

УДК 577.322

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СТРУКТУРНОЙ АДАПТАЦИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА, КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII И ПЛАЗМИН(ОГЕН)А)**Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, В.С. Иванов, М.И. Индейкина, М.А. Розенфельд***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия*

Белки представляют собой высокочувствительные мишени для активных форм кислорода (АФК). Окислительные модификации белков могут вызывать нарушение их структуры и механизма функционирования. В данной работе была исследована структурная адаптация белков системы гемостаза (на примере фибриногена, коагуляционного фактора XIII и плазмин(оген)а) к воздействию окислителя.

Пост-трансляционные окислительные модификации ФГ вызывают нарушения функциональных свойств белка и, как следствие, сборку фибрина, характеризующегося аномальной архитектурой, пониженной прочностью и эластичностью [1]. Альтернативная сборка трехмерной структуры фибриновой сети при окислении ФГ может быть обусловлена окислительными модификациями специфических остатков метионина, принадлежащих Aα-, Bβ- и γ-полипептидным цепям и, прежде всего, метионина AαMet476, локализованного в αC-доме [2]. Было показано, что окисление белка вызывало ингибирование процесса самосборки фибриновой сети. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии была проанализирована структура фибриновых гелей; отчетливо видно наличие тонких фибрилл и мелкопористой структуры фибрина после обработки окислителем. Методом ВЭЖХ-МС/МС был идентифицирован набор аминокислотных остатков, локализованных во всех трех Aα-, Bβ- и γ-полипептидных цепях фибриногена. Впервые установлено, что ряд сайтов, ответственных за превращение фибриногена в фибрин, не подвергается окислительным повреждениям. В покрытии области E, в том числе в структурах knob 'A', knob 'B', а также тромбин-связывающих участков, за исключением непокрытого AαTrp33, не обнаружено ни одного остатка, вовлеченного в окисление. В структурах hole 'a' и hole 'b', исключая окисленные остатки γHis240 и βMet367, в покрытиях также не выявлено ни одного модифицированного сайта. Идентифицированы окисленные аминокислотные остатки в αC-областях, в суперспиральном сегменте и C-терминальной части Bβ-цепи, которые могли бы влиять на агрегацию протофибрилл. Детектированы множественные окисленные остатки метионинов, которые могли бы служить перехватчиками АФК [3].

Плазменный коагуляционный фактор XIII (rFXIII) является ключевым белком системы свертывания крови, основная функция которого заключается в ферментативной ковалентной стабилизации полимерной структуры фибрина. Белок обладает гетеротетрамерой структурой, состоящей из двух каталитических FXIII-A2 и двух регуляторных субъединиц FXIII-B2 [4].

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения, изучено гипохлорит-индуцированное окисление молекул rFXIII и его ферментативной формы FXIIIa. Показано, что серосодержащие и ароматические аминокислотные остатки являются наиболее уязвимыми к окислительной атаке. Данные масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что в исследуемом нами белке за исключением активационного пептида, окисленные аминокислотные остатки обнаруживаются во всех структурных элементах каталитической субъединицы FXIII-A, в то время как в регуляторной субъединице FXIII-B целый ряд доменов остается в нативной форме. При обработке гипохлоритом FXIIIa были выявлены дополнительные сайты модификаций как в субъединице FXIII-A2*, так и в FXIII-B2. Полученные данные позволили постулировать, что в процессе превращения профермента в FXIIIa новые аминокислотные остатки, ранее недоступные окислителю, мигрируют к поверхности белковой глобулы, становясь уязвимыми мишенями для молекул окислителя, в то время как некоторые из исходно поверхностно-экспонированных аминокислотных остатков перемещаются внутрь белка, теряя способность вовлекаться в окислительные модификации [5].

Плазминоген, будучи предшественником плазмина, основная функция которого заключается в осуществлении внутрисосудистого тромболизиса, является полностью неизученным белком плазмы крови в отношении его посттрансляционных окислительных модификаций и, как следствие, структурных нарушений.

В данной работе было исследовано влияние окисления плазминогена и плазмина как на модификацию отдельных сайтов в первичной структуре белков, а также на ферментативную активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена.

Используя метод масс-спектрометрии высокого разрешения показано, что малое количество окислителя вовлекало в процесс окисления только домены KR-2, KR-4 и SP, в то время как при более высоком количестве окислителя все структурные области плазминогена и плазмина были окислены. Наибольшее число сайтов окисления приходится на остатки метионина и циклические аминокислоты, среди которых триптофаны были наиболее доступными для окислителя. Окисление плазмина сопровождалось образованием дополнительных центров окисления в белке, отсутствующих в окисленном плазминогене.

Сделан вывод, что менее свернутая структура плазмина по сравнению с компактной структурой плазминогена становится более уязвимой для действия АФК. Обсуждается антиоксидантная роль метиониновых остатков в сохранении целостности ключевых остатков плазминогена [6].

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001 и 0084–2014–0005) и при финансовой поддержке гранта РНФ № 21–74–00146.

Литература

- Weigandt K.M., White N., Chung D., Ellingson E., Wang Y., Fu X., Pozzo D.C. // Biophys. J. 2012. V. 103. P. 2399–2407.
Burney P.R., White N., Pfaendtner J. // PLOS ONE 2014. V. 9. P. 1–10.
Yurina L.V., Vasilyeva A.D., Bugrova A.E., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Doklady Biochemistry and Biophysics 2019, V. 484. P. 37–41.
Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. // Physiol. Rev. 2011, V. 91 (3). P. 931–939.
Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Shchegolikhin A.N., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Biomolecules 2020, V. 10. P. 914–931.
Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Shchegolikhin A.N., Bugrova A.E., Konstantinova T.S., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Dokl Biochem Biophys. 2019, V. 488(1). P. 332–337.

УДК 616–006–092.9

Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗА PIRH2 ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО

О.А. Федорова, А.И. Гудович, А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, Е.В. Байдюк, Н.А. Барлев

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Аутофагия – естественный, регулируемый процесс в клетках, при котором ненужные компоненты клеток доставляются внутрь ее лизосом и вакуолей и подвергаются в них деградации.

Важно отметить, что на поздних стадиях онкогенеза раковые клетки используют аутофагию для поддержания пролиферации в неблагоприятных условиях, включая противораковую лекарственную терапию.

Известно, что Е3 – убиквитинлигазы играют важную роль в контроле аутофагии. В данной работе мы показали, что Е3-убиквитинлигаза Pirh2 участвует в регуляции аутофагии в клетках рака легкого. Используя метод ПЦР в реальном времени, мы показали, что Pirh2 влияет на регулирующий уровень аутофагии. Важно отметить, что Pirh2 влиял на экспрессию генов на разных этапах аутофагии (инициация, элонгация и образование аутофагосомы). Существует несколько методик оценки уровня аутофагии в клетках, среди которых общепризнанной является оценка уровня LC3-II в клетках. При активации аутофагии цитозольная форма LC3 (LC3-I) связывается с липидом PE, что приводит к образованию липидной формы LC3 (LC3-II). В линиях с нокадауном Pirh2 сигнал LC3-II был понижен, что также свидетельствует о подавлении аутофагии в клетках с пониженной экспрессией Pirh2. Эти результаты были подтверждены иммуноцитохимией с использованием антитела к LC3 и красителя LysoTracker. Известно, что один из механизмов устойчивости к химиопрепаратам является активация аутофагии в клетках. Мы также показали, что клетки с нокадауном Pirh2 были более чувствительны к доксорубину. Обобщая полученные данные, мы показали, что Е3-убиквитинлигаза Pirh2 регулирует уровень аутофагии в клетках рака лёгкого.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18–75–10076.