII + Ca²⁺ и FXIII + Ca²⁺/Thr являются образцами каталитической субъединицы FXIII-A в неактивированном FXIII, FXIII, активированном только Ca²⁺, и FXIII, активированном совместным действием Ca²⁺ и тромбина, соответственно.

Значения транслугаминазной активности FXIIIa, измеренные колориметрическим методом для различных образцов, также подтвердили

этот вывод (рис. 2). Для FXIIIa, полученного из неокисленного FXIII или FXIII, окисленного 50 мкМ и 150 мкМ гипохлорита, значения транс-

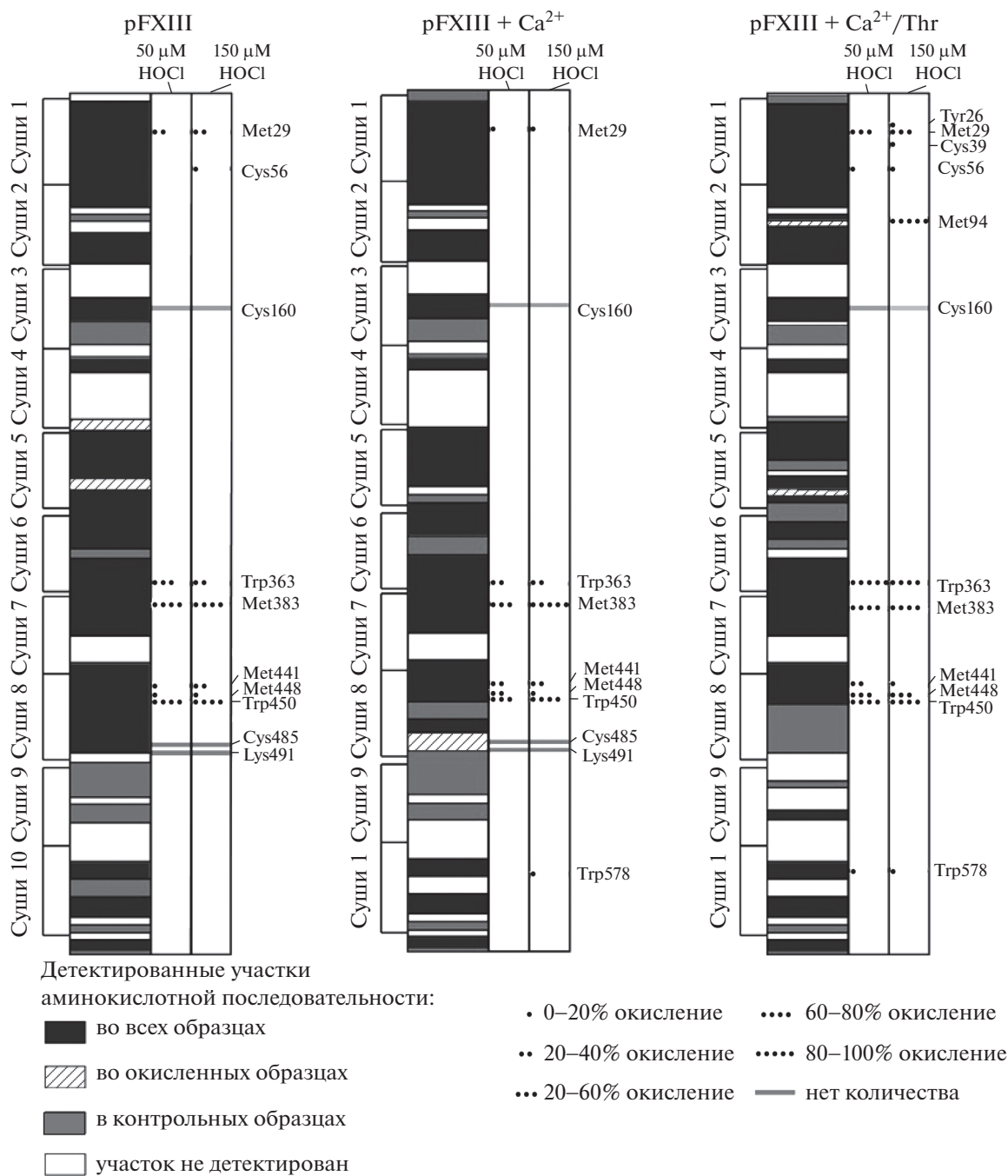


Рис. 4. Покрытие первичной структуры (левые столбцы) и окислительные модификации регуляторной субъединицы FXIII-B различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (средние колонки) и 150 мкМ гипохлорита (правые колонки). (Обозначения те же, как и в подписи к рис. 3).

глутаминазной активности практически не изменялись и составили (1836 ± 55 , 1830 ± 49 и 1790 ± 51) ед./мг по Лоуэу с соавт. [8] соответственно. Результаты показали, что значение трансклутаминазной активности FXIIIa, который был образован из FXIII + Ca²⁺ составляло (1841 ± 62) ед./мг, а затем снижалось до (1804 ± 57 и 1710 ± 41) ед./мг при инкубации смеси FXIII + Ca²⁺ с 50 или

150 мкМ гипохлорита. При окислении FXIIIa значения трансклутаминазной активности снизились с (886 ± 43) до (532 ± 31) ед./мг, тогда как в контроле (образец FXIII + Ca²⁺/тромбин), она была равной (1812 ± 61) ед./мг. Таким образом, можно сделать вывод, что каталитические субъединицы FXIII-A в FXIIIa более уязвимы для окислителя, чем в FXIII.

Масс-спектрометрические данные также свидетельствуют о том, что окислительная восприимчивость молекулы FXIII растет на разных этапах ее активации, причем ферментативная форма FXIIIa наиболее уязвима к окислению (рис. 3, 4). Окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных областях субъединицы FXIII-A, за исключением N-концевого активационного пептида. Набор окислительных сайтов, выявленных для нативных и окисленных гипохлоритом образцов FXIII, убедительно показывает, что каталитическая субъединица претерпевает значительные химические изменения при индуцированном окислении.

Поскольку в белках Cys и Met являются основными мишенями для гипохлорита [9], эти остатки в каталитической субъединице были доминирующими, подвергшимися модификации. Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что из 19 остатков Met, присутствующих в первичной структуре белка, 12 остатков были идентифицированы в образцах FXIII и FXIII+ Ca²⁺, 14 остатков в образцах FXIIIa, тогда как только пять остатков метионина, Met136, Met247, Met380, Met679 и Met 731 не были покрыты. Данные масс-спектрометрии показывают, что остатки метионина (Met242, Met350, Met406, Met474, Met475, Met499, Met512, Met520, Met595, Met646, Met676 и Met709) претерпевают модификации, процент окисления которых 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.

Преобразование метионина в метионин сульфоксид в белках является одной из наиболее часто встречающихся модификаций из-за особой восприимчивости метионина к окислительным условиям. Полагают, что остатки метионина действуют как внутримолекулярные антиоксиданты и защищают другие функционально ключевые аминокислоты от окисления [10]. Поскольку ни один из окисленных аминокислотных остатков, обнаруженных в окисленном проферменте, не является функционально значимым для фермента, вышеуказанные остатки метионина могут выполнять антиоксидантную роль и вместе с остатками Cys152, Cys188, Cys423, Cys152, Cys188 и Cys423 способны защищать каталитический центр белка от окисления.

Регуляторная субъединица FXIII-B также является мишенью для молекулы гипохлорита (рис. 4). Как мы полагаем, субъединицы FXIII-B дополнительно способствуют антиоксидантной защите каталитической субъединицы. Хорошо известно, что в нативной конформации FXIII взаимодействия между всеми четырьмя субъединицами обеспечи-

вают образование компактной глобулярной структуры мультимерного белкового комплекса. В результате вход в каталитический центр закрыт для любых веществ, включая малые молекулы [1], таких как HOCl/OCl⁻. Важно отметить, что, как и каталитическая субъединица, уязвимостью регуляторной субъединицы к индуцированному окислению возрастает с активацией FXIII в следующем порядке: нативный FXIII < FXIII + Ca²⁺ < FXIII + Ca²⁺/тромбин (рис. 4). Кроме того, то, что на последней стадии активации FXIII в FXIII-B₂ возникают новые сайты окисления (Tyr26, Cys39 и Met94), является фактом наличия конформационных изменений в FXIII-B, происходящих при диссоциации FXIII.

Таким образом, плотная упаковка тетрамерной структуры профермента FXIII, антиоксидантные остатки Met и Cys на субъединицах FXIII-A и дополнительная защитная функция субъединиц FXIII-B могут быть основными факторами, которые обеспечивают высокую устойчивость белка к окислителю.

В заключении хотелось бы отметить следующее. В текущем исследовании результаты получены с использованием изолированного фХIII, в то время как в кровотоке фХIII циркулирует вместе с другими белками, существенно превосходящими его по концентрации. Каждый из белков плазмы крови способен перехватывать АФК, экранируя тем самым фХIIIa от молекул окислителей. Было показано [11], что добавление 500 HOCl/OCl⁻ мкМ в плазму крови не изменяло транслугтаминазную активность. Так как профермент, как установлено нами, обладает максимальной устойчивостью к действию гипохлорита, представляется разумным предположить, что белок остается либо не модифицированным, либо слегка 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 HOCl/OCl⁻ может достигать миллимолярных концентраций [12]. В плазме крови фХIII, как известно, за счет регуляторной субъединицы взаимодействует с фибриногеном [1], который, в свою очередь, путем связывания с интегрином альфаMbeta2 (Mac-1), экспрессируемым на активированных лейкоцитах, обеспечивает ключевую связь между тромбозом и воспалением [13]. Следовательно, влияние нейтрофильных окислителей на фХIII, скорее всего, будет локальным. При высоких локальных концентрациях HOCl/OCl⁻ можно ожидать, что транслугтаминазная активность FXIIIa (наиболее уязвимой мишени для окислителей относительно FXIII) будет снижена, что приведет к уменьшению количества α-полимеров в фибриновой сети. Это убедительно пока-

зано в нашем текущем исследовании (рис. 1, 2). Поскольку α -полимеры вносят значительный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмина [14], их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда из фибриногена, поврежденного окислением, образуется устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой [15].

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 16-14-00181.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. // *Physiol. Rev.* 2011. V. 91. № 3. P. 931.
2. Rosenfeld M.A., Bychkova A.V., Shchegolikhin A.N., Leonova V.B., Biryukova M.I., Kostanova E.A. // *Biochim. Biophys. Acta* 2013. V. 1834. № 12. P. 2470–2479.
3. Васильева А.Д., Бычкова А.В., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Чукунова А.П., Леонова В.Б., Костанова Е.А., Бирюкова М.И., Константинова М.Л., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А. // *ДАН.* 2017. Т. 472. № 4. С. 471–474.
4. Vasilyeva A., Yurina L., Indeykina M., Bychkova A., Bugrova A., Biryukova M., Kononikhin A., Nikolaev E., Rosenfeld M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2018. V. 1866. № 8. P. 875–884.
5. Loria V., Dato I., Graziani F., Biasucci L.M. // *Mediat. Inflamm.* 2008. V. 271. C.1–4.
6. Chen R., Doolittle R.F. // *Biochemistry* 1971. V. 10. № 24. P. 4487–4491.
7. Sobel J.H., Gawinowicz M.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 32. P. 19288–19297.
8. Loewy A.G., Dunathan K., Kriel R., Wolfinger H.L. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. № 10. P. 2625–2633.
9. Hawkins C.L., Pattison, D.I., Davies M.J. // *Amino Acids* 2003. V. 25. № 3–4. P. 259–274.
10. Lim J., Kim G., Levine R. // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. № 1. P. 247–257.
11. Misztal T., Golaszewska A., Tomasiak-Lozowska M.M., Iwanicka M., Marcinczyk N., Leszczynska A., Chabielska E., Rusak T. // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 141. P. 426–437.
12. Stief T.W., Kurz J., Doss M.O., Fareed J. // *Thromb. Res.* 2000. V. 97. P. 473–480.
13. Lishko V.K., Podolnikova N.P., Yakubenko V.P., Yakovlev S., Medved L., Yadav S.P., Ugarova T.P. // *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 44897–44906. 2004.
14. Rijken D.C., Uitte de Willige S. // *Biomed. Res. Int.* 2017:1209676.
15. Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 411–418.

THE NATURE OF RESISTANCE OF THE COAGULATION FACTOR XIII STRUCTURE TO HYPOCHLORITE-INDUCED OXIDATION

A. D. Vasilyeva^{a, #}, L. V. Yurina^a, A. E. Bugrova^a, M. I. Indeykina^{a, c}, A. C. Kononikhin^b, A. N. Schegolikhin^a, V. S. Ivanov^a, 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: ms.kadaver@mail.ru

The damage to blood coagulation factor XIII (FXIII) at different stages of its enzymatic activation under the action of various physiological amounts of hypochlorite ion has been studied. The results obtained by HPLC-MS/MS, SDS-PAAG electrophoresis and colorimetry showed that during the conversion of FXIII to FXIIIa, the vulnerability of FXIII to hypochlorite-induced oxidation increased. FXIII oxidized with 150 μ M hypochlorite completely retained its enzymatic activity inherent to the intact protein, while FXIIIa treated with 50 μ M hypochlorite revealed sharply reduced enzymatic activity. It was shown that a number of methionine and cysteine residues on the catalytic subunit can perform antioxidant function; additionally, the regulatory subunits of FXIII-B contribute to the antioxidant protection of the catalytic center of the FXIII-A subunit, which, together with the tight packing of the tetrameric structure of the FXIII proenzyme, are the three factors that provide high protein resistance to the oxidizing agent.

Keywords: blood coagulation factor XIII, oxidation, oxidative modifications, HPLC-MS/MS, electrophoresis, transglutaminase activity