

На правах рукописи



САВИНА ЕКАТЕРИНА ДМИТРИЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ, ДИНАМИКИ И
ПРОДУКТОВ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ
КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ С БЕЛКАМИ ХРУСТАЛИКА И
МОДЕЛЬНЫМИ СИСТЕМАМИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание
ученой степени кандидата химических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Научные руководители:

Шерин Пётр Сергеевич, к.ф.-м.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» СО РАН, с.н.с., зав. группы фотоиндуцированных процессов

Центалович Юрий Павлович, д.х.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» СО РАН, г.н.с., зав. лабораторией протеомики и метабомики

Официальные оппоненты:

Коваль Владимир Васильевич, к.х.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зам. директора по научной работе

Некипелова Татьяна Дмитриевна, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г.н.с. лаборатории процессов фотосенсибилизации

Поляков Николай Эдуардович, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, зав. лабораторией магнитных явлений

Защита состоится « 11 » сентября 2020 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2020г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. С увеличением продолжительности жизни человека повышается риск развития различных возрастных заболеваний, причины возникновения которых на сегодняшний день остаются во многом неизвестными. В основе многих распространенных заболеваний, в частности, катаракты, лежат реакции белков с реакционно-активными частицами, образующимися в организме под воздействием внешних и внутренних факторов. Важнейшим внешним фактором является солнечное излучение: под действием света в клетках запускается каскад фотохимических реакций с участием реакционных форм кислорода и реакционно-активных состояний низкомолекулярных соединений, которые присутствуют в живой ткани и поглощают УФ-А излучение (315-400 нм). Дальнейшие реакции этих реакционно-активных частиц в настоящее время мало изучены, однако, их итогом может являться химическая модификация белков с последующей агрегацией. Предполагается, что подобные реакции постоянно происходят в хрусталике и, в силу отсутствия механизмов обновления белков, продукты этих реакций накапливаются, приводя к необратимым возрастным изменениям в ткани и развитию катаракты.

Хрусталик человека содержит ряд метаболитов, способных поглощать свет в УФ-А диапазоне – кинуренин (KN) и его производные. Несмотря на то, что основной функцией кинуренинов является защита сетчатки и самого хрусталика от УФ-излучения, под действием света они с низким выходом (< 1%) образуют реакционно-активные формы – триплетные состояния молекул. Последние могут вступать в реакции с белками с образованием радикалов (тип I) или с кислородом с образованием синглетного кислорода (тип II), который окисляет находящиеся рядом аминокислотные остатки белков.

Особенностью кинуренинов является их термическая нестабильность, что приводит к формированию в клетках хрусталика фотохимически активных соединений, играющих роль фотосенсибилизаторов. Кинуреновая кислота (KNA), один из продуктов распада KN, является наиболее эффективным фотосенсибилизатором из исследованных производных KN. KNA была обнаружена в здоровом хрусталике в следовых количествах: ее количество на два порядка меньше, чем совокупное содержание кинуренинов. Принимая во внимание то, что KNA обладает высоким выходом триплетного состояния (82%), на два порядка превышающим таковой для остальных кинуренинов, можно ожидать, что под действием света KNA и другие кинуренины образуют сопоставимые количества соответствующих реакционно-активных частиц. Количество KNA значительно возрастает при развитии катаракты, то есть можно ожидать, что вклад фотохимических реакций, индуцированных KNA, в общую модификацию белков существенно увеличивается с развитием этой патологии. В настоящее время фотохимические реакции KNA мало изучены, и особый интерес представляет информация о её фотоиндуцированных реакциях с белками хрусталика. Информация о механизмах, динамике и продуктах этих реакций может существенно улучшить понимание молекулярных механизмов развития катаракты.

Целью диссертационной работы является исследование фотохимических реакций с участием KNA и установление её роли в фотоиндуцированной

модификации белков хрусталика.

В ходе работы были поставлены и успешно решены следующие **задачи**:

1. Установление механизмов реакций триплетного возбужденного состояния KNA с рядом аминокислот, антиоксидантов, модельным белком лизоцимом и белками хрусталика глаза;

2. Определение механизмов, динамики и продуктов фотоиндуцированной реакции KNA с аминокислотой триптофаном, наиболее эффективным тушителем триплетного состояния KNA;

3. Установление влияния кислорода, присутствующего в растворе, на протекание исследуемых фотохимических реакций;

4. Идентификация основных типов модификаций белка лизоцима, образующихся в результате KNA-сенсibilизированного фотолиза. Установление аминокислот, подвергающихся модификации, и их положения в структуре белка;

5. Установление основных типов модификаций белков хрусталика, вызванных взаимодействиями с фотовозбужденной KNA в анаэробных условиях.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В настоящей работе впервые были установлены механизмы фотоиндуцированных радикальных реакций между хромофором хрусталика и аминокислотами/белками в условиях, приближенных к естественным: (а) анаэробных условиях фотолиза, то есть крайне низкой концентрации остаточного кислорода (5-10 мкМ) и (б) облучении УФ-А светом (315-400 нм), который способен глубоко проникать в ткань хрусталика, и который поглощается хромофорами ткани. Впервые были установлены детальные механизмы фотоиндуцированных реакций триплетного состояния KNA с аминокислотой триптофан и белками, идентифицированы продукты реакций и определена динамика их накопления.

Результаты, полученные при выполнении данной работы, дают сведения об эффективности различных радикальных реакций и типах продуктов, образующихся в результате этих фотоиндуцированных процессов. Эта информация является важной как с точки зрения фундаментальных исследований (механизмы фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика), так и для понимания роли радикалов в развитии различных заболеваний, в первую очередь катаракты, с целью разработки новых методов замедления или предотвращения развития этого заболевания.

Положения, выносимые на защиту

1. УФ-А фотолиз белков в присутствии KNA приводит к формированию радикалов на аминокислотных остатках триптофана и тирозина, основным каналом гибели которых являются реакции обратного переноса электрона с участием анион радикала $\text{KNA}^{\cdot -}$ или супероксида $\text{O}_2^{\cdot -}$, с образованием исходных реагентов;

2. В обескислороженных тканях с высоким содержанием белков, таких как хрусталик, большинство фотовозбужденных УФ-А хромофоров участвуют в прямых реакциях с аминокислотными остатками белков (тип I), с образованием радикалов, в то время как реакции с кислородом с образованием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ (тип II) маловероятны;

3. В зависимости от соотношения концентраций радикалов и O_2 в среде, повреждения белков в реакциях типа I могут происходить (а) через прямые реакции между образовавшимися радикалами $KNA^{\cdot-}$ и белков, тип Ia, или (б) через реакции последних с супероксидом $O_2^{\cdot-}$, образованным в реакции окисления $KNA^{\cdot-}$ молекулярным кислородом, тип Ib;

4. Квантовый выход разложения аминокислоты триптофан и белков при KNA-сенситивизированном фотолизе на порядок выше в случае фотолиза типа Ia по сравнению с фотолизом типа Ib. Участие супероксида в радикальных реакциях типа Ib значительно снижает распад реагентов;

5. УФ-А фотолиз в присутствии KNA приводит к следующим модификациям аминокислотных остатков триптофана и тирозина: образованию ковалентных связей между ними, присоединению одного или двух атомов кислорода и ковалентному связыванию KNA по аминокислотным остаткам триптофана. Основными продуктами фоторазложения KNA являются её мономерные и димерные производные с потерей атома кислорода из карбонильной или карбоксильной групп.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 печатных работы. Содержание диссертации докладывалось на VIII Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия (Новосибирск, Россия) в 2015 году, X международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры генома \ Системная биология (BGRS/SB, Новосибирск, Россия) в 2016 году, Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России, Конференции ADFLIM - ACTA NATURAE (Сочи-Дагомыс, Россия) в 2016 году, IX Международной конференции им. Воеводского "Физика и химия элементарных химических процессов" (VVV-100, Новосибирск, Россия) в 2017 году, Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, Россия) в 2017 году, Центрально-европейской конференции по фотохимии (БадХофгаштайн, Австрия) в 2018 году и 17-м конгрессе Международного Союза по Фотобиологии (Барселона, Испания) в 2019 году.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 175 листах и включает 8 таблиц, 34 рисунка, 8 схем. Библиография включает 256 литературных источников.

Вклад автора. Автор работы участвовал в постановке задач, решаемых в настоящем исследовании, разработке плана исследований, в обсуждении полученных результатов, формулировке выводов и подготовке публикаций. Все использованные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии.

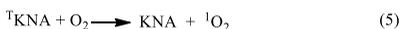
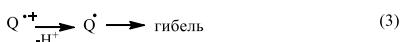
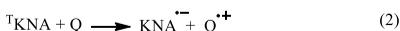
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Фотохимические реакции KNA с биологическими молекулами

В рамках диссертационной работы были выполнены исследования первичных

фотохимических реакций триплетного состояния KNA (1KNA) с биологически важными молекулами – аминокислотами, антиоксидантами, кислородом и белками.

На первом этапе исследования были получены константы скорости тушения 1KNA аминокислотами (триптофан, тирозин, цистеин, гистидин, фенилаланин и метионин), и антиоксидантами – аскорбатом (Asc) и глутатионом (GSH), которые присутствуют в хрусталике в значительных количествах. Рассматриваемые аминокислоты являются эффективными донорами электронов и активно участвуют в процессах тушения возбужденных состояний. Метионин, цистеин и GSH были выбраны из-за наличия SH-группы (с замещенной метильной группой в случае метионина), которая потенциально может участвовать в подобных процессах. Схема реакций, протекающих в растворе, может быть представлена следующим образом (Q – молекула-тушитель):



Результаты работы показали, что наибольшие значения констант скорости тушения демонстрируют кислород и аминокислоты Trp, Tyr и Cys (Таблица 1). Основываясь на полученных значениях, можно сделать вывод, что другие аминокислоты (His, Phe и Met) не являются эффективными тушителями 1KNA . Среди антиоксидантов наибольшее значение константы скорости тушения возбужденного состояния KNA демонстрирует Asc, который является эффективным тушителем триплетного состояния УФ-фильтров хрусталика. Значительное снижение константы скорости реакции с участием GSH по сравнению с Cys, вероятно, связано с наличием заместителей по его N- и C-концам (глутамина и глицина), которые стерически затрудняют реакцию с 1KNA .

Таблица 1. Константы скорости тушения 1KNA различными тушителями в нативных и денатурирующих условиях.

Тушитель	$k_q \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	
	PBS	PBS / 6M мочеви́на
Триптофан (Trp)	25.3 ± 3.0	16.0 ± 2.2
Тирозин (Tyr)	5.2 ± 1.0	2.2 ± 0.4
Цистеин (Cys)	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Гистидин (His)	< 0.01	< 0.01
Фенилаланин (Phe)	< 0.01	< 0.01
Метионин (Met)	< 0.01	< 0.01
Аскорбат (Asc)	14.0 ± 1.4	11.0 ± 1.1
Глутатион (GSH)	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Кислород	23.0 ± 2.3	13.0 ± 1.3
Лизоцим	7.7 ± 1.5	4.0 ± 0.2
α-кристаллин	-	9.4 ± 0.9

На Рис. 1 приведены спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные при лазерном фотоллизе 0.3 мМ KNA в присутствии 1.0 мМ Trp или 1.0 мМ Tyr в фосфатно-солевом буферном водном растворе (PBS, pH 7.4). Представленные спектры соответствуют короткоживущим частицам,

образующимся после тушения ^1KNA . В случае Trp и Tug наблюдаются полосы промежуточного поглощения с максимумами на 510 нм и 410 нм, соответственно, которые ранее наблюдали для радикалов этих аминокислот. Таким образом, можно сделать вывод, что тушение ^1KNA происходит с образованием радикалов аминокислот и $\text{KNA}^{\cdot-}$. Наличие $\text{KNA}^{\cdot-}$ подтверждается отрицательными значениями промежуточного поглощения в районе 310-350 нм, что указывает на уменьшение концентрации KNA в основном состоянии за счет её перехода в продукты реакции. На основании полученных данных можно сделать вывод, что аминокислотные остатки белков Trp и Tug являются наиболее уязвимыми для атаки ^1KNA , поскольку именно эти аминокислоты демонстрируют значительно более высокие значения констант скорости тушения ^1KNA , чем остальные аминокислоты (Таблица 1).

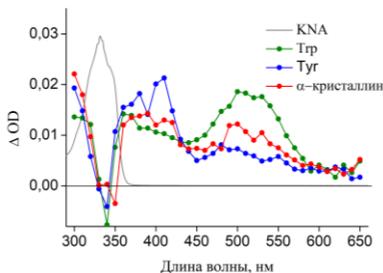


Рис. 1. Спектры поглощения промежуточных частиц, полученные при фотолизе на длине волны 355 нм KNA в насыщенном аргоне растворе через 37 мкс после лазерной вспышки: зеленые кружки - в присутствии Trp; синие - при наличии Tug; красные - в присутствии α -кристаллина. Серая линия: стационарный спектр поглощения KNA.

Далее были проведены исследования фотохимических реакций ^1KNA со следующими белками: (1) модельным белком лизоцимом (Hen Egg White Lysozyme, HEWL) и (2) белками хрусталика животного происхождения (*Bos taurus* L., Bovine) – кристаллинами. Кристаллины, высокостабильные водорастворимые белки хрусталика, традиционно подразделяются на три больших гетерогенных семейства: альфа- (α), бета- (β) и гамма- (γ) кристаллины, различающиеся по строению и функциям. В pH нейтральных водных растворах α -кристаллины образуют нековалентно связанные комплексы с высокой молекулярной массой, включающие в себя 15-60 мономерных субъединиц, β -кристаллины образуют комплексы, состоящие из 2-8 мономерных субъединиц, а γ -кристаллины присутствуют строго в мономерной форме. В каждом семействе содержится от двух до семи белков, которые характеризуются высокой гомологией аминокислотных последовательностей. Ввиду сложности структуры кристаллинов в качестве модельной системы для исследования фотохимических реакций KNA с белками был выбран лизоцим (HEWL) – коммерчески доступный мономерный белок с хорошо известной структурой.

Результаты работы показали, что HEWL способен вступать в реакции тушения ^1KNA с высокой константой скорости с образованием радикалов (Таблица 1). На спектре промежуточного поглощения, полученном при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 1.0 мМ HEWL, наблюдается суперпозиция спектров поглощения анион радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ и радикала Trp $^{\cdot}$. При этом не наблюдается узкой полосы поглощения с максимумом на 410 нм, соответствующей поглощению радикалов Tug $^{\cdot}$. Это говорит о незначительном

вкладе остатков Туг в процесс тушения ^1KNA лизоцимом, которые согласно рентгеноструктурным данным скрыты внутри белковой глобулы. В аминокислотную последовательность лизоцима входят 6 остатков Тгр, один из которых наиболее доступен для молекул растворителя (Тгр62), два наполовину погружены в белковую глобулу (Тгр63 и Тгр123), и три из них находятся глубоко внутри белковой глобулы (Тгр28, Тгр108, Тгр111). Как будет показано ниже, основной вклад в наблюдаемую после тушения полосу поглощения на 510 нм, соответствующую поглощению нейтрального радикала Тгр * , следует отнести к Тгр62, как наиболее доступному для атаки ^1KNA .

Кристаллины, выделенные из хрусталиков *Bos taurus*, были разделены с помощью гель-проникающей хроматографии на 4 фракции (α -, β_h -, β_L - и γ -кристаллины). Обозначения β_h и β_L относятся к высокомолекулярным (октомерам) и низкомолекулярным (димерам) комплексам β -кристаллина, соответственно. В Таблицах 1 и 2 приведены значения констант скорости тушения ^1KNA белками хрусталика. Константа скорости тушения α -кристаллином в PBS (Таблица 2) является оценкой сверху, поскольку наблюдалось лишь незначительное изменение скорости гибели ^1KNA в присутствии белка в широком диапазоне концентраций (0-30 мг/мл). Причиной этого является свойство α -кристаллина образовывать мультимерные ковалентно несвязанные комплексы, которые ограничивают доступ ^1KNA к большинству остатков Тгр и Туг. Кроме того, образование комплексов в десятки раз снижает эффективную концентрацию тушителей в растворе (в состав каждого комплекса входит от 15 до 60 молекул). В связи с этим спектр промежуточного поглощения для α -кристаллина был записан в денатурирующих условиях (Рис. 1, PBS/6М мочеви́на), при которых мультимерные комплексы распадаются на одиночные молекулы. В денатурирующих условиях на спектре наблюдается наличие двух полос поглощения с максимумами, соответствующими поглощению нейтральных радикалов Тгр * (510 нм) и Туг * (410 нм). Это говорит о том, что тушение ^1KNA α -кристаллином проходит посредством реакций с аминокислотными остатками Тгр и Туг. В Таблице 1 приведено значение константы скорости тушения ^1KNA α -кристаллином в денатурирующих условиях (PBS/6М мочеви́на).

Таблица 2. Константы скорости тушения ^1KNA белками в нативных условиях (PBS).

	Тушитель				
	α -кристаллин	β_h -кристаллин	β_L -кристаллин	γ -кристаллин	HEWL
$k_q \times 10^3 \text{ мл мг}^{-1} \text{ с}^{-1}$	$\leq 3.7 \pm 0.7$	8.1 ± 1.6	15.0 ± 3.0	29.0 ± 5.8	53.8 ± 10.5

На Рис. 2 приведены спектры промежуточного поглощения, полученные при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 2.7 мг/мл α -кристаллина (PBS/6М мочеви́на), 5.3 мг/мл β -кристаллина (объединенная фракция β_h и β_L) и 5.6 мг/мл γ -кристаллина через 40 мкс после лазерного импульса. Сравнение спектров показывает, что фотолиз α - и β -кристаллинов в присутствии KNA протекает через взаимодействие с Тгр и Туг с образованием соответствующих нейтральных радикалов. С другой стороны, реакция ^1KNA с представителями семейства γ -кристаллинов протекает через остатки Туг, о чем свидетельствует наличие полосы поглощения с максимумом на 410 нм (Туг *). Наблюдаемые эффекты объясняются различным составом аминокислотных последовательностей белков: в составе

белков семейств α - и β -кристаллинов содержание остатков Туг и Тгр примерно одинаково, тогда как в случае γ -кристаллинов количество остатков Туг значительно превышает Тгр (Таблица 3). Кроме того, анализ трехмерных структур γ -кристаллинов показывает, что в нативных условиях остатки Тгр находятся внутри белковой глобулы, то есть недоступны для молекул растворителя и ^1KNA . Следовательно, вероятность ^1KNA встретиться с Туг значительно выше, чем с Тгр, поэтому сигнал радикала Тгр $^{\bullet}$ в спектре практически не наблюдается.

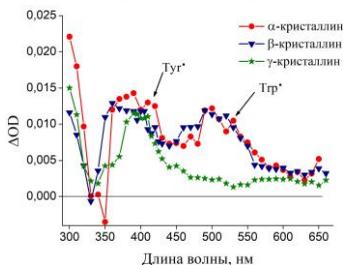


Рис. 2. Спектры поглощения промежуточных частиц, наблюдаемые при лазерном импульсном фотолизе раствора KNA с кристаллинами через 40 мкс после импульса лазера. α -Кристаллин в денатурирующих условиях (PBS/6M мочевины), β - и γ -кристаллины в нативных условиях (PBS).

Таблица 3. Содержание аминокислот в белках хрусталика *Bos taurus* и лизоциме.

Белки	Тгр	Туг	Сус
α -кристаллин	1-2	1-6	1
β -кристаллин	5-9	7-11	2-8
γ -кристаллин	4-5	12-15	5-10
лизоцим	6	3	8

Из общих соображений ясно, что способность белков хрусталика тушить ^1KNA зависит от следующих факторов: (1) аминокислотного состава белка, а именно, от количества Тгр и Туг аминокислотных остатков в полипептидной цепочке белка, (2) упаковки аминокислотных остатков внутри белковой глобулы и (3) от количества субъединиц, из которых состоит белок. Полученные результаты показывают, что константы скорости тушения увеличиваются в ряду α (мультимеры) $< \beta$ (октомеры) $< \gamma$ (димеры) $< \delta$ (мономеры). Это означает, что в случае кристаллинов упаковка белков и их трехмерная структура играют более важную роль, нежели количество аминокислотных остатков Тгр и Туг в их составе.

2. Димеризация и окисление аминокислоты триптофан в результате УФ-А фотолиза в присутствии кинуреновой кислоты

Было изучено влияние остаточного кислорода на протекание реакции между радикалами KNA^{\bullet} и N-ацетил-L-триптофана (NTгр $^{\bullet}$), производного Тгр, взятого для исследования (KNA^{\bullet} и NTгр $^{\bullet}$ - модельная система). Эксперименты в атмосфере аргона, воздуха и кислорода показали, что скорость гибели радикалов увеличивается пропорционально увеличению концентрации O_2 в растворе. Из литературных данных известно, что радикалы Тгр $^{\bullet}$ реагируют с O_2 с очень маленькой константой скорости ($\leq 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) и на использованной временной шкале эксперимента (10 мкс) наблюдать эту реакцию невозможно. Следовательно, наблюдаемый эффект следует отнести к реакции между KNA^{\bullet} и O_2 . Константа скорости этой реакции была определена как величина $(2.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Анализ спектров промежуточного поглощения показал, что после гибели радикала KNA^{\bullet} в диапазоне 350-650 нм наблюдается сигнал промежуточного поглощения, соответствующий радикалу NTгр $^{\bullet}$; сигналы от каких-либо других долгоживущих

частиц отсутствуют. Это указывает на то, что реакция между $\text{KNA}^{\bullet-}$ и O_2 протекает по механизму окисления $\text{KNA}^{\bullet-}$ с образованием супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$ (максимум поглощения на 240 нм). На Рис. 3 представлен спектр промежуточного поглощения радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$, полученного вычитанием спектра радикала NTGr^{\bullet} из спектра промежуточного поглощения, соответствующего сумме двух радикалов. Полученный спектр радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ имеет две широкие полосы поглощения с максимумами около 370 нм и 510 нм. Кроме того, в работе был рассчитан коэффициент экстинкции радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ ($\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}}$) на 510 нм:

$$\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}}(\lambda) = \epsilon_{\text{NTGr}^{\bullet}}(\lambda) * A(\lambda)/B(\lambda) \quad (6)$$

где $\epsilon_{\text{NTGr}^{\bullet}}(\lambda)$ - коэффициент экстинкции радикала NTGr^{\bullet} на длине волны λ , отношение $A(\lambda) / B(\lambda)$ экспериментально измерено. Из литературных данных известно, что $\epsilon_{\text{NTGr}^{\bullet}}(510 \text{ нм}) = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Таким образом, $\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}}(510 \text{ нм}) = 2100 \pm 200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

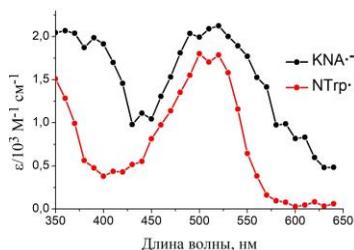


Рис. 3. Спектры поглощения радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTGr^{\bullet} .

Быстрое окисление радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ кислородом очень важно для всех дальнейших фотохимических исследований. Это означает, что для изучения прямых реакций между радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и аминокислот/белков необходимо, чтобы их концентрация превышала концентрацию остаточного кислорода. В противном случае происходит эффективное образование супероксид радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$, и дальнейшие реакции будут происходить между $\text{O}_2^{\bullet-}$ и радикалами аминокислот/белков.

Эксперименты по лазерному импульсному фотолизу KNA показали, что наименьшая концентрация кислорода, которая может быть получена барботированием аргона через раствор, составляет величину 5-10 мкМ. В то же время концентрация образующихся под действием света радикалов может быть изменена путем использования импульсного (лазерный импульс продолжительностью 8 нс) или стационарного (ртутная лампа высокой мощности) источника света. В первом случае концентрация радикалов варьируется в диапазоне 20-40 мкМ, а во втором может быть оценена как величина меньше 0.1 мкМ. Таким образом, во всех дальнейших исследованиях эксперименты были проведены при фотолизе либо с использованием импульсного излучения, что приводит к прямым реакциям между $\text{KNA}^{\bullet-}$ и радикалами аминокислот/белков (тип Ia), либо с использованием стационарного излучения, что приводит к реакциям между $\text{O}_2^{\bullet-}$ и радикалами аминокислот/белков (тип Ib).

Далее были проведены исследования механизма обоих типов фотолиза (тип Ia и Ib) и основных продуктов фотохимических реакций. Образцы, содержащие 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTGrH в PBS, облучали с помощью двух типов источников

света: импульсный лазер (355 нм, фотолиз типа Ia) и ртутная лампа непрерывного излучения (355-380 нм, фотолиз типа Ib).

Фотолиз типа Ib растворов показал, что скорость разложения NTpH зависит от концентрации O₂ в растворе и значительно превышает скорость разложения KNA (Рис. 4 (А) и (Б), Таблица 4). Различия в скорости разложения исходных форм NTpH и KNA связаны с участием O₂^{•-} и ¹O₂ в фотохимических реакциях. Синглетный кислород может образовываться в реакциях тушения ¹KNA кислородом (тип II) и затем окислять аминокислоту. Контрольные эксперименты по фотолизу в D₂O, в которой время жизни ¹O₂ значительно увеличивается, показали, что фоторазложение NTpH в D₂O в атмосфере воздуха и кислорода увеличивается в 2 раза по сравнению с аналогичными экспериментами в H₂O, в то время как для анаэробных условий Φ_{дегр} не изменяется (Таблица 4). Таким образом, в анаэробных условиях реакции с ¹O₂ дают незначительный вклад в общую гибель реагентов, и тушение ¹KNA происходит только в реакции с NTpH. Следовательно, значительное увеличение разложения NTpH в аэробных условиях следует связать с реакцией NTpH с ¹O₂ с образованием окисленных продуктов.

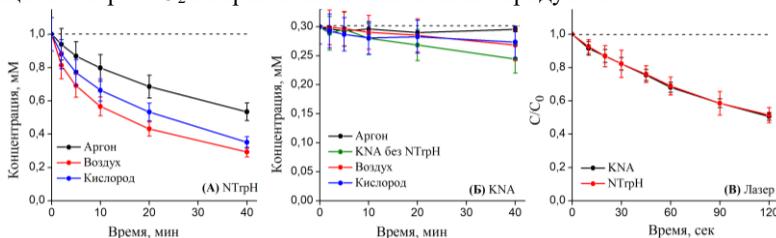


Рис. 4. Зависимости степени разложения (А) NTpH и (Б) KNA при УФ-А фотолизе типа Ib KNA и NTpH в PBS от дозы облучения: черная линия – под аргоном; красная – под воздухом и синяя – под кислородом. (Б) зеленая линия – фоторазложение KNA под аргоном в отсутствие NTpH. (В): Зависимости разложения NTpH и KNA от времени облучения относительно их начальных концентраций (C/C₀) при фотолизе типа Ia KNA и NTpH в PBS в атмосфере аргона. Каждая точка представляет собой среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Таблица 4. Квантовые выходы разложения (Φ_{дегр}) KNA и NTpH в PBS (pH 7.4) при фотолизе типа Ia и Ib.

Источник излучения	Условия	Растворитель	Φ _{дегр} (KNA) / %	Φ _{дегр} (NTpH) / %
Лампа (355-380 нм)	Аргон, без NTpH	H ₂ O	0.11 ± 0.02	–
	Аргон	H ₂ O	0.021 ± 0.013	1.6 ± 0.3
		D ₂ O	0.041 ± 0.018	1.6 ± 0.4
	Воздух	H ₂ O	0.055 ± 0.009	7.3 ± 1.4
		D ₂ O	0.067 ± 0.021	14.0 ± 2.8
	Кислород	H ₂ O	0.043 ± 0.025	3.6 ± 0.2
D ₂ O		0.053 ± 0.034	5.8 ± 1.2	
Лазер (355 нм)	Аргон	H ₂ O	5.7 ± 1.1	19.0 ± 3.8

При фотолизе типа Ia происходит генерация высоких концентраций ¹KNA и радикалов за короткое время. Как видно из Таблицы 4, Φ_{дегр} реагентов значительно возрастают при переходе от типа Ib к типу Ia, что может быть вызвано прямыми реакциями между радикалами KNA^{•-} и NTpH с образованием продуктов. Следует также отметить, что зависимости C/C₀ для KNA и NTpH совпадают (Рис. 4 (В));

это указывает на то, что при фоторазложении одной молекулы KNA происходит деградация трех молекул NTpH. При фотолизе типа Ib концентрация радикалов значительно ниже, и образовавшиеся радикалы KNA⁻ в основном участвуют в реакциях с O₂ в растворе с восстановлением диамагнитной молекулы KNA и образованием O₂⁻. Последний реагирует с NTpH в реакциях рекомбинации с образованием окисленного NTpH или через обратный перенос электрона с восстановлением радикала NTpH[•] в диамагнитное состояние NTpH. Результаты настоящей работы показывают, что несмотря на то, что в анаэробных условиях образование O₂⁻ происходит с высокой эффективностью, квантовый выход разложения NTpH составляет всего 1.6% (Таблица 4). Следовательно, реакция восстановления аминокислоты является основным путем взаимодействия между O₂⁻ и NTpH[•], тогда как вклад от реакции с образованием окисленных продуктов в фоторазложение аминокислоты незначителен.

Как видно из Таблицы 4, квантовые выходы разложения исходных веществ при обоих типах фотолиза значительно ниже квантового выхода триплетного состояния ¹KNA (82%). Это указывает на то, что основным путем гибели радикалов является обратный перенос электрона с восстановлением исходных соединений.

Масс-спектрометрический анализ образцов после фотолиза Ia и Ib показал, что в обоих случаях составы продуктов практически одинаковы. К продуктам фоторазложения KNA относятся соединения 4-гидроксихинолин (4HQ, m/z 146.0595) и 1,4-дигидрохинолин-2-карбоновая кислота (1,4-DHQ, m/z 176.0710), а также их димеры с потерей двух атомов кислорода и добавлением (m/z 349.1182, ddO-KNA₁) или потерей (m/z 345.0869, ddO-KNA₂) двух атомов водорода. На основании МС/МС спектров и сравнении спектров поглощения с литературными данными были предложены их структуры (Рис. 5). Эти продукты образуются из KNA в реакциях, приводящих к отрыву атома кислорода из карбоксильной или карбонильной группы, и последующей димеризацией. Содержание этих продуктов монотонно возрастает при увеличении дозы облучения в обоих случаях фотолиза, однако, общее содержание в растворе практически на порядок выше в случае фотолиза типа Ia. Важно отметить, что эти продукты не образуются при аэробном фотолизе (тип II), что свидетельствует об эффективном взаимодействии ¹KNA с кислородом. Наличие продуктов распада KNA в случае фотолиза типа Ib указывает на то, что реакция между KNA⁻ и кислородом происходит недостаточно быстро, чтобы полностью исключить прямые реакции между радикалами KNA⁻ и аминокислоты.

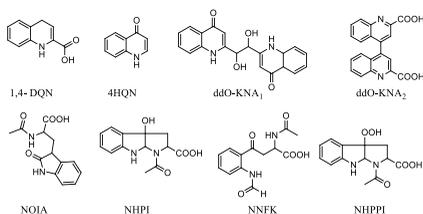


Рис. 5. Структуры продуктов фотохимических реакций между KNA и NTpH.

Были обнаружены два типа продуктов распада NTpH: присоединение одного

или двух атомов кислорода (окисление) и образование ковалентно связанных димеров. Продукты окисления NTpH были идентифицированы на основании совпадения их спектров оптического поглощения с литературными данными по окисленным формам Tp. Таким образом, однократно окисленным производным соответствуют: N-ацетил-оксиндолаланин (NOIA) и N-ацетил-3 α -гидрокси-пирролоиндол (NHPI), а к двукратно окисленным относятся: N-ацетил-N-формилкинуренин (NNFK) и N-ацетил-3 α -гидроперокси-пирролоиндол (NHPP1) (Рис. 5). Продукты окисления аминокислоты присутствуют в следовых количествах в исходном растворе, и их содержание существенно увеличивается в зависимости от времени облучения. Важно отметить, что в случае типа Ia/Ib реакций общее содержание продуктов окисления не превышает 20% от общего распада NTpH, тогда как в случае фотолиза тип II эти продукты составляют более 90% от итоговой дегградации аминокислоты.

Ковалентно связанные продукты NTpH были обнаружены в форме димеров (доминирующие продукты), тримеров и тетрамеров (следовые количества). Каждая мультимерная форма демонстрирует несколько отдельных пиков на хроматограммах. Было зарегистрировано семь и шесть различных димеров аминокислоты в случаях фотолиза типа Ia и Ib, соответственно. Эти продукты были отнесены к димерам NTpH, ковалентно связанным по различным положениям индольного кольца и/или аминокислотного остова. Некоторые димеры демонстрируют близкие спектры оптического поглощения и спектры МС/МС фрагментации при МС анализе, что дает основание предполагать, что часть димеров NTpH являются диастереоизомерами. Кроме того, некоторые димерные структуры, вероятно, менее стабильны, чем другие: даже при мягкой ионизации электро-спреем они демонстрируют различную степень фрагментации с образованием иона с m/z 245.0920, соответствующего мономеру NTpH с потерей двух протонов. Полученные результаты явно показывают, что эти мультимерные формы образуются в результате комбинации радикалов NTpH $^{\bullet}$. Димеры исходной формы KNA не были обнаружены, что свидетельствует о том, что реакция между двумя KNA $^{\bullet}$ протекает со значительно меньшей константой скорости, чем реакция образования димеров NTpH. Таким образом, низкая константа скорости реакции образования димеров KNA и восстановления KNA $^{\bullet}$ молекулярным кислородом объясняет отношение квантовых выходов разложения реагентов, $\Phi_{\text{дегр}}(\text{NTpH})/\Phi_{\text{дегр}}(\text{KNA}) \approx 3$ (Таблица 4).

В случае реакций типа Ia были идентифицированы продукты ковалентного связывания KNA и триптофана, KNA-NTpH (m/z 434.1349). Было обнаружено по меньшей мере 6 различных пиков в МС-хроматограммах, что указывает на реакцию комбинации радикалов KNA $^{\bullet}$ и NTpH $^{\bullet}$ по различным положениям ароматического кольца как в структуре KNA, так и в аминокислоте. Структуры этих продуктов не были определены из-за низкой интенсивности сигнала.

Контрольные эксперименты по фотолизу типа Ib растворов KNA без NTpH в анаэробных условиях, а также по инкубации KNA с NTpH в полной темноте показали, что все описанные выше продукты образуются только при фотоиндуцированных реакциях KNA с аминокислотой.

На Схеме 1 представлен механизм фотохимических реакций между KNA и

NTpH и продукты радикальных реакций, которые могут образовываться в водных растворах после тушения ^1KNA аминокислотой. Вероятно, эта схема справедлива и для других фотосенсибилизаторов, реагирующих с Trp посредством переноса электрона, включая кинуренины. Хотя химическая природа фотосенсибилизатора может оказывать сильное влияние на константы скорости и эффективность реакций, принципиальная схема не должна меняться. Таким образом, было сформулировано предположение о том, что молекулярные УФ-фильтры могут участвовать в радикальных реакциях в тканях хрусталика глаза, приводя к сшиванию белков, хотя и с небольшими выходами.

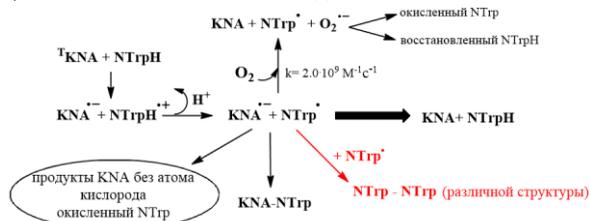


Схема 1. Механизм фотоиндуцированных реакций между ^1KNA и NTpH.

3. Повреждения белка лизоцима в результате УФ-А фотолиза типа I в присутствии кинуреновой кислоты

В ходе выполнения диссертационной работы были исследованы механизмы анаэробного фотоповреждения типа I модельного белка лизоцима (HEWL) в присутствии KNA. Целью экспериментов было изучение того, как белковое окружение может влиять на радикальные реакции между KNA и триптофаном. Как было показано выше, ^1KNA реагирует с HEWL через аминокислотные остатки Trp с образованием соответствующих радикалов. В настоящем исследовании были установлены пути повреждения белка в результате прямых реакций между радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и HEWL^{\bullet} (тип Ia) и в результате реакций между супероксидом $\text{O}_2^{\bullet-}$ и HEWL^{\bullet} (тип Ib). Стоит отметить, что фотолизы типа Ia и Ib были проведены с разными дозами облучения, 10 и 30 Дж, соответственно, поскольку в случае реакций типа Ib распад исходных реагентов был существенно ниже по сравнению с типом Ia.

Общее повреждение белка после фотолиза можно определить по снижению его ферментативной активности. На Рис. 6 показана ферментативная активность HEWL по отношению к клеточной культуре *M. lysodeikticus* в зависимости от его концентрации при pH 6.2 до и после обоих типов УФ-А фотолиза. Как видно из графика, в линейном диапазоне используемых концентраций HEWL ферментативная активность облученного белка снижается относительно активности исходного. Несмотря на то, что при фотолизе типа Ia система поглотила меньшее количество энергии света, ферментативная активность HEWL снижается значительно больше, чем в случае фотолиза типа Ib. Следовательно, прямые реакции между радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и HEWL^{\bullet} приводят к большему повреждению белка, чем реакции между супероксидом $\text{O}_2^{\bullet-}$ и HEWL^{\bullet} . Присутствие KNA в растворе не оказывает влияние на ферментативную активность HEWL.

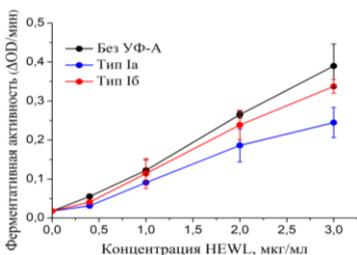


Рис. 6. Ферментативная активность HEWL до (черные кружки) и после фотолиза типа Ia (синие кружки) и типа Ib (красные кружки), определенная по уменьшению светорассеяния суспензии клеток *M. lysodeikticus* на 450 нм в 50 мМ PBS (pH 6.2), содержащем различные концентрации фермента. Активность выражается как скорость изменения поглощения в минуту.

Как было описано выше, основными продуктами фотолизом обоих типов являются ковалентно связанные димеры аминокислоты триптофан. С целью установления образования аналогичных олигомерных форм HEWL был проведен анализ образцов до и после фотолиза методом гель-электрофореза. На Рис. 7 приведены изображения гелей, содержащих HEWL при различных дозах облучения в процессе фотолизом типа Ia и Ib. В обоих случаях наблюдается формирование полос, соответствующих олигомерным (димерным и тримерным) формам белка, интенсивность которых увеличивается с увеличением дозы облучения. Образование олигомеров HEWL значительно более выражено в случае фотолиза типа Ia по сравнению с типом Ib. Денситометрический анализ показал, что относительные содержания димеров HEWL составляли $27 \pm 4\%$ и $7 \pm 2\%$, что соответствует квантовым выходам димеризации ($\Phi_{\text{димер}}$) $0.82 \pm 0.12\%$ и $0.074 \pm 0.021\%$ для типов Ia и Ib, соответственно. Контрольные эксперименты по инкубации растворов KNA с HEWL в полной темноте и по фотолизу HEWL без KNA в анаэробных условиях показали, что олигомерные формы лизоцима образуются только при фотоиндуцированных реакциях с KNA.

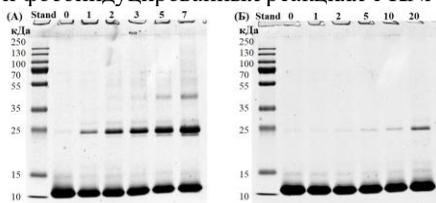


Рис. 7. 15%- SDS-ПАА гели, содержащие в дорожках образцы, отобранные во время УФ-А фотолиза типа Ia (A) и типа Ib (B) раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4). Дорожки Stand – смесь стандартов молекулярных масс белков, дорожки 2–7 – содержат пробы образцов с различными дозами облучения, указанными в верхней части гелей (минуты фотолиза). Гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Методами оптической спектроскопии (поглощение и флуоресценция) были изучены растворы белков, очищенные от молекул с низкой молекулярной массой (KNA и ее продукты фотолиза), до и после фотолиза. На спектрах оптического поглощения наблюдается образование новой полосы поглощения с максимумом на 335 нм. Флуоресцентный анализ показал, что облучение HEWL приводит к существенному снижению флуоресценции от остатков Trp, что указывает на их участие в фотохимических реакциях. Возбуждение на длинах волн в диапазоне 320–400 нм, соответствующих новой полосе поглощения, приводит к регистрации двух полос излучения с максимумами на 405 нм и 470 нм, что свидетельствует о

формировании, по меньшей мере, двух типов флуоресцентных модификаций в ходе фотоллиза. Изменения спектральных свойств белка наиболее выражены в случае фотоллиза типа Ia.

Анализ состава молекул с низкой молекулярной массой до и после обоих типов фотоллиза методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС показал, что фотохимические реакции KNA с HEWL приводят к образованию тех же продуктов распада KNA, которые наблюдались ранее в случае NTpH (Рис. 5). Образование продуктов фотодегградации KNA более выражено в случае фотоллиза типа Ia по сравнению с типом Ib. На основании полученных данных были определены квантовые выходы фотодегградации KNA ($\Phi_{\text{дегр}}$), представленные в Таблице 5.

Таблица 5. Квантовые выходы разложения ($\Phi_{\text{дегр}}$) KNA и HEWL в PBS (pH 7.4) при анаэробном УФ-А фотоллизе типа Ia и типа Ib.

Тип фотоллиза	$\Phi_{\text{дегр}}(\text{KNA}) / \%$	$\Phi_{\text{дегр}}(\text{HEWL}) / \%$
Тип Ia	1.0 ± 0.2	$1.3 \pm 0.3\%$
Тип Ib	0.03 ± 0.01	$0.12 \pm 0.03\%$

Масс-спектрометрический анализ целого белка показал, что в процессе обоих типов фотоллизом наблюдается существенное уменьшение содержания исходного HEWL и увеличение содержания его окисленных и олигомерных форм, преимущественно димерных. На Рис. 8 показана зависимость изменения концентрации исходной формы белка и продуктов, образующихся из HEWL во время обоих типов фотоллизом от количества поглощённой энергии света. По данным на Рис. 8А были рассчитаны значения $\Phi_{\text{дегр}}$ для HEWL (Таблица 5). На основании этих данных можно сделать вывод, что фотоллиз по типу Ia приводит к значительно большему повреждению как KNA, так и белка, по сравнению с типом Ib. Однако, значения $\Phi_{\text{дегр}}$ в обоих случаях фотоллиза, как и в случае реакций с одиночной аминокислотой, значительно меньше квантового выхода ^1KNA (82%). Следовательно, основным каналом гибели образовавшихся радикалов остаётся обратный перенос электрона с образованием исходных реагентов. Малое фоторазложение белка в случае фотоллиза типа Ib, по всей видимости, связано с преобладанием реакции восстановления исходных реагентов над комбинацией радикалов HEWL \cdot и O $_2^{\cdot-}$. Результаты однозначно указывают на то, что присутствие кислоты в растворе значительно снижает повреждение HEWL в результате фотоллиза типа Ib.

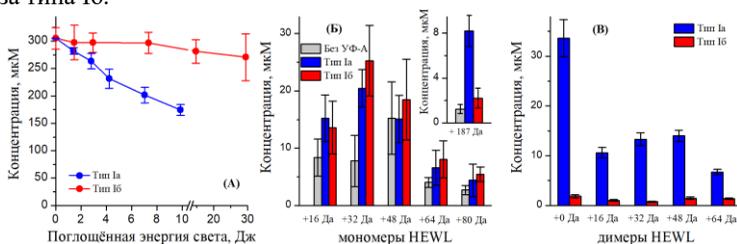


Рис. 8. ВЭЖХ-МС анализ HEWL до и после фотоллиза типа Ia и типа Ib. (А) Зависимость концентрации исходного HEWL со средней массой 14303.85 Да от количества поглощенной энергии света во время обоих типов фотоллиза. (Б, В) Концентрации (Б) мономерных и (В) димерных продуктов HEWL, образованных до и после фотоллизом типа Ia и типа Ib. На вставке рисунка (Б) показана концентрация продукта KNA-HEWL (+187 Да).

Основными продуктами радикальных реакций в обоих типах фотоллиза

являются ковалентно связанные димеры HEWL, которые доминируют в случае фотоллиза типа Ia. В случае реакций по типу Ib, в котором основным каналом гибели HEWL* являются реакции с O₂^{•-}, на долю димеров приходится примерно половина от всего количества образовавшихся продуктов. Полученные результаты хорошо согласуются с данными электрофоретического анализа (Рис. 7) и с результатами, описанными в главе 2 автореферата. Фотоллиз обоих типов приводит к образованию примерно одинакового количества окисленных производных белка, вероятно, это может указывать на вклад реакций между HEWL и ¹O₂, который в незначительных количествах может образовываться в условиях проведенного эксперимента.

Характерной особенностью фотоллиза типа Ia является ковалентное присоединение KNA к HEWL с потерей двух протонов (+187 Да). Отсутствие данной модификации в случае фотоллиза Ib явно указывает на эффективное окисление радикала KNA^{•-} остаточным кислородом при данном типе фотоллиза.

Для идентификации положения и типа модификаций, образовавшихся в результате фотохимических реакций, образцы HEWL до и после УФ-А фотоллиза подвергались ферментативному гидролизу трипсином и анализировались методом ВЭЖХ-МС. Анализ показал, что в фотохимических реакциях участвуют только пептиды HEWL, содержащие аминокислотные остатки Trp (W), Tyr (Y) и Met (M). В Таблице 6 собрана краткая информация о найденных модификациях.

Известно, что аминокислотные остатки Met и Trp являются основными мишенями для окисления различными реакционно-активными частицами. При масс-спектрометрическом анализе был обнаружен пептид с окислением по Met105, содержание которого увеличивается в результате УФ-А фотоллиза типа Ia и Ib (Таблица 6). Вполне вероятно, что окисление по остаткам Met105 белка происходит в реакциях с ¹O₂, поскольку, как было показано выше, метионин не является эффективным тушителем ¹KNA (Таблица 1). Константа скорости реакции метионина с ¹O₂ значительно выше, чем с ¹KNA.

Таблица 6. Пептиды HEWL и их идентифицированные модификации после фотоллизом типа Ia и типа Ib.

Последовательность	[M+H] ⁺	Модификации	
		Тип Ia	Тип Ib
G ²² YSLGNWVC*AAK ³³	1325.6306	Ковалентная связь: Y ²³ -Y ²³ , W ⁶² -Y ²³	Одно- и двукратное [§] окисление W ²⁸ (+16 Да и +32 Да). Ковалентная связь: W ⁶² -Y ²³
W ⁶² WC*NDGR ⁶⁸	993.3995	Одно [§] - и двукратное окисление W ⁶² (+16 Да и +32 Да). Ковалентная связь: W ⁶² -W ⁶² , W ⁶² -Y ²³ . Присоединение KNA к W ⁶² .	Одно [§] - и двукратное окисление W ⁶² (+16 Да и +32 Да), Ковалентная связь: W ⁶² -Y ²³
I ⁹⁸ VSDGNGMNAWVAWR ¹¹²	1675.8009	Однократное окисление M ¹⁰⁵ (+16 Да), Потеря – 2Да на (W ¹⁰⁸ /W ¹¹¹) [§]	
G ¹¹⁷ TDVQAWIR ¹²⁵	1045.5425	Одно- и двукратное окисление W ¹²³ (+16 Да и +32 Да). Присоединение KNA к W ¹²³ [§]	Одно- и двукратное окисление W ¹²³ (+16 Да и +32 Да).

* - остатки цистеина, модифицированные йодацетамидом (+57.02 Да)

§ - структура и положение модификации не подтверждены МС/МС анализом

Кроме того, были обнаружены пептиды с присоединением одного и двух атомов кислорода к аминокислотным остаткам Trp28, Trp62 и Trp123 (Таблица 6). Основываясь на результатах работы по фотолизу одиночной аминокислоты NTrpH в присутствии KNA, обнаруженные окисленные пептиды также можно отнести к различным гидроксипирироиндольным и гидропероксипирироиндольным продуктам окисления Trp. Количество всех описанных окисленных Trp-содержащих пептидов значительно повышается в результате обоих типов фотолиза. Единственным исключением являются пептиды с присоединением одного и двух атомов кислорода к Trp28, количество которых заметно увеличивается только в результате фотолиза типа Ib. Структуры всех описанных продуктов были подтверждены МС/МС фрагментацией.

В растворах образцов после обоих типов фотолиза были обнаружены ковалентно связанные пептиды. Для подтверждения структур димеров полосы, соответствующие мономерным и димерным формам белка, вырезали из геля (Рис. 7), белки подвергали селективному ферментативному гидролизу трипсином и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Полученные МС/МС спектры однозначно подтверждают образование ковалентных связей через Trp62 и Trp23. Ковалентно связанные пептиды были обнаружены только в экстрактах из полос, соответствующих димерным формам белка, и отсутствуют в его мономерах. Димер Trp62-Trp23 является продуктом обоих типов фотолизисов, а два других (Trp62-Trp62 и Trp23-Trp23) были обнаружены только в случае фотолиза типа Ia. Образование димера Trp23-Trp23 свидетельствует о том, что формирование радикалов на аминокислотных остатках Trp происходит также эффективно, как и на остатках Trp, несмотря на то, что на спектрах поглощения промежуточных частиц для HEWL не наблюдалось образование сигнала, соответствующего радикалу Trp. Вероятно, радикал на Trp образуется в результате внутримолекулярного переноса электрона от Trp к расположенному на некотором расстоянии радикалу Trp^{*}, что хорошо описано в литературе.

Ковалентное присоединение KNA к аминокислотным остаткам Trp было обнаружено для двух пептидов (Таблица 6), что подтверждает наблюдаемое увеличение сигнала, соответствующего массе KNA-HEWL. Определить положение модификации с помощью МС/МС фрагментации удалось только для пептида KNA-(W⁶²WC*NDGR⁶⁸). В случае пептида G¹¹⁷TDVQAWIR¹²⁵ было предположено, что присоединение KNA происходит по остатку Trp123. Необходимо отметить, что ковалентное связывание KNA с белком по остаткам Trp было обнаружено впервые. В случае одиночной аминокислоты, количество продуктов KNA-NTrp примерно на три порядка меньше количества димеров NTrp, в то время как для реакций с HEWL в случае фотолиза типа Ia разница между ними всего один порядок. Это указывает на то, что белковая среда значительно повышает эффективность реакции комбинации KNA⁻ и HEWL^{*} с образованием KNA-HEWL.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют значительное разложение белка во время фотолиза типа Ia с образованием различных олигомерных и окисленных форм HEWL и нескольких продуктов фоторазложения KNA. Основными продуктами реакции являются димеры белка и продукты ковалентного присоединения KNA к белку через остатки Trp. Реакции типа Ib

приводят к значительно меньшему повреждению HEWL. Низкие значения $\Phi_{\text{дегр}}$ (Таблица 6) для обоих типов фотолиза указывают на то, что обратный перенос электрона с восстановлением исходных реагентов является основным путём гибели радикалов, который более эффективно протекает в случае реакций типа Ib. Следовательно, в тканях с низким содержанием кислорода, таких как хрусталик, прямые радикальные реакции по механизму типа Ia могут вызывать значительно большие повреждения белков, что приводит к их димеризации и окислению. Накопление этих модификаций может вызвать развитие различных заболеваний, в частности катаракты.

4. Фотолиз кристаллинов в присутствии кинуреновой кислоты

В рамках работы был исследован характер модификации белков хрусталика, вызванных взаимодействиями с фотовозбужденной KNA в анаэробных условиях, с учётом полученных ранее результатов. Эксперименты были проведены преимущественно с использованием фотолиза типа Ia, как наиболее опасного для белков. Дополнительно к нативным условиям, были проведены эксперименты в денатурирующих условиях (PBS/ 6М мочеви́на) с целью сравнения динамики фотоиндуцированной модификации кристаллинов в нативной мультимерной и денатурированной мономерной формах.

Образцы, содержащие KNA и кристаллины, до и после фотолиза типа Ia были разделены на фракции с низкой молекулярной массой (менее 3 кДа, KNA и продукты ее разложения) и высокой молекулярной массой (более 3 кДа, белки). Анализ белковой фракции для β - и γ -кристаллинов методами оптической спектроскопии показал существенное уменьшение флуоресценции от остатков Trp и образование новой полосы поглощения с максимумом на 335 нм. При денатурации белков наблюдается ещё большее уменьшение флуоресценции от остатков Trp и увеличение интенсивности поглощения на 335 нм. Таким образом, наблюдалось образование модификаций, обладающих спектральными свойствами, сильно отличающимися от спектров поглощения Trp и Tug, аналогично ранее наблюдавшимся для HEWL.

Анализ фракции, содержащей соединения с низкой молекулярной массой, был проведён методом ВЭЖХ-МС. Для трех основных семейств кристаллинов основными продуктами распада KNA являлись 1,4-DHQ, 4HQN, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ (Рис. 5), которые были обнаружены как в случае фотохимических реакций KNA с одиночной аминокислотой, так и с HEWL. Количество всех четырёх продуктов монотонно увеличивается во время фотолиза. Полученные результаты показывают, что фотохимические реакции KNA с кристаллинами и с модельными системами (NTTrp и HEWL) протекают по сходным механизмам.

Образование олигомерных форм белков всех трех семейств кристаллинов при анаэробном KNA-сенситивизированном фотолизе (типов Ia и Ib) было подтверждено методом гель-электрофореза. В качестве примера на Рис. 9 приведены изображения гелей для γ -кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях (PBS/ 6М мочеви́на). Рис. 9А показывает, что УФ-А фотолиз в нативных условиях приводит к интенсивному образованию олигомерных форм и уменьшению содержания мономерной формы белка. Для α - и β -кристаллинов наблюдались аналогичные эффекты.

Денатурирующие условия по-разному влияют на олигомеризацию всех трех семейств белков. В случае γ -кристаллинов наблюдается существенное замедление этого процесса, см. Рис 9Б. По-видимому, это связано с замедлением реакций комбинации радикалов в силу потери белками природной трехмерной структуры и гибели радикалов по иным механизмам. Однако, в случае α - и β -кристаллинов олигомеризация существенно ускоряется при денатурирующих условиях. Это является следствием того, что в денатурирующих условиях эти белки не образуют мультимерные комплексы, а в мономерных формах остатки Trp и Tug становятся значительно более доступными для атаки ^1KNA и дальнейших радикальных реакций, приводящих к олигомеризации белков. Таким образом, денатурирующие условия, приводящие к разрушению мультимерных комплексов, существенно ускоряют фотоиндуцированную олигомеризацию белков, однако, потеря пространственной структуры белков может приводить к замедлению этого нежелательного процесса.

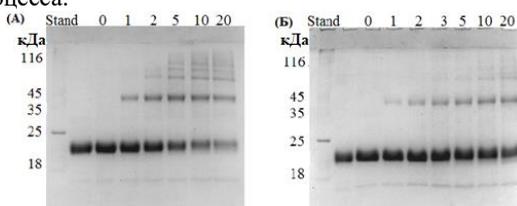


Рис. 9. 15%-SDS-ПАА гель γ -кристаллина после УФ-А фотолиза типа Ia в присутствии KNA в нативных (А) и денатурирующих условиях (6 М мочевины) (Б): дорожка Stand соответствует стандарту молекулярных масс, следующая дорожка соответствует образцу без барботирования и облучения. Для остальных дорожек указана продолжительность фотолиза (в минутах). Гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Для сравнения характера и динамики олигомеризации кристаллинов при фотолизах типа Iб и II были проведены аналогичные эксперименты с γ -кристаллином в нативных условиях в атмосфере аргона и кислорода с использованием в качестве источника излучения ртутной лампы (Рис. 10). Сравнение с анаэробными условиями (Рис. 10А) показывает, что в присутствии кислорода (Рис. 10 Б) олигомеризация существенно ускоряется и приводит к образованию высокомолекулярных агрегатов (более 200 кДа), которые не наблюдаются в случае анаэробного фотолиза.

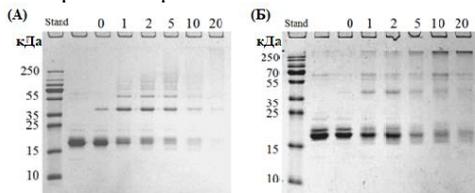


Рис. 10. 15%-SDS-ПАА гель γ -кристаллина после фотолиза типа Iб (А) и типа II (Б). Дорожка Stand соответствует стандарту молекулярных масс, следующая дорожка соответствует образцу без барботирования и облучения. Для остальных дорожек указана продолжительность фотолиза (в минутах). Гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Наблюдаемые различия в степени олигомеризации при анаэробном и

аэробном фотолизе γ -кристаллинов свидетельствуют о различиях в механизмах протекания реакций. Вероятно, при аэробных условиях основным механизмом фотоокисления белка является не прямое окисление (тип II). Кислород, присутствующий в растворе в больших концентрациях, быстро реагирует с молекулами ^1KNA с образованием $^1\text{O}_2$, который затем окисляет белки. По-видимому, окисление белков меняет их пространственную структуру, предрасполагая их к олигомеризации. Поскольку в аэробных условиях имеет место конкуренция между кислородом и белком за ^1KNA , то в данных условиях также происходит образование радикалов по типу I. Можно предполагать, что столь быстрая олигомеризация в аэробных условиях является следствием комбинированного действия реакций обоих типов I и II.

Таким образом, было показано, что фотолиз белков хрусталика в присутствии KNA приводит к агрегации кристаллинов, что хорошо согласуется с результатами, полученными для HEWL.

Масс-спектрометрический анализ белков показал, что с увеличением дозы УФ-излучения происходит монотонное уменьшение исходных форм белка, скорость этого процесса значительно возрастает при добавлении 6 М мочевины. Таким образом, незначительное уменьшение мономерной формы на гелях (Рис. 9Б) и существенное увеличение интенсивности полосы поглощения с максимумом на 335 нм подтверждают предположение о том, что в денатурирующих условиях происходит замедление процесса олигомеризации и ускорение модификации белков с незначительным изменением молекулярной массы белка и образованием продуктов, поглощающих в УФ-А диапазоне. В отсутствие мочевины основными продуктами фотоповреждения являются олигомерные формы белков. МС анализ пептидов, полученных при ферментативном гидролизе кристаллинов трипсином, показал значительное уменьшение количества Трп- и Туг-содержащих пептидов в случае α - и β -кристаллинов и Туг-содержащих пептидов для γ -кристаллинов. Эти результаты хорошо согласуются с результатами, полученными методом лазерного импульсного фотолиза (см. главу I автореферата) и подтверждают предложенный механизм, согласно которому тушение ^1KNA белками хрусталика происходит за счёт реакций с Трп и Туг аминокислотными остатками α - и β -кристаллинов и с остатками Туг для γ -кристаллина. Дегградация соответствующих пептидов, Трп- и Туг-содержащих для α - и β -кристаллинов и Туг-содержащих для γ -кристаллина, говорит об их активном участии в фотоповреждении белков.

ВЫВОДЫ

В рамках данной диссертационной работы были проведены исследования механизмов, динамики и продуктов фотоиндуцированных реакций кинуреновой кислоты с белками хрусталика и рядом модельных систем. На основании полученных результатов могут быть сделаны следующие выводы:

1. Первичные реакции между ^1KNA и белками протекают в основном через аминокислотные остатки триптофана (Трп) и тирозина (Туг) с образованием соответствующих нейтральных радикалов. В случае α - и β -кристаллинов в реакциях участвуют сопоставимые количества остатков Трп и Туг, в случае γ -

кристаллина реакция протекает через остатки Туг, а в случае лизоцима – остатки Тгр.

2. Радикалы $\text{KNA}^{\cdot-}$ и Tgr^{\cdot} , образующиеся в результате УФА фотолиза в анаэробных условиях, вступают в следующие реакции: (1) обратного переноса электрона, которая является основным каналом гибели радикалов; (2) комбинации радикалов Tgr^{\cdot} с образованием димерных и олигомерных форм Тгр, которые являются основными продуктами разложения аминокислоты; (3) реакции, результатом которых является образование мономерных и димерных продуктов распада KNA с потерей кислорода из карбонильной или карбоксильной групп, (4) комбинации радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и Tgr^{\cdot} с образованием ковалентно связанных продуктов KNA -Тгр.

3. Кислород эффективно окисляет радикал $\text{KNA}^{\cdot-}$ с образованием исходной молекулы KNA и супероксид радикала. Соотношение концентраций между кислородом и радикалами фотосенсибилизатора в растворе играет ключевую роль в процессе фотолиза KNA и аминокислот/белков. При высоких концентрациях радикалов происходят прямые реакции между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и аминокислот/белков (тип Ia фотолиза). В случае доминирования кислорода происходят реакции между супероксидом и радикалами аминокислот/белков (тип Ib фотолиза).

4. Квантовый выход распада исходных реагентов (аминокислота или белок) в случае фотореакций типа Ib на порядок ниже, чем при фотореакциях типа Ia. Это указывает на высокую эффективность реакции обратного переноса электрона между супероксидом и радикалами аминокислоты или белка с восстановлением исходных реагентов. Таким образом, кислород в низких концентрациях может выступать в роли протекторного агента, снижая фотоповреждение белков.

5. Фотолиз лизоцима и кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях приводит к (а) деградации Тгр и Туг остатков белков, (б) образованию продуктов, поглощающих в диапазоне 320-400 нм, (в) образованию димерных, тримерных и других мультимерных форм, ковалентно связанных через остатки Тгр и Туг, (г) ковалентному присоединению KNA к белкам хрусталика.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. P.S. Sherin, E.A. Zelentsova, **E.D. Sormacheva**, V.V. Yanshole, T.G. Duzhak, Yu.P. Tsentalovich, Aggregation of crystallins in kynurenic acid sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016), 8827-8839. Impact Factor: 3.430

2. **E.D. Sormacheva**, P.S. Sherin, Yu.P. Tsentalovich, Dimerization and oxidation of tryptophan in UV-A photolysis sensitized by kynurenic acid, Free Radical Biology and Medicine. 113 (2017), 372-384. Impact Factor: 6.170

3. **E.D. Savina**, Yu.P. Tsentalovich, P.S. Sherin, UV-A induced damage to lysozyme via Type I photochemical reactions sensitized by kynurenic acid, Free Radical Biology and Medicine. 152 (2020), 482-493. Impact Factor: 6.170