

УДК 577.322.75

ИНДУЦИРОВАННАЯ ГИПОХЛОРИТОМ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФИБРИНОГЕНА

Л. В. Юрина^{1,*}, А. Д. Васильева¹, А. Е. Бугрова¹, М. И. Индейкина^{1,2},
А. С. Кононихин^{1,2,3}, член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев^{1,3,4}, М. А. Розенфельд¹

Поступило 27.07.2018 г.

Окисление фибриногена гипохлоритом вызывало ингибирование процесса самосборки фибриновой сети уже при наименьшей концентрации окислителя. Анализ результатов белкового электрофореза при этой концентрации гипохлорита выявил отсутствие фрагментации белка и ковалентного сшивания его цепей. При исследовании участков, ответственных за превращение фибриногена в фибрин, с помощью масс-спектрометрии обнаружили, что они не подвергаются окислительным повреждениям, однако при этом мы идентифицировали окисленные аминокислотные остатки, которые могли бы влиять на агрегацию протофибрилл.

Ключевые слова: фибриноген, окисление, гипохлорит, масс-спектрометрия.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524843367-371>

Молекулы фибриногена (ФГ), мишень для активных форм кислорода (АФК), циркулируя в крови, постоянно подвергаются атаке свободных радикалов. Посттрансляционные окислительные модификации ФГ вызывают нарушения функциональных свойств белка и, как следствие, сборку фибрина, характеризуемого аномальной архитектурой, пониженной прочностью и эластичностью [1]. Альтернативная сборка трёхмерной структуры фибриновой сети при окислении ФГ может быть обусловлена окислительными модификациями специфических остатков метионина, принадлежащих $\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ - и γ -полипептидным цепям и, прежде всего, метионина $\alpha\alpha$ Met476, локализованного в α C-домене [2].

Ранее [3] методом масс-спектрометрии мы исследовали окислительные модификации $\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ - и γ -полипептидных цепей ФГ при его окислении озоном. Было показано, что α C-область является наиболее уязвимой мишенью для окислителя по сравнению с другими структурными элементами

ФГ. Кроме того, значительная часть ключевых сайтов, ответственных за самосборку фибриновой сети, оставалась незатронутой в условиях массивного окисления озоном, способным генерировать высокореактивные и неселективные гидроксильные радикалы [4]. Эти результаты позволили сделать предположение, что структура ФГ может быть адаптирована к действию АФК [5].

Чтобы получить дополнительные доказательства, свидетельствующие в пользу сделанного предположения, в настоящей работе в условиях, максимально приближённых к физиологическим, мы исследовали окислительную модификацию ФГ под действием гипохлорита (Гпх), являющегося одним из главных окислителей в организме человека.

Фибриноген выделяли из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения [6]. Окисление ФГ индуцировали раствором Гпх ("Sigma-Aldrich", США, SHBJ5633) в концентрации 50, 500 и 1500 мкмоль/мг белка [1]. Раствор ФГ (1 мг/мл) инкубировали с этими концентрациями Гпх при температуре 25 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании. По окончании инкубации проводили электрофорез белков в градиенте (8–23%) полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли. Фореграммы окрашивали coomassie brilliant blue (R250). Для определения молекулярной массы полипептидных цепей исследуемого белка использовали смесь белков-маркёров PageRuler Prestained Protein Ladder ("ThermoFisher Scientific", США, Mr от 10 до 180 кДа).

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук, Москва

² Московский физико-технический институт
(государственный университет),
Долгопрудный Московской обл.

³ Институт энергетических проблем химической физики
им. В.Л. Тальрозе Российской Академии наук, Москва

⁴ Сколковский институт науки и технологий,
д. Сколково Московской обл.

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

Хромато-масс-спектрометрическое исследование проводили, как и в работах [7, 8], с помощью хроматографа Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (“Agilent Technologies Inc.”, США) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (“ThermoFisher Scientific”). При подготовке проб образцы обрабатывали дитиотреитолом для восстановления дисульфидных связей с последующим алкилированием йодацетамидом и гидролизом трипсином (“Promega”, США). Пептиды после трипсинолиза идентифицировали с помощью программного обеспечения PEAKS Studio V. 8.5 (“Bioinformatics Solutions Inc.”, Канада). При сравнении результатов учитывали аминокислоты, не окисленные в контроле, уровень окисления которых по сравнению с контролем возрастал более чем на 1%.

Полимеризацию фибрина, катализируемую тромбином, проводили в микропланшетах при 37 °С в течение 60 мин. В каждую лунку добавляли 200 мкл раствора контрольного или окисленного ФГ (1 мг/мл). Реакцию инициировали тромбином (50 мкл, конечная концентрация 0,5 единицы НИН/мл). Образцы автоматически перемешивали в течение 5 с сразу же после начала реакции. Мутность измеряли каждые 20 с в течение 60 мин [9]. Результаты регистрировали с помощью xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (“Bio-Rad”, США) при 350 нм.

На рис. 1 представлены результаты электрофореза полипептидных цепей нативного и окисленного ФГ. Известно, что взаимодействие Гпх с белками вызывает окислительные повреждения, в результате которых происходят окислительные модификации аминокислотных остатков (а. о.), фрагментация полипептидных цепей и их димеризация [10]. Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что при отношении окислитель/белок, равном 50 мкмоль/мг белка, мы не наблюдали фрагментацию белка и ковалентное сшивание его цепей, однако при повышении концентрации окислителя до 500 и 1500 мкмоль/мг мы зарегистрировали соответственно частичную и полную фрагментацию белка.

При исследовании окислительной модификации ФГ методом масс-спектрометрии мы проанализировали образцы ФГ, не подвергавшиеся индуцированному окислению (контроль) и обработанные 50 мкмоль/мг белка Гпх (опыт). В контрольном и опытном образцах картировали целый ряд участков полипептидных $\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ - и γ -цепей ФГ. Содержание этих участков в контроле и опыте составило 77, 82, 83 и 89, 92, 92% соответственно. Оказалось, что при индуцируемом окислении ФГ мо-

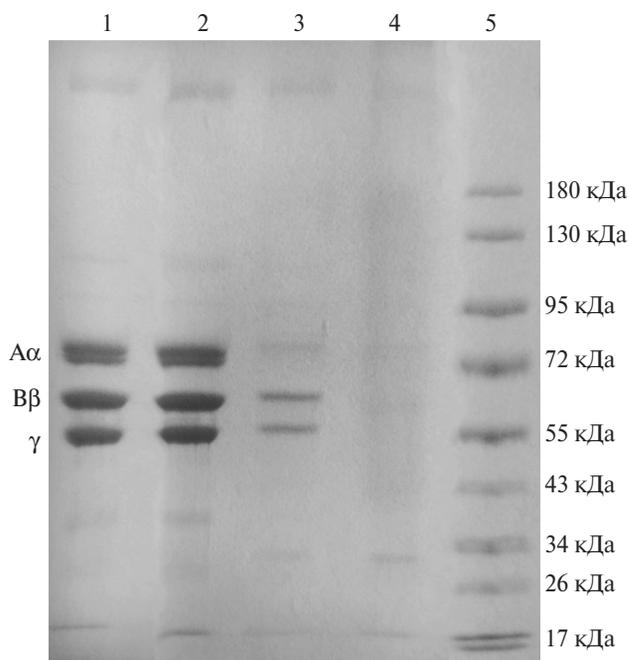


Рис. 1. Электрофореграммы полипептидных цепей ФГ. 1 — неокисленный ФГ, 2 — ФГ, окисленный 50 мкМ гипохлорита, 3 — ФГ, окисленный 500 мкМ гипохлорита, 4 — ФГ, окисленный 1500 мкМ гипохлорита, 5 — маркерные белки.

дификации затрагивают разные а. о., принадлежащие всем трём полипептидным цепям белка (рис. 2).

Полученные данные позволили проанализировать окислительные повреждения в разных структурных элементах белка. Известно, что молекула ФГ состоит из центральной области *E*, образованной *N*-концевыми фрагментами всех трёх полипептидных цепей белка ($\alpha\alpha$ 1-48, $\beta\beta$ 1-79 и γ 1-22), двух периферических областей *D*, включающих $\alpha\alpha$ 161-220, $\beta\beta$ 193-461 и γ 135-427, суперспирального сегмента, соединяющего области *E* и *D* между собой и составленного из фрагментов $\alpha\alpha$ 49-160, $\beta\beta$ 80-192 и γ 23-134, α C-коннектора и α C-домена, включающих сегменты $\alpha\alpha$ -цепи 221-391 и 392-610 соответственно [11]. Как следует из рис. 2, в области *E* мы не обнаружили ни одного модифицированного остатка. В структуре суперспирального сегмента модифицированными оказались АКО $\alpha\alpha$ Met91, $\beta\beta$ Tyr152, $\beta\beta$ Asp154, γ Lys75, γ Pro76, γ Asn77, γ Met78, γ Met89, γ Met94. В области *D* окислению подверглись а. о. $\alpha\alpha$ Met207, $\alpha\alpha$ Lys219, $\beta\beta$ Pro196, $\beta\beta$ Trp293, $\beta\beta$ Tyr338, $\beta\beta$ Met367, $\beta\beta$ Met373, γ Phe226, γ Met264, γ His340. В α C-коннекторе доступными к окислителю оказались остатки Met235, Met238, Ser255 и Asn288, а в области α C-домена — а. о. Ser432, Met476, Asp477, Met517, Glu526, Arg528 и Tyr570. Несколько из идентифицированных нами окисленных остатков мети-

A α -цепь						
1	11	21	31	41	51	
MFSMRIVCLV	LSVVGTAWTA	A DSGEQDFLAE	GGVVRGPRV	ERHQSACKDS	DWFFCSDEW	NYKPCSGRM
61	71	81	91	101	111	121
KGLIDEVND	FTRNKLN	SLFEYQKNK	DSHSLTINM	EILRGDFSSA	NNRNDTYNRV	SEDLRSRIEY
131	141	151	161	171	181	191
LKRKVIKQV	HIQLLQKVR	AQLVDMKRL	VVIDITKRS	RGSCSRALAR	EVDLKDVEDO	OKOLEQVIAR
201	211	221	231	241	251	261
DLLEPSRORH	LPLIKMKPVP	DLVPGNFQO	LQKVPPEWKA	LTDMPQMRM	LERPQGNETT	RGGSSTSYGTG
271	281	291	301	311	321	331
SETESPRNPS	SAGSWNSGSS	GPSTGTRNP	GSSGTGGTAT	WKPSSSGFGS	TGWSNSGSSG	TGSTGNQWFG
341	351	361	371	381	391	401
SPRPGSTGW	NPGSSERGSA	GHWTSSESVS	GSTGQWHS	GSFRPDSFGS	GNARFNNPDW	GTFFEVSGNV
411	421	431	441	451	461	471
SPGTRREYHT	EKLVTSKDGK	ELRTGKQVT	SGSTTTTRRS	CSKTVTKTVI	GPDGHKVTK	EVVTSDEGSD
481	491	501	511	521	531	541
CPEAMDGLTL	SGIGTLDFGR	HRHPDEAAFF	DTASTGKTFP	GFFSFMJGEP	VSESTSRGE	SGIPTNTKES
551	561	571	581	591	601	
SSHHPGIAEF	PSRGKSSSY	KQFTSSTSYN	RGDSTFESKS	YKMADEAGSE	ADHEGTHSTK	RGHAKSRPV
B β -цепь						
10	20	30	40			
MKRMVSWSEH	KLKTMKHL	LLLCLVFLVKS	QVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	PAPPPISGGG
50	60	70	80	90	100	110
YRARPAAAA	TQKVRKAP	DAGGCLHAPD	DLGLCPTGC	QLQEAALQOE	RPINRSVDEL	NNVAVSQT
120	130	140	150	160	170	180
SSSSFOYML	LKDLWQKQK	QVKDNEVSN	EYSSELEKHQ	LYIDETVNSN	IPTNLRVLS	ILENLRSKO
190	200	210	220	230	240	250
KLESDVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSQKE	CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	DMNTEGQWT
260	270	280	290	300	310	320
VIGNRODGV	DFGRKWDPK	QGFNVATNT	DGKNYCGLEP	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTLE	LIERMEDKWD
330	340	350	360	370	380	390
KVKAHYGGFT	VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	NALMDGASQL	MGENRMTI	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDF
400	410	420	430	440	450	460
RKQCSKEDGG	GWYINRCHAA	NPNGRYTWGG	OYTWDMAKHG	TDGQVVMWNV	KGSWYSMRKM	SMKIRFFPQ
Г-цепь						
4	14	24	34	44		
MSWSLHPRNL	ILYFYALLFL	SSTCAVYVAT	RDNCCILDER	FGSYCPTTCG	IADFSLTYQT	KVKDKLOSLE
54	64	74	84	94	104	114
DILHQVENKT	SEVKQLKAI	QLTYNPESS	KPNMIDAATL	KSRMLREIM	KYEASILTHD	SSIRVLOEYI
124	134	144	154	164	174	184
NSNNOKIVNL	KEKVAQLEAQ	COEPCCKDTVO	IHDITGKDCQ	DIANKGAKOS	GLYFIKPLKA	NOQFLVCEI
194	204	214	224	234	244	254
DGSGNGWTVF	OKRLDGSVDF	KKNQIQYKEG	FCHLSPTGTT	EFWLGNKETH	LISTOSAIYF	ALRVELEDWN
264	274	284	294	304	314	324
GRTSTADYAM	FKVGPADKY	RLTYAYFAG	DAGDAFDGD	EGDDPSDKFF	TSHNGMFOST	WDNDNDKPEG
334	344	354	364	374	384	394
NCAEODSGGW	WNNKCHAGHL	NGVYQGGTY	SKASTPNQYD	NGIITWTKT	RWYSMKKTTM	KLIFFNRIIT
404						
GEGQOHILGG AKVQVPE						

Рис. 2. Результаты аминокислотного секвенса полипептидных цепей окисленного ФГ. Серым цветом обозначены а. о. сигнального пептида, стрелками — окисленные а. о., защищенные в опыте а. о. — подчеркиванием.

онина, A α Met476, B β Met367, B β Met373, γ Met78, мы выявили ранее [6] при модификации ФГ в условиях *in vivo* при коагулопатии после травматического шока, в то время как другие остатки метионина, A α Met91, A α Met517, A α Met235, A α Met238, γ Met89 и γ Met94, мы обнаружили впервые.

При сопоставлении с данными, полученными для индуцированной озоном окислительной модификации ФГ [3], обнаруживается общая интересная закономерность, заключающаяся в том, что область E в обоих случаях является наименее уязвимой к действию окислителей по сравнению с другими струк-

турными элементами белка. Другая повторяющаяся закономерность связана с сохранением структурной целостности ряда а. о. и пептидных фрагментов при окислении, играющих ключевую роль в функционировании ФГ. Данные масс-спектрометрии показали, что из восьми а. о., участвующих в связывании тромбина (A α Trp33, A α Phe35, A α Asp38, A α Glu39, B β Ala68, B β Asp69, γ Asp27 и γ Ser30 [12]), за исключением A α Trp33, который не был идентифицирован, ни один из оставшихся семи остатков не подвергся химическому изменению. Этот важный результат указывает на сохранение тромбинсвязывающих свойств ФГ при окислении, что обеспечивает протекание одной из основных стадий образования фибрина — отщепление от ФГ фибринопептидов и превращение его в мономерный фибрин.

Хорошо известно, что самосборка молекул мономерного фибрина, обуславливающая построение двухцепочечных протофибрилл, осуществляется посредством взаимодействий knob 'A': hole 'a' [13]. Структура knob 'A' (α Gly17–Arg19), как следует из рис. 2, не подвержена окислению. Центр hole 'a' включает три петли: γ Trp315–Trp331, γ Trp335–Asn365 и γ Phe295–Thr305 [13]. Пептидный сегмент γ Phe295–Thr305 полностью защищен и не окислен. В петлях γ Trp315–Trp331 и γ Trp335–Asn365 не защищенными оказались участки γ Trp315–Lys321 и γ Ala357–Asn365. Остальные участки этих петель защищены и, исключая единственный окисленный остаток His240, остаются не поврежденными при окислении. При анализе влияния окисления на взаимодействия knob 'B': hole 'b', которые, как полагают, усиливают латеральную ассоциацию протофибрилл [14], обращает на себя внимание тот факт, что химическая структура knob 'B' (β Gly15–Pro18) сохраняется в целостности. В структуре hole 'b' участвуют области связывания β Asp383–Asp398, β Tyr404–Gly434 и β Gln359–Phe369 [14]. Область β Asp383–Asp398 полностью закрыта и не окислена (рис. 2). В областях β Tyr404–Gly434 и β Gln359–Phe369 закрытыми являются участки β Tyr404–Arg415, β Gly419–Lys428, β Gln359–Met361 и β Thr366–Phe369, в которых единственным модифицированным остатком оказался Met367.

Окисление ФГ вызывает ингибирование полимеризации фибрина, снижение мутности (рис. 3) благодаря тому, что структура такого фибрина характеризуется более тонкими индивидуальными фибриллами, низкой пористостью и уменьшенной механической прочностью по сравнению с фибрином, образованным из неокисленного ФГ [1]. Авторы работ [1, 2] полагают, что альтернативная сборка трёхмерной структуры фибриновой сети при

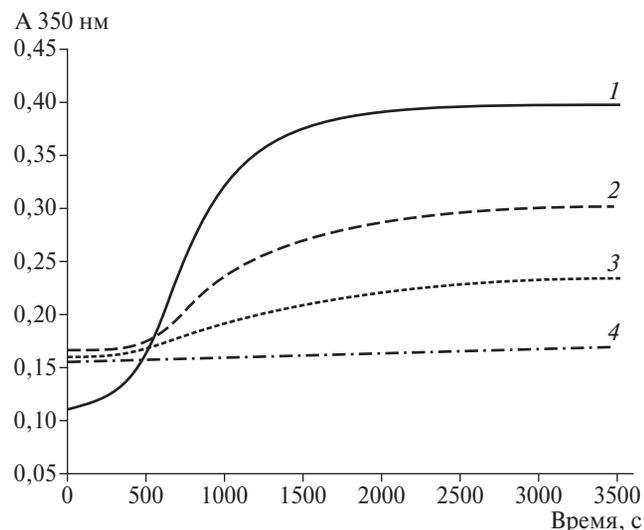


Рис. 3. Кинетика образования фибрина. 1 — неокисленный ФГ; 2 — ФГ, окисленный 50 мкМ гипохлорита; 3 — ФГ, окисленный 500 мкМ гипохлорита; 4 — ФГ, окисленный 1500 мкМ гипохлорита.

окислению может быть обусловлена окислением остатка метионина, $\text{A}\alpha\text{Met476}$, нарушающего способность αC -областей окисленных молекул участвовать в латеральной агрегации протофибрилл. В этой связи следует отметить, что предпочтительное окисление $\text{A}\alpha\text{Met476}$ по сравнению с другими многочисленными остатками метионинов в $\text{A}\alpha$ -цепи свидетельствует о том, что этот остаток, по всей видимости, локализован на поверхности белка и может окисляться без существенных потерь в функциональной активности белка [15]. Кроме того, выявленные окислительные модификации других остатков, локализованных на αC -доменах и αC -коннекторах, также, вероятно, могут способствовать ослаблению взаимодействия αC – αC . Наряду с этим в суперспиральном сегменте и С-терминальной части $\text{V}\beta$ -цепи (рис. 2) мы обнаружили большое количество модификаций структур, способных дополнительно влиять на агрегацию протофибрилл [13]. Следовательно, механизм влияния окисления на процесс латеральной агрегации протофибрилл является достаточно сложным и требует дополнительных исследований.

В заключение хотелось бы отметить, что набор окислительных сайтов, идентифицированных в нашей работе, выявлен впервые. Он позволяет проанализировать особенности окислительной модификации молекул ФГ в условиях, близких к таковым в кровотоке. Масс-спектрометрические данные демонстрируют возможности структуры ФГ удерживать в неприкосновенности витальные а. о. и пептидные фрагменты при окислении, что в совокуп-

ности с большим количеством обнаруженных модифицированных остатков метионинов, рассматриваемых как перехватчики АФК [15], позволяет предполагать наличие структурной антиоксидантной адаптации белка.

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001) и при финансовой поддержке гранта РФФИ 18–04–01313. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда 16–14–00181.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Weigandt K.M., White N., Chung D., Ellingson E., Wang Y., Fu X., Pozzo D.C. // *Biophys. J.* 2012. V. 103. P. 2399–2407.
2. Burney P.R., White N., Pfaendtner J. // *PloS One.* 2014. V. 9. P. 1–10.
3. Бычкова А.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Константинова М.Л., Розенфельд М.А. // *ДАН.* 2017. Т. 474. № 2. С. 238–242.
4. 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.
5. Rosenfeld M.A., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Bychkova A.V. // *Free Radic. Res.* 2018. V. 52. P. 14–38.
6. 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.
7. Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Adamska I. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. P. 184–190.
8. Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Indeykina M.I., Bychkova A.V., Bugrova A.E., Biryukova M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // *BBA Proteins Proteom.* 2018. In press.
9. Азизова О.А., Пурязев А.П., Асейчев А.В., Швачко А.Г. // *Бюл. экперим. биологии и медицины.* 2009. Т. 147. № 2. С. 160–163.
10. Hawkins C.L., Davies M. // *Biochem. J.* 1998. V. 332. P. 617–625.
11. Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 411–418.
12. Pechik I., Madraza J., Mosesson M.W., Hernandez I., Gilliland G.L., Medved L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 2718–2723.
13. Weisel J.W., Litvinov R.I. // *Subcell. Biochem.* 2017. V. 82. P. 405–456.
14. Kononova O., Litvinov R.I., Zhmurov A., Alekseenko A., Cheng C.H., Agarwal S., Marx K.A., Weisel J.W., Bar-

segov V. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 22681–22692. 15. *Lim J., Kim G., Levine R.* // Neurochem. Res. 2018. DOI: 10.1007/s11064-017-2460-0.

HYPOCHLORITE-INDUCED OXIDATIVE MODIFICATION OF FIBRINOGEN

**L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva, A. E. Bugrova, M. I. Indeykina,
A. S. Kononikhin, Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev, M. A. Rosenfeld**

Received July 27, 2018

Oxidation of fibrinogen with hypochlorite inhibited the fibrin network self-assembly even at the lowest concentration of the oxidant. The analysis of the results of protein electrophoresis at this hypochlorite concentration showed the absence of fragmentation of the protein and covalent cross-linking of its chains. The study of the areas responsible for the conversion of fibrinogen into fibrin by mass spectrometry showed that they are not subject to oxidative damage. However, we identified oxidized amino acid residues, which could affect the protofibril aggregation.

Keywords: fibrinogen, oxidation, hypochlorite, mass spectrometry.