

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.322.75

ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ
МОДИФИКАЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА

А. Д. Васильева^{1,*}, Л. В. Юрина¹, А. Е. Бугрова¹, М. И. Индейкина^{1,3},
Д. Ю. Азарова^{1,5}, А. В. Бычкова¹, К. И. Акжигитова^{1,6}, А. С. Кононихин^{1,2,3},
член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев^{1,2,4}, М. А. Розенфельд¹

Поступило 23.11.2018 г.

Исследовалась окислительная модификация человеческого гемоглобина Hb, обработанного пероксидом водорода. Методом масс-спектрометрии были детектированы окисленные аминокислотные остатки молекулы гемоглобина α Trp14, α Tyr24, α Arg31, α Met32, α Tyr42, α His45, α His72, α Met76, α Pro77, α Lys90, α Cys104, α Tyr140, β His2, β Trp15, β Trp37, β Met55, β Cys93, β Cys112, β Tyr130, β Lys144, β His146. Обсуждается антиоксидантный потенциал молекулы Hb во внутриклеточном пространстве и при его попадании в плазму крови.

Ключевые слова: гемоглобин, масс-спектрометрия, перекись водорода, окислительные модификации.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863380-383>

В живом организме постоянно происходит генерация активных форм кислорода (АФК), включающая пероксид водорода H_2O_2 , супероксид анион радикал ($O_2^{\cdot-}$), хлорноватистую кислоту $HOCl$ и некоторые другие АФК. Они представляют собой высокореакционные молекулы, которые способны атаковать белки-мишени, вызывая окислительные повреждения белков, в конечном итоге влияя на их пространственную организацию и механизм функционирования. Важно отметить, что в отличие от плазменных белков, защита внутриклеточных белков против АФК-индуцированного окислительного повреждения катализируется широким набором антиоксидантных систем [1]. Кроме того, клетки содержат протеин-дисульфид и метионин сульфоксид

редуктазы, которые восстанавливают окисленные цистеиновые и метиониновые остатки в исходную, немодифицированную форму [2]. Всё это должно обеспечивать высокую толерантность внутриклеточных белков к разрушительному действию АФК. Однако высвобождение из клеток этих белков существенно снижает их возможности к антиоксидантной защите.

В настоящей работе анализируются пост-трансляционные модификации человеческого гемоглобина Hb при его индуцированном окислении пероксидом водорода. Hb представляет собой особо высокореакционную молекулу, которая может высвобождаться во внеклеточную среду при патологических состояниях, таких как наследственные синдромы гемолиза и др. или попадать в кровоток при инфузии заменителей крови на основе Hb [3].

Молекула гемоглобина является тетрамером, состоящим из двух идентичных субъединиц α и двух идентичных субъединиц β , первичная структура которых включает 141 и 146 аминокислотных остатков соответственно. Вторичная структура α и β цепей сформирована исключительно альфа-спиральными сегментами различной длины (семь спиральных сегментов для субъединиц α и восемь спиральных сегментов для субъединиц β), соединённых неспиральными участками. Внутри каждой субъединицы глобина находится “гидрофобный карман”, в котором располагается простетическая группа.

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

²Институт энергетических проблем химической физики
им. В.Л. Тальрозе Российской Академии наук,
Москва

³Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет),
Долгопрудный Московской обл.

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

⁵Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина

⁶Педагогический институт им. В. Г. Белинского
Пензенского государственного университета, Пенза

*E-mail: ms.kadaver@mail.ru

В работе был использован коммерческий препарат человеческого гемоглобина (H7379, "Sigma", USA).

Окисление белка инициировалось пероксидом водорода (95321, "Sigma", USA) при фиксированном соотношении окислитель/гемоглобин, равном $1,3 \cdot 10^{-5}$ моль H_2O_2 /мг белка.

Электрофорез проводили в градиентном полиакриламидном геле (8–23%) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli. Белок был окрашен coomassie brilliant blue (R250). Для определения молекулярных масс полипептидных цепей исследуемого белка использовали смесь белков-маркеров с молекулярной массой от 10 до 250 кДа (Precision Plus Protein Dual Color Standards, "Bio Rad", USA).

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ–МС/МС) проводился на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany) [4, 5]. Образцы белков были подготовлены к анализу по методике, указанной производителем (Trypsin gold, V5280, "Promega", USA). Для каждого образца были выполнены три технических измерения, чтобы обеспечить надежность и воспроизводимость полученных данных. Триптические пептиды были идентифицированы с помощью программного обеспечения PEAKS Studio (V. 8.5, "Bioinformatics Solutions Inc.", Waterloo, On, Canada). При сравнении результатов учитывались аминокислоты, не окисленные в контроле, а также те, уровень окисления которых по сравнению с контролем возростал более чем на 1%.

Электрофорез субъединиц неокисленного и окисленного перекисью водорода человеческого гемоглобина представлен на рис. 1.

Известно, что в общем случае окисление белков может сопровождаться химической модификацией аминокислотных остатков белка, ковалентным сшиванием полипептидных цепей или их фрагментацией. Рисунок 1 демонстрирует, что электрофоретическая подвижность окисленных α и β субъединиц не отличается от таковой для неокисленных субъединиц. Это является надёжным индикатором того, что окисление белка ограничивается только модификацией отдельных остатков, т.е. ни сшивания, ни фрагментации цепей не происходит.

При исследовании окислительной модификации молекулы Hb методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы Hb, не подвергающиеся индуцированному окислению (контроль) и обрабо-

танные $1,3 \cdot 10^{-5}$ моль H_2O_2 /мг белка (опыт). Как в контрольном, так и опытном образцах был картирован целый ряд пептидных сегментов, относящихся к α и β субъединицам. Нам удалось добиться очень высокого процента детектированных участков для субъединиц гемоглобина. В контроле и опыте вся первичная структура субъединицы α (141 аминокислотный остаток) была детектирована. Что касается субъединицы β , за исключением аминокислотных остатков Val60 и Lys61, все остальные 144 аминокислотных остатка были идентифицированы.

При индуцируемом пероксидом водорода окислении гемоглобина в модификацию вовлекаются главным образом серосодержащие остатки цистеина (α Cys104, β Cys93, β Cys112) и метионина (α Met32, α Met76 и β Met55), а также ароматические остатки тирозина, триптофана и гистидина (α Tyr24, α Tyr42, α Tyr140, β Tyr130, α Trp14, β Trp15, β Trp37, α His45, α His72, β His2, β His146). Масс-спектрометрические данные свидетельствуют также о химической альтерации единичных остатков аргинина α Arg31, лизина α Lys90, β Lys144 и пролина α Pro77 (рис. 2).

В ряде работ также было исследовано влияние пероксида водорода на окислительную модификацию гемоглобина [6–10]. В субъединицах α и β был идентифицирован ряд окисленных остатков, цели-

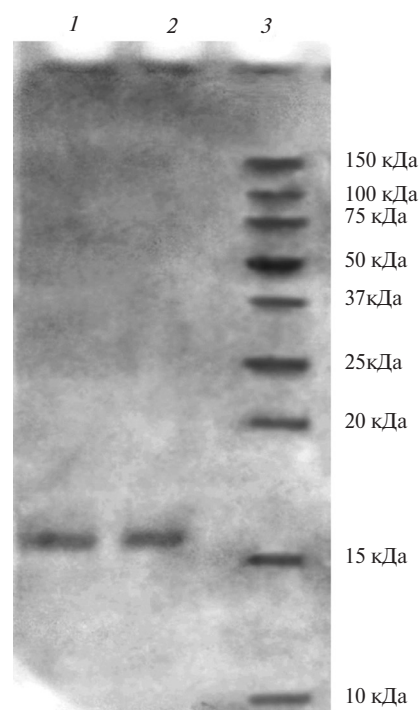


Рис. 1. Электрофорез образцов человеческого гемоглобина: 1 — неокисленный образец Hb; 2 — Hb, окисленный из расчета $1,7$ моль H_2O_2 /моль белка; 3 — маркерные белки.

ком включающих серосодержащие и ароматические аминокислоты. Важно отметить, что как в нашем исследовании, так и в работах Pimenova, *et al.* [6], Deterding, *et al.* [7] и Jia, *et al.* [10] были выявлены окисленные аминокислотные остатки α Tyr24, α Tyr42, β Trp15, β Met55, β Cys93 и β Cys112. Однако в наших экспериментах не были обнаружены модификации в α His20 и β Tyr145, описанные в вышеуказанных работах [6, 7, 10]. Также нами был детектирован ряд ранее неизвестных аминокислотных остатков, подверженных окислению: α Trp14, α Arg31, α Met32, α His45, α His72, α Met76, α Pro77, α Lys90, α Cys104, α Tyr140, β His2, β Trp37, β Tyr130, β Lys144 и β His146.

Известно, что радикальное повреждение α Tyr42 и β Cys93 наносит максимальный ущерб структуре белкового региона, содержащего эти остатки и, та-

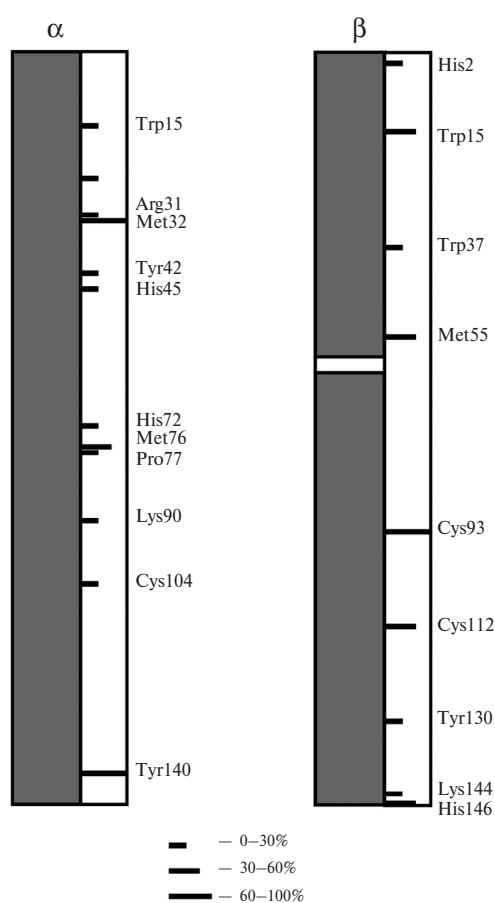


Рис. 2. Картирование аминокислотных остатков гемоглобина в образце при индуцированном окислении белка ($1,3 \cdot 10^{-5}$ моль H_2O_2 /мг белка) для альфа-цепи и бета-цепи. Процентным соотношением обозначено отношение количества модифицированной аминокислоты к общему количеству данной аминокислоты в пептидном фрагменте. Серым цветом обозначены детектированные участки, белым — не детектированные.

ким образом, влияющего на интерфейс $\alpha\beta 2/\alpha\beta 1$ тетрамерной структуры гемоглобина [6]. Кроме того, необратимая окислительная модификация β Cys93 и β Cys112 с последующим окислением β Trp15 и β Met55 способна вызывать кардинальное нарушение структуры β субъединицы как результат атаки H_2O_2 [10]. Первичная структура гемоглобина содержит шесть триптофановых остатков, которые не являются поверхностно экспонированными и поэтому относительно пространственно недоступны для АФК. То, что β Trp15 и β Trp37 подвергаются окислительной альтерации, обусловлено разрыхлением $\alpha\beta 2/\alpha\beta 1$ тетрамерной структуры белка [10].

В заключение хотелось бы отметить следующее. За последние годы убедительно показано, что процесс окисления белков протекает не случайным образом. В соответствии с концепцией сайт-специфического окисления метиониновые, а для ряда белков, цистеиновые остатки служат в качестве антиоксидантов, способных перехватывать АФК и тем самым защищать другие, функционально значимые аминокислотные остатки от окислительного повреждения [11]. Как нами ранее указывалось, благодаря действию редуктаз серосодержащие остатки внутриклеточных белков способны к обратимому окислению, что значительно повышает их антиоксидантный статус. Это подразумевает, что необратимое окисление метионинов и цистеинов в гемоглобине, по-видимому, не позволяет им защищать ряд ключевых тирозинов и триптофанов, претерпевших окислительные модификации в белке при его обработке пероксидом водорода в той мере, как они были бы защищены во внутриклеточном гемоглобине. Кроме того, складывается впечатление, что с точки зрения антиоксидантной защиты, сама структура гемоглобина кажется менее совершенной по сравнению с плазменными белками. Действительно, даже при низких концентрациях пероксида водорода окисление β Cys93 и β Cys112 в конечном итоге приводят к структурному коллапсу Нб. Плазменные белки, как полагают, в определённой мере адаптированы к вредоносному действию АФК благодаря тому, что некоторые из структурных частей белка способны экранировать другие части и ключевые остатки от окислительного повреждения [12]. Это было убедительно продемонстрировано для молекул плазменного фибринстабилизирующего фактора и фибриногена, которые оказались способными функционировать в условиях массивного окисления, так как пост-трансляционные модификации не вовлекали ключевых аминокислотных

остатков, ответственных за функциональность этих белков [5, 12].

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по государственному заданию (тема 0084–2014–0001), а также при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 16–34–60244 мол_а_дк.

Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда № 16–14–00181.

В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grune T. // Biogerontology. 2000. V. 1. P. 31–40.
2. Groitl B., Jakob U. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1844. P. 1335–1343.
3. Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E. // Front Physiol. 2015. V. 5. P. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2014.00500. eCollection 2014
4. 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.
5. 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. // Biochim. Biophys. Acta. 2018. V. 1866. P. 875–874.
6. Pimenova T., Pereira C.P., Gehrig T., Buehler P.W., Schaer D.J., Zenobi R. // J. Proteome Research. 2010. V. 9. P. 4061–4070.
7. Deterding L.J., Ramirez D.C., Dubin J.R., Mason R.P., Tomer K.B. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 11 600–11 607.
8. Ramirez D.C., Chen Y.R., Mason R.P. // Free Radic. Biol. Med. 2003. V. 34. P. 830–839.
9. Mason R.P. // Free Radic. Biol. Med. 2004. V. 36. P. 1214–1223.
10. Jia Y., Buehler P.W., Boykins R.A., Venable R.M., Alayash A.I. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 4894–4907.
11. Kim G., Weiss S.J., Levine R.L. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 901–905.
12. Rosenfeld M.A., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Bychkova A.V. // Free Radic. Res. 2018. V. 52. P. 14–38.

PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE MODIFICATION OF HEMOGLOBIN

A. D. Vasilyeva¹, L. V. Yurina¹, A. E. Bugrova¹, M. I. Indeykina^{1,3}, D. Y. Azarova^{1,5},
A. V. Bychkova¹, K. I. Akzhigitova^{1,6}, A. S. Kononikhin^{1,2,3},
Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev^{1,2,4}, M. A. Rosenfeld¹

¹Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation

⁴Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region, Russian Federation

⁵Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation

⁶Penza State University, Penza, Russian Federation

Received November 23, 2018

The oxidative modification of human hemoglobin Hb treated with hydrogen peroxide was investigated. The method of mass spectrometry were detected oxidized amino acid residues of the hemoglobin molecule: αTrp14, αTyr24, αArg31, αMet32, αTyr42, αHis45, αHis72, αMet76, αPro77, αLys90, αCys104, αTyr140, βHis2, βTrp15, βTrp37, βMet55, βCys93, βCys112, βTyr130, βLys144, βHis146. The antioxidant potential of the Hb molecule in the intracellular space and when it enters the blood plasma is discussed.

Keywords: hemoglobin, mass spectrometry, hydrogen peroxide, oxidative modifications.