

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ «МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР»

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

Диссертация на
соискание ученой степени кандидата
химических наук

Научные руководители:

Кандидат физико-математических наук

Шерин П.С.

Доктор химических наук, профессор

Центалович Ю.П.

Новосибирск – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА I ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Оптическая система глаза. Патологии глаза.....	13
1.2. Анатомия хрусталика.....	15
1.3. Белки хрусталика.....	18
1.3.1. α -Кристаллин.....	19
1.3.2. β - и γ -Кристаллины.....	21
1.4. Пост-трансляционные модификации кристаллинов.....	23
1.4.1. Окисление кристаллинов.....	24
1.4.2. Фотоокисление белков хрусталика.....	26
1.4.3. Ковалентное присоединение УФ-фильтров.....	30
1.4.4. Фосфорилирование, дезаминирование и усечение кристаллинов.....	32
1.4.5. Олигомеризация и агрегация белков хрусталика.....	35
1.5. Низкомолекулярные соединения хрусталика: антиоксиданты и УФ-фильтры.....	39
1.5.1. Антиоксиданты.....	40
1.5.2. Кинуренин и его производные – УФ-фильтры хрусталика.....	42
1.5.3. Фотохимические реакции кинуренинов.....	43
1.5.4. Производные КН: их роль в хрусталике и фотохимические свойства.....	45
1.6. Заключение по материалам главы I.....	49
ГЛАВА II ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	51
2.1. Материалы и реактивы.....	51
2.2. Выделение белковых экстрактов из хрусталика <i>Bos taurus</i> L. (Bovine).....	51
2.3. Оптическая спектроскопия.....	52
2.4. Лазерный импульсный фотолиз.....	52
2.5. Фотолиз водных растворов.....	53
2.6. Разделение низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений.....	54
2.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография с оптическим детектированием.....	54
2.8. Электрофорез.....	55
2.9. Анализ ферментативной активности лизоцима.....	56
2.10. Ферментативный гидролиз белков.....	56
2.11. Масс-спектрометрия.....	57

2.11.1. Масс-спектрометрический анализ с использованием матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI)	57
2.11.2. Масс-спектрометрический анализ с использованием электроспрейной ионизации в сопряжении с ВЭЖХ	57
2.12. Расчёт квантовых выходов фоторазложения исходных реагентов	58
ГЛАВА III ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ С	
БИОЛОГИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛАМИ	61
3.1. Определение константы скорости тушения ^1KNA аминокислотами, кислородом и антиоксидантами	61
3.2. Определение констант скорости тушения ^1KNA белками	65
3.3. Определение механизма тушения ^1KNA лизоцимом	69
3.4. Определение механизма тушения ^1KNA кристаллинами	70
ГЛАВА IV ДИМЕРИЗАЦИЯ И ОКИСЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТЫ ТРИПТОФАН В	
РЕЗУЛЬТАТЕ УФ-А ФОТОЛИЗА В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ	73
4.1 Спектральные характеристики радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$	73
4.2. Влияние кислорода на фотолиз аминокислот и белков в присутствии KNA	77
4.2 Фотолиз типа Ia и Ib водных растворов KNA и NTpH	78
4.3 Анализ продуктов, образующихся при УФ-А фотолизе	80
4.4. Механизмы реакций фотовозбужденной KNA с NTpH	87
ГЛАВА V ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА В РЕЗУЛЬТАТЕ УФ-А ФОТОЛИЗА ТИПА I	
В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ	94
5.1. УФ-А фотолиз KNA и HEWL	95
5.2. Ферментативная активность HEWL после УФ-А фотолиза	96
5.3. Электрофоретический анализ ковалентных сшивок HEWL после УФ-А фотолиза	97
5.4. Спектры поглощения и флуоресценции HEWL после фотолиза	98
5.5. ВЭЖХ-МС анализ низкомолекулярных продуктов фотолиза	100
5.6. Масс-спектрометрический анализ HEWL до и после УФ-А фотолиза	101
5.7. Масс-спектрометрический анализ пептидов HEWL	103
5.7.1. Окисление по аминокислотным остаткам Met и Trp	105
5.7.2. Ковалентно связанные димеры HEWL через остатки Trp и Tyr	106
5.7.3. Другие модификации остатков Trp	109
ГЛАВА VI ФОТОЛИЗ КРИСТАЛЛИНОВ В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ	113
6.1. Спектры поглощения белков после фотолиза	113
6.2. Анализ низкомолекулярных продуктов фотолиза	115
6.3. Электрофоретический анализ белков хрусталика после фотолиза	116

6.4. Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов кристаллинов	120
6.4.1. Дегградация белков при УФ-А фотолизе.....	120
6.4.2. Анализ белков после ферментативного гидролиза	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ.....	127
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

1,4-DHQ – 1,4-дигидрохинолин-2-карбоновая кислота

$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород

$\text{O}_2^{\cdot-}$ – супероксид анион радикал кислорода

3ОНКГ – *O*- β -D-гликозид 3-гидроксикинуренина

3ОНКГ-GSH – глутатионил-3-гидроксикинуренин гликозид

3ОНКН – 3-гидроксикинуренин

4НQN – 4-гидроксихинолин

АСN – ацетонитрил

АНBG – гликозид 4-(2-амино-3-гидроксифенил)-4-оксобутановая кислота

AmB – аммоний-бикарбонатный буфер

Asc – аскорбат

СКА – карбоксикетоалкен кинуренина

D₂O – дейтерированная вода

ddO-KNAs – димеры дезоксигенированной KNA с потерей двух атомов кислорода и добавлением (ddO-KNA₁) или потерей (ddO-KNA₂) двух атомов водорода.

DHB – 2,5-дигидроксибензойная кислота

DTT – дитиотреитол

GSH – глутатион-L- восстановленный

GSSG – окисленная форма GSH

HEWL – куриный яичный белок лизоцим (Hen Egg White Lysozyme)

IAA – йодацетамид

KN – кинуренин

KNA – кинуреновая кислота

KNY – кинуренин желтый

k_q – константа скорости тушения триплетного состояния молекулой тушителем (Q)

k_{T-T} – константа скорости триплет-триплетной аннигиляции

MALDI-MS – масс-спектрометрический анализ с использованием матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

NAD⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида

NFK – N-формилкинуренин

NHPI – N-ацетил-3 α -гидроксипирролоиндол

NHPPI – N-ацетил-3 α гидропероксипирролоиндол

NNFK – N-ацетил-N-формилкинуренин

NOIA – N-ацетилоксиндолаланин

NTrpH – N-ацетил-L-триптофан

PBS – фосфатно-солевой буфер

pD – водородный показатель в дейтерированном растворе

pH – водородный показатель

pKa – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты (K_a)

s_0 NFK – основное состояние N-формилкинурина

s_1 NFK – синглетное возбужденное состояние N-формилкинурина

SA – синапиновая кислота

SDS – додецилсульфат натрия

TEMED – N, N, N', N'-тетраметилэтилен – 1,2-диамин

TFA – трифторуксусная кислота

T NFK – триплетное возбужденное состояние N-формилкинурина

Tris – трис (гидроксиметил) аминметан

β_H -кристаллин – высокомолекулярные (октомеры) комплексы β -кристаллина

β_L -кристаллин – низкомолекулярные (димеры) комплексы β_L -кристаллина

ϵ – коэффициент экстинкции вещества

λ_{max} – длина волны, соответствующая максимуму поглощения молекулы

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография с оптическим детектированием

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Да – атомная единица массы (Дальтон)

МС – масс-спектрометрический

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

ПААГ – полиакриламидный гель

ПТМ – пост-трансляционные модификации

РНКаза А – рибонуклеаза А

Трис-HCl – буферный раствор, содержащий трис (гидроксиметил) аминметан и соляную кислоту

УФ – ультрафиолетовый

УФ-А – ультрафиолетовое излучение диапазоном 315-400 нм

УФ-Б – ультрафиолетовое излучение диапазоном 280-315 нм

$\Phi_{детр}$ – квантовый выход разложения реагентов

Φ_T – квантовый выход триплетного состояния

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Термины:

Тип Ia – прямые реакции между образовавшимися радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и аминокислоты/белков

Тип Ib – реакции радикалов аминокислот/белков с супероксидом $\text{O}_2^{\bullet-}$, образованным в реакции окисления $\text{KNA}^{\bullet-}$ молекулярным кислородом

Тип II – реакции фотовозбуждённых УФ-А хромофором с кислородом с образованием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$.

ВВЕДЕНИЕ

С увеличением продолжительности жизни человека повышается риск развития возраст-ассоциированных заболеваний, причины возникновения которых на сегодняшний день остаются во многом неизвестными. В основе многих распространенных болезней, в частности, катаракты, лежат реакции биополимеров с реакционно-активными частицами, образующимися в организме под воздействием внешних и внутренних факторов. Важнейшим внешним фактором является ультрафиолетовое излучение Солнца. Последнее может быть поглощено молекулами с малой молекулярной массой, которые присутствуют в живых тканях. Реакции фотовозбужденных состояний (триплетные состояния) этих молекул с белками и/или с кислородом могут приводить к необратимой модификации белков, включая их ковалентное связывание и последующую агрегацию. С возрастом накопление модифицированных белков может приводить к развитию различных заболеваний. В настоящее время эти фотоиндуцированные процессы изучены слабо.

Хрусталик – это особенная ткань глаза, прозрачная в видимом диапазоне излучения и лишенная кровоснабжения, нервных клеток и лимфатических сосудов. В процессе развития организма клетки хрусталика, образованные в его эпителиальном слое, видоизменяются и теряют свои органеллы и ядра. Основными компонентами хрусталика глаза являются водорастворимые белки и метаболиты. Белки хрусталика – кристаллины – играют ключевую роль в поддержании прозрачности хрусталика и его светопреломляющей силы. Кристаллины не обновляются на протяжении жизни индивида и со временем накапливают многочисленные пост-трансляционные модификации [1,2]. В молодом возрасте они защищены от окислительных повреждений высокой концентрацией антиоксидантов: аскорбата и глутатиона, присутствующих в хрусталике в миллимолярных концентрациях [3-5]. Однако, с возрастом антиоксидантная защита ослабевает, что приводит к ускорению накопления модифицированных биомолекул в клетках. В итоге белки окрашиваются и теряют водорастворимость, а хрусталик становится более жестким и светорассеивающим [2,6]. Развитие катаракты является частым следствием возрастных изменений в структуре хрусталика, но характер изменений, ответственных за инициирование и развитие этого заболевания, до сих пор не ясен.

Из всех внешних факторов, наиболее пагубное влияние на компоненты хрусталика оказывает УФ-излучение Солнца, которое по своему действию обычно разделяют на диапазоны УФ-Б (280-315 нм) и УФ-А (315-400 нм). В настоящее время известны два основных пути фотоокисления биомолекул. Первый путь – это прямое фотоокисление белков за счет поглощения света УФ-Б диапазона, что приводит к их фотоионизации и последующей агрегации. Второй путь – это фотоокисление белков в результате реакций с

фотовозбужденными молекулами, присутствующими в ткани и поглощающими УФ-излучение. Эти молекулы под действием УФ-света образуют реакционно-активные триплетные состояния, которые способны реагировать с белками в реакциях двух типов: (1) прямой реакции с белками и образованием радикалов (тип I) и (2) переноса энергии от фотовозбужденной молекулы к молекулам O_2 с образованием синглетного кислорода (1O_2), который, в свою очередь, окисляет находящиеся рядом аминокислотные остатки белков (тип II) [7]. Реакции второго типа, как правило, протекают под действием УФ-А излучения, которое практически не поглощается белками хрусталика. В научной литературе уделено много внимания реакциям первого типа (реакциям под действием УФ-Б света) и второго типа с участием синглетного кислорода (тип II фотореакций). Однако, в тканях с малым содержанием кислорода, таких как хрусталик, будут доминировать реакции с образованием радикалов (тип I фотореакций), которые в настоящее время остаются малоизученными.

В хрусталике глаза человека УФ-А излучение поглощается молекулами с небольшой молекулярной массой – кинуренином (KN) и его производными [8]. Кинуренины, метаболиты аминокислоты триптофан, присутствуют в клетках в количествах нескольких сотен пикомоль на 1 грамм ткани [3,5] и выполняют функцию светофильтров. При фотовозбуждении они эффективно преобразуют поглощенный свет в тепло [9], защищая содержимое хрусталика от повреждения. Под действием УФ-излучения может также образовываться короткоживущее триплетное состояние кинуренинов [10,11], которое способно участвовать в процессах повреждения кристаллинов. Особенностью кинуренинов является их термическая нестабильность. Некоторые из продуктов термического распада кинуренинов являются фотохимически активными соединениями, способными под действием света образовывать триплетные состояния с высоким выходом. Одним из таких продуктов распада кинуренина является кинуреновая кислота (KNA), которая является наиболее эффективным фотосенсибилизатором из производных KN, исследованных на сегодняшний день [12]. KNA была обнаружена в здоровых хрусталиках в количествах, на два порядка меньше, чем совокупное содержание кинуренинов [3,13]. Однако, принимая во внимание практически на два порядка более высокий выход реакционно-активного триплетного состояния по сравнению с кинуренинами, KNA может вносить вклад в модификацию белков под воздействием УФ-А, сопоставимый с гораздо более представленными, но фотохимически инертными кинуренинами. Следует подчеркнуть, что 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 свойства KNA мало изучены, а информация о её фотоиндуцированных реакциях с белками хрусталика и вовсе отсутствует.

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 проведены исследования механизмов фотоиндуцированных радикальных реакций между хромофором хрусталика и аминокислотами/белками в условиях, близких к естественным: (а) анаэробные условия фотолиза (крайне низкая концентрация остаточного кислорода) и (б) использование УФ-А излучения, проникающего в глубь ткани хрусталика и поглощаемое его хромофорами. 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 фотовозбуждённых 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 $\text{KNA}^{\cdot-}$ и белков, тип Ia, или (б) через реакции последних с супероксидом $\text{O}_2^{\cdot-}$, образованным в реакции окисления $\text{KNA}^{\cdot-}$ молекулярным кислородом, тип Ib;
4. Квантовый выход разложения аминокислоты триптофан и белков при KNA-сенсibilизированном 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 (Бад Хофгаштайн, 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, формулировки выводов и подготовке публикаций. Все использованные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии.

ГЛАВА I ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Оптическая система глаза. Патологии глаза

Человек получает более 90% информации об окружающем мире благодаря органам зрения. Глаз – это парный сенсорный орган, обладающий способностью воспринимать электромагнитное излучение в диапазоне длин волн 400-800 нм и обеспечивающий функцию зрения. Человеческий глаз достаточно сложно устроен, поскольку представляет собой комплекс из множества элементов. За восприятие света отвечает слаженно работающая оптическая система глаза (Рис. 1.1), к которой относят роговицу, радужную оболочку, хрусталик и стекловидное тело. Поток излучения, отраженный от наблюдаемого предмета, проходит через роговицу на внешнем слое глазного яблока. Роговица представляет собой уникальную структуру из-за своей прозрачности, которая обеспечивается особым расположением клеток и коллагеновых фибрилл, отсутствием кровеносных сосудов и регенерацией [14]. На роговицу приходится около 2/3 преломляющей силы глаза, а остальное на хрусталик и стекловидное тело [15]. Диаметр пучка, который, в конечном счете, будет поглощён, контролируется в среднем слое глаза радужной оболочкой. Радужка – это тонкая сократительная пигментированная диафрагма с центральным отверстием – зрачком [16]. Основной функцией радужки является регулировка поступления света в глаз в зависимости от внешних условий. Благодаря этому зрачок при сильном свете сужается, а при слабом — расширяется [14,17]. Пройдя зрачок, свет попадает на так называемую оптическую линзу человеческого глаза, хрусталик. Основными функциями его является пропускание и фокусировка света, а также изоляция стекловидного тела от водянистой влаги, которая циркулирует через зрачок в переднюю камеру и выходит в Шлемов канал. Клетки хрусталика на 2/3 заполнены водой и на 1/3 структурными белками. Конформационные изменения структуры белков приводят к потере прозрачности оптической линзы [14,16]. Структура и функции хрусталика будут более подробно рассмотрены в разделе 1.2. Хрусталик и конечную точку передачи света, сетчатку, разделяет ещё одна компонента оптической системы глаза, а именно стекловидное тело. Эта структура состоит из сети коллагеновых фибрилл, заполненных на 98-99 % водой, в которой в небольших количествах растворены белки, некоторые соли и гиалуроновая кислота. Стекловидное тело, находясь в непосредственном контакте с хрусталиком и сетчаткой, служит связующим звеном в передаче света между ними [16]. Свет, пройдя через всю оптическую систему, фокусируется на внутренней поверхности глаза – сетчатке (нейронный, сенсорный центр глаза), образуя на ней обратное и уменьшенное изображение объекта. Сетчатка представляет собой тонкую полупрозрачную пурпурно-красного цвета (благодаря пронизывающим её кровеносным

сосудам) структуру, занимающую 2/3 задней стенки глазного яблока. Высокоорганизованная ткань сетчатки со сложным строением и большим разнообразием клеток, которые входят в её состав и выполняют разные функции, позволяет преобразовать световую энергию в нервный импульс и передать информацию по зрительному нерву в мозг [14]. Мозг преобразует полученный сигнал и «переворачивает» картинку, в конечном счёте, мы получаем прямое изображение объекта. Помимо описанных компонентов в глазе присутствует большое количество структур, осуществляющих питательную, двигательную и структурную функции, помогающих работе оптической системы.

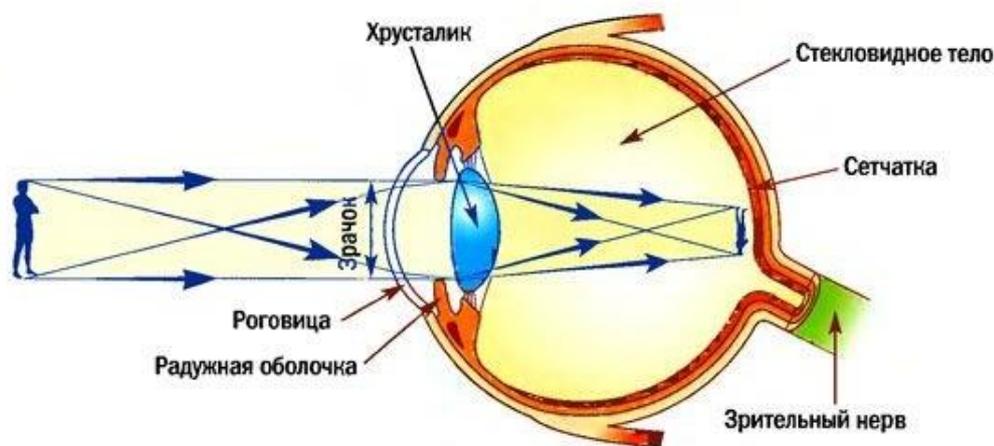


Рис. 1.1. Оптическая система глаза.

В связи со сложностью строения глаза человека он зачастую подвержен развитию различных патологий, основным симптомом которых является снижение остроты зрения. Глазные заболевания широко распространены во всём мире, чаще всего они проявляются у людей пожилого возраста. Связано это с различными нарушениями в организме, в том числе с ухудшением метаболических процессов. Наибольшее число случаев частичной или полной потери зрения ассоциируется с развитием катаракты.

Катаракта — это прогрессирующее помутнение хрусталика глаза, которое препятствует прохождению света к сетчатке. В основном катаракта развивается в процессе старения хрусталика, при котором происходит постепенное накопление желто-коричневого пигмента внутри органа, что снижает передачу света к сетчатке и ослабевает защиту от окислительного стресса [18]. Кроме того, появляются структурные изменения волокон хрусталика, которые приводят к нарушению изначально правильной архитектуры и расположения клеток, необходимых для поддержания оптической прозрачности [19]. Помимо старения организма, на развитие заболевания могут влиять некоторые внешние факторы, которые варьируют в

зависимости от социально-экономических и географических различий до генетических особенностей индивида и разных популяций [20]. Наиболее пагубное влияние оказывают системные заболевания (в частности, диабет) [21,22], курение [23,24], употребление кортикостероидов [25,26], диеты (голодание) [27-29], а также воздействие ультрафиолетового излучения [30,31]. К другим причинам развития катаракты можно отнести различные виды травм - прямое повреждение, ушиб, радиационное излучение, метаболические и врожденные расстройства [19]. Однако, в связи с ухудшающейся экологической обстановкой на нашей планете (загрязнение атмосферы, парниковый эффект и, как следствие, разрушение озонового слоя) и увеличением средней продолжительности жизни индивида, значимость ультрафиолетового излучения Солнца среди причин развития заболевания существенно возрастает.

К сожалению, в настоящее время универсального подхода для полного излечения катаракты не существует. Единственным способом лечения является операция по замене хрусталика на интраокулярную линзу (искусственный хрусталик). После операции у пациентов в большинстве случаев восстанавливается нормальное зрение, однако, в менее благоприятных ситуациях, возможно возникновение ряда осложнений: развитие инфекций, глаукома, воспаление тканей глаза и других [32,33]. Методы хирургической замены хрусталика постоянно совершенствуются и риски развития подобных осложнений значительно снижаются, однако, операции до сих пор остаются дорогостоящими для людей пожилого возраста и представителей среднего и низшего экономического класса. В связи с этим перед мировым научным сообществом остро стоит вопрос по поиску более простых методов медикаментозного лечения, что не представляется возможным без детального исследования механизмов формирования катаракты и способов остановить потерю зрения на ранних этапах развития заболевания.

1.2. Анатомия хрусталика

Хрусталик — это один из важнейших компонентов оптической системы глаза. Он представляет собой бессосудистую, двояковыпуклую, прозрачную структуру, расположенную в переднем сегменте глаза, где она принимает участие в фокусировке света на сетчатку. Его поверхность покрывает эластичная капсула, которая служит местом прикрепления зонных волокон, соединяющих хрусталик с мышцами цилиарного тела. Сокращение и расслабление этих мышц приводит к изменению формы хрусталика, что необходимо для фокусировки [34]. Возможность фокусироваться на дальних и ближних предметах при нахождении в одной точке пространства называется аккомодацией. Кроме того, в хрусталике отсутствуют кровеносные сосуды и нервы, что также обеспечивает его прозрачность, а питательные вещества поступают в него из омывающей его водянистой влаги [35].

Хрусталик – это орган с уникальной по своей природе структурой (Рис. 1.2). Он формируется во время раннего эмбрионального развития из эктодермы [1,35]. Впоследствии из поверхностных клеток эктодермы формируются два типа клеток хрусталика: слой кубических эпителиальных клеток на его передней поверхности, а также слой удлинённых фибриллярных клеток, которые составляют основную часть ткани. Таким образом, хрусталик приобретает свою отличительную полярность [1,34,36]. Эти клетки имеют разные свойства и функции. Эпителиальные клетки проявляют большую часть метаболической активности ткани и вместе с незрелыми фибриллярными клетками отвечают за энергоёмкие процессы, такие как поддержание ионных градиентов и синтез белка. Фибриллярные клетки являются результатом терминальной дифференциации эпителиальных клеток. Они представляют собой инертные оболочки, заполненные концентрированным белковым раствором, и сохраняют только остатки исходной метаболической активности. Фибриллярные клетки обеспечивают необходимый для фокусировки света на сетчатке коэффициент преломления. Это свойство обусловлено не только регулярным расположением фибриллярных клеток, но и специфическими взаимодействиями внутриклеточных белков (см. раздел 1.3) [34].

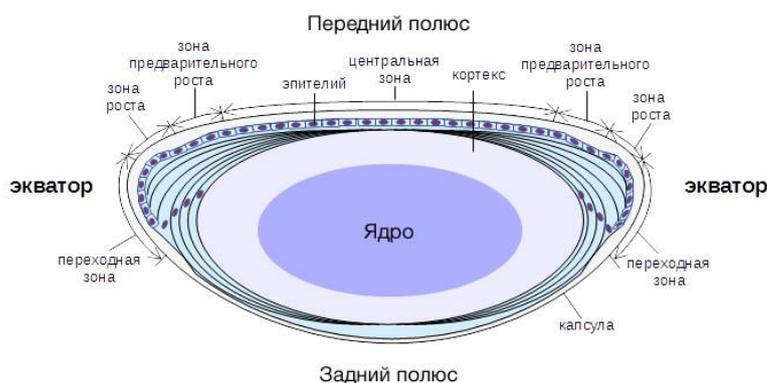


Рис. 1.2. Строение хрусталика глаза человека.

Различные свойства и функции клеток возникают в результате уникального роста, при котором эпителиальные клетки делятся на передней поверхности и мигрируют в поперечном направлении в экваториальную область хрусталика, где они удлиняются и дифференцируются в фибриллярные клетки. Вновь сформированные фибриллярные клетки укладываются поверх уже существующих. Таким образом, ранее образованные клетки спрессовываются в центре хрусталика, теряя при этом воду. В качестве последнего шага дифференциации фибриллярные клетки теряют свои ядра, митохондрии, рибосомы и другие органеллы в процессах, напоминающих ранние стадии апоптоза [37,38]. Потеря клеточных органелл необходима для обеспечения прозрачности хрусталика, но, как следствие, такие клетки утрачивают способность синтезировать и расщеплять белки. Важными следствиями этой уникальной картины роста и

строения являются: (1) формирование градиента показателя преломления, который увеличивает оптическую силу хрусталика [34]; (2) сохранение практически всех белков, синтезированных на протяжении жизни хрусталика. Самые старые белки, синтезированные во время развития плода, расположены в центре ткани; самые молодые и недавно синтезированные находятся на периферии хрусталика. Во время жизни организма происходит изменение внутриклеточной среды, и белки подвергаются различным химическим и физическим воздействиям, которые приводят к физико-химическим изменениям, включая агрегацию, гликозилирование, дезаминирование, фосфорилирование, рацемизацию, деградацию и так далее. Некоторые из этих изменений, возможно, могут влиять на правильную упаковку белков в центральной части хрусталика. Часть из них могут инициировать процессы, которые, в конечном счете, приведут к развитию катаракты [1,34-36]. Для понимания степени влияния модификаций белков на развитие различных нарушений зрения, связанных с хрусталиком, необходимо знать структуру и свойства его белков.

Следует специально отметить, что еще одной отличительной особенностью ткани хрусталика является крайне малое содержание молекулярного кислорода. McNulty R. и соавторы в своей работе [39] показали, что распределение кислорода в хрусталике определяется различными уровнями его в водянистой влаге и стекловидном теле. Водянистая влага содержит кислород в относительно больших концентрациях (давление около 40 торр), она покрывает всю переднюю стенку хрусталика и насыщает его кислородом [40]. Стекловидное тело является гелеобразной субстанцией с довольно низким уровнем кислорода (давление менее 16 торр) [41]. Основная часть поступающего в хрусталик кислорода расходуется на процессы, происходящие в митохондриях, расположенных в наружном слое клеток хрусталика. Таким образом, содержание кислорода в ткани хрусталика резко уменьшается при переходе от внешних слоев к внутренним, и в ядре оно не превышает 2 торр. По оценкам авторов, такое давление кислорода соответствует концентрации 1-2 мкМ [39].

Главные функции хрусталика заключаются в светопреломлении и светопроведении. Основным источником света на Земле является Солнце, излучение которого принято делить на три диапазона: С (100-280 нм), Б (280-315 нм) и А (315-400 нм) (Рис. 1.3). Первый диапазон, наиболее опасный для живых организмов, практически полностью поглощается озоновым слоем и земной атмосферой, а именно содержащимися в них молекулами воды, кислорода и углекислого газа [42]. Излучение УФ-Б и УФ-А диапазонов беспрепятственно достигают поверхности нашей планеты и может оказывать пагубное влияние на ткани тела человека. УФ-А излучение в меньшей степени, чем УФ-Б, задерживается атмосферой и с легкостью проникает через облака и оконные стекла, которые способны поглощать излучение с длиной волны короче 320 нм [43]. УФ-Б излучение напрямую поглощается аминокислотными

остатками белков хрусталика, а именно триптофаном (Trp), приводя к их фотоионизации [44,45]. Важно заметить, что основная часть УФ-Б излучения поглощается роговицей и до хрусталика доходит только лишь незначительная его часть, тогда как излучение УФ-А и видимого диапазонов проникают глубоко в ткани глаза. Большинство исследований посвящены изучению влияния УФ-Б излучения, тогда как влиянию УФ-А уделяется гораздо меньше внимания. Это связано с тем, что данное излучение поглощается не самими белками, а хромофорами, присутствующими в живых тканях. Молекулы хромофоров, поглощая свет в области 320-400 нм, переходят в возбужденное состояние и затем участвуют в реакциях фотосенсибилизирования и фотоповреждения белков. Исследования показывают, что УФ-облучение может приводить к развитию различных форм катаракты [31,46-48].

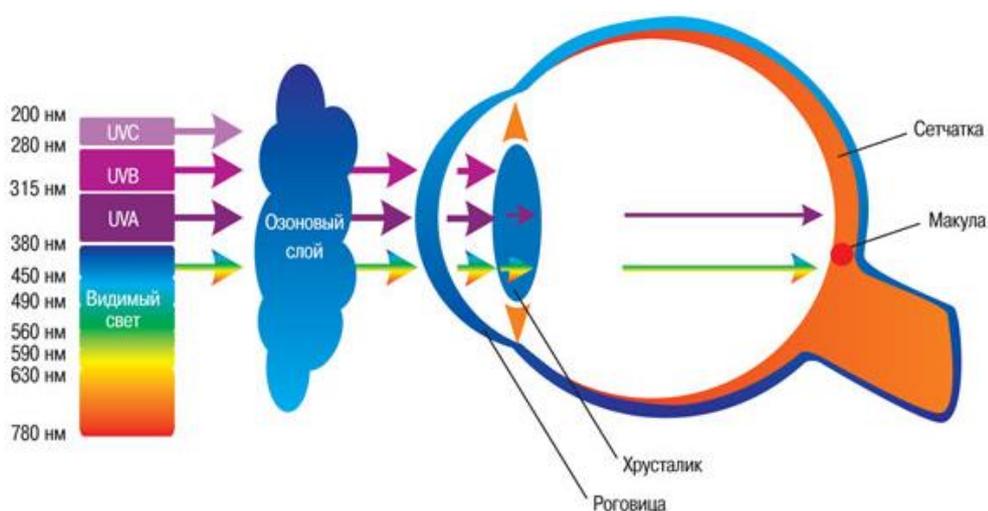


Рис. 1.3. Распространение диапазонов излучения Солнца в тканях глаза человека.

1.3. Белки хрусталика

Основными цитоплазматическими белками хрусталика являются кристаллины. Кристаллины представляют собой гетерогенное семейство высокостабильных водорастворимых белков хрусталика. Традиционно принято выделять три больших семейства белков хрусталика: альфа- (α), бета- (β) и гамма- (γ) кристаллины, различающихся между собой строением и функциями. Известно, что около 90% от сухой массы хрусталика приходится на кристаллины, и их плотная упаковка обеспечивает его прозрачность [1,38,49]. Остальной объем клеток хрусталика занят водой и низкомолекулярными соединениями, речь о некоторых из них пойдет в разделе 1.5 настоящего обзора. На протяжении последних десятилетий были проведены многочисленные исследования строения, свойств и функций кристаллинов, которые достаточно хорошо описаны в нескольких обзорных статьях [1,38,50-52]. Одно из наиболее интересных открытий — это изучение α -кристаллина как белка теплового шока или

молекулярного шаперона [53]. Не менее интересно то, что кристаллины, которые долгое время считались исключительно структурными белками хрусталика, оказались широко распространены в других тканях организма [54,55].

Необходимо отметить, что хрусталики всех млекопитающих содержат все три семейства кристаллинов, а также имеет место высокая степень гомологии пептидной последовательности белков из различных семейств. Отличия между кристаллинами различных видов животных в основном заключаются в некоторых изменениях аминокислотной последовательности, а также в содержании различных белков в клетках хрусталика. Здесь и далее, кроме отдельно оговариваемых случаев, под кристаллинами будут пониматься белки хрусталика глаза человека.

1.3.1. α -Кристаллин

Для большинства видов животных основным белком хрусталика является α -кристаллин, содержание которого в ткани составляет около 50 % от сухой массы белков хрусталика. Природный α -кристаллин представляет собой полидисперсный белок с высокодинамичной четвертичной структурой. В водных растворах этот белок образует гетеро-олигомерный комплекс с молекулярным весом в диапазоне 300 ÷ 1200 кДа, состоящий из 15-60 мономерных белков с молекулярной массой в 20 кДа [1,34,51]. Механизмы образования комплексов и нерастворимых форм α -кристаллина остаются во многом неизвестными. В клетках хрусталика белковый комплекс α -кристаллина состоит из αA - и αB -кристаллинов (в соотношении 3:1, соответственно) [51]. αA -Кристаллин чаще всего встречается в хрусталике глаза и в следовых количествах в некоторых других тканях организма. αB -Кристаллин считается повсеместным белком и встречается не только в хрусталике, но и в мозге, сердце и скелетных мышцах [54,55].

αA - и αB -кристаллины синтезируются в эпителиальных клетках до тех пор пока хрусталик растет и гомогенно распределяются по всему его объёму. Первичные структуры этих белков на 60% идентичны не только у отдельного животного [56,57], но и практически не зависят от вида, то есть подверглись незначительным изменениям в результате эволюции [35]. Стоит отметить, что до настоящего момента не удалось получить кристаллическую структуру α -кристаллина, необходимую для изучения его вторичной, третичной и четвертичной структуры. Сложность получения структуры заключается в высокой динамичности гетеро-олигомерного комплекса α -кристаллина. Однако сходство этих белков с белками теплового шока и результаты модельных экспериментов позволили сделать ряд предположений об уровнях упаковки аминокислотной последовательности. Так, вторичная структура α -кристаллинов в основном представлена β -листами и лишь 10-20% приходится на α -спирали [1,34]. Расположение ряда аминокислотных остатков удалось определить с помощью изучения их доступности для растворителя, модифицирующих агентов, протеаз и антител. Так было

установлено, что у человека в α A-кристаллине Cys131 спрятан глубоко в структуре, а Cys142, наоборот, находится на поверхности [34]. N-концевой домен мономера α -кристаллина представляет собой глобулярную гидрофобную структуру с преобладанием α -спиралей. С-концевой домен гомологичен последовательности малых белков теплового шока из-за сохранившегося фрагмента (α -кристаллиновый домен) переходящего в гибкую С-концевую последовательность [1,35,38]. Как было установлено, С-конец, помимо схожести с белками малого теплового шока, очень консервативен для прокариота и эукариот [35]. В состав α -кристаллинового домена входят 9 β -тяжей, собранных в два гидрофобных β -листа, и короткая α -спираль, расположенная между седьмым и восьмым β -тяжами [35,58,59]. Считается, что α -кристаллиновый домен имеет схожее строение с иммуноглобулиновым доменом [1]. Исследования с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) показали, что С-конец более гибкий, чем N-конец, вероятно, из-за нахождения на нем варибельной последовательности, в которой выделяют α -спираль, короткую β -складку и протяженные участки неупорядоченной структуры [52,58,59]. Четвертичная структура также не была полностью доказана, модельные эксперименты позволили предположить, что она имеет шарообразную форму с отверстием в центральной области [34,60]. Исследования субъединиц-субъединичных взаимодействий и узнавания субстрата показали, что аминокислотные остатки на N-конце α B-кристаллина необходимы для процессов узнавания, ассоциации и обмена мономеров белков в комплексе.

Ассоциация и диссоциация комплекса, а также способность распознавать субстрат являются важными для выполнения основной функции – шаперонной [61]. Исследования показали, что участок связывания субстрата находится в третьей и четвертой β -складке кристаллинового домена [58]. Напомним, что из-за особенностей строения хрусталика (см. раздел 1.2) в нём не осуществляются процессы синтеза/расщепления белков и весьма ограничена способность последних перемещаться между слоями клеток для поддержания однородности среды. Для нормальной работы хрусталик должен быть прозрачным и обладать градиентом коэффициента преломления, следовательно, необходимо, чтобы модифицированные с возрастом белки не теряли свою водорастворимость и не выпадали в светорассеивающий осадок. α -Кристаллин, выполняющий шаперонную функцию, связывается с поврежденными компонентами белковой смеси с высокой аффинностью и стехиометрией, предотвращая их агрегацию и выпадение в осадок [50]. С возрастом всё больше и больше белков, подвергнутых модификации и денатурации, связываются с α -кристаллином. В конечном счёте происходит накопление некоторого критического количества модифицированных белков, включая сам α -кристаллин, что приводит к образованию светорассеивающих областей в хрусталике и развитию катаракты (см. раздел 1.4).

1.3.2. β - и γ -Кристаллины

β - и γ -Кристаллины часто объединяют в одно суперсемейство, которое включает в себя семь олигомерных β -кристаллинов и семь мономерных γ -кристаллинов. Последовательности их доменов примерно на 30% совпадают [1,34]. Основное отличие заключается в том, что у β -кристаллинов и у одного из γ -кристаллинов (γ S) аминокислотная последовательность N- и C-концов увеличена по сравнению с остальными γ -кристаллинами. Эти концы позволяют молекулам кристаллинов объединяться в высокомолекулярные олигомеры, упаковывая гидрофобные аминокислотные остатки вовнутрь белковых глобул, что дополнительно снижает светорассеяние [49]. Имеются сведения, что β - и γ -кристаллины обладают схожей вторичной и третичной структурами [34]. Олигомерные β - и мономерные γ -кристаллины построены из четырех мотивов, организованных в два домена, которые образуют пространственную структуру, напоминающую «греческий ключ» - узор, изображение которого часто встречается на античных вазах. [1]. Два последовательных мотива типа «греческий ключ» содержат восемь β -нитей, укладываемых с образованием двух β -листов, которые упаковываются вместе с образованием β -сэндвич домена (Рис. 1.4 (А)) [38,62,63]. Хотя β -сэндвич домены являются общими для β/γ -кристаллинов, они характеризуются высокой внутренней конформационной симметрией и консервативными структурами каждого мотива [62,63].

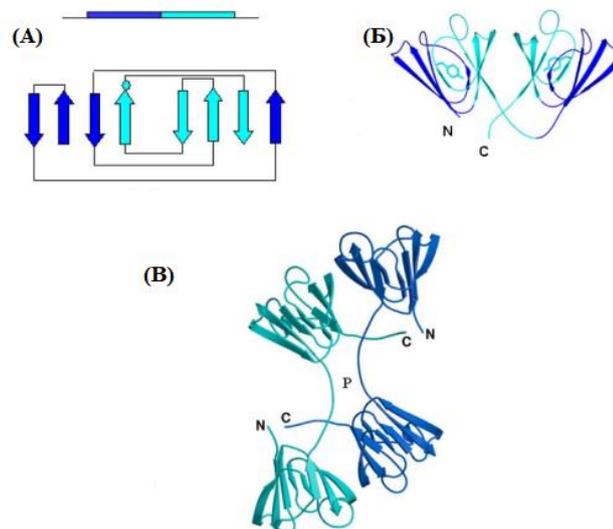


Рис. 1.4. Структуры белков суперсемейства β/γ -кристаллинов. (А) 2 мотива «греческий ключ», соединенные в β -сэндвич; (Б) структура мономера γ -кристаллинов; (В) структура димеров β B2-кристаллина [1].

В семейство γ -кристаллинов входят семь мономерных белков: γ A - γ F и γ S, с молекулярным весом ~ 20 кДа каждый [64]. Аминокислотные последовательности примерно на 70% схожи между собой. Синтез белков четко регулируется развитием организма: так, γ (D, E,

F) синтезируются в период эмбриогенеза и, как следствие, являются основными белками семейства в центре хрусталика, тогда как γ (A, B, C) в основном синтезируются на поздних стадиях развития эмбриона [34]. Согласно рентгеноструктурному анализу, γ -кристаллины - мономерные белки, состоящие из двух доменов, в которые плотно упакованы четыре мотива «греческий ключ» (Рис. 1.4 (Б)) [1,34]. В каждом домене есть гидрофобное ядро (2 β -нити), которое закрыто от контакта с растворителем гидрофильной оболочкой (2 β -нити). Домены соединены коротким связывающим пептидом. Из-за наличия внутри доменов ароматических аминокислот они принимают форму своеобразного конуса [34]. γ A- γ F-кристаллины схожи по своей полипептидной последовательности [1]. γ S-Кристаллин представляет собой нечто среднее между двумя семействами, поскольку к γ -кристаллинам близок по аминокислотной последовательности и электрофоретической подвижности, а по строению кодирующего гена, размеру и расположению консервативных заряженных аминокислот близок к β -кристаллинам [34]. Поэтому он часто упоминается в литературе как β S. Связывающий пептид γ S-кристаллина на одну аминокислоту длиннее, чем у γ A- и γ B-кристаллинов, и на две, чем у других γ -кристаллинов [1,34]. В хрусталиках глаза человека γ D и γ F присутствуют в следовых количествах, тогда как, например, в бычьих хрусталиках их содержание существенно выше. Важной особенностью структуры всех γ -кристаллинов является то, что в боковых цепях четыре аминокислотных остатка Trp окружены неполярными аминокислотами, защищающими его от молекул растворителя. Эти триптофаны инварианты для каждого члена семейства [63,65].

β -Кристаллины включают четыре кислых (β A1, β A2, β A3 и β A4) и три основных (β B1, β B2 и β B3) белка, которые ассоциируются либо в гомо-, либо в гетеро-олигомеры, с молекулярным весом 50÷200 кДа. Последовательности их доменов на 45 - 60% идентичны друг другу [66]. Мотив «греческого ключа» также, как и для γ -кристаллинов, остаётся основной формой укладки аминокислотной последовательности. β A1- и β A3-кристаллины кодируются одним и тем же геном и являются изоморфными белками, имеющими идентичную последовательность, кроме 17-ой и N-концевых аминокислот [64]. У млекопитающих β B1- и β B3-кристаллины формируются на ранних этапах развития хрусталика, и поэтому они в основном находятся в его ядре [1,67]. Особо высокой экспрессией отличаются гены белка β B2, поэтому его количество в хрусталике глаза человека значительно превышает содержание других β -кристаллинов, тогда как β A2-кристаллин можно обнаружить лишь в следовых количествах [1]. Димеризация β B2-кристаллина приводит к образованию структуры, напоминающей два связанных γ -кристаллина с измененной ориентацией доменов и структурой связывающего пептида (Рис. 1.4 (В)). Исследования показали, что именно структура связывающего пептида определяет способность β B2-кристаллина существовать в виде димера [68].

В настоящее время неизвестно какие олигомеры образуют β -кристаллины в клетках хрусталика, однако, в лабораторных условиях преимущественно наблюдается образование октомеров, тетрамеров и димеров. Последние, вероятно, являются структурными блоками для последующей олигомеризации с формированием тетрамеров и октомеров [69-71]. В литературе имеются данные о том, что человеческий β V1-кристаллин так же, как и β V2, склонен образовывать димерные структуры [34,72]. Помимо этого, β V1 легко олигомеризуется с β A4 в гетеро-олигомерный комплекс [69], а его укороченная версия (потеря 6 N-концевых остатков) образует более высокомолекулярные комплексы с β A4 / β A3 [1]. Кроме того, в работе Liu и соавторов [63] было показано, что все β -кристаллины, за исключением β A4 и β V3, участвуют в гетеро-молекулярных взаимодействиях. При этом кислые белки стремятся образовывать гетеро-олигомерные комплексы более высоких масс в отличие от основных. Взаимодействие между субъединицами происходит за счёт присутствия большого количества β -листов в их структурах, заряженных аминокислотных остатков и гидрофобных взаимодействий.

Первоначально считалось, что β/γ -кристаллины присутствуют только в хрусталике глаза и являются маркерами дифференцировки клеток хрусталика. Однако, позднее было обнаружено, что β/γ -кристаллины присутствуют и в других тканях организма [73]. Функции белков этих семейств мало изучены. Из семи β -кристаллинов лишь β V2-кристаллин наиболее широко распространен вне хрусталика, но уровень его экспрессии низок. Из γ -кристаллинов наиболее высокий уровень экспрессии гена характерен для γ S-кристаллина. Судя по характеру его экспрессии, он может выступать в качестве белка стресса [50].

1.4. Пост-трансляционные модификации кристаллинов

Кристаллины за время жизни организма не обновляются и, соответственно, с возрастом накапливают различные пост-трансляционные модификации (ПТМ). Модификация кристаллинов значительно влияет на упорядоченность их структуры и функции. Большинство ПТМ формируются за счет работы ферментов, которые напрямую изменяют химический состав белка (протеазы, трансферазы, фосфатазы, деацетилазы, гликозидазы и другие). Кроме того, одним из основных источников модификаций считается ультрафиолетовое излучение Солнца. Как говорилось в разделе 1.2, УФ-излучение, в зависимости от диапазона, может поглощаться различными молекулами хрусталика: УФ-А – молекулами с небольшим молекулярным весом, кинуренином и его производными (см. раздел 1.5.2-1.5.3), а УФ-Б – кристаллинами напрямую. При поглощении солнечных лучей происходит либо фотоионизация белков, либо образование возбужденных состояний кинуренинов, которые в свою очередь могут реагировать с аминокислотными остатками белков, модифицируя их [74]. В данном разделе будут

рассмотрены основные известные на сегодняшний день модификации белков хрусталика и механизмы их образования.

1.4.1. Окисление кристаллинов

Окисление считается основной физиологической проблемой для белков хрусталика, и одной из основных причин развития катаракты. В живых организмах в процессах обмена веществ, сопровождающихся окислительно-восстановительными реакциями, и при взаимодействии с окружающей средой постоянно формируются свободные радикалы и другие окислители. В молодом возрасте подобные окислители вносят незначительный вклад в модификации биомолекул благодаря природной антиоксидантной защите хрусталика. Однако с возрастом содержание антиоксидантов уменьшается, что приводит к повышению риска окисления биомолекул.

Необходимо отметить, что в настоящее время в научной литературе под термином «окисление» подразумевают не только реакцию переноса электрона, но и реакции, которые приводят к приобретению молекулой субстрата одного или двух атомов кислорода. В англоязычной литературе существуют два термина, разделяющие эти процессы: «oxidation» - реакция переноса электрона с одной молекулы на другую, и «oxygenation» - реакция(и), итогом которой(ых) является перенос одного или двух атомов кислорода на молекулу субстрата. Эквивалентных терминов в русскоязычных источниках не существует и большинство авторов не указывают, какой именно процесс они подразумевают, предлагая читателю самостоятельно разбираться в этом вопросе, исходя из контекста повествования. В настоящей работе под термином «окисление» в основном будут подразумеваться реакции присоединения одного или двух атомов кислорода к молекуле, кроме специально оговоренных случаев (перенос электрона/одноэлектронное окисление).

Для окислителей и свободных радикалов белки являются основными мишенями из-за их высокой концентрации в клетках, высокой реакционной способности этих частиц по отношению к белкам и расположения белка относительно окислителя [75,76]. Одноэлектронное окисление и присоединение атомов кислорода белка может быть вызвано как окислителями напрямую, так и косвенно через реакции вторичных продуктов, возникающих в результате первоначального окислительного повреждения. Известно, что перенос электрона и окисление вызывают множественные ПТМ, которые приводят к изменениям структуры, заряда, гидрофобности / гидрофильности, укладки и функций белков [75]. Традиционно принято считать, что основными окисляющими агентами *in vivo* являются реакционные формы кислорода: синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и свободные радикалы – гидроксильные радикалы (OH^\bullet) и супероксид ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [52]. Предполагается, что $^1\text{O}_2$ и $\text{O}_2^{\bullet-}$ генерируются в биологических

системах в результате ряда эндогенных процессов (например, ферментативных и химических реакций) и экзогенных под действием различных внешних факторов, например, УФ-света в присутствии сенсбилизаторов. УФ-излучение является важным источником активных форм кислорода (АФК): HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и $^1\text{O}_2$.

Наиболее подверженными переносу электрона и окислению являются серосодержащие остатки цистеин (Cys), метионин (Met) и цистин (дисульфид) и ароматические остатки гистидин (His), тирозин (Tyr), Trp и в меньшей степени фенилаланин (Phe) [75-77]. Алифатические аминокислоты также могут подвергаться переносу электрона и окислению, но в значительно меньшей степени. Присутствие этих аминокислот в больших количествах в некоторых белках делает их мишенями для окислительных агентов. Повреждение также может происходить по α -углероду аминокислоты. Степень повреждения зависит от наличия заряда на окислителе и от доступности остатка. Например, остатки Trp часто скрыты в белковых структурах и ограничено взаимодействуют с растворителем. Недоступность мишени и электростатические взаимодействия между аминокислотой и заряженным окислителем снижают вероятность повреждения. Таким образом, нейтральные вещества-окислители зачастую наносят больший вред, чем заряженные [75]. Реакция с каждым из перечисленных выше остатков приводит к появлению других реакционноспособных частиц. Однако, благодаря ферментативным системам хрусталика одноэлектронное окисление Cys и Met является обратимым процессом, тогда как перенос электрона и окисление остальных аминокислотных остатков необратимо и влечет за собой приобретение других ковалентных модификаций, таких как усечение пептидной последовательности, нитрование, галогенирование и образование ковалентных связей между белками и липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами. Модификации приводят к серьезным нарушениям в белках, а именно вызывают их фрагментацию, потерю основных функций и агрегацию, что ведёт к дисфункции клеток и тканей. В молодом возрасте поврежденные белки подвергаются деградации ферментативными системами клетки, однако, в процессе старения «испорченные» белки накапливаются, что приводит к различным патологиям [76].

α -Кристаллин обладает только двумя остатками Cys, чувствительными к окислению, в то время как в состав β - и γ -кристаллинов входит от 4 до 10 остатков Cys (Таблица III Приложения 1). Следовательно, белки семейства β/γ -кристаллинов более подвержены модификации +16 Да (присоединение одного атома кислорода) на цистеине. В настоящее время известно, что в молодых хрусталиках 37.5% Met находится в окисленном состоянии, тогда как в катарактальных хрусталиках их количество достигает 50% [78]. Недавно была продемонстрирована потеря шаперонной активности αA -кристаллина из-за окисления Met [79]. Остатки Met1 αA -кристаллина и Met68 αB -кристаллина, по-видимому, особенно чувствительны

к окислению *in vivo*. Окисление по Met обратимо и восстанавливается метионинсульфоксидредуктазой [52]. Недавние исследования β_L -кристаллинов (низкомолекулярных олигомеров β -кристаллина) показали, что окисление фрагментов этих белков подавляет способность α -кристаллина предотвращать их выпадение в осадок в результате тепловой денатурации [63].

Ароматические аминокислотные остатки, особенно Trp, также подвержены процессам перенос электрона и окисления. Несмотря на то, что частота встречаемости Trp в белках значительно ниже, чем других аминокислот, его окисление проходит по различным положениям индольного кольца, порождая тем самым большое количество окисленных форм белка. Наиболее охарактеризованными продуктами окисления аминокислотного остатка Trp в белках хрусталика является радикалы типа белок-Trp[•]. Окисление остатков Trp может привести к димеризации, олигомеризации и агрегации белка [76].

Как говорилось в разделе 1.2 настоящего обзора, хрусталик глаза представляет собой практически обескислороженную ткань, поэтому можно предположить, что реакции с активными формами кислорода вносят незначительный вклад в модификацию белков по сравнению с реакциями фотоокисления.

1.4.2. Фотоокисление белков хрусталика

Все живое на Земле ежедневно подвергается воздействию солнечного света. В большинстве случаев это воздействие важно для жизнеспособности и здоровья. Однако, наряду с полезным эффектом, УФ-излучение, при наличии необходимых хромофоров, может вызывать модификации белков. Широко известны два пути фотоокисления белков. Первый путь – это прямое фотоокисление биомолекул за счет поглощения в основном света УФ-Б диапазона (280-315 нм) аминокислотными остатками Trp, Tyr, Cys, Phe, His, Met и дисульфидами (Cys-Cys). Поглощение кванта света высокой энергии может приводить к прямой фотоинициации аминокислот с образованием радикалов, что вызывает наибольшие повреждения белков. Образование триплетных состояний с последующими реакциями также дает вклад в деградацию полипептидов. По второму пути излучение УФ-А диапазона (315-400 нм) поглощается не самими белками, а молекулами хромофорами данного излучения (непрямое фотоокисление) (Схема 1). Хромофоры под действием кванта света переходят в синглетное возбужденное состояние, из которого в результате интеркомбинационной конверсии переходят в более долгоживущее триплетное состояние. В случае высокого выхода триплетных состояний (более 20%) такие молекулы называются фотосенсибилизаторами. Триплетные молекулы либо переходят в основное состояние, либо реагируют с белками. Выделяют два типа реакций фотосенсибилизаторов в триплетном состоянии с белками: (1) прямая реакция с образованием

радикалов (тип I) и (2) перенос энергии от возбужденного сенсбилизатора к молекулам кислорода с получением $^1\text{O}_2$, который уже и окисляет находящиеся рядом аминокислотные остатки белков (тип II). Канал, по которому пойдет реакция, зависит от химической структуры фотосенсибилизатора, длины волны возбуждения и условий реакции. Как правило, реакции фотоокисления с участием фотосенсибилизаторов протекают по смешанному механизму (типа I + тип II), с образованием как $^1\text{O}_2$, так и радикалов биомолекул и супероксида ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [7,80].

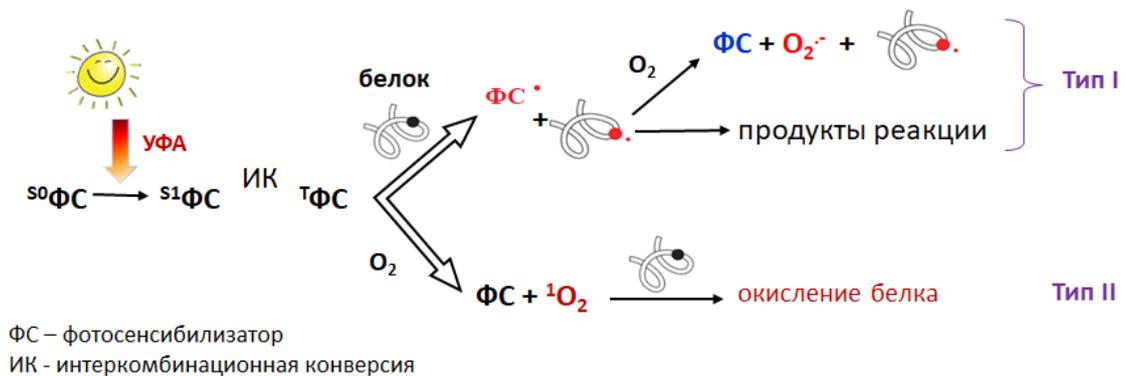


Схема 1.1. Непрямое окисление белков

Индольное кольцо Trp обладает наибольшим поглощением в УФ-Б диапазоне среди стандартных 20 аминокислот, из которых состоят все белки. Под действием УФ-Б излучения основными продуктами фотолиза Trp являются N-формилкинуренин (NFK) и кинуренин (KN), образованные в последовательных реакциях гидролиза аминокислоты и окисления кислородом, в которых побочным продуктом является супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Более подробно о KN и NFK будет рассказано в разделах 1.5.2-1.5.3. Стоит отметить, что важным свойством NFK является способность выступать в качестве эндогенного фотосенсибилизатора УФ-Б и УФ-А излучения [81,82]. Существуют три возможных пути его фотосенсибилизации: (1) ^1NFK сначала вступает в реакции тушения с другими молекулами системы, отличными от O_2 (Тип I); (2) триплетное состояние NFK (^3NFK) передает энергию молекуле O_2 с образованием синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), который в свою очередь будет реагировать с белками (тип II); (3) ^1NFK реагирует с H_2O с образованием гидроксильных радикалов (OH^{\cdot}) и NFKH^{\cdot} ; последний в свою очередь реагирует с O_2 с образованием $\text{O}_2^{\cdot-}$. Таким образом, фотоокисление Trp до NFK может приводить к формированию трёх АФК: $^1\text{O}_2$, OH^{\cdot} и $\text{O}_2^{\cdot-}$, которые далее способны вступать в реакции с Trp и белками [81]. Важно отметить, что несмотря на высокую фотохимическую активность, NFK не был обнаружен в хрусталике глаза, [81] что указывает на его быструю и эффективную трансформацию в последующие продукты кинуренинового пути распада триптофана (см. раздел 1.5.2).

В дополнение к прямому фотоокислению аминокислотные остатки Trp также очень чувствительны к $^1\text{O}_2$ -опосредованному окислению. Последнее может приводить к образованию как NFK и KN, так и замыканию кольца с образованием 3-гидропероксипирролоиндолов (HPPI) и 3a-дигидроксипирролоиндолов [7,80]. Аналогичные реакции могут протекать и с триптофан-содержащими белками. Было показано, что ряд продуктов окисления / деградации свободного Trp реагирует с белками, в частности с белками хрусталика, что приводит к образованию ковалентно связанных продуктов KN и его производных с остатками Cys, His и лизина (Lys) [83-86]. Таким образом, образование NFK, KN и других производных Trp в полипептидной последовательности белка под воздействием УФ-излучения может привести к усилению фотоокисления белков-мишеней из-за образования реакционно-активных частиц при дальнейшем облучении и их последующих реакций.

Одноэлектронное окисление Trp приводит к образованию его радикалов, которые являются долгоживущими частицами, способными вступать в реакции с другими радикалами. В работе Carroll и коллег [87] было показано, что образовавшиеся радикалы Trp^\bullet в Trp-содержащих пептидах подвергаются быстрой димеризации ($k = 2 - 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) с образованием разнообразных структур типа Trp-Trp (связи C-C и C-N). Однако наряду с реакцией рекомбинации двух радикалов Trp^\bullet , в тканях могут протекать конкурирующие процессы. В недавней работе Carroll и коллеги [88] показали, что Trp^\bullet реагируют с $\text{O}_2^{\bullet-}$ с константой скорости $k = 1-2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, которая не зависит от структуры Trp-содержащего пептида. В аэробных условиях эта реакция становится более предпочтительной, нежели димеризация. Продуктами реакции между Trp^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$ являются гидропероксиды аминокислоты, деградация последних в конечном счёте приводит к образованию NFK, KN, спиртов и диолов. В белках реакции димеризации радикалов Trp^\bullet также будут конкурировать с реакциями переноса электронов с остатков Tug на радикал триптофана. Константы скорости таких реакций составляют от 10^2 до 10^4 s^{-1} и сильно зависят от расстояния между остатками, структуры белка и его конформации [89-92]. Кроме того, было отмечено, что на полученные значение констант скорости димеризации и время жизни Trp^\bullet оказывают отрицательное влияние как суммарный заряд пептида, так и стерические факторы. Последнее обстоятельство играет особенно важную роль в том случае, когда радикал образуется на аминокислотных остатках, скрытых глубоко внутри пептидной последовательности и не доступных для второй молекулы Trp^\bullet [87]. Образование Trp-Trp ковалентно связанных белков может способствовать накоплению агрегатов белков в клетках, подверженных окислительному стрессу.

Тирозин, участвуя в аналогичных триптофану реакциях, образует катион-радикалы и феноксильные радикалы. Феноксильные радикалы Tug могут в дальнейшем участвовать в разнообразных реакциях, включая димеризацию (через C-O и C-C-связи) с образованием

димеров Туг. Фотоокисление свободных остатков Туг $^1\text{O}_2$ приводит к формированию различных пероксидов и циклических продуктов с участием α - NH_2 -группы [7]. Исследования показали, что при фотолизе белков в отсутствие или в присутствии фотосенсибилизатора, генерирующего $^1\text{O}_2$, основными продуктами являются дитиозиновые димеры и 3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA) [93-95].

Для His, Met и Cys фотоокисление происходит в основном через реакции с сенсибилизаторами. Окисление His $^1\text{O}_2$, генерированным фотосенсибилизирующей молекулой, приводит к образованию различных эндопероксидов или бициклических продуктов (через α - NH_2 -группу), а одноэлектронное окисление Cys к образованию цистина (Cys-Cys) и других продуктов. При одноэлектронном окислении Met с участием сенсибилизаторов, на первичных этапах реакции образуются катион-радикалы $\text{MetS}^{+\bullet}$, которые могут подвергаться ряду реакций в зависимости от pH, включая димеризацию. Фотоокисление светом УФ-диапазона дисульфидных связей в белках (RSSR) заключается в переносе электрона с триплетного состояния ^1Tyr и/или ^1Tug к связи Cys-Cys, что приводит к образованию анион-радикала ($\text{RSSR}^{\bullet-}$) последнего, который в свою очередь диссоциирует с образованием аниона RS^- и радикала RS^\bullet или участвует в реакции с O_2 по механизму переноса электрона с образованием $\text{O}_2^{\bullet-}$. Полученные таким образом тиольные радикалы подвергаются множественным реакциям, включая отщепление водорода от ближайшей связи C-H, что приводит к дальнейшему повреждению полипептидной цепи белка [7].

Фотоокисление Phe протекает значительно проще относительно других ароматических аминокислот. Реакционные формы Phe при различных путях фотоокисления быстро деградируют с образованием бензильных радикалов (непрямое окисление) или гидроксильированных циклических продуктов (прямое окисление) [7,80].

Стоит отметить, что антиоксиданты хрусталика – глутатион и аскорбат, речь о которых пойдет в разделе 1.5.1, эффективно предотвращают фотоокисление свободных аминокислот и аминокислотных остатков белков.

Считается, что фотосенсибилизированное окисление белков хрусталика глаза приводит к образованию ковалентных сшивок между кристаллинами и к формированию агрегатов с высокой молекулярной массой. Такая модификация белка может играть важную роль при помутнении хрусталика. В работе Balasubramanian и коллег [96] было исследовано фотоокисление по типу II, при котором $^1\text{O}_2$ реагирует с кристаллинами. Было показано, что (а) остатки Tyr и Tug окисляются до NFK в случае триптофана и до других продуктов, соответствующих Tug, что само по себе не приводит к агрегации белка; (б) окисление His необходимо для образования ковалентных агрегатов белка с высокой молекулярной массой. Отсутствие His в полипептидной цепи или его блокировка защитными группами препятствует

формированию агрегатов. Считается, что окисленный белок является более кислым, чем исходный, и имеет измененную третичную структуру. Среди кристаллинов реакционная способность по отношению к $^1\text{O}_2$ изменяется в ряду $\gamma > \beta > \alpha$, а также $\gamma\text{A/E} > \gamma\text{D} > \gamma\text{B}$ -кристаллин [96]. Кроме того, при облучении бычьего α -кристаллина помимо высокомолекулярных агрегатов были обнаружены флуоресцентные продукты, поглощающие в синей области спектра с максимумом поглощения на 440/460 нм, количество которых вместе с агрегатами увеличивается при продолжительном УФ-облучении. Этот эффект связывают с появлением NFK в качестве первичного продукта фотоокисления Trp, который также может поглощать в УФ-диапазоне, с дальнейшим превращением во вторичные фотопродукты [97,98].

Шаперонная активность наиболее распространенного белка хрусталика – α -кристаллина – после облучения УФ-Б излучением снижается [99]. Стоит отметить, что положение аминокислотного остатка Trp в белке и его окружение сильно влияют на подобные модификации. Было показано, что для N-концевых остатков Trp α -кристаллина фотоокисление происходит быстрее, чем для аналогичных остатков, скрытых внутри белковой глобулы [100]. Finley и его коллеги [101] на бычьих α -кристаллинах показали, что при длительном воздействии УФ-излучения происходит однократное или многократное окисление N-концевых фрагментов обеих субъединиц α -кристаллина по Met, His и Trp. Они также обнаружили, что Met1 в обеих субъединицах и Met68 α -кристаллина подвергаются однократному окислению.

Таким образом, фотоокисление аминокислотных остатков белков может привести к конформационным изменениям в структуре и дестабилизации, усилению чувствительности к другим модификациям и УФ-излучению, потере функций и агрегации.

1.4.3. Ковалентное присоединение УФ-фильтров

Хрусталики человека и других млекопитающих содержат низкомолекулярные соединения, которым приписывается функция молекулярных УФ-фильтров за счет эффективного поглощения УФ-А излучения и его конверсии в тепло без инициирования фотохимических реакций. К УФ-фильтрам хрусталика относятся кинуренин (KN), 3-гидроксикинуренин (ЗОНKN), *O*- β -D-гликозид 3-гидроксикинуренина (ЗОНKG) (Рис. 1.5) [9,102,103]. Более подробно речь о фотофизических и фотохимических свойствах этих соединений пойдет в разделах 1.5.2-1.5.3 настоящего обзора. Было показано, что при физиологических условиях KN и его производные являются нестабильными соединениями и могут претерпевать спонтанное дезаминирование [104,105]. Дезаминированный KN (α,β -ненасыщенный кетон, СКА) может реагировать с аминокислотами, такими как Cys, His и Lys, ковалентно связываясь с ними. Некоторые из этих продуктов были найдены в человеческом хрусталике, где они, предположительно, действуют как УФ-фильтры [106-108].

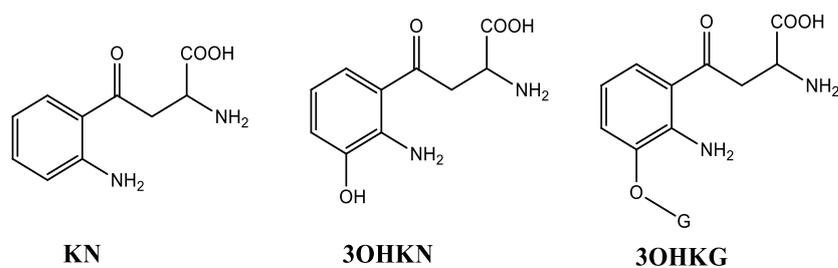


Рис. 1.5. Структуры УФ-фильтров хрусталика.

В настоящее время известно, что KN способен ковалентно связываться с белками хрусталика, вызывая окрашивание последних в желтый цвет. Под действием УФ-А излучения белки с ковалентно связанным KN демонстрируют образование ковалентных связей между аминокислотными остатками с формированием высокомолекулярных олигомерных форм белков [84,95,109]. Механизм присоединения УФ-фильтров состоит из двух этапов (Схема 2). На первом этапе происходит дезаминирование боковой цепи KN с образованием α,β -ненасыщенного кетона. Затем происходит реакция нуклеофильного присоединения по Михаэлю кетона к аминокислотным остаткам белков хрусталика. Существует несколько факторов, влияющих на присоединение УФ-фильтров к аминокислотным остаткам белков: (1) значения pK_a аминокислот (более низкие значения увеличивают реакционную способность этих аминокислот по отношению к KN при физиологическом pH); (2) третичная структура белка и доступность остатков для реакции; (3) стабильности ковалентно связанного продукта при физиологическом значении pH. Образование His-KN и Lys-KN более предпочтительно, чем Cys-KN. Это может быть связано с тем, что остатков Cys в кристаллинах значительно меньше, чем His и Lys (Таблица III Приложения 1), а также с тем, что продукт Cys-KN является менее термически стабильным. Считается, что Cys является начальным участком связывания в белках хрусталика, но из-за нестабильности Cys-KN при нейтральном pH эти продукты разлагаются с восстановлением Cys и дезаминированного KN, который становится доступным для образования других типов ковалентно связанных продуктов [110].

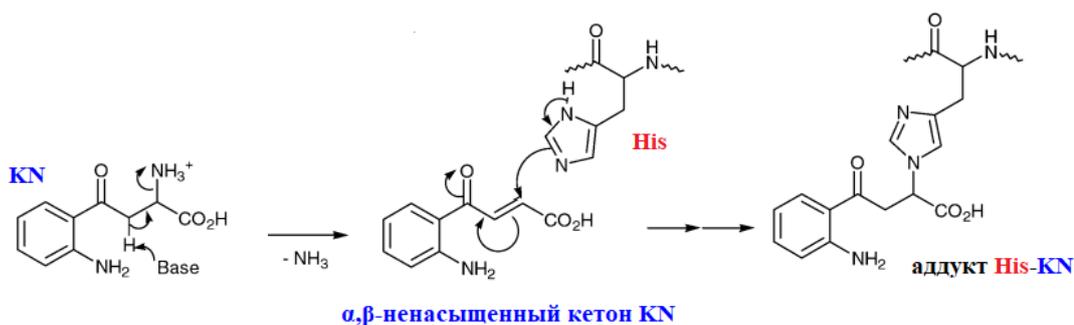


Схема 1.2. Механизм образования ковалентно связанного продукта His-KN в белках.

В литературе также представлены данные о других УФ-филтрах, 3-ОНКNG и 3-ОНКN, ковалентно связанных с кристаллинами и природным антиоксидантом хрусталика глутатионом (GSH) по аналогичному механизму [83,110]. В работе Aquilina и соавторов [111] были определены аминокислотные остатки γ S- и β V1-кристаллинов, модифицированные 3ОНКG, которыми оказались остатки Cys82 и Cys129 в γ S-, и Cys79 в β V1-кристаллине. Модификация белков происходит, в основном, в ядре хрусталика, и концентрация связанного с белком 3ОНКN увеличивается с возрастом [112]. Так, у людей в возрасте 50-ти лет не было обнаружено 3ОНКN, присоединенного к кристаллинам, в то время как уже в 68-летнем хрусталике уровень связанного 3ОНКN составил 0.3 ммоль/моль белка [83]. В свою очередь было показано, что KN реагирует с His83 α V-кристаллина, который находится в пептид-связывающем регионе белка. Подобная реакция может влиять на шаперонную активность α -кристаллина в стареющих хрусталиках [109].

Последствия связывания кинуренинов с белками хрусталика до конца не изучены, однако, уровень содержания этих продуктов увеличивается в процессе старения. Присоединение кинуренинов к белкам увеличивает фотоактивность последних. В случае ковалентного связывания 3ОНКN с белком хрусталика человека можно ожидать, что о-аминофенольное кольцо связанного 3ОНКN будет подвергаться реакциям окисления, которые, в свою очередь, могут приводить к образованию $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Окисление связанного 3ОНКN также может приводить к образованию ковалентных связей в белке, окрашиванию, выпадению в осадок и образованию катаракты [110].

1.4.4. Фосфорилирование, дезаминирование и усечение кристаллинов

Не меньший вклад в потерю растворимости и функций белков хрусталика оказывают такие распространенные регуляторные ПТМ как фосфорилирование, дезаминирование и усечение кристаллинов. Стоит отметить, что в настоящей работе особого внимания этим типам ПТМ не уделялось, поскольку предполагается, что фотохимические реакции не оказывают какого-либо влияния на их формирование. Обзор литературы по данным модификациям позволяет понять общую картину ПТМ, которые могут происходить в хрусталике глаза и приводить к развитию катаракты.

1) Фосфорилирование

Фосфорилирование белков способно изменять внутреннюю локализацию белков, стабильность и способность к последующим ковалентным модификациям. Основными участниками процесса фосфорилирования являются ферменты класса киназ (протеинкиназы) и остатки серина (Ser), треонина (Thr) и Тур. Протеинкиназы переносят фосфатную группу с

аденозинтрифосфата (АТФ) на остатки аминокислот в белках, образуя химически устойчивые фосфорные эфиры.

В кристаллинах фосфорилированию чаще всего подвергаются остатки Ser [52]. Оба α -кристаллина (α A- и α B-) фосфорилируются цАМФ-зависимой киназой [113-115], активность которой зависит от уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в клетке. Основным сайтом модифицирования в α A-кристаллине человека является Ser122 и дополнительно - Ser41, Ser42 или Ser45, однако, точное положение модификации определить не удалось из-за отсутствия сайтов для ферментативного гидролиза и последующего анализа пептидов с меньшей аминокислотной последовательностью [116]. Для бычьего α A-кристаллина были идентифицированы, по крайней мере, ещё три сайта фосфорилирования *in vivo* между аминокислотами 122 и 173, а также между 29 и 38 [117], которые могут дефосфорилироваться за счёт присутствия в клетках фосфатазы [118], для α B-кристаллина - Ser19, 45 и 59 [119-121]. β V2-кристаллин, основной человеческий β -кристаллин, фосфорилируются в концевых доменах, в основном по аминокислотному остатку Ser203 *in vitro* [122] и дополнительно по Thr118 [123]. Другие представители данного семейства - β A2- и β V3-кристаллины являются монофосфорилированными белками по Ser30 и Tyr29, соответственно. Сообщается, что β A3/A1, β A4 и β V1 содержат по 2 сайта фосфорилирования: Thr127 и Ser160, Ser34 и Thr43, Ser9 и Thr11, соответственно [52]. Известно, что среди γ -кристаллином только γ V (Tyr63, Tyr66), γ C (Tyr63, Tyr66) и γ S (Ser89) подвергаются действию киназ [123,124].

Физиологическая роль фосфорилирования α -кристаллина и его влияние на функции белка до конца не доказано. Было показано, что модификация может изменять структуру белка, не оказывая влияние на способность субъединиц собираться в нативно-подобные агрегаты [125]. α -Кристаллины являются белками теплового шока, а фосфорилирование белков теплового шока изменяет их способность связываться с белками; возможно, что внесение фосфатной группы в полипептидную цепь может влиять на роль α -кристаллина, как защитника других кристаллинов от модификаций [116].

2) Дезаминирование

Основными сайтами дезаминирования являются аминокислотные остатки глутамина (Gln) и аспарагина (Asn). Дезаминирование по Asn приводит к образованию смеси аспартата и изоаспартата, по Gln – к образованию глутаминовой кислоты [126]. Дезаминирование вызывает изменение массы пептида всего на 1 Да, что затрудняет точное определение этой модификации. Исследования кристаллинов, выделенных из молодых хрусталиков без патологии, показали значительное содержание дезаминированных форм белков, количество которых увеличивается с возрастом или развитием заболевания [124,127]. Однако специфическая роль дезаминирования в агрегации белка хрусталика при катарактогенезе остается невыясненной,

поскольку дезаминированные белки также часто содержат другие модификации, такие как усечение, гликирование и окисление [52]. Дезаминирование приносит отрицательный заряд на белок и влияет на его третичную структуру, изменяя растворимость белка, а также его структурные и функциональные свойства [125,127-129].

Глубокое влияние на структурные и функциональные свойства α -кристаллинов и максимальное снижение шаперонной активности наблюдалось при дезаминировании остатка Asn123 в α A-кристаллине [130,131] и Asn146 в α B-кристаллине [131]. Дезаминированные формы гетеро-агрегатов α A- или α B-кристаллинов имеют пониженную гидрофобность, увеличенный размер олигомеров, измененную структуру и сниженную шаперонную активность [125,131]. Дезаминирование считается основной возрастной модификацией β -кристаллинов. В ряде исследований было выявлено большое количество сайтов дезаминирования в C- и N-концевых доменах, дестабилизирующих структуры белков [67,72,124,127,128,132]. Hanson и коллеги в своих исследованиях по изучению водорастворимых γ -кристаллинов (γ S, γ C и γ D) показали, что дезаминирование Asn и Gln приносит более полярный карбоксильный анион в полипептидную цепь, что может вызывать ионные взаимодействия, приводящие к конформационным изменениям, что, как следствие, облегчает образование дисульфидных связей в γ -кристаллинах [133]. Таким образом, данные, представленные в литературе, показывают, что дезаминирование *in vivo* может влиять на стабильность белка и накопление подобных модификаций, вероятно, способствует потере растворимости кристаллинов.

3) Усечение белков

Укорачивание пептидной последовательности кристаллинов с N- и/или C-конца (усечение) наблюдается во время старения организма и переводит белки из водорастворимых в водонерастворимые олигомеры. Усечение происходит между остатками Ser и/или Thr [134-137] и в некоторых случаях между Asn/Glu [129] в α -кристаллинах. Гибкие гидрофильные C-концы α -кристаллина необходимы для правильной олигомеризации и определяют растворимость этих белков. Вполне вероятно, что усечение частично удаляет последовательность, которая отвечает за поддержание комплексов шаперон-субстрат в растворимой форме [52,133].

Среди β -кристаллинов усечению в основном подвергаются β B1, β A3 и β A1, модифицированные производные которых быстро накапливаются с возрастом [138,139]. Ещё на ранних этапах развития β B1- и β A3-кристаллины теряют 15 и 22 аминокислоты, соответственно, с их N-конца [140,141]. Более интенсивное усечение β B1 происходит во время старения [67,140]. Роль N-концов в настоящее время неизвестна, вероятно, они облегчают взаимодействия с другими субъединицами кристаллина [142]. Потеря конечного пептида может нарушить эти взаимодействия. Кроме того, усечение β B1 по его N-концу в сочетании с дезаминированием значительно снижает стабильность белка [143,144]. β A1-Кристаллин можно

считать укороченной версией β A3-кристаллина, потеря N-конца немного увеличивает его стабильность. На прозрачность хрусталика влияет усечение, при котором изменяется растворимость белка. Например, для правильной сборки β _n-кристаллина (высокомолекулярного олигомера β -кристаллина, в основном октомерного) необходимо, чтобы β V1-кристаллин не был усеченным, в противном случае происходит распад олигомерного комплекса β _n-кристаллина. В случае γ S-кристаллина потеря N-концевого фрагмента стабилизирует структуру, но при отделении N-концевых доменов он становится более чувствительным к окислению [72,132].

1.4.5. Олигомеризация и агрегация белков хрусталика

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что большинство ПТМ способствуют или вызывают олигомеризацию кристаллинов посредством образования дисульфидных связей между остатками цистеинов или иных ковалентных сшивок между различными аминокислотными остатками белков. Свободные радикалы, образованные в ходе физиологических процессов и при воздействии множества внешних источников, способны быстро реагировать с белками, приводя к модификации их аминокислотных остатков, фрагментации полипептидной цепи и агрегации. Считается, что возрастное накопление модифицированных кристаллинов играет определенную роль в потере прозрачности хрусталика и в развитии катаракты. Образование высокомолекулярных агрегатов является распространенным и достаточно хорошо изученным следствием фотоокисления белков.

Известны два механизма образования ковалентных сшивок в белках: (1) взаимодействие двух радикалов и (2) взаимодействие радикальной частицы с молекулой мишенью – аминокислотным остатком белка. По первому механизму димерные структуры в клетках могут формироваться через радикальные реакции. Радикальные частицы обладают разной реакционной способностью, поэтому не все образовавшиеся радикалы формируют димерные структуры. Например, радикалы алифатических аминокислот гораздо предпочтительнее реагируют с кислородом, присутствующим в клетке, чем друг с другом [75]. Однако, в некоторых тканях, например, в хрусталике [39], кислород содержится в следовых количествах и единственным путем гибели радикалов является рекомбинация с образованием димеров. Ароматические аминокислоты (Trp и Tyr) и Cys реагируют с кислородом гораздо с меньшей скоростью, что повышает выход димерных продуктов: дитриптофанов, дитириозинов и дицистеинов, соответственно [75].

Относительно второго пути димеризации в литературе пока мало данных. Известно, только лишь о редко встречающихся аминокислотах: дегидроаланин и дегидроаминомасляная кислота, которые могут реагировать по данному механизму. Дегидроаланин образуется в реакциях разложения Ser, фосфосерина или селеноцистеина (Sec), а дегидроаминомасляная

кислота из Thr и фосфотреонина [2,75,145]. Эти производные содержат двойную связь между α -углеродом и первым атомом углерода боковой цепи, к которой впоследствии будет присоединена радикальная частица и образуется ковалентная связь; примером может служить присоединение Cys^{*} к дегидроаминомасляной кислоте [75]. Поскольку двойные связи в белках практически отсутствуют, ковалентные сшивки по второму механизму образуются редко, что делает радикал-радикальный механизм основным для процесса димеризации. Далее в настоящем обзоре будут рассмотрены конкретные примеры ковалентных сшивок, которые могут образовываться в белках.

Благодаря низкому окислительному потенциалу, Trp и Tyr являются основными мишенями для окисления, что, в конечном счёте, приводит к формированию индольных или феноксильных радикалов. Исторически первыми были обнаружены белки с ковалентными сшивками по остаткам Tyr [146]. Ковалентная связь в димерах может образовываться по двум положениям: между C3-C3 атомами или между C3-O (фенольной группы) [75,147]. Образование дитиозиновых сшивок было продемонстрировано *in vitro* и *in vivo* для ряда белков (лизоцима, альбумина, РНКазы и других) [75].

Стоит отметить, что, несмотря на идентичность радикальных механизмов образования ковалентных сшивок в результате комбинации радикалов Tyr, сшивки Trp-Trp были обнаружены в белках лишь недавно [148,149]. Как уже было описано выше, на формирование ковалентных связей особое влияние оказывает аминокислотное окружение радикала Trp^{*} [87]. Ковалентная связь может быть образована между двумя C3-C3 углеродными атомами индольных колец и C3-N атомами, и, кроме того, могут образовываться многочисленные стереоизомеры, что сильно затрудняет определение структур димеров [75,87].

Окисление смеси пептидов, содержащих остатки Trp и Tyr, с помощью высокоэнергетических УФ-лазерных импульсов приводит к образованию радикалов пептид-Trp^{*} и пептид-Tyr^{*}, которые рекомбинируют с образованием ковалентных сшивок не только между одинаковыми аминокислотными остатками (Trp-Trp и Tyr-Tyr), но и Trp-Tyr [76]. Димеры подобной структуры часто встречаются в модельных пептидах, подвергшихся УФ-облучению, в белковых экстрактах грамположительных бактерий *Lactococcus lactis*, подвергнутых фотоокислению и других субстратах [75].

В литературе также имеются данные о роли окисленных остатков His в образовании ковалентных сшивок. Вероятнее всего, в сшивках участвуют продукты окисления His через нуклеофильные реакции с молекулами-мишенями. Димерные формы His-His, His-Cys и His-Lys были идентифицированы в окисленных моноклональных антителах IgG, His-Arg и His-Lys в фотоокисленной РНКазе А [75] и лизоциме куриного яйца [150].

Фосфосерин и фосфотреонин также могут принимать участие в олигомеризации белка. Упомянутые ранее продукты разложения этих соединений – дегидроаланин и дегидробутирин, способны не только взаимодействовать с радикальными частицами [75], но и участвовать в нуклеофильной атаке (реакция Михаэля) тиольной группы Cys или боковой аминогруппы Lys. В частности, реакция с дегидроаланином преобразует Cys в 3,3'-тиодиаланин, а с Lys в лизиноаланин [2,75,145]. Эти продукты были обнаружены в хрусталике человека. Основными продуктами ковалентного связывания дегидроаланина, обнаруженными в водорастворимых и в водонерастворимых фракциях белков, были гистидиноаланин и лантионин. Уровень содержания этих продуктов повышается при развитии катаракты. Лизиноаланин также присутствует в катарактальных хрусталиках в пикомолярных количествах [151].

Образование ковалентных сшивок между аминокислотными остатками белков является необратимым процессом, и в настоящее время неизвестно, как можно предотвратить агрегацию кристаллинов или восстановить уже поврежденный белок. В работе Sherin и коллег [152] проводили изучение бычьего α -кристаллина, подвергнутого анаэробному фотолизу (330-390 нм) в присутствии природного фотосенсибилизатора хрусталика – кинуреновой кислоты. С помощью гель-электрофореза было показано, что в результате фотолиза образуются высокомолекулярные агрегаты белка, образование которых возможно предотвратить с помощью природных антиоксидантов хрусталика, аскорбата и глутатиона восстановленного. Было показано, что аскорбат является эффективным тушителем возбужденных молекул кислоты, а глутатион – захватчиком свободных радикалов. Однако, с возрастом антиоксидантная защита ослабевает и происходит накопление модифицированных белков и, как следствие, развивается катаракта. Дитиросиновая связь, внутри- или межмолекулярная на поверхности белка, чаще всего идентифицируется как маркер окислительного стресса, старения, развития заболеваний и обнаруживается при различных патологиях [75]. Несмотря на то, что дитиросиновая димеризация γ -кристаллина не изменяет его вторичную структуру, она очень сильно влияет на третичную, увеличивая скорость агрегации и потерю растворимости [153].

В другой работе [154] было также показано, что при УФ-облучении бычьих γ - и α -кристаллинов растворы этих белков теряют прозрачность (становятся светорассеивающими), а при электрофоретическом анализе наблюдается снижение количества мономерной формы белков с массой ~20 кДа и образование олигомеров с более высокой молекулярной массой, по-видимому, в результате образования ковалентных сшивок. Стоит отметить, что изменения оптических свойств растворов при фотолизе идет с различной скоростью (у γ -кристаллина примерно в два раза быстрее), и светорассеяние наиболее ярко выражено в случае с γ -кристаллином, что вероятно говорит о различных механизмах агрегации для этих белков.

Авторы предполагают, что под действием света в случае γ -кристаллина происходит образование ковалентных связей между мономерными структурами белка с образованием нерастворимых высокомолекулярных олигомеров. Тогда как в случае α -кристаллина ковалентные связи образуются внутри уже существующего гетеро-олигомерного комплекса, что в конечном итоге не приводит к увеличению его молекулярной массы и сохраняет его способность к растворимости. Workman и коллеги показали, что добавление α -кристаллина к γ -кристаллину в стехиометрических количествах ($\gamma/\alpha = 1/n$, где $n=1\pm 4$) снижает светорассеяние раствора при УФ-облучении по сравнению с аналогичными экспериментами в отсутствие α -кристаллина [99].

На агрегацию бычьего α -кристаллина также могут оказывать влияние ионы Ca^{2+} , присутствующие в хрусталике и приводящие к его помутнению с ростом концентрации. Было показано, что при добавлении CaCl_2 к белку α -кристаллин теряет свою водорастворимость и раствор мутнеет. Удаление ионов Ca^{2+} из раствора восстанавливает его прозрачность и, по-видимому, приводит к диссоциации агрегатов [155]. В работе Mach и коллег [156] было показано, что добавление к нерастворимому α -кристаллину γ - (в основном γB) и βL -кристаллинов приводит к частичной диссоциации агрегатов и снижает светорассеяние раствора; кроме того, эти белки способны предотвращать химическую агрегацию α -кристаллинов. Несмотря на то, что небольшая часть γ - и βL -кристаллинов при инкубировании с α -кристаллином связывается с ним, авторы высказывают предположение, что одной из возможных ролей низкомолекулярных кристаллинов может быть восстановление α -кристаллина из агрегатов.

Усечение последовательности белков также вносит вклад в формирование высокомолекулярных агрегатов. Исследования по изучению белкового состава возрастных хрусталиков и хрусталиков с катарактой показали присутствие большого количества фрагментов кристаллинов в составе высокомолекулярных агрегатов водорастворимых и водонерастворимых фракций [157,158]. В работах [159,160] было показано, что в хрусталиках человека наблюдается накопление фрагментов пептидов с молекулярными массами от ~ 3 -18 кДа, содержание которых в возрастных или катарактальных хрусталиках оставляет около 20%. Понимание взаимодействия между белками хрусталика и фрагментами кристаллинов является ключом к оценке последствий неполной протеолитической деградации. В работе Santhoshkumar и соавторов [161] были идентифицированы низкомолекулярные пептиды до 3500 Да, которые потенциально могут участвовать в агрегации или являться маркерами старения и развития заболевания. Для изучения роли таких пептидов в агрегационных процессах, проводился их синтез и добавление к белкам хрусталика. Добавление пептидов αB - (1-18) и βA3 / A1 - (59-74) к фракциям белков увеличивало рассеяние света для β - и γ -кристаллинов, и значительно

снижало способность α -кристаллина функционировать в качестве молекулярного шаперона, тогда как пептид γ S не влиял на шаперонную активность α -кристаллина. Кроме того, присутствие пептида β A3 / A1- (59–74) в растворе приводит к формированию высокомолекулярных агрегатов α B-кристаллина. При этом замена гидрофобных остатков в пептидах α B- (1–18) и β A3 / A1- (59–74) на нейтральные или положительно заряженные приводила к потере способности этих пептидов вызывать агрегацию кристаллина и рассеяние света [161]. Позднее этими же исследователями были изучены свойства другого пептида и его укороченных производных - α A- (66–80) (SDRDKFVIFLDVKHF), пептидная последовательность которого входит в α -домен, отвечающий за шаперонную активность. Последовательность α A- (66–80) схожа с последовательностью β -амилоида, которая отвечает за образование фибрилл и может инициировать агрегацию белков. Было установлено, что с возрастом концентрация пептида α A- (66–80) в хрусталиках возрастает. Добавление этого пептида к фракции α -кристаллина приводит к агрегации последнего, который затем может функционировать в качестве центра агрегации при увеличении концентрации нативного белка или добавлении фракций β - и γ -кристаллинов [162]. Таким образом, агрегация белков хрусталика может происходить не только за счёт образование ковалентных связей через радикальные реакции. Низкомолекулярные пептиды кристаллинов, образованные *in vivo*, также могут вызывать возрастные изменения хрусталика, нарушая структуру и организацию кристаллинов, что приводит к потере их растворимости.

В настоящее время во многих лабораториях мира ведутся работы по поиску и установлению структуры и механизмов образования ковалентных сшивок в белках, вызванных различными ПТМ. Исследования осложняются многообразием как модификаций, так и кристаллинов, а также их сложной и многогранной структурой. Однако, основываясь на уже полученных результатах, можно сказать, что основными участниками в процессе агрегации являются аминокислотные остатки Trp и Tug кристаллинов. Прицельный поиск и моделирование нативных условий хрусталика (внутриклеточная среда, белок-белковые взаимодействия, содержание кислорода и низкомолекулярных соединений), а также проведение экспериментов *in vitro* на целом хрусталике, вероятно, позволят приблизиться к разгадке механизма старения и формирования катаракты.

1.5. Низкомолекулярные соединения хрусталика: антиоксиданты и УФ-фильтры

Глаз из-за своей уникальной структуры не имеет дополнительной защитной оболочки – плотного, непрозрачного эпителия кожного типа. Таким образом, он в несколько десятков раз чаще подвергается пагубному воздействию внешних факторов окружающей среды. Наиболее опасное влияние на здоровье зрительного органа оказывает излучение Солнца, под действием

которого в тканях образуются различные высокореакционные частицы. Особое внимание уделяется АФК (синглетный кислород и супероксид анион радикал кислорода), различным пероксидам (например, H_2O_2) и гидроксильным радикалам, которые могут вступать в реакции с белковыми и другими низкомолекулярными молекулами клеток хрусталика, приводя к их модификации и порождая новые формы активных частиц [163]. Для поддержания нормальной работы в хрусталике присутствуют молекулы антиоксидантной защиты и УФ-фильтры различного строения, которые вступают в реакции с высокореакционными частицами, преобразуя их в безопасные соединения.

1.5.1. Антиоксиданты

Известно, что окислительный стресс – это дисбаланс между про- и антиоксидантами в пользу первых. Окислительный стресс является основным фактором развития катаракты [79]. Концентрация белков, поврежденных окислительными процессами, в человеческом хрусталике возрастает с возрастом и значительно увеличивается при катаракте по сравнению со здоровыми хрусталиками [164]. Антиоксиданты могут предотвращать вызванное светом окисление белков [165] и липидов [166]. Антиоксиданты – это соединения, способные ингибировать окислительное действие свободных радикалов, АФК и иных окисляющих частиц/реагентов, нейтрализуя их или прекращая цепные реакции до повреждения жизненно важных молекул. Основными антиоксидантами хрусталика являются аскорбат (Asc) и глутатион восстановленный (GSH) (см. химические структуры на Рис. 1.6).



Рис. 1.6. Структуры основных антиоксидантов хрусталика человека: (А) глутатион, (Б) аскорбат.

GSH присутствует в хрусталике человека и других млекопитающих в концентрациях 1-10 мМ [3,5,163], больше всего его в клетках эпителия, где происходит синтез GSH под действием двух ферментов γ-глутамилцистеин синтетазы и глутатион синтетазы [167]. В остальные части хрусталика GSH поступает из эпителиального слоя диффузионным путем через щелевые контакты клеток хрусталика [168]. В процессе старения концентрация GSH

уменьшается на 12 % / десятилетие [3], что делает возрастные хрусталики более восприимчивыми к окислительному стрессу и к катарактогенезу [163]. Основными функциями GSH в хрусталике являются: предотвращение формирования дисульфидных связей между цистеинами белков, сохраняя структуры кристаллинов; и дезактивация реакционно активных частиц. Механизм взаимодействия GSH со свободными радикалами хорошо изучен [169,170] и представлен на Рис. 1.7 [169]. В процессе жизнедеятельности организма и при старении происходит накопление GSSG - окисленной формы GSH, эффективность защитного механизма снижается и развивается заболевание.

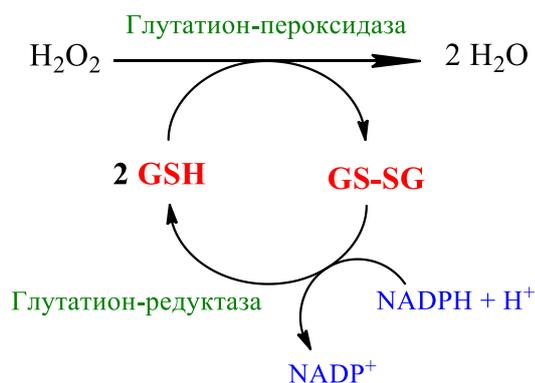


Рис. 1.7. Механизм действия GSH.

Другим важным водорастворимым антиоксидантом хрусталика, участвующим в его защите от окисления, является витамин С или L-аскорбат (Asc). В хрусталиках многих животных Asc накапливается в концентрациях (0.5-2 мМ) в несколько раз превышающей концентрацию в плазме крови (0.03-0.2 мМ) и в большинстве тканей глаза [163]. Его количество снижается в процессе развития катаракты [171]. Аскорбат проявляет сильные восстановительные свойства в реакции дезактивации АФК [172] и выступает в роли эффективного тушителя триплетного состояния УФ-фильтров, речь о которых пойдет ниже, по механизму переноса электрона [74]. Стоит отметить, что в результате сложного механизма антиоксидантной защиты белков от АФК с участием Asc [163,171,173] могут образовываться не менее вредные для биологических тканей, чем исходные АФК, высокореакционные продукты распада аскорбата [171,173,174]. В подтверждение этого было показано, что витамин С ответственен за химическое старение кристаллинов хрусталика [175], а последующие исследования показали способность витамина С приводить к формированию продуктов с высоким уровнем гликирования белков [175,176]. Кроме того, было продемонстрировано, что дегидроаскорбат может ковалентно связываться с белками, и при этом хрусталик теряет свою прозрачность [171,177].

1.5.2. Кинуренин и его производные – УФ-фильтры хрусталика

В клетках хрусталика человека содержится большое количество соединений с небольшими молекулярными массами – эндогенные хромофоры, которые эффективно поглощают УФ-А свет и переводят его в тепло, защищая сетчатку глаза от УФ-излучения и улучшая остроту зрения за счет снижения хроматической аберрации [102]. Низкомолекулярные соединения, обладающие подобными свойствами, принято называть молекулярными УФ-фильтрами. Среди них можно выделить первичные УФ-фильтры: кинуренин (KN), 3-гидроскинуренин (ЗОНKN), *O*- β -D-гликозид 3-гидроскинуренина (ЗОНKG), которые синтезируются в клетках из Trp напрямую и вторичные, являющиеся побочными продуктами кинуренинового пути, полученные в реакциях модификации ЗОНKG - гликозид 4-(2-амино-3-гидроксибензил)-4-оксобутановой кислоты (АНBG) и глутатионил-3-гидроскинуренин гликозид (ЗОНKG-GSH) (Схема 3) [102,103,178,179].

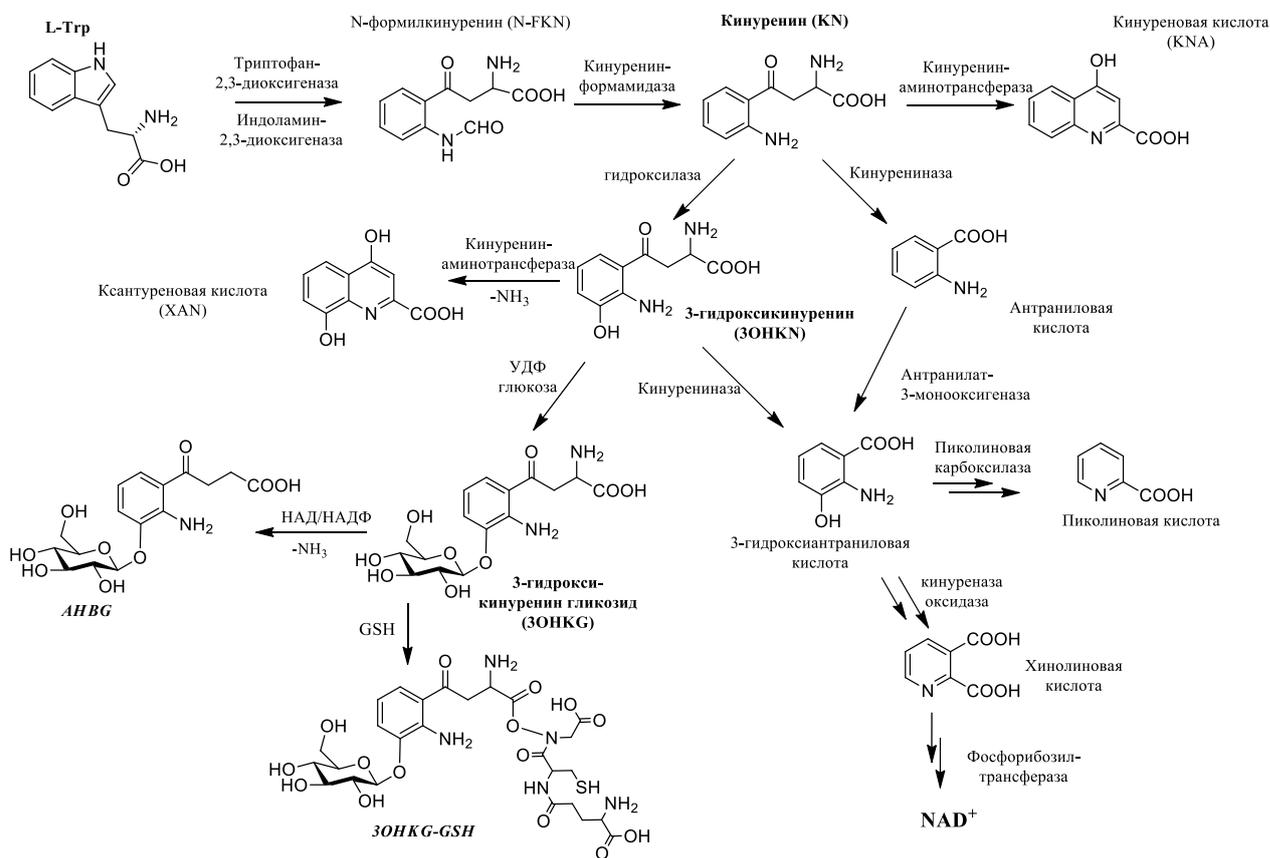


Схема 1.3. Кинурениновый путь метаболизма триптофана

Кинурениновый путь метаболизма триптофана (Схема 1.3) происходит в присутствии кислорода, необходимого для работы фермента триптофан-2,3-диоксигеназы, а также он является энергетически зависимым [179,180]. На первой стадии кинуренинового пути Trp под действием либо триптофан-2,3-диоксигеназы либо индоламин-2,3-диоксигеназы переходит в N-

формилкинуренин (NFK) с расщеплением индольного кольца. NFK является промежуточным продуктом пути и под действием фермента класса гидролаз – формамидазы быстро превращается в основной УФ-фильтр – кинуренин, концентрация которого в хрусталике человека моложе 20 лет составляет ~ 30 нмоль/г [3]. Однако, он не является конечным продуктом и под действием гидроксилазы, катализируемой NAD^+ переходит в ещё один УФ-фильтр хрусталика 3-гидроксикинуренин, содержание которого уже в два раза ниже (15 нмоль/г [3]). В реакции гликозилирования катализируемом ферментом уридиндифосфогликозилтрансферазой образуется 3ОНКГ [179,181], количество которого поддерживается в молодых хрусталиках на высоком уровне (500 нмоль/г [3]). Из этих трёх основных продуктов под действием различных ферментов получают вторичные УФ-фильтры. Кинурениновый путь, в конечном счете, приводит к образованию никотиновой кислоты (витамина В3) и других производных, которые являются важнейшими кофакторами многих ферментов [182-185].

Концентрация УФ-фильтров в хрусталике человеческого глаза варьируется от индивидуума к индивидууму. С возрастом концентрация свободных УФ-фильтров уменьшается примерно на 12 % каждые 10 лет, и к 80-ти годам составляет 5 нмоль/г для KN и 3ОНKN, 100 нмоль/г для 3ОНКГ [3]. Причина уменьшения количества кинуренинов в хрусталике остается невыясненной. Возможно, возрастное снижение концентрации УФ-фильтров обусловлено нарушением транспортной системы хрусталика в среднем возрасте, что подтверждается нарушениями в транспорте восстановленного глутатиона (GSH) внутри хрусталика [186,187]. Наличие таких нарушений замедляет движение антиоксидантов к центру хрусталика, подвергая его ядро дополнительному окислительному стрессу. При наличии нарушения транспортной системы KN и его производные, проникая в ядро хрусталика, находятся там дольше и, соответственно, обладают бóльшим временем, чтобы вступить в фотоиндуцированные реакции с кристаллинами. Известно, что с возрастом хрусталики окрашиваются в желтый цвет, а спектры поглощения белков возрастных хрусталиков похожи на спектры поглощения KN и его производных [188,189]. В связи с этим, можно предположить, что одним из возможных механизмов развития катаракты является ковалентное связывание УФ-фильтров с белками хрусталика [79,190]. В дополнение к изменению функций белка, эта модификация может также значительно увеличить восприимчивость хрусталика к УФ-излучению [95].

1.5.3. Фотохимические реакции кинуренинов

До недавнего времени кинуренины считались фотохимически инертными соединениями. Единственным исключением был NFK, при фотолизе которого образуется триплетная возбужденная молекула (^1NFK), способная реагировать с субстратом непосредственно или через образование высокореакционного синглетного кислорода по механизмам, описанным в

разделе 1.4.2. При фотолизе насыщенных кислородом растворов KN и ЗОНKN наблюдается очень низкий выход синглетного кислорода и супероксида [191,192]. Было показано, что KN и его производные обладают очень малым квантовым выходом флуоресценции ($\geq 10^{-3}$ [9,108,188]). В работе Sherin и коллег [9] было продемонстрировано, что в водном растворе время жизни синглетного возбужденного состояния KN (^1KN) составляет величину около 30 пс, при этом не было обнаружено образования долгоживущих реакционных соединений. В этой же работе было показано, что время жизни ^1KN увеличивается с потерей способности растворителя к образованию водородных связей. Был предложен механизм быстрой дезактивации возбужденного состояния в молекуле KN за счет эффективных взаимодействий с молекулами растворителя посредством образования водородных связей. Ключевой особенностью механизма является перенос электронной плотности с атома азота аминокруппы на атом кислорода карбонильной группы после оптического возбуждения KN. Это увеличивает кислотность аминокруппы и основность карбонильной группы в возбужденном состоянии, что, в свою очередь, усиливает взаимодействия с молекулами растворителя посредством водородных связей. Валентные колебания водородных связей выступают в качестве акцепторных мод для безызлучательного перехода $S_1 \rightarrow S_0$ и, таким образом, электронная энергия рассеивается как колебательная через водородные связи [9].

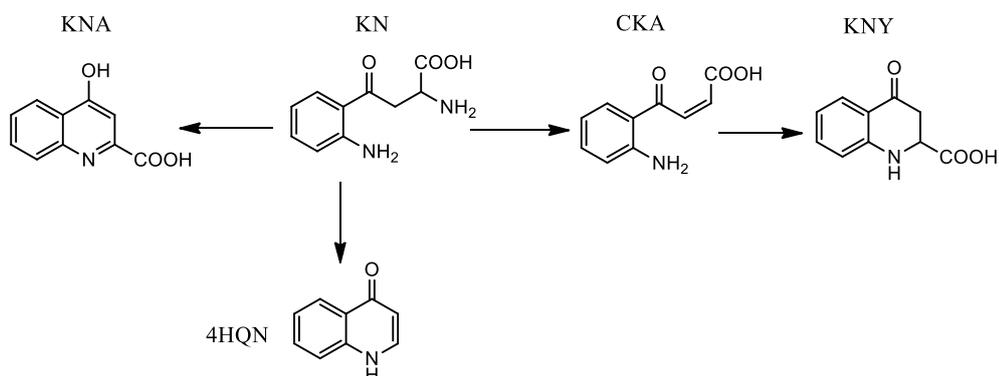
На основании этих наблюдений были сделаны выводы, что в глазах млекопитающих кинуренины являются фотохимически инертными молекулами, которые рассеивают поглощаемую световую энергию в тепло, не приводя к образованию реакционно-активных соединений. Однако, впоследствии было обнаружено, что под действием света KN образует триплетное возбужденное состояние (^3KN). Квантовый выход ^3KN составляет величину $(7.0 \pm 1.7) \times 10^{-3}$ в широком диапазоне значений pH 2-12 [108], ^3KN имеет максимум поглощения на 430 нм (коэффициент экстинкции $\epsilon_{430} = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11]). Под воздействием второго кванта света ^3KN может фотоионизоваться с образованием катион радикала и сольватированного электрона. Важнейшей особенностью ^3KN является его реакционная активность по отношению к аминокислотным остаткам белка (T_{Tr} и T_{Tyr}). Реакция тушения протекает по механизму переноса электрона с константами скорости тушения, представленными в Таблице 1.1. Кроме того, ^3KN может реагировать с антиоксидантами. Наиболее активным тушителем ^3KN среди антиоксидантов, присутствующих в хрусталике, является Asc, для которого наблюдается высокая константа скорости тушения (Таблица 1.1), близкая по значению к пределу для диффузионно-контролируемых реакций. Другой известный антиоксидант – GSH, не является эффективным тушителем ^3KN (Таблица 1.1). Таким образом, можно предположить, что именно Asc защищает белки хрусталика от повреждений, индуцированных фотовозбужденными молекулами KN и его производных [74].

Таблица 1.1. Константы скорости тушения (k_q) триплетных состояний ^1KN и $^1\text{4HQN}$

	$k_q / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
	^1KN	$^1\text{4HQN}$
L-триптофан (Trp)	$(2.6 \pm 0.7) \times 10^8$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^9$
L-тирозин (Tyr)	$(6.7 \pm 1.5) \times 10^7$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^8$
Asc	$(8.5 \pm 1.2) \times 10^8$	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^9$
GSH	$< 10^6$	-
O₂	$(2.1 \pm 0.5) \times 10^9$	$(3.5 \pm 0.7) \times 10^9$

1.5.4. Производные KN: их роль в хрусталике и фотохимические свойства

Другой возможной причиной снижения уровня содержания кинуренинов хрусталика в процессе старения или развития катаракты является их фотохимическая и термическая нестабильность. При физиологических условиях молекулы KN и его производных могут подвергаться ряду реакций: (1) реакции дезаминирования с образованием реакционно-активных карбоксикетоалкенов (СКА) [105] и последующей циклизацией с образованием ряда продуктов, включая кинуренин желтый (KNY) и другие (2) реакции декарбоксилирования и циклизации с формированием 4-гидроксикинолина (4HQN) [193], (3) реакции необратимого трансаминирования с образованием кинуреновой кислоты (KNA) [13]. Структуры этих соединений приведены на Рис. 1.8. Некоторые продукты распада УФ-фильтров являются гораздо более эффективными фотосенсибилизаторами, чем исходные молекулы [12,194,195], а фотохимические реакции с их участием могут приводить к ПТМ белков хрусталика и содействовать развитию катаракты.

**Рис. 1.8.** Структурные формулы продуктов разложения KN.

4HQN является одним из конечных продуктов термического и/или фотохимического разложения KN, образованным в реакции его декарбоксилирования с последующей

циклизацией аминокетоалкена [193]. Стоит отметить, что в литературе нет информации о наличии 4HQN в хрусталике человека. Отсутствие детектируемых количеств этого соединения в хрусталике может означать, что 4HQN химически или фотохимически намного более активен, чем KN и его производные, и, вероятно, после синтеза расходуется в термических или фотохимических реакциях, поэтому его концентрация в хрусталике остается ниже предела детектирования. В работе Sherin и коллег [194] были изучены фотохимические свойства 4HQN. В водных растворах 4HQN существует преимущественно в депротонированной кето-форме в широком диапазоне значений pH (pKa 2.4 и 11.3). Квантовый выход триплетного состояния 4HQN (T4HQN) и его максимум оптического поглощения, как было установлено, зависит от формы молекулы и составляет 30%, 35% и 7,5% при кислом, нейтральном и щелочном значении pH раствора ($\lambda_{max} = 530, 575$ и 510), соответственно. Было показано, что наиболее активными тушителями T4HQN являются Trp, Tug, антиоксидант Asc и кислород. Реакции протекают по механизму переноса электрона с константами скорости, приведёнными в Таблице 1.1. Основываясь на этих данных, можно сделать вывод, что 4HQN является фотохимически активным соединением и, несмотря на следовые количества в хрусталике, может активно вступать в реакции с аминокислотными остатками белков, приводя к их модификации.

Другим производным кинуренинов является 4-(2-аминофенил)-4-оксокротоновая кислота (СКА). СКА является основным продуктом процесса термического дезаминирования KN. Как было показано в работах [86,104,111,196] СКА, как и другие кинуренины (см. раздел 1.4.3) способна образовывать продукты ковалентные связанные с аминокислотными остатками белков цистеином (Cys), гистидином (His) и лизином (Lys) [86,111,196], и изменять их структуры и функции. Антиоксиданты, присутствующие в хрусталиках, способны предотвращать реакции между СКА и белками. При этом константа скорости реакции GSH с продуктом дезаминирования KN, СКА, намного больше, чем для Asc. Принимая во внимание, что GSH в хрусталике присутствует в высокой концентрации (см. раздел 1.5.1), можно сказать, что большая часть продуктов дезаминирования KN нейтрализуются GSH, сохраняя кристаллины [104].

СКА может подвергаться реакциям циклизации с образованием желтого кинуренина (KNY) [105]. Известно, что при фотовозбуждении KNY образуется два короткоживущих интермедиата: триплетное состояние ($\Phi_T \approx 2\%$) и енольная форма ($\Phi_T \approx 1\%$). Эти промежуточные соединения очень нестабильны и быстро переходят в продукты реакции – дигидро-4-гидроксихинолин и 4HQN из триплетного состояния и енольной формы, соответственно [12].

Настоящая работа направлена на изучение фотохимических реакций с компонентами хрусталика одного из самых фотохимически активных производных KN – кинуреновой

кислоты (KNA). KNA образуется в реакции необратимого трансминирования KN, катализируемой тремя подтипами кинуренинаминотрансфераз или митохондриальной аспаратаминотрансферазой (Схема 1.3) [197]. KNA была обнаружена в различных тканях организма, где выполняет разнообразные функции. Так, например, в тканях мозга она присутствует в наномолярных концентрациях [198] и выступает в качестве нейропротекторного агента, а также проявляет способность ингибировать нейроны [198-202]. Также KNA была обнаружена в хрусталиках млекопитающих. Содержание ее в здоровом человеческом хрусталике составляет около 1 нмоль/г, тогда как в катарактальном хрусталике концентрация увеличивается до 8 нмоль/г [13]. Увеличение уровня содержания KNA также было показано в работе Kanth и коллег [203] при изучении катарактальных хрусталиков у крыс. Кроме того, уровень KNA значительно возрастает при наличии сопутствующего заболевания – диабета [13].

В работах [12,204,205] авторы изучали спектроскопические и фотосенсибилизирующие свойства KNA. В нейтральном водном растворе KNA характеризуется полосой поглощения с максимумом на 332 нм. Было показано, что спектр оптического поглощения раствора KNA зависит от pH. Установлено, что в нейтральном растворе KNA в основном присутствует в анионной форме, при переходе к кислой среде происходит протонирование карбоксильной группы и молекула становится нейтральной ($pK_{a1} = 2.5$), а в щелочной среде происходит депротонирование аминогруппы и молекула становится дианионом ($pK_{a2} = 11.6$) [12]. При фотолизе нейтрального водного раствора KNA было обнаружено формирование переходного состояния с $\lambda_{max} = 590$ нм и временем жизни около 20 мкс. Это переходное состояние было отнесено к 1KNA . Природу триплетного состояния подтвердили его тушением кислородом; константа скорости реакции составила величину $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Несмотря на то, что концентрация KNA в человеческих хрусталиках примерно на 2 порядка ниже, чем основного УФ-фильтра хрусталика KN, она проявляет значительную фотохимическую активность и выход её триплетного состояния примерно в 100 раз выше, чем для KN, и составляет 82 % [12]. Таким образом, вклад фотохимических реакций KNA с белками хрусталика в общий уровень модификации последних становится сопоставимым со вкладом от фотохимических реакций, индуцированных кинуренинами.

Изучение фотохимических свойств KNA показало, что в отсутствие тушителя кинетика спада поглощения триплетного состояния описывается бимолекулярной кинетической кривой (триплет-триплетная аннигиляция, $k_{T-T} = 4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [204]. В присутствии тушителя кинетическая кривая гибели триплетного состояния становится экспоненциальной с константой скорости псевдопервого порядка, пропорциональной концентрации тушителя. Реакция тушения может приводить к образованию свободных радикалов, и на длинах волн, соответствующих поглощению этих радикалов, наблюдается растущий сигнал. В работе Pileni и

коллег [205] было рассмотрено взаимодействие ^1KNA с различными молекулами-тушителями (Q). Было показано, что скорость гибели ^1KNA увеличивается в присутствии аминокислот и нуклеотидов, были получены бимолекулярные константы скорости (k_q) тушения ^1KNA (Таблица 1.2). Тушение ^1KNA происходит с образованием нового переходного состояния с максимумами поглощения на 375 и 530 нм [205], которое может быть отнесено к радикалу KNA (KNA^\cdot). Вероятно, KNA^\cdot возникает по механизму:



Наибольшие значения констант скорости тушения ^1KNA демонстрируют аминокислоты Trp, Tyr и Cys. Можно предположить, что в случае белковых молекул именно эти аминокислотные остатки являются наиболее уязвимыми при взаимодействии с ^1KNA .

Таблица 1.2. Константы скорости тушения ^1KNA различными молекулами-тушителями (Q)

Q	Trp	Tyr	Cys	His	Аденозин	Цитидин	Цистамин
$k_q (\text{M}^{-1}\text{c}^{-1})$	1.5×10^9	1×10^8	1.9×10^8	$\leq 5 \times 10^5$	7×10^6	2×10^8	1.6×10^8

Фотосенсибилизирующие свойства KNA были также подтверждены в работе Krishna и коллег [192], в которой сообщается о значительном выходе синглетного кислорода при УФ-облучении растворов KNA. R. Lugo-Huitrón и коллеги [198] показали, что KNA обладает способностью взаимодействовать со свободными радикалами и уменьшать образование активных форм кислорода. Иными словами, KNA обладает антиоксидантными свойствами, однако, механизмы антиоксидантной защиты не были установлены.

К настоящему времени в литературе представлен ряд работ по исследованию фотохимических свойств KNA [12,192,198,204-206]. Однако, данные о механизмах реакций KNA с белковыми молекулами в литературе отсутствуют. Изучение этих реакций является важным, поскольку KNA может давать существенный вклад в модификацию белков хрусталика. Также эти реакции могут рассматриваться как процессы, моделирующие реакции кинуренинов с белками хрусталика. Знания о механизмах, их динамике и продуктах дадут более полное понимание о роли фотоиндуцированных процессов в ткани хрусталика как при нормальном старении хрусталика, так и катарактогенезе.

1.6. Заключение по материалам главы I

Многочисленные внутренние и внешние факторы оказывают пагубное влияние на стабильность, структуру и функции белков в процессе жизнедеятельности организма человека. Пост-трансляционные процессы повреждения белков особенно опасны в тканях, в которых восстановление и утилизация модифицированных компонент протекает очень медленно или вовсе отсутствует, например, в хрусталике глаза. Большая часть пространства клеток хрусталика занята его структурными белками, кристаллинами, отличительной особенностью которых является отсутствие механизмов обновления [1-2]. Несмотря на то, что в хрусталике реализована система антиоксидантной защиты [3-5] и α -кристаллин помимо структурной функции обладает дополнительно шаперонной активностью [53, 61], с возрастом происходит накопление модифицированных белков. Среди многочисленных пост-трансляционных модификаций белков следует особо выделить модификации, приводящие к образованию ковалентных связей между аминокислотными остатками и к появлению новых полос поглощения в диапазоне ближнего УФ-излучения (320-400 нм) (см. разделы 1.4.3. и 1.4.5. настоящего обзора). Накопление подобных структур в хрусталике может приводить к появлению светорассеивающих областей и фотохимически активных производных белков [84,95,106-109], ускоряя тем самым развитие возрастных изменений в структуре ткани и различных заболеваний, в том числе катаракты.

Компоненты хрусталика ежедневно подвергаются воздействию излучения Солнца. Поглощение ультрафиолетового излучения с диапазонами 280-315 нм (УФ-Б) и 315-400 нм (УФ-А) приводит к появлению различных модификаций в хрусталике. Основным направлением исследований последних десятилетий являлось рассмотрение фото процессов под действием УФ-Б излучения, поглощаемого белками напрямую [44,45], и лишь недавно была показана роль УФ-А излучения в модификации молекул. Доля этого диапазона излучения в общем спектре солнечного света, достигающего поверхности Земли, превышает 95%. Ранее было показано, что кинуренин и его производные являются основными УФ-А хромофорами в хрусталике человека [8]. Поглощение света приводит либо к рассеиванию его в тепло [9], либо к образованию реакционно активных триплетных состояний кинуренинов [10, 11]. Триплетные состояния самих кинуренинов, а также продуктов их термического разложения, обладающих более высокими квантовыми выходами этих реакционно-активных форм, способны реагировать с окружающими их молекулами [7, 74, 80]. Реакции с белками и, в значительной меньшей степени, молекулярным кислородом приводят к образованию новых реакционно-активных соединений (радикалов, АФК), увеличение концентрации которых в хрусталике может приводить к появлению различных модификаций. На сегодняшний день достаточно хорошо изучены процессы с участием АФК при которых происходит окисление белков [75-77]. Тогда

как по-настоящему не раскрытой областью являются прямые реакции между радикалами кинуренинов и белков, образованных при взаимодействии триплетных состояний хромофоров хрусталика с кристаллинами.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы восполнить недостающий пробел и выполнить систематическое исследование механизмов и продуктов фотоиндуцированных радикальных реакций с участием компонентов хрусталика. Используя в качестве модели для исследования наиболее фотоактивное производное кинуренина – кинуреновую кислоту, а также ряд модельных систем и белки хрусталика предлагается изучить: (1) прямые реакции между образующимися радикалами; (2) влияние кислорода на фотохимические процессы, происходящие в хрусталике глаза, как ткани с низким содержанием кислорода. Для осуществления последнего эксперименты будут проводиться в анаэробных условиях и с высокими концентрациями аминокислот/белков в растворе, как наиболее близким к физиологическому состоянию в хрусталике [1,39].

ГЛАВА II ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и реактивы

В работе были использованы коммерчески доступные соединения без дополнительной очистки: кинуреновая кислота (KNA), L-триптофан (Trp), N-ацетил-L-триптофан (NTrpH), L-тирозин (Tyr), L-цистеин (Cys), L-метионин (Met), L-фенилаланин (Phe), L-гистидин (His), аскорбат (Asc), восстановленный глутатион (GSH), йодацетамид (IAA), трифторуксусная кислота (TFA), смесь ингибиторов протеаз, суспензия культуры клеток *Micrococcus lysodeikticus*, куриный яичный белок лизоцим (HEWL) производства «Sigma/Aldrich»; додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония производства «Helicon»; тетраметилэтилендиамин (TEMED), дитиотреитол (DTT) фирмы «Bio-RaD»; трипсин производства «Promega»; масс-стандарты для электрофореза фирмы «Thermo Fisher Scientific». Ацетонитрил (ACN) производства «Криохром», муравьиная (HCOOH) и уксусная (CH₃COOH) кислоты хроматографической чистоты производства «Sigma/Aldrich» использовались без предварительной очистки. Вода для всех экспериментов была дистиллирована и деионизирована (17.5 МОм). Дейтерированная вода (D₂O) производства Armar Chemicals использовалась для приготовления дейтерированного фосфатно-солевого буфера (PBS, рD 7.4).

Для приготовления буферных водных растворов использовались следующие соединения: мочеви́на и трисаминометан (Tris) («Bio-Rad Laboratories», США), фосфатные соли натрия и аммоний бикарбонат («х.ч.», ДИА-М, Россия). После разведения растворы дополнительно были очищены с помощью бумажных фильтров. Для приготовления растворов с различными значениями рН использовались соляная кислота (HCl) и гидроксид натрия (NaOH) производства «Sigma/Aldrich». Измерение кислотности растворов осуществлялось с помощью стеклянного электрода InLabMicro от MettlerToledo (Швейцария) на рН-метре PP-15 от Sartorius (Германия). Калибровка рН-метра проводилась по набору стандарт-титров образцов буферных растворов (ГОСТ 8.135).

2.2. Выделение белковых экстрактов из хрусталика *Bos taurus L.* (Bovine)

В работе были использованы белки животного происхождения (*Bos taurus L.*, Bovine). Хрусталик извлекался из глаза, удалялась капсула (мембрана, покрывающая хрусталик) и ткань гомогенизировалась при помощи стеклянного механического гомогенизатора в фосфатно-солевом буфере (PBS 150 мМ, рН 7.4), из расчета 450 мкл/50 мкг ткани. Для предотвращения возможного ферментативного гидролиза белков хрусталика в итоговый гомогенат добавляли смесь ингибиторов протеаз (в соотношении 1 мл на 20 г ткани). Для удаления водонерастворимого материала, полученный раствор центрифугировали при 4 °С и 13000 г в

течение 30 минут, а затем пропускали через фильтр 0.22 мкм. Водорастворимые белки разделялись на фракции с высокой, средней и низкой молекулярной массой с помощью гелепроникающей хроматографии. Была использована хроматографическая система ÄKTA purifier 100 и колонка Superdex 200 10/300 GL от GE Healthcare (Пискатауэй, Нью-Джерси, США); в качестве подвижной фазы использовали PBS, скорость потока 0.5 мл/мин. Детектирование оптического поглощения производилось на длине волны 280 нм. В результате нескольких последовательных хроматографических экспериментов были выделены 4 фракции водорастворимых белков: α -кристаллины, β _H-кристаллины, β _L-кристаллины и γ -кристаллины. Чистота получаемых белков проверялась при помощи масс-спектрометрических измерений целых белков и наборов пептидов, полученных при помощи ферментативного гидролиза трипсином, на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF.

2.3. Оптическая спектроскопия

Кварцевую кювету 10×10 мм² с исследуемыми растворами помещали в кюветное отделение спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США) и записывали спектры оптического поглощения растворов. Для всех экспериментов по фотолизу аминокислот/белков в присутствии KNA оптическая плотность приготовленных образцов на длине волны 355 нм составляла около 0.9 для оптического пути 1 см (при расчете квантового выхода производилась нормировка на оптическую плотность каждого образца). Концентрация белков после хроматографического разделения была определена с помощью спектрофотометра NanoDrop2000C (Thermo Fisher Scientific). Объем пробы составил 3 мкл.

Спектры флуоресцентного излучения измеряли с использованием спектрофлуориметра FLSP920 от Edinburgh Instruments (Эдинбург, Великобритания). Все оптические измерения проводились в кварцевой ячейке размером 10 × 10 мм².

2.4. Лазерный импульсный фотолиз

Для записи спектров поглощения и кинетики гибели промежуточных частиц использовалась установка наносекундного лазерного импульсного фотолиза с фотоэлектрической регистрацией изменения промежуточного поглощения в УФ и видимой областях спектра, созданная в МТЦ СО РАН (Схема 2.1). В качестве источника возбуждения во всех экспериментах использовался твердотельный Nd³⁺:YAG лазер (Quanta-Ray LAB-130-10, λ = 355 нм; энергия импульса до 150 мДж, длительность импульса 8 нс). Для постоянного контроля энергии лазера часть возбуждающего импульса отражается кварцевой пластиной на фотодиод, запускающий осциллограф и измеритель мощности (Newport 1918-C). Данные с измерителя мощности поступают на компьютер, что позволяет отслеживать и корректировать

энергию лазера в реальном времени. Система регистрации состоит из дуговой ксеноновой лампы ДКсШ-150 (длительность импульса 2 мс, размер регистрирующего луча 1×3 мм), монохроматора (Newport, Model 78025, 200-1000 нм, 1нм/дел), фотоумножителя (ElectronTubesLtd. 9794В), цифрового двухканального осциллографа LeCroy 104МХi с 11-битным АЦП (1 ГГц) и системы фильтров и шторок. Установка полностью управляется персональным компьютером. Поскольку детектирующий свет, сконцентрированный в прямоугольнике 3 мм в высоту и 1 мм в ширину, проходит вдоль передней (облучаемой лазером) стенке кюветы (ширина лазерного пучка 8 мм, высота 3 мм), то во всех экспериментах длина пути оптического возбуждения составляла 1 мм, а длина пути детектирования 8 мм. Все растворы посредством тонкого капилляра продували аргоном в течение 15 минут до начала и во время облучения, если не указано иное.

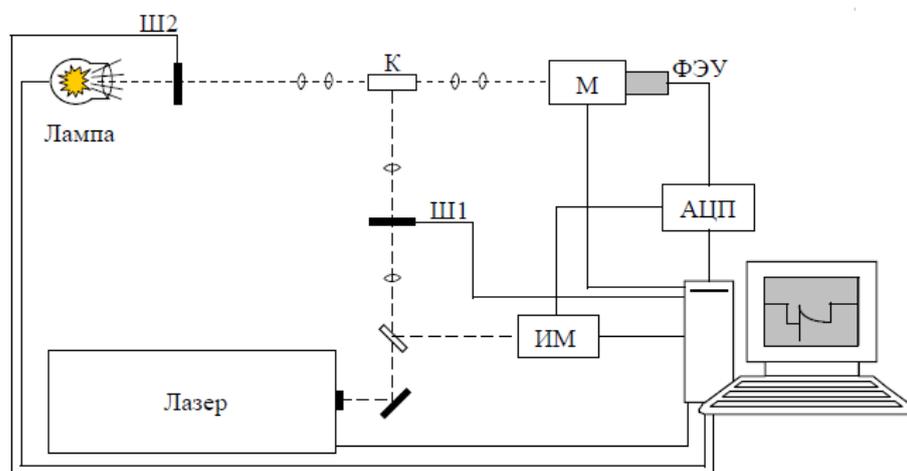


Схема 2.1. Схема экспериментальной установки лазерного импульсного фотолиза. Буквами на рисунке обозначены: АЦП – цифровой осциллограф LeCroy 104МХi, ИМ – импульсный измеритель лазерной энергии, Ш1, Ш2 – автоматические шторки, М – монохроматор, К – оптическая кювета

2.5. Фотолиз водных растворов

Стационарный фотолиз образцов проводили с помощью установки изображенной на Схеме 2.2. Растворы образцов объемом 3 мл помещались в кварцевую ячейку $10 \times 8 \text{ мм}^2$ и облучались ртутной лампой высокого давления ДРШ-1000. ИК диапазон излучения лампы отсекался с помощью водного фильтра, интересующая спектральная область 355-380 нм выделялась с помощью набора стеклянных УФ-фильтров (УФС-6 и БС-7). Площадь светового пучка на входе в кювету составляла около 0.7 см^2 . Согласно результатам актинометрии, проведенной по стандартной методике с использованием водного раствора ферриоксалата

калия [207], интенсивность излучения в интересующем диапазоне длин волн составила $(2.64 \pm 0.3) \times 10^{17}$ квантов $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$.

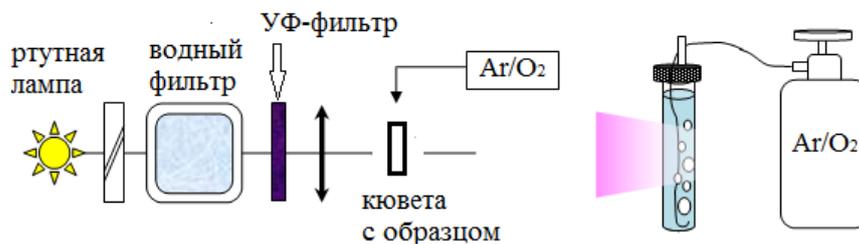


Схема 2.2. Схема экспериментальной установки для стационарного фотолиза

Фотолиз с использованием лазерного излучения проводился в той же кювете ($10 \times 8 \text{ мм}^2$) и том же объеме образца (3 мл). Для фотолиза использовался твердотельный лазер Nd: YAG, описанный в разделе 2.4, использовались энергии лазерного импульса 3 мДж и 10 мДж на импульс.

Растворы продували аргоном в течение 15 минут до и во время облучения, если не указано иное. Перед облучением и в процессе фотолиза с помощью шприца отбирались пробы (50 мкл) и хранились при температуре 4°C до последующего анализа. 40 мкл от полученных проб использовали для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с оптическим детектированием, а 10 мкл - для анализа с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) детектированием (ВЭЖХ-МС).

2.6. Разделение низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений

Образцы, содержащие белок и KNA, до и после фотолиза были разделены на низкомолекулярную (KNA и продукты её разложения) и высокомолекулярную фракцию (белки) с помощью центробежных фильтров AmiconUltra от MerckMillipore (Tullagreen, Ирландия) с отсечкой молекулярной массы 3 кДа. Для этого 100 мкл пробы разбавляли до объема 500 мкл деионизованной водой и центрифугировали в течение 20 минут ($t = 4^{\circ}\text{C}$, 10000 g), процедуру повторяли несколько раз. Низкомолекулярную фракцию, прошедшую через фильтр, затем анализировали с помощью метода ВЭЖХ с оптическим детектированием, для высокомолекулярной фракции были записаны спектры оптического поглощения и флуоресценции.

2.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография с оптическим детектированием

Метод высокоэффективной хроматографии с оптическим детектированием применялся для анализа продуктов фотохимических реакций между KNA и аминокислотой NTrpH и

молекул с низкой молекулярной массой в случае фотолиза с белками. Для проведения анализа отобранные во время фотолиза пробы образцов (40 мкл) разбавлялись 600 мкл дистиллированной воды. Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке 4.6×150 мм, 5 мкм, ZORBAX EclipseXBD-C18 (4.6 × 100 мм, 80 Å, 1,8 мкм), в качестве подвижной фазы использовали два типа растворителей: А (0,1% муравьиная кислота в воде) и В (0,1% муравьиная кислота в ACN), скорость потока 0,5 мл / мин. Разделение проводилось с градиентом концентрации ацетонитрила: 0% В (0–5 мин), 0–35% В (5–20 мин), 35–80% В (20–30 мин) и 80–100% В (30–31 мин). Образцы вводили с использованием автосэмплера, термостатированного при 4 ° С. Объем вводимой пробы составлял 80 мкл. Оптическое детектирование проводили с использованием детектора с диодной матрицей (DAD) на длинах волн 240, 280, 316, 330 и 400 нм. Обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Agilent ChemStation. Изменение количества исходных реагентов оценивали исходя из изменения площади пиков на хроматограммах, записанных на длинах волн, соответствующих максимуму их поглощения, $\lambda = 280$ нм для NTrpH, $\lambda = 330$ нм – KNA.

В экспериментах по фотолизу NTrpH в присутствии KNA концентрации реагентов и продуктов определяли с помощью литературных данных об их коэффициентах экстинкции: $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 332 нм для KNA [12]; $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 316 нм для 4HQ [194]; $5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для NTrpH на 280 нм; $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 240 нм для N-ацетилоксиндолаланина (NOIA) [208]; $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 235 нм для N-ацетил-3 α -гидроксипирролоиндола (NHPI) [209]; $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 240 нм для N-ацетил-N-формилкинуруенина (NNFK) [82] и $6.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 235 нм для N-ацетил-3 α гидропероксипирролоиндола (NHPPi) [210]. Значение коэффициентов экстинкции для 1,4-DHQ, ddO-KNAs и димеров NTrp в литературе не представлены. Для оценки количества 1,4-DHQ использовался коэффициент экстинкции для родственного соединения 2-гидроксихинолина – $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 316 нм [211,212]. Для расчёта концентрации димеров NTrp и продуктов ddO-KNAs, являющихся димерами 4HQ и 2-гидроксихинолина, было сделано предположение, что их поглощение в два раза выше, чем поглощение мономера и коэффициенты экстинкции составили: $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для всех димеров NTrp в максимумах их полосы поглощения; 3.0×10^4 или $12.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на 316 нм.

2.8. Электрофорез

Для определения состава белков после фотолиза был произведен одномерный электрофорез в полиакриламидном геле 10×10 см (15%-ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Лэммли [213]. Непосредственно перед нанесением на гель к пробам растворов белков, отобранным во время фотолиза, добавлялся раствор 31 мМ Трис-НСl, содержащий 1% SDS и 2.5% β -меркаптоэтанола. Полученная смесь инкубировалась в течении 5

минут при 95°C. После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Изображения гелей были получены с использованием системы визуализации VersaDoc 4000 MP от Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Приблизительные молекулярные массы исследуемых белков были определены с использованием белковых маркеров PageRuler (Thermo Fisher Scientific, Литва).

Для денситометрического анализа интенсивность каждой полосы определяли с использованием программного обеспечения BioRad Image Lab. Общая интенсивность всех полос в дорожке была принята за 100%, что соответствует общей концентрации белка в растворах. Концентрации мономеров, димеров и тримеров были оценены с учетом вклада (%) отдельных полос в каждой дорожке.

2.9. Анализ ферментативной активности лизоцима

Ферментативную активность лизоцима определяли путем количественной оценки лизиса клеток *Micrococcus lysodeikticus* методом измерения светорассеяния образца, ранее описанным в работе Ibrahim и коллег [214]. Этот метод основан на наблюдении снижения светорассеяния 1.9 мл клеточной суспензии (170 мкг сухих клеток/мл) в PBS (50 мМ, рН 6.2) после добавления 100 мкл растворов, содержащих 20-60 мкг/мл лизоцима до и после фотоллиза. Изменение оптического поглощения на 450 нм (25 °С) контролировали с помощью спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США). Ферментативная активность была выражена как скорость уменьшения поглощения в минуту.

2.10. Ферментативный гидролиз белков

Ферментативный гидролиз модифицированных белков проводили трипсином в растворе и в 15%-ПАА геле. Для проведения гидролиза белка в растворе образец (3мкл) разводили в 100 мМ аммоний-бикарбонатном буфере (AmB, 75 мкл) и подвергали расщеплению в течение 4 часов при 37 °С по стандартной методике [215]. Концентрация трипсина составляла 0.2 мкг на дайджест. Полученные пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ-МС. С целью выявления положения ковалентных сшивок был проведен ферментативный гидролиз мономерных и мультимерных форм белка в геле. Для этого полосы содержащие белок вырезали из геля и дважды обесцвечивали с помощью 200 мМ AmB в 50% ACN при 37 °С в течение 45 минут. Куски геля обезвоживали в 100% ACN и затем расщепляли трипсином (20 мкл, 0.4 мкг трипсина в 40 мМ AmB на образец) при 37 °С в течение 16 часов. Полученный экстракт пептидов анализировали с помощью MALDI-MS и ВЭЖХ-МС.

2.11. Масс-спектрометрия

2.11.1. Масс-спектрометрический анализ с использованием матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI)

Масс-спектрометрический анализ с матрично-активной лазерной десорбцией / ионизацией (MALDI) применялся для исследования чистоты белковых фракций хрусталика *Bos taurus*, полученных после хроматографического разделения гомогенного раствора кристаллинов и для идентификации белков, экстрагированных из геля. Анализ проводили на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (BrukerDaltonics, Германия). Масс-спектры белков получали в линейном режиме положительных ионов в диапазоне m/z от 1000 до 45000 Да. Масс-спектры пептидов получали в отражающем режиме положительных ионов прибора в диапазоне m/z от 420 до 4700 Да. Образцы наносили на мишень приборной пластины смешивая с синапиновой кислотой (SA) или 2,5-дигидроксибензойной кислотой (DHB) для белков или пептидов, соответственно. SA и DHB были растворены в 70%-ACN (0.1% TFA) и использовались в качестве фотоионизирующей матрицы. При необходимости экстрагированные пептиды обессоливали и концентрировали на микроколонках C18 ZipTip Pipette Tips от Millipore (Биллерика, Массачусетс, США), элюировали 20 мкл 70% ACN. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов смеси пептидов или белков фирмы Bruker.

Полученные спектры белков и пептидов анализировали в программе FlexAnalysis 3.0 Build 96 от BrukerDaltonics (Бремен, Германия) с формированием масс-листа в автоматическом режиме. Идентификацию белков проводили путем поиска соответствующих кандидатов в базах данных поисковой системы Mascot. При идентификации белков по пептидным картам в программе использовали общедоступную базу данных Swiss-Prot [216]. Для идентификации белков в программе Mascot задавали следующие параметры поиска: таксономическая единица – “млекопитающие”; фермент – трипсин; количество пропущенных сайтов рестрикции – 2; допустимое отклонение массы заряженного пептида допускалось не более 200 м.д. (миллионных долей); положительный заряд пептидов; моноизотопное распределение пиков.

2.11.2. Масс-спектрометрический анализ с использованием электроспрейной ионизации в сопряжении с ВЭЖХ

Для анализа степени деградации исходных реагентов, а также идентификации характера и места фотоиндуцированных модификаций был использован более чувствительный метод масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией и квадрупольным время-пролетным детектором. Для этого был использован масс-спектрометр Maxis 4G (BrukerDaltonics, Германия) сопряженный с системой ВЭЖХ UltiMate 3000RS (Dionex, Германия) с оптическим

детектированием. Система UltiMate 3000RS оснащена тройным насосом, термостатированными автосемплером и отделением для колонки и проточной ячейкой для оптических измерений в диапазоне 190-800 нм. Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Agilent Zorbax 300 SB-C18 (1.0 × 150 мм, 300 Å, 3.5 мкм), в качестве подвижной фазы использовали смесь двух растворителей: А (0.1 % муравьиная кислота в H₂O) и В (0.1 % муравьиная кислота в ACN); скорость потока 150мкл/мин. Белки были разделены с градиентом ацетонитрила: 5% В (0-4 мин), 5%-30% В (4-10 мин), 30%-45% В (10-45 мин), 45%-95% В (45-46 мин), 95% В (46-50 мин), 95%-5% В (50-51 мин) и 5% В (51-65 мин). Для разделения пептидов использовали следующий градиент: 5% В (0-5 мин), 5%-60% В (5-45 мин), 60%-95% В (45-46 мин), 95% В (46-50 мин), 95%-5% В (50-51 мин) и 5% В (51-65 мин). Градиент для растворов, содержащих NTrpH был: 5% В (0-4 мин), 5%-35% В (4-19 мин), 35%-80% В (19-29 мин), 80%-95% В (29-30 мин), 95%В (30-34 мин), 95% -5% В (34-35 мин) и 5% В (35-44 мин).

Масс-спектрометрический анализ был осуществлен в условиях, детально описанных в работе Yanshole и коллег [217]. Масс-спектры были зарегистрированы в положительном режиме в диапазоне m/z 300-2900 для белков и пептидов и 50-600 для аминокислот. Были установлены следующие параметры прибора: напряжение на торцевой пластине смещения – 500 В; напряжение на капилляре – 4200 В; давление распылителя – 1 бар; скорость потока осушающего газа - 8 л/мин; температура осушающего газа – 200°C. Температура в автосемплере поддерживалась на уровне 4°C. Каждое измерение ВЭЖХ-МС включало небольшой отрезок по времени, во время которого вводился калибровочный раствор для получения МС–калибровки, используемой для контроля параметров прибора и для пост-калибровки данных, если это необходимо. Для белков использовали калибровочный раствор ESI-TuneMix низкой концентрации от фирмы Agilent Technologies (Санта-Клара, Калифорния, США), а для пептидов и аминокислоты – калибровочный раствор кластеров формиата натрия. Интенсивности ионов определялись по MS спектрам; точность определения массы ± 0,001 Да. Полученные данные анализировались с помощью программного обеспечения DataAnalysis 4.0 (Build 275, BrukerDaltonics). Для ряда неизвестных пептидов и соединений была установлена аминокислотная последовательность и структура, соответственно, с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), при которой происходит фрагментация пептида на фрагменты методом столкновительной диссоциации молекул (Collision Induced Dissociation).

2.12. Расчёт квантовых выходов фоторазложения исходных реагентов

Для нахождения квантовых выходов фоторазложения использовались только линейные части графиков зависимости концентрации реагентов от времени облучения.

1. Квантовые выходы разложения реагентов в случае фотолиза типа Ia (источник излучения – лазер) рассчитывались по следующим формулам:

$$\Phi_{\text{д.э.р}} = \frac{N}{N_{\text{погл.ц}}} \times 100\% \quad (2.1),$$

где N - число разложившихся молекул реагента, рассчитанное по формуле (2.2), $N_{\text{погл.ц}}$ – число поглощенных квантов света за время облучения (t), рассчитанное по формуле (2.3).

$$N = \Delta C \times V \times N_a \quad (2.2),$$

где ΔC – изменение концентрации реагента [моль/л] за время облучения (t), V – объём облучаемого раствора [л], N_a – число Авогадро (6.02×10^{23} моль⁻¹).

$$N_{\text{погл.ц}} = N_{\text{исп}} \times t \times (1 - 10^{-OD}) \quad (2.3),$$

где $N_{\text{исп}}$ – количество квантов света в секунду [квант/с], испускаемое лазером и рассчитанное по формуле (2.4), t - время облучения [с], $(1 - 10^{-OD})$ - коэффициент, учитывающий долю поглощенного света, OD - оптическое поглощение образца на длине волны 355 нм, измеренное с помощью спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США).

$$N_{\text{исп}} = \frac{E \times \lambda \times t \times \nu}{h \times c} \quad (2.4),$$

где E – энергия импульса лазерного излучения, используемое в эксперименте (Дж/с), λ – длина волны возбуждения (355×10^{-9} м), t - время облучения [с], ν – частота излучения (10 Гц), h – постоянная Планка (6.63×10^{-34} Дж×с) и c – скорость света (3×10^8 м/с).

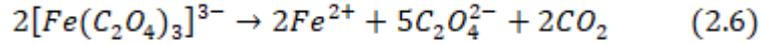
2. Квантовые выходы разложения реагентов в случае фотолиза типа Ib (источник излучения – ртутная лампа) вычислялись с помощью формул (2.1-2.3). В формуле (2.3) для расчёта числа поглощенных квантов света за время облучения $N_{\text{погл.ц}}$ используется интенсивность света в секунду (I_a), которая в этом типе фотолиза была рассчитана с помощью (2.5), (2.7-2.8).

Интенсивность света за секунду (I) [квантов/с] для ртутной лампы (ДРШ-1000) была определена сотрудником лаборатории Шериным П.С. с помощью актинометрии. Актинometрия проводилась с использованием химического актинометра - раствора ферриоксалата калия ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в H_2SO_4 (0.1 н) по формуле:

$$I = \frac{N}{\Phi \times t \times (1 - 10^{-OD})} \quad (2.5),$$

где N - число образовавшихся моль продукта фоторазложения ферриоксалата калия; Φ - квантовый выход образования продукта [207]; t - время облучения; $(1 - 10^{-OD})$ - коэффициент, учитывающий долю поглощенного света (в условиях актинометрии чаще всего равен 1 - полное поглощение света).

Эксперимент основан на определении количества образовавшихся под действием света (2.6) ионов Fe^{2+} ($N_{Fe^{2+}}$) с помощью измерения интенсивности окраски комплекса Fe^{2+} с 1,10-фенантролином



$$N_{Fe^{2+}} = 10^{-3} \cdot \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot OD}{\varepsilon \cdot l \cdot V_2} \quad (2.7),$$

где V_1 – исходный объём раствора, содержащего актинометр [мл], V_2 – объём облучённого раствора актинометра, взятый для анализа [мл]; V_3 – конечный объём до которого был разбавлен 1,10-фенантролином раствор V_2 [мл]; OD – оптическая плотность раствора ферриоксалата калия на 510 нм; ε – коэффициент экстинкции комплекса на 510 нм ($1.11 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$); l – длина оптического пути.

Таким образом, с помощью уравнений (2.5) и (2.7) была рассчитана интенсивность света за секунду на см^2 , которая составила $(2.64 \pm 0.3) \times 10^{17}$. Используемый в работе образец КНА с поглощением 0.9 на 355 нм поглощает только 24.2% от интенсивности света (2.8), попадаемого в образец. Таким образом, интенсивность света дошедшая до поверхности кюветы (I_a) составляет $6.4 \times 10^{16} \text{ квантов} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$.

$$I_a = 0.242 \times I \quad (2.8)$$

ГЛАВА III ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛАМИ

Кинуренин (KN) и его производные выполняют функцию молекулярных УФ-фильтров, предотвращая фотоповреждения тканей глаза, в первую очередь сетчатки (см. раздел 1.5.3). Механизм фотозащиты основан на быстрой конверсии энергии поглощённых квантов света в тепло посредством внутренней конверсии фотовозбуждённого состояния в основное с эффективностью $\sim 99\%$ [9,106] и с небольшим выходом реакционного триплетного состояния (${}^1\text{KN}$) $< 1\%$ [108]. ${}^1\text{KN}$ способен вступать в реакции тушения с рядом аминокислот и антиоксидантов по механизму переноса электрона на молекулу KN с образованием соответствующих радикалов [74]. Однако, дальнейшая судьба радикалов в настоящее время не известна. Предполагается, что реакции с участием фотоиндуцированных радикалов могут приводить к различным необратимым модификациям белков, включая агрегацию, что способствует развитию катаракты. Также вклад в общую модификацию белков хрусталика могут вносить продукты термического распада KN, некоторые из которых проявляют высокую фотохимическую активность. К ним относятся KNA, которая в небольших количествах присутствует в хрусталиках глаз млекопитающих и обладает высоким квантовым выходом триплетных состояний ($\Phi_T = 82\%$ [12]). В силу высокого значения Φ_T можно ожидать, что вклад KNA в общую модификацию белков будет сопоставим со вкладом фотохимически инертных кинуренинов, представленных в хрусталике в значительном количестве. Кроме того, высокое значение Φ_T существенно упрощает исследования механизмов реакций триплетных состояний с белками, а также установление структуры фотоиндуцированных модификаций биомолекул, поскольку для проведения экспериментов не требуется использовать высокие энергии источников излучения и длительное время облучения.

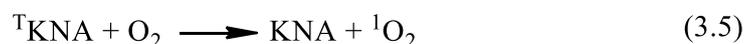
Настоящая глава работы направлена на изучение реакций тушения ${}^1\text{KNA}$ аминокислотами, кислородом, антиоксидантами, модельным белком лизоцимом и белками хрусталика, в первую очередь для определения значений констант скорости и механизмов данных реакций.

3.1. Определение константы скорости тушения ${}^1\text{KNA}$ аминокислотами, кислородом и антиоксидантами

Оптическое возбуждение KNA в водном растворе приводит к образованию ${}^1\text{KNA}$, которое способно вступать в фотохимические реакции с аминокислотами и кислородом [205]. Стоит отметить, что Pileni и коллеги [205] проводили свои эксперименты в водных растворах без контроля pH. Настоящие исследования были проведены в буферном растворе с постоянным

значением pH (PBS, pH 7.4), близким к физиологическим условиям в хрусталике глаза (pH 6.89 [218]).

В данной работе были исследованы реакции тушения ^1KNA аминокислотами Trp, Tug, Phe, Cys, His и Met, кислородом и антиоксидантами GSH и Asc в нативных и денатурирующих условиях (с добавлением 6 М мочевины). Эксперименты в денатурирующих условиях проводились для установления влияния мочевины на механизм реакции тушения и значение константы скорости этой реакции как в случае аминокислот, так и белков. Ароматические аминокислоты являются известными донорами электронов и активно участвуют в процессах тушения возбужденных состояний. Met, Cys и GSH были выбраны из-за наличия SH-группы (замещенной у метионина метильной группой), которая потенциально может участвовать в подобных реакциях. Схема реакций, протекающих в растворе, может быть представлена следующим образом (Q – молекула-тушитель):



Помимо реакций тушения (3.2), ^TKNA может гибнуть в реакции триплет-триплетной аннигиляции (3.4) и в реакции с кислородом, присутствующим в растворе (3.5). Для измерения константы скорости реакции (3.2) эксперименты были проведены в следующих условиях: (а) низкой интенсивности лазерного облучения (1-3 мДж/импульс) и (б) в анаэробных условиях. В условиях низкой интенсивности лазерного излучения образуются малые количества ^TKNA , что приводит к малому вкладу от реакции (3.4) в общую гибель ^TKNA , а в анаэробных условиях становится мал вклад от реакции (3.5). В таких условиях основным каналом гибели ^TKNA является реакция псевдо-первого порядка (3.2), которая линейно зависит от концентрации тушителя Q.

В качестве примера на Рис. 3.1 показаны кинетические кривые спада оптического поглощения ^TKNA на 600 нм при добавлении различных концентраций Trp. Видно, что при увеличении концентрации тушителя скорость гибели ^TKNA увеличивается. Кинетические кривые хорошо описываются моноэкспоненциальной зависимостью с наблюдаемой константой скорости k_{obs} , значение которой линейно зависит от концентрации тушителя:

$$k_{obs} = k_0 + k_q \cdot C_q \quad (3.6),$$

где k_q - константа скорости тушения, C_q - концентрация тушителя. Из линейной зависимости k_{obs} от концентрации тушителя была рассчитана константа скорости тушения 1KNA молекулой-тушителем (k_q). Графики зависимостей k_{obs} от концентрации тушителя представлены в Приложении 2 (Рис. П1). Константы скорости тушения 1KNA аминокислотами, кислородом и антиоксидантами приведены в Таблице 3.1. Наибольшие значения констант скорости демонстрируют: кислород и аминокислоты Trp, Tyr и Cys.

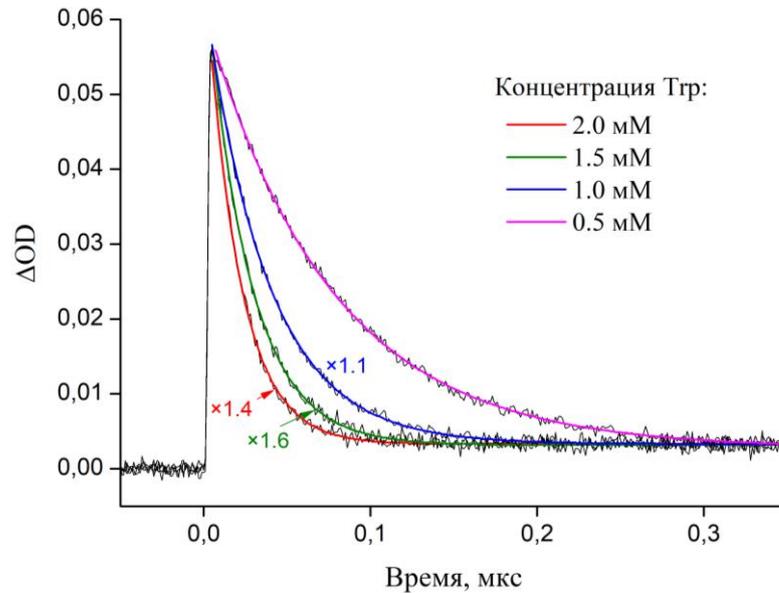


Рис. 3.1. Кинетические кривые промежуточного поглощения 1KNA в PBS, зарегистрированные на длине волны 600 нм после оптического возбуждения KNA на длине волны 355 нм (1 мДж/импульс) в присутствии различных концентраций Trp.

Таблица 3.1. 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 мочевины
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

Значения k_q для Trp, Tyr, His и Cys хорошо согласуются со значениями, полученными ранее [205]. Также 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, как уже говорилось в разделе 1.5.1, является эффективным тушителем триплетного состояния УФ-фильтров хрусталика [74]. Полученное значение константы хорошо согласуется с данными для KN [74] и его другого производного – 4HQN [194]. Значительное снижение константы скорости реакции с GSH по сравнению с Cys связано с наличием заместителей по его N- и C-концам (глутамина и глицина), которые стерически затрудняют реакцию с ^1KNA или ^1KN [74]. Как можно заметить, константы в нативных условиях в 1.5 - 2 раза выше, чем в присутствии 6М мочевины. Эту разницу следует связать с увеличением вязкости раствора примерно в 1.5 раза при добавлении 6 М мочевины [219].

Следующим шагом исследования было установление природы частиц, образующихся после тушения ^1KNA . С этой целью были записаны спектры промежуточного поглощения в различные интервалы времени после импульса лазера. На Рис. 3.2 в качестве примера приведены спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные при лазерном фотолизе 0.3 мМ KNA в PBS (pH 7.4) с добавлением 6М мочевины и в присутствии 1.0 мМ Trp или 1.0 мМ Tyr; длина волны возбуждения 355 нм, энергия импульса лазера 3 мДж. Представленные спектры соответствуют короткоживущим частицам, образующимся после тушения ^1KNA (через 37 мкс после лазерного импульса). На спектрах наблюдаются полосы промежуточного поглощения с максимумами на 510 и 410 нм соответствующие радикалам Trp $^{\cdot}$ [45,220,221] и Tyr $^{\cdot}$ [222], соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что тушение ^1KNA происходит с образованием радикалов аминокислот и KNA. Образование радикала KNA подтверждается наличием полосы промежуточного поглощения с отрицательным сигналом в районе 310-350 нм, что соответствует уменьшению концентрации исходного KNA в основном состоянии за счет его перехода в радикальную форму. На основании полученных данных можно сделать вывод, что аминокислотные остатки белков Trp и Tyr являются наиболее уязвимыми для атаки ^1KNA , поскольку именно эти аминокислоты демонстрируют наиболее высокие значения k_q по сравнению с остальными аминокислотами.

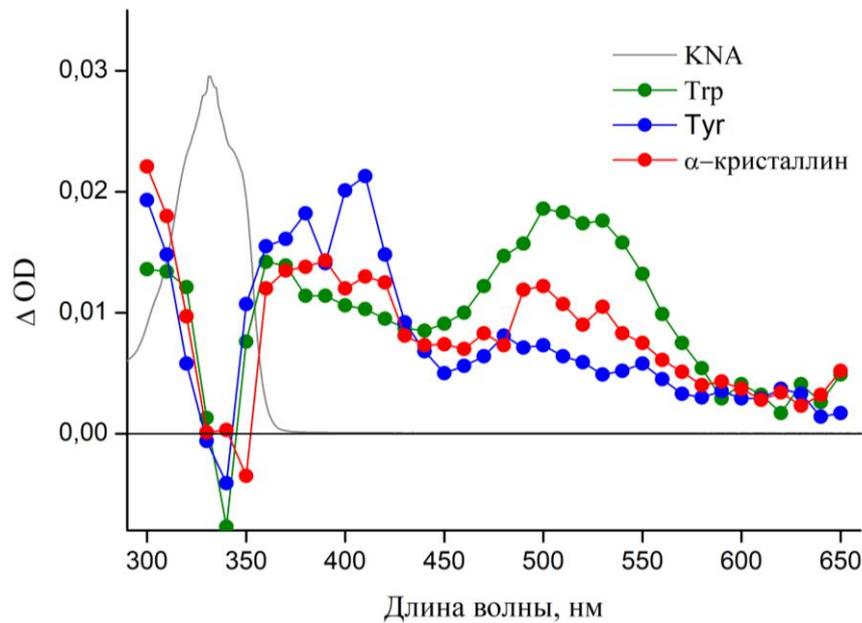


Рис. 3.2. Спектры поглощения промежуточных частиц, полученные при фотолизе на длине волны 355 нм 0.3 мМ KNA в насыщенном аргоном растворе PBS / 6 М мочевины через 37 мкс после лазерной вспышки: зеленые кружки - в присутствии 1.0 мМ Trp; синие - при наличии 1.0 мМ Tyr; красные - в присутствии 2.8 мг/мл α -кристаллина через 40 мкс после лазерной вспышки. Серая линия: стационарный спектр поглощения KNA.

3.2. Определение констант скорости тушения ^1KNA белками

Для изучения фотохимических реакций KNA с белками использовались следующие тушители: (1) модельный белок лизоцим (Hen Egg White Lysozyme, HEWL) и (2) белки хрусталика животного происхождения (*Bos taurus*, Bovine) – кристаллины. Кристаллины, высокостабильные водорастворимые белки хрусталика, традиционно подразделяются на три больших гетерогенных семейства (альфа- (α), бета- (β) и гамма- (γ) кристаллины), различающихся между собой строением и функциями. В водных растворах α -кристаллины образуют нековалентно связанные комплексы с высокой молекулярной массой, включающие в себя 15-60 мономерных субъединиц, β -кристаллины – 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 обладают высокой гомологией аминокислотных последовательностей (см. раздел 1.3). В силу высокой сложности структуры природных белков, в качестве модельной системы для исследования фотохимических реакций KNA с белками был выбран лизоцим (HEWL) – коммерчески доступный мономерный белок с хорошо известной структурой. Необходимо отметить, что реакции ^1KNA как с белками хрусталика, так и лизоцимом были исследованы впервые.

Лизоцим – небольшой фермент, в структуре которого имеется четыре поперечных дисульфидных мостика, обуславливающих стабильность фермента. В его последовательности присутствуют 6 остатков Trp и 3 остатка Tyr, которые, как было показано, являются эффективными тушителями возбужденных состояний кинуренина и его производных (раздел 3.1, [74,194]). Константы скорости тушения ^1KNA модельным белком HEWL были рассчитаны в нативных и денатурирующих (добавление 6 М мочевины) условиях. На Рис. 3.3 в качестве примера показаны кинетические кривые спада оптического поглощения ^1KNA ($\lambda_{\text{max}} = 600$ нм) при добавлении различных концентраций HEWL в PBS. Видно, что при увеличении концентрации тушителя скорость реакции тушения ^1KNA увеличивается. Кинетические кривые хорошо описываются экспоненциальной зависимостью, наблюдаемые константы скорости псевдопервого порядка пропорциональны концентрации HEWL согласно уравнению (3.6). Полученное значение константы скорости тушения в нативных условиях (Таблица 3.1) хорошо согласуется с константой скорости реакции радикала азида (N_3^{\cdot}) с остатками Trp белка HEWL [223,224]. Аналогичные зависимости были получены для денатурирующих условий. Значение константы тушения для лизоцима в мочеине (Таблица 3.1) в 2.5 раза меньше, чем в нативных условиях, что можно объяснить, как изменением вязкости раствора (за счёт добавления мочевины), так и изменением структуры белка вследствие его денатурации (по-видимому, разупорядочивание структуры белка затрудняет доступ к остаткам Trp и Tyr). Таким образом, эксперименты с модельным белком показывают, что мочевина оказывает влияние на эффективность протекания фотохимических реакций между KNA и белками не только за счёт изменения вязкости раствора, но и за счёт конформационных изменений в структуре белка, благодаря которым часть реакционных центров в полипептидной цепи становится недоступной для атаки ^1KNA . Поскольку основной целью работы было изучение реакций в условиях близких к физиологическим все последующие эксперименты проводились в растворах без добавления мочевины (нативные условия).

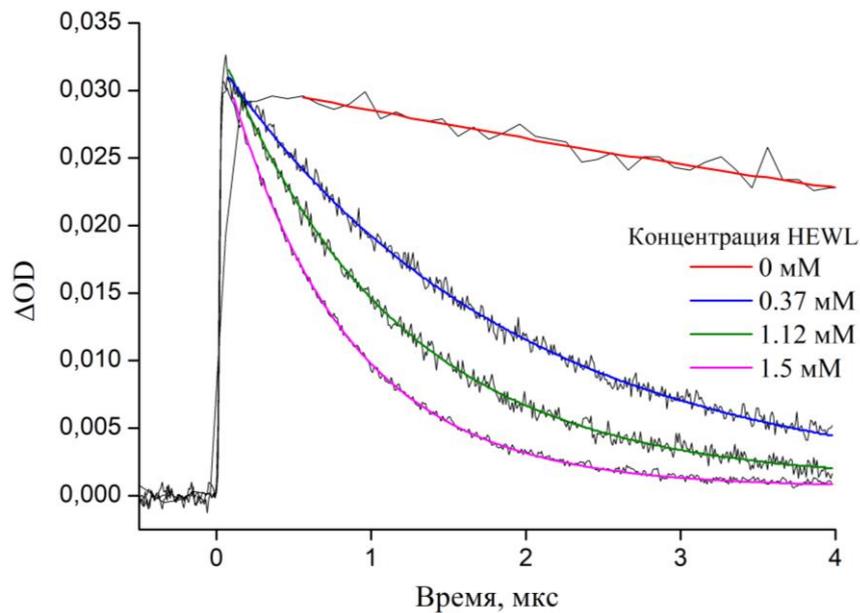


Рис. 3.3. Кинетические кривые промежуточного поглощения T КНА в PBS, зарегистрированные на длине волны 600 нм после оптического возбуждения КНА на длине волны 355 нм (1 мДж/импульс) при различных концентрациях HEWL.

Кристаллины, выделенные из хрусталиков *Bos taurus*, были разделены с помощью гелепроникающей хроматографии на 4 фракции (α -, β_H -, β_L - и γ -кристаллины). Обозначения β_H и β_L относятся к высокомолекулярным (октомеры) и низкомолекулярным (димерам) комплексам β -кристаллина, соответственно. В случае α -кристаллина в нативных условиях наблюдалось едва заметное ускорение гибели сигнала в широком диапазоне концентраций белка (0-30 мг/мл). Это связано с тем, что в нативных условиях этот белок образует мультимерные комплексы, которые существенно затрудняют доступ T КНА к реакционно-активным остаткам Trp и Tyr [34,61]. Кроме того, образование комплексов в десятки раз снижает эффективную концентрацию тушителей в растворе. Более надёжное измерение константы скорости тушения T КНА α -кристаллином возможно в условиях денатурации белка (6М мочевины), когда белок присутствует в виде мономеров. На Рис. 3.4 показаны кинетические кривые спада оптического поглощения T КНА ($\lambda_{max} = 600$ нм) при добавлении различных концентраций α -кристаллина в денатурирующих условиях (6М мочевины). Аналогично описанным выше исследованиям, с увеличением концентрации белка наблюдается заметно более резкий спад кинетической кривой. Аналогичные кинетические кривые были получены для остальных кристаллинов. В Таблицах 3.1 и 3.2 приведены значения констант скорости тушения T КНА белками хрусталика, полученные в данной работе впервые. Стоит отметить, что константа скорости тушения α -кристаллином в PBS (Таблица 3.2) является оценкой сверху, поскольку, как уже было

упомянуто, наблюдалось крайне малое изменение скорости гибели ^TKNA . Графики зависимостей k_{obs} от концентрации тушителя представлены в Приложении 2 (Рис.П1и П2).

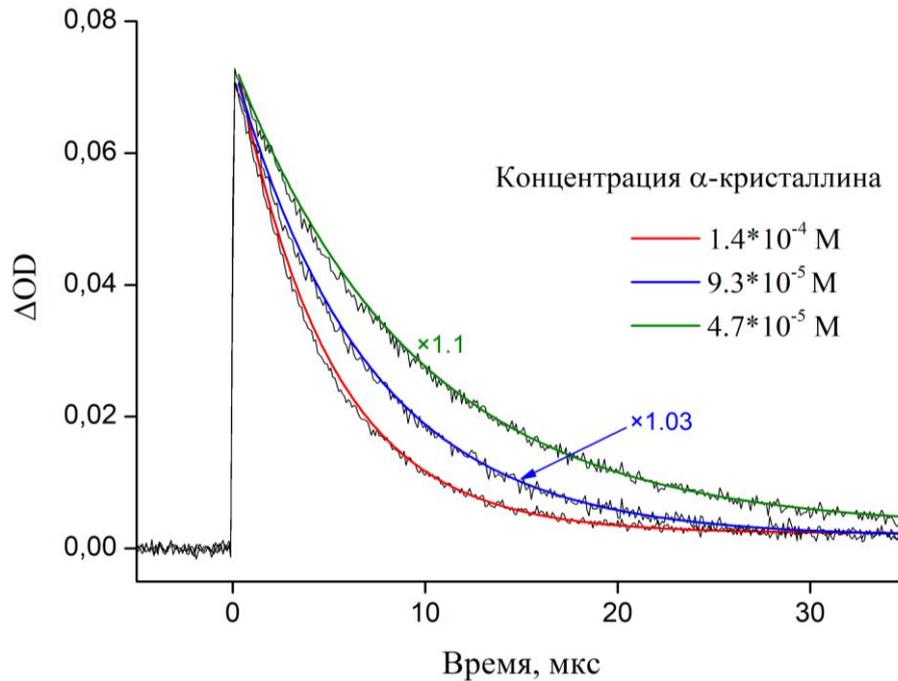


Рис. 3.4. Кинетические кривые промежуточного поглощения ^TKNA в PBS с добавлением 6 М мочевины, зарегистрированные на длине волны 600 нм после оптического возбуждения KNA на длине волны 355 нм (1 мДж/импульс) при различных концентрациях α -кристаллина.

Следует также отметить, что значения k_q значительно снижаются для белков (Таблица 3.2) по сравнению с одиночными аминокислотами (Таблица 3.1). Подобный эффект может быть связан с двумя важными факторами: (1) подвижность белка в растворе и (2) стерический фактор. Во-первых, в отличие от свободных аминокислот белки имеют значительно бóльшие размеры молекул и являются менее подвижными. Во-вторых, каждый реакционный центр в белке окружён большим количеством соседей, которые стерически затрудняют доступ того или иного аминокислотного остатка к ^TKNA , свободно перемещающейся в растворе.

Таблица 3.2. Константы скорости тушения ^TKNA белками в нативных условиях

	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

Из полученных данных становится ясно, что способность белков хрусталика тушить ^TKNA зависит от следующих факторов: (1) аминокислотного состава белка, а именно, от

количества Trp и Tug аминокислотных остатков в полипептидной цепочке белка; (2) упаковки аминокислотных остатков внутри белковой глобулы; (3) от количества субъединиц, из которых состоит белок. Полученные результаты показывают, что константы скорости тушения увеличивается в ряду α (мультимеры) $< \beta_h$ (октомеры) $< \beta_L$ (димеры) $< \gamma$ (мономер). Это означает, что в случае кристаллинов упаковка белков и их трехмерная структура играют более важную роль, нежели количество аминокислотных остатков в их составе (Таблица П1 Приложения 1).

3.3. Определение механизма тушения ^1KNA лизоцимом

На Рис. 3.5 приведён спектр промежуточного поглощения, полученный при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 1.0 мМ HEWL через 12 мкс после лазерного импульса (Рис. 3.5 черная линия), который является суперпозицией спектров поглощения радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ (Рис. 3.5 синяя линия) и радикала Trp $^{\cdot}$ (Рис. 3.5 зеленая линия). Спектр радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ был получен при исследовании механизма реакции между KNA и NTrpH (Глава IV), подробности его получения можно найти в разделе 4.1. Необходимо отметить, что полученный спектр полностью совпадает со спектром, полученным при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 1.0 мМ Trp (Рис. 3.5 красная линия). На спектре радикала лизоцима (Рис. 3.5 черная линия) не наблюдается сколь-либо значительного сигнала от полосы поглощения с максимумом на 410 нм, которая соответствует поглощению радикалов Tug $^{\cdot}$. Это говорит о незначительном вкладе остатков Tug в процесс тушения ^1KNA лизоцимом, которые, согласно рентгеноструктурным данным, скрыты внутри белковой глобулы. В аминокислотную последовательность HEWL входят 6 остатков триптофана, один из которых наиболее доступен для молекул растворителя (Trp62), два наполовину погружены в белковую глобулу (Trp63 и Trp123) и три из них находятся глубоко внутри белка (Trp28, Trp108, Trp111). Согласно трехмерной структуре белка и предыдущим исследованиям [89,223-225], можно ожидать, что основной вклад в наблюдаемую после тушения полосу поглощения на 510 нм, соответствующую поглощению нейтрального радикала Trp $^{\cdot}$, относится к Trp62, как наиболее доступному для атаки ^1KNA . Таким образом, можно сделать вывод, что тушение ^1KNA лизоцимом приводит в основном к формированию радикалов на Trp и KNA.

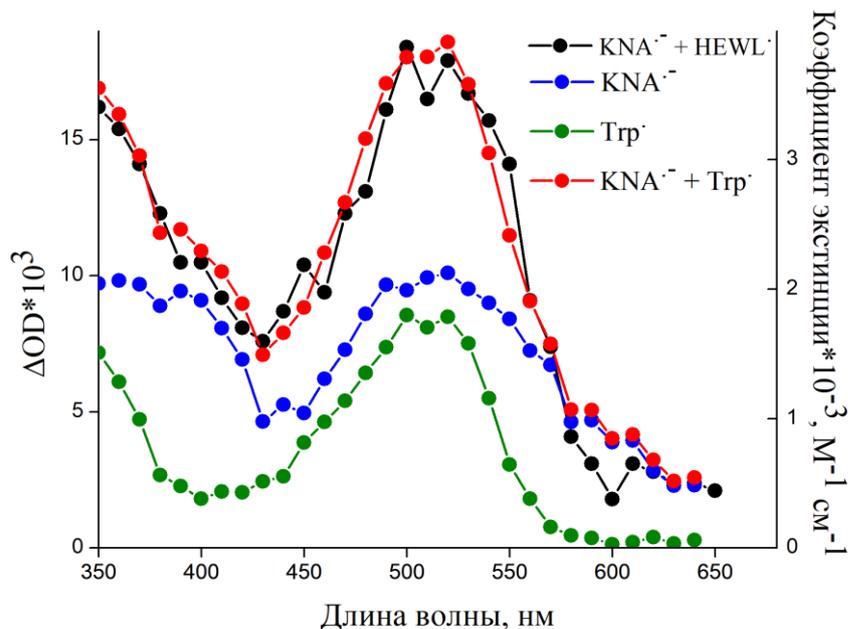


Рис. 3.5. Спектр поглощения промежуточных частиц, наблюдаемый при лазерном импульсном фотолизе (355 нм) раствора KNA с HEWL в PBS через 12 мкс (черная линия), спектр поглощения радикал $\text{KNA}^{\bullet-}$ (синяя линия) и Trp^{\bullet} (зеленая линия) и суперпозиция этих двух спектров (красная линия).

3.4. Определение механизма тушения ^1KNA кристаллинами

С целью идентификации типов аминокислотных остатков, участвующих в реакциях тушения ^1KNA кристаллинами, были записаны спектры промежуточного поглощения, полученные при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в присутствии 2.7 мг/мл α -кристаллина, 5.3 мг/мл β -кристаллина (объединённая фракция) и 5.6 мг/мл γ -кристаллина через 40 мкс после импульса. Концентрации кристаллинов были рассчитаны с помощью коэффициентов экстинкции, полученных в работе студента группы фотоиндуцированных процессов МТЦ СО РАН Сеницына С.А. Согласно расчётам, были получены следующие значения ϵ_{280} (мг мл⁻¹ см⁻¹): 0.9 ± 0.1 , 2.2 ± 0.2 и 1.8 ± 0.2 для α -, β - и γ -кристаллина, соответственно. Как уже говорилось выше, в нативном состоянии α -кристаллин представляет собой комплекс из 15-60 мономерных субъединиц, в котором большая часть его немногочисленных триптофановых (суммарно 3 на αA и αB) и тирозиновых (суммарно 7 на αA и αB) аминокислотных остатков оказываются недоступными для взаимодействия с KNA (Таблица П1 Приложения 1). Такое сложное устройство белковой глобулы делает невозможным регистрацию спектра и наблюдение за эффектами, происходящими при взаимодействии белка с фотовозбуждённой кислотой в нативных условиях. Поэтому для этого семейства белков спектр поглощения промежуточных частиц был записан только в денатурирующих условиях, который демонстрирует, какие

аминокислотные остатки белка участвуют в реакции. Стоит отметить также, что для записи спектра для β -кристаллинов фракции β_h - и β_L -кристаллинов, которые состоят из белков одного семейства и являются очень схожими по своей структуре, были объединены. Объединение фракций позволило увеличить концентрацию белков и эффективность тушения.

На Рис. 3.6 приведены спектры поглощения промежуточных частиц для β - и γ -кристаллинов в нативных условиях и α -кристаллина в денатурирующих условиях (6М мочевины). Последний также приведен на Рис. 3.2 с целью прямой демонстрации совпадения полос поглощения радикалов на α -кристаллине и радикалов Trp^* и Tyr^* . Таким образом, можно видеть, что реакция между ^1KNA и α -кристаллином протекает по обоим ароматическим аминокислотным остаткам.

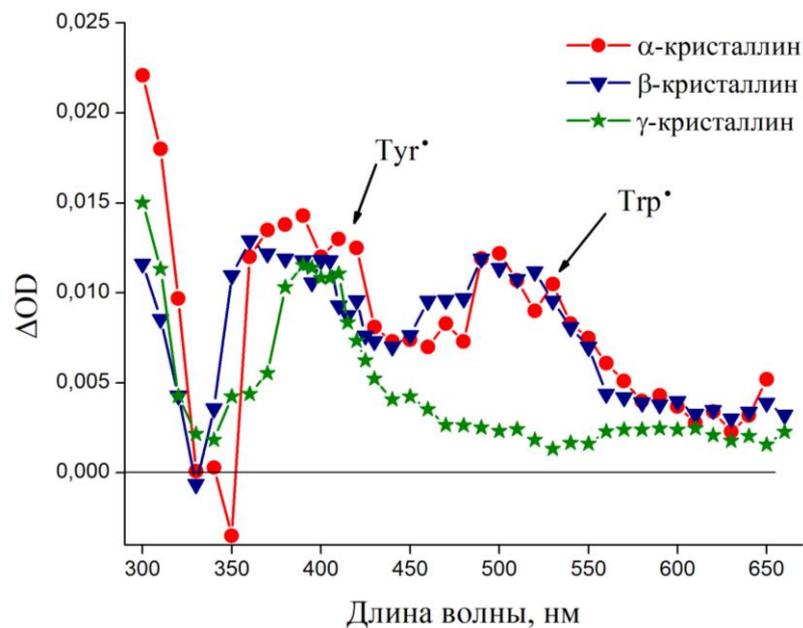


Рис. 3.6. Спектры поглощения промежуточных частиц, наблюдаемые при лазерном импульсном фотолизе раствора KNA с кристаллинами через 40 мкс после импульса лазера. α -Кристаллин в денатурирующих условиях, β - и γ -кристаллины в нативных условиях.

Сравнение спектров для кристаллинов (Рис. 3.6) показывает, что фотолиз β -кристаллинов в присутствии KNA также протекает через остатки Trp и Tyr , о чём свидетельствует формирование полос поглощения с максимумами на 510 и 410 нм, соответственно. Стоит отметить, что для α -кристаллина в нативных условиях вклад от радикалов Trp и Tyr в общий вид спектра может отличаться от денатурирующих в связи с мультимерным строением комплекса и экранированием части аминокислотных остатков. Представители семейства γ -кристаллинов тушат ^1KNA в основном за счёт реакций с Tyr аминокислотными остатками, о чём свидетельствует ярко выраженная полоса поглощения с

максимумом на 410 нм (нейтральный радикал Tgr^{*}). Наблюдаемые эффекты объясняются аминокислотным составом белков (Таблица П1 Приложения 1). В составе представителей семейств α - и β -кристаллинов Tug и Tgr содержатся практически в одинаковых количествах поэтому регистрируются сигналы радикалов от обеих аминокислот. В γ -кристаллинах количество остатков Tug (15-16 остатков) значительно превышает Tgr (4-5 остатка). Кроме того, в нативных условиях молекулы Tgr экранированы от молекул растворителя, а значит и от KNA (см. раздел 1.3). Следовательно, вероятность ^TKNA встретиться с Tug значительно выше, чем с Tgr, поэтому сигнала радикала Tgr^{*} на спектре практически не наблюдается.

Заключение по материалам главы III

В главе III настоящей работы было показано, что наиболее активными тушителями триплетного состояния ^TKNA являются аминокислоты Tgr, Tug, Cys, антиоксидант Asc и молекулярный кислород. В силу высоких значений констант скорости, близких к диффузионно-контролируемым для данных соединений, предполагается, что механизм тушения заключается в переносе электрона с молекулы тушителя на молекулу KNA. Основываясь на полученных результатах, можно сказать, что триптофановые и тирозиновые остатки в кристаллинах являются наиболее уязвимыми положениями для модификации белков хрусталика ^TKNA. Впервые было показано, что тушение ^TKNA α - и β -кристаллинами происходит за счет реакций возбужденных молекул с ароматическими аминокислотами Tgr и Tug, тогда как для γ -кристаллинов тушение ^TKNA в основном происходит за счет взаимодействия с Tug.

Дальнейшая судьба радикалов, образованных в результате фотохимических реакций, в данном разделе не устанавливалась. Однако, можно предположить, что далее они вступают в два типа реакций: (1) обратный перенос электрона с образованием исходных реагентов и (2) в реакции с образованием продуктов, которые могут приводить к развитию патологий хрусталика. Можно ожидать, что в хрусталике глаза аскорбат, обладая высокой константой скорости тушения, будет эффективно тушить ^TKNA, защищая кристаллины от фотоповреждений. GSH хоть и не способен тушить триплетное состояние KNA, как это было показано в данной главе, является эффективным захватчиком радикальных частиц с их последующим переводом в неактивные формы (см. раздел 1.5.1). Эффективность предотвращения фотоиндуцированных модификаций α -кристаллинов этими антиоксидантами была продемонстрирована ранее [152]. Следовательно, GSH также может играть важную роль в предотвращении модификаций белка.

ГЛАВА IV ДИМЕРИЗАЦИЯ И ОКИСЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТЫ ТРИПТОФАН В РЕЗУЛЬТАТЕ УФ-А ФОТОЛИЗА В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

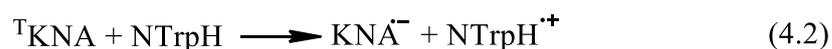
Тушение триплетных состояний KN [74] и KNA (см. главу III) аминокислотами Trp и Tug протекает по механизмам переноса электрона на фотовозбуждённую молекулу с образованием соответствующих радикалов. Дальнейшие реакции фотоиндуцированных радикалов могут включать в себя реакции с образованием продуктов фотолиза, либо реакции восстановления исходных соединений через процесс обратного переноса электрона. Последняя реакция является основным каналом гибели радикалов для ряда фотосенсибилизаторов, взаимодействующих с аминокислотами Trp и Tug, таких как флавин моноклеотид [226], диперидил [225] и птерин [227]. Механизмы реакций, приводящих к образованию продуктов, во многом остаются не ясными. Молекулярный кислород, присутствующий в тканях хрусталика в следовых количествах [39], и его высокореакционные формы могут оказывать влияние на протекание фотохимических реакций с участием Trp (см. главу I, раздел 1.4.2). С целью эмуляции физиологических условий среды хрусталика все эксперименты проводились в анаэробных условиях (в атмосфере аргона), если не указано иное. Известно, что радикалы Trp[•] практически не реагируют с основным состоянием кислорода [228,229], но легко вступают в реакции с супероксидом O₂^{•-} [229]. Механизм последней реакции в настоящее время неизвестен, а имеющиеся данные противоречивы: реакция может протекать по механизму комбинации радикалов с образованием пероксидов [229] или обратного переноса электрона с восстановлением исходных реагентов [227]. Кроме того, Trp способен вступать в реакцию с синглетным кислородом ¹O₂ с образованием ряда окисленных продуктов [77,230].

Данная глава диссертационной работа направлена на восполнение недостающей информации о механизме УФ-А фотолиза белков хрусталика в присутствии его фотосенсибилизатора KNA на примере детального изучения фотоиндуцированных реакций в простой молекулярной системе, KNA и N-ацетил-L-триптофаном (NTrpH). Особое внимание уделено роли остаточного молекулярного кислорода в механизме фотолиза в анаэробных условиях, а также характеристике продуктов, образующихся в фотохимических реакциях KNA с NTrpH.

4.1 Спектральные характеристики радикала KNA^{•-}

Как было показано в главе III, реакция между Trp и ^TKNA протекает по механизму переноса электрона с константой скорости $2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Фотолиз в присутствии 5.5 мМ NTrpH приводит к полной гибели ^TKNA через 200-300 нс после лазерного импульса и образованию двух радикальных частиц: KNA^{•-} и NTrpH^{•+} (реакция 4.2). В нейтральной среде

$\text{NTrpH}^{+\bullet}$ быстро депротонируется с образованием нейтрального радикала NTrp^{\bullet} (рКа 4.3 [220], реакция 4.3). Вероятно, в водном растворе при нейтральных значениях рН анион-радикал $\text{KNA}^{\bullet-}$ протонируется и образуется KNAH^{\bullet} . Поскольку в настоящее время нет данных, указывающих, какая именно форма радикала KNA присутствует в нейтральном водном растворе, то далее по тексту данный радикал обозначается как $\text{KNA}^{\bullet-}$ (подразумевается форма, которая доминирует при нейтральном рН).



На Рис. 4.1 представлены кинетики и спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные при лазерном фотолизе 0.3 мМ KNA в PBS (рН 7.4) в присутствии 5.5 мМ NTrpH в атмосфере аргона, воздуха и кислорода. Концентрация аминокислоты была подобрана таким образом, чтобы тушение ${}^T\text{KNA}$ происходило в реакциях с NTrpH одинаково быстро, вне зависимости от концентрации молекулярного кислорода в растворе – другими словами, даже в насыщенном кислородом растворе тушение происходит в основном за счет реакции ${}^T\text{KNA}$ с NTrpH , а не с кислородом. На Рис. 4.1 (А) и (Б) приведены кинетические кривые спада оптического поглощения радикалов на 400 и 510 нм при разных концентрациях кислорода в растворе. В анаэробных условиях $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrp^{\bullet} демонстрируют относительно медленную гибель, преимущественно с константой скорости второго порядка (Рис. ПЗ Приложения 3). Как видно из графиков на Рис. 4.1 (А) и (Б) скорость гибели радикалов увеличивается при увеличении концентрации кислорода в растворе. Ускорение гибели радикалов в аэробных условиях, по-видимому, связано со взаимодействием радикалов с молекулярным кислородом. Ранее было показано, что радикалы Trp^{\bullet} реагируют с O_2 с очень маленькой константой скорости ($\leq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [228,229], реакция 4.5) и на временной шкале данного эксперимента (10 мкс) эта реакция не может быть зарегистрирована. Следовательно, наблюдаемый эффект необходимо отнести к реакции между $\text{KNA}^{\bullet-}$ и O_2 (реакция 4.4), которая приводит к восстановлению KNA и образованию супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$. Кроме того, спектр промежуточного поглощения, записанный для раствора в атмосфере кислорода (Рис. 4.1 (В)), полностью совпадает со спектром, полученным для Trp в главе III (Рис. 3.2), и со спектром нейтрального радикала Trp^{\bullet} , в ранее опубликованных исследованиях [45,220,221].

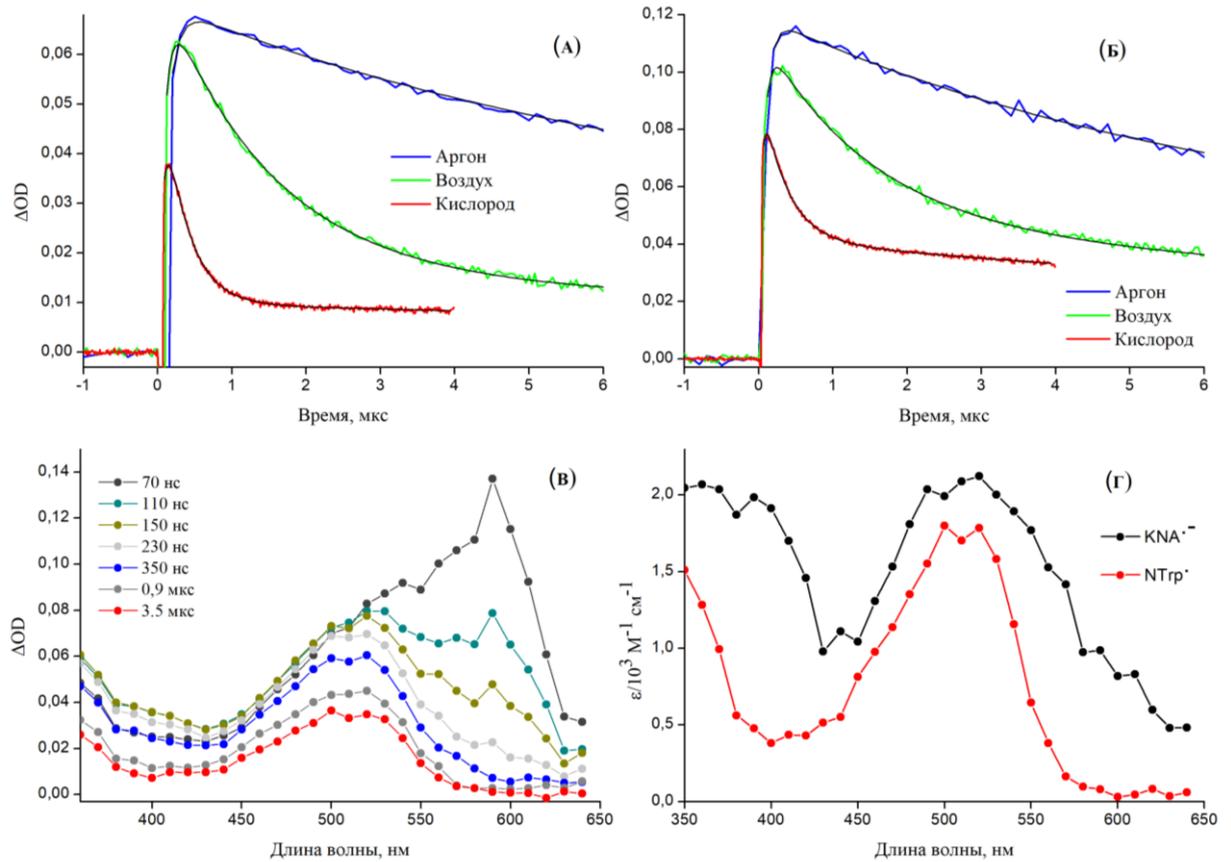
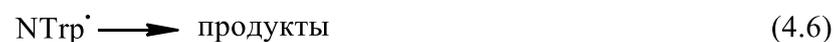
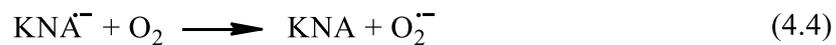


Рис. 4.1. Кинетики и спектры промежуточного поглощения полученные после облучения лазером (355 нм, 3 мДж/импульс) раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 5.5 мМ NTrpH в PBS. (А, Б): Кинетики промежуточного поглощения, зарегистрированные на длине волны (А) 400 и (Б) 510 нм в атмосфере аргона (синий), воздуха (зеленый) и кислорода (красный). (В): Спектры промежуточного поглощения при различных временах после лазерного импульса, полученные в атмосфере кислорода. (Г): Спектры поглощения радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrp^{\bullet} .



Для определения константы скорости реакции 4.4, был проведён анализ динамики оптического поглощения на 400 и 510 нм (Рис. 4.1 (А) и (Б)), соответствующего минимуму и максимуму спектра поглощения радикала NTrp^{\bullet} , при разных концентрациях кислорода (в атмосфере аргона, воздуха и кислорода). Эти кинетические кривые хорошо описываются суммой трех экспоненциальных функций: первая экспоненциальная функция соответствует образованию радикалов в реакциях 4.2 и 4.3, а вторая и третья экспоненциальные функции - гибели радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ в реакции 4.4 и NTrp^{\bullet} в реакции 4.6, соответственно. Необходимо

отметить, что гибель радикалов NTrp^{\bullet} протекает в результате реакций второго порядка (комбинации радикалов NTrp^{\bullet}), однако, на рассматриваемом интервале времени начальный участок гибели радикалов хорошо описывается экспоненциальной кривой. Для упрощения расчетов была выбрана более простая модель. Результаты анализа полученных данных в рамках трех-экспоненциальной модели показали, что вторая экспоненциальная функция демонстрирует линейную зависимость наблюдаемой константы скорости, k_{obs} , от концентрации кислорода:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2] \quad (4.7),$$

где k_{O_2} - константа скорости реакции между $\text{KNA}^{\bullet-}$ и O_2 , k_0 - константа скорости гибели радикала в реакции без участия кислорода. Графики зависимости k_{obs} от концентрации кислорода и линейные аппроксимации согласно уравнению 4.7 для двух длин волн (400 и 510 нм) представлены в Приложении 3. На основании этих данных было получено усредненное значение $k_{\text{O}_2} = (2.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, которое согласуется со значением константы скорости аналогичной реакции для другого фотохимически активного производного KN - N-формилкинурина ($5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [231]).

На Рис. 4.1 (Г) представлен впервые зарегистрированный спектр промежуточного поглощения радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$, полученного вычитанием спектра радикала NTrp^{\bullet} (красная кривая на Рис. 4.1 (В)) из спектра промежуточного поглощения через 350 нс после лазерного импульса, соответствующего полной гибели ^1KNA (синяя кривая на Рис. 4.1 (В)). Полученный спектр радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ имеет две широкие полосы поглощения с максимумами около 370 и 510 нм (Рис. 4.1 (Г)). На основании полученных данных был рассчитан коэффициент экстинкции радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ ($\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}}$):

$$\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}}(\lambda) = \epsilon_{\text{Trp}^{\bullet}}(\lambda) * A(\lambda)/B(\lambda) \quad (4.8),$$

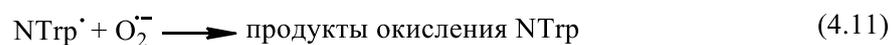
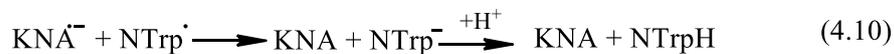
где $\epsilon_{\text{NTrp}^{\bullet}}(\lambda)$ - коэффициент экстинкции радикала NTrp^{\bullet} на длине волны λ , $A(\lambda)$ и $B(\lambda)$ – предэкспоненциальные множители, соответствующие гибели радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrp^{\bullet} , полученные из уравнения, описывающего кинетики промежуточного поглощения (см. уравнение (3) Приложения 3). Из литературных данных известно, что $\epsilon_{\text{NTrp}^{\bullet}}(510 \text{ нм}) = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [232]. Отношение $A(\lambda) / B(\lambda)$ было экспериментально измерено. Таким образом, было получено значение $\epsilon_{\text{KNA}^{\bullet-}} = 2100 \pm 200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Полученные данные позволяют сделать оценку константы скорости реакции между радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrp^{\bullet} . Радикалы могут гибнуть в реакциях между двумя одинаковыми радикалами или вступать во взаимодействие друг с другом. На Рис. П1 (Приложение 3) приведены кинетические кривые спада поглощения радикалов в атмосфере аргона на 400 и 510 нм, записанные при варьировании энергии лазерного импульса от 4 до 30 мДж/импульс. Кинетические кривые хорошо описываются уравнением второго порядка, в котором

используются значения коэффициентов экстинкции радикалов. Первоначально было предположено, что два типа реакций между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTrp^{\cdot} могут протекать с одинаковыми скоростями. Полученное значение $k_R = (3.2 \pm 0.6) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ оказалось значительно выше типичных значений для констант скорости реакции рекомбинации двух радикалов Trp^{\cdot} , известное по литературным данным $((2-8) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, [87,229]). Поэтому вышеприведенное предположение оказалось не совсем верным, и полученное значение k_R следует рассматривать как оценочное значение константы скорости реакции между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTrp^{\cdot} .

4.2. Влияние кислорода на фотолиз аминокислот и белков в присутствии KNA

Быстрое окисление радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ кислородом очень важно для всех дальнейших фотохимических исследований. Это означает, что для изучения прямых реакций между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и аминокислот/белков (4.9-4.10) необходимо, чтобы их концентрация превышала концентрацию остаточного кислорода. В противном случае происходит эффективное образование супероксид радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$, и дальнейшие реакции будут происходить между $\text{O}_2^{\cdot-}$ и радикалами аминокислот/белков (4.11-4.12).



Эксперименты по лазерному импульсному фотолизу KNA показали, что наименьшая концентрация кислорода, которая может быть получена в данных экспериментальных условиях, составляет величину 5-10 мкМ. В то же время концентрация образующихся под действием света радикалов может быть изменена путем использования импульсного (лазерный импульс длиной 8 нс) или стационарного (ртутная лампы высокой мощности) источника света. В первом случае концентрации 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 или с использованием импульсного излучения, что приводит к прямым реакциям между $\text{KNA}^{\bullet-}$ и радикалами аминокислот/белков (тип Ia), или с использованием стационарного излучения, что приводит к реакциям между $\text{O}_2^{\bullet-}$ и радикалами аминокислот/белков (тип Ib).

4.2 Фотолиз типа Ia и Ib водных растворов KNA и NTGrH

Образцы, содержащие 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTGrH в PBS, облучали с помощью ртутной лампы (фотолиз типа Ib); диапазон длин волн, соответствующего УФ-А излучению, вырезали с помощью водного фильтра и набора стеклянных фильтров (355-380 нм). На Рис. 4.2 (А) и (Б) представлены зависимости концентраций KNA и NTGrH от времени облучения, полученные с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В анаэробных условиях разложение NTGrH происходит значительно быстрее, чем KNA. Согласно методике, представленной в главе II (раздел 2.12), были рассчитаны квантовые выходы разложения ($\Phi_{\text{дегр}}$) KNA и NTGrH, которые составили значения 0.02% и 1.6%, соответственно (Таблица 4.1).

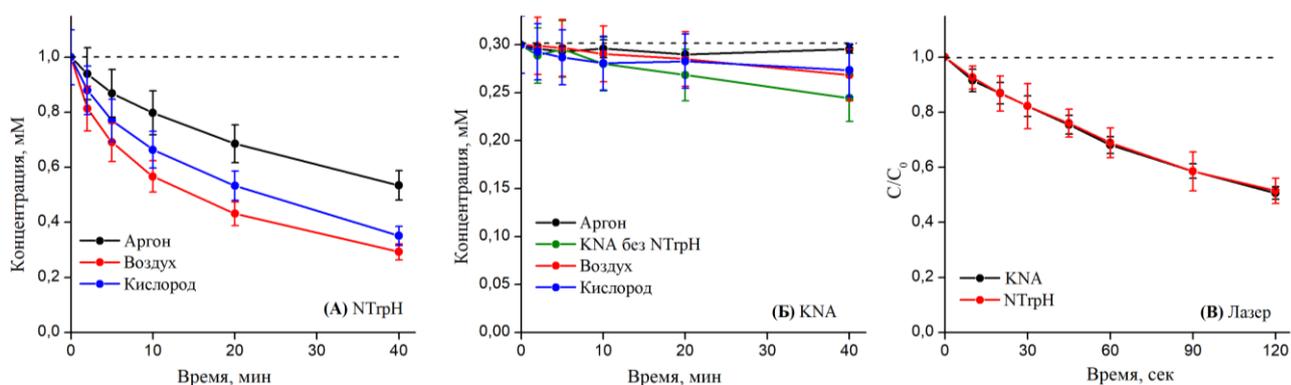


Рис. 4.2. Зависимости концентраций (А) NTGrH и (Б) KNA при УФ-А фотолизе тип Ib 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTGrH в PBS от дозы облучения. (А и Б): черная линия - аргон; красная – воздух и синяя – кислород. (Б): Зеленая линия – фоторазложение KNA в атмосфере аргона без добавления NTGrH. (В): Зависимости относительных концентраций (C/C_0) NTGrH и KNA от времени облучения при фотолизе тип Ia (355 нм, 3 мДж/импульс) 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTGrH в PBS в атмосфере аргона. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Как видно из графиков (Рис. 4.2 (А) и (Б)) скорость разложения NTGrH в атмосфере воздуха и кислорода увеличивается, тогда как для KNA изменения незначительны. Различия в скорости разложения исходных форм NTGrH и KNA связаны с участием АФК ($\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^1\text{O}_2$) в фотохимических реакциях. Как было показано в разделе 4.1, супероксид $\text{O}_2^{\bullet-}$ образуется при

взаимодействии $\text{KNA}^{\cdot-}$ с молекулярным кислородом по реакции 4.4. По литературным данным известно, что синглетный кислород $^1\text{O}_2$ может образовываться в реакциях ^1KNA с O_2 (реакция 4.15) с квантовым выходом 42% [192].

Таблица 4.1. Квантовые выходы ($\Phi_{\text{дегр}}$) разложения KNA и NTrpH в PBS (pH 7.4) при фотолизе тип Ib (облучение лампой) и тип Ia (облучение лазером) фотолизе.

Источник излучения	Условия	Растворитель	$\Phi_{\text{дегр}}(\text{KNA}) / \%$	$\Phi_{\text{дегр}}(\text{NTrpH}) / \%$
Лампа (355-380 нм)	Аргон, без NTrpH	H_2O	0.11 ± 0.02	–
	Аргон	H_2O	0.021 ± 0.013	1.6 ± 0.3
		D_2O	0.041 ± 0.018	1.6 ± 0.4
	Воздух	H_2O	0.055 ± 0.009	7.3 ± 1.4
		D_2O	0.067 ± 0.021	14.0 ± 2.8
	Кислород	H_2O	0.053 ± 0.034	3.6 ± 0.2
		D_2O	0.043 ± 0.025	5.8 ± 1.2
	Лазер (355 нм)	Аргон	H_2O	5.7 ± 1.1

Для оценки степени участия $^1\text{O}_2$ в разложении NTrpH был проведён дополнительный эксперимент по фотолизу в дейтерированном PBS. Известно, что время жизни $^1\text{O}_2$ многократно увеличивается при переходе от H_2O (4 мкс) к D_2O (64 мкс) [233]. Следовательно, в дейтерированной воде более длительное присутствие $^1\text{O}_2$ в растворе должно увеличить степень разложения NTrpH. Результаты экспериментов показали, что фоторазложение NTrpH в D_2O в атмосфере воздуха и кислорода увеличивается в два раза по сравнению с аналогичными экспериментами, проведёнными в H_2O , в то время как для анаэробных условий значение $\Phi_{\text{дегр}}$ не изменяется (см. Таблицу 4.1). Это указывает на то, что в анаэробных условиях (при низких концентрациях O_2) вклад реакции NTrpH с $^1\text{O}_2$ в общее разложение аминокислоты незначителен, и тушение ^1KNA преимущественно происходит по реакции 4.2. Квантовые выходы разложения реагентов представлены в Таблице 4.1, графики зависимости концентрации NTrpH и KNA от дозы УФ-излучения приведены в Приложении 4 (Рис. П5). Кроме того, эксперименты по фотолизу растворов с различной концентрацией NTrpH (0.3 мМ, 1.0 мМ и 3.0 мМ) (Рис. П6 Приложения 4) в атмосфере аргона показали, что скорость его фоторазложения практически не зависит от концентрации, что также подтверждает вывод о реакциях с $^1\text{O}_2$. Следовательно, значительное разложение NTrpH по сравнению с KNA при анаэробном фотолизе может быть связано с реакцией NTrp $^{\cdot}$ с супероксидом (реакция 4.11), образованном в реакции 4.4.

Фотолиз типа Ia заключается в облучении образцов, содержащих 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTpH низкоинтенсивным лазерным излучением (355 нм, 3 мДж/импульс, частота 10 Гц). Особенностью такого типа фотолиза является генерация высоких концентраций реакционно-активных частиц - триплетного состояния KNA и радикалов, за короткое время. На Рис. 4.2 (B) представлены зависимости относительных концентраций (C/C_0) реагентов от времени облучения лазером. Как видно из данных, представленных в Таблице 4.1, квантовые выходы фоторазложения NTpH и KNA значительно возрастают при переходе от фотолиза типа Ib к типу Ia, что может быть вызвано прямыми реакциями между радикалами $KNA^{\cdot-}$ и $NTpH^{\cdot}$ с образованием продуктов (реакция 4.9). В случае типа Ib концентрация радикалов значительно ниже, и образовавшиеся в реакции 4.2 радикалы $KNA^{\cdot-}$ в основном участвуют в реакциях с остаточным кислородом в растворе с образованием восстановленной формы KNA и $O_2^{\cdot-}$ (реакция 4.4). Следует также отметить, что зависимости C/C_0 для KNA и NTpH совпадают (Рис. 4.2 (B)), это указывает на то, что на фоторазложение одной молекулы KNA приходится три молекулы NTpH.

4.3 Анализ продуктов, образующихся при УФ-А фотолизе

Пробы, отобранные при фотолизе типа Ib 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTpH в PBS, анализировали с помощью метода ВЭЖХ-МС. В ходе масс-спектрометрического анализа были определены основные продукты фотохимических реакций с отношением массы к заряду (m/z) иона $[M+H^+]$: 176.0710, 146.0595, 263.1026, 279.0973 и 491.1926 (в порядке возрастания времени удерживания при хроматографическом разделении).

Два пика на хроматограмме с m/z 176.0710 и 146.0595 относятся к продуктам фоторазложения KNA. Продукт с m/z 146.0595 и временем удержания (Retention Time, RT) 12.7 минут демонстрирует спектры оптического поглощения (Рис. 4.3) и МС/МС фрагментации (Рис. 4.4 (B)), совпадающие со спектрами для 4HQ, представленными в литературе [194,234]. На основании этих совпадений данный продукт был идентифицирован как 4HQ. Второй продукт с m/z 176.0710 и RT 12.4 мин был отнесен к 1,4-дигидрохиолин-2-карбоновой кислоте (1,4-DHQ). Спектр поглощения 1,4-DHQ близок к спектру поглощения 4HQ (Рис. 4.3), а МС/МС анализ (Рис. 4.4 (A)) показал, что он образуется из KNA с потерей карбонильного кислорода. На схеме 4.1 представлены возможные структуры и пути фрагментации описанных продуктов, полученные при МС/МС фрагментации (Рис. 4.4 (A) и (B)). 1,4-DHQ и 4HQ являются продуктами фотохимических реакций, и их концентрации увеличиваются во время фотолиза (Рис. 4.5 (A)). Стоит также отметить, что эти продукты не образуются при аэробном фотолизе, что свидетельствует о протекании реакции между $KNA^{\cdot-}$ и кислородом, при которой происходит эффективное восстановление KNA (реакция 4.4).

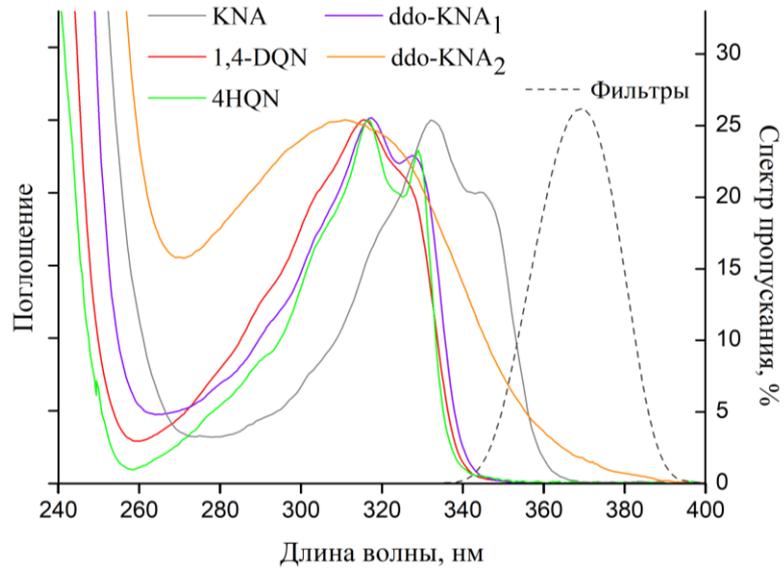


Рис. 4.3. Спектры поглощения KNA, 1,4-DHQ, 4HQ, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ в PBS и спектр пропускания УФ-фильтров.

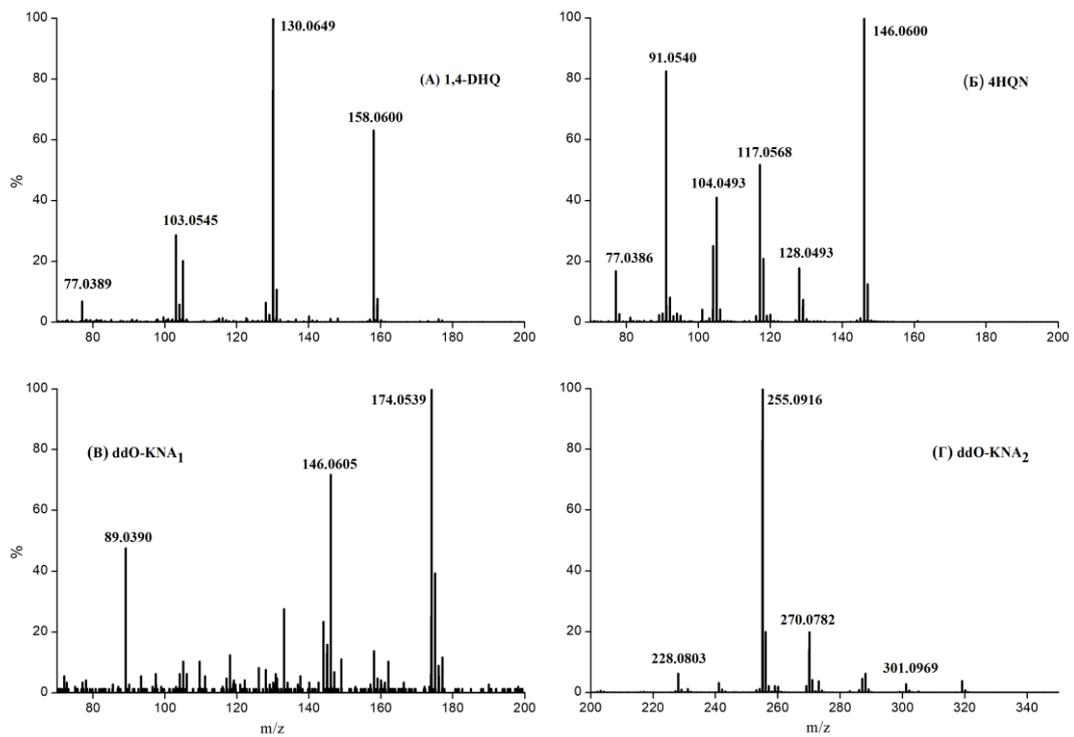


Рис. 4.4. MS/MS спектры ионов продуктов фоторазложения KNA: (А): 1,4-DHQ, m/z 176.710; (Б): 4HQ, m/z 146.0600, (В): ddO-KNA₁, m/z 349.1182; (Г): ddO-KNA₂, m/z 345.0869.

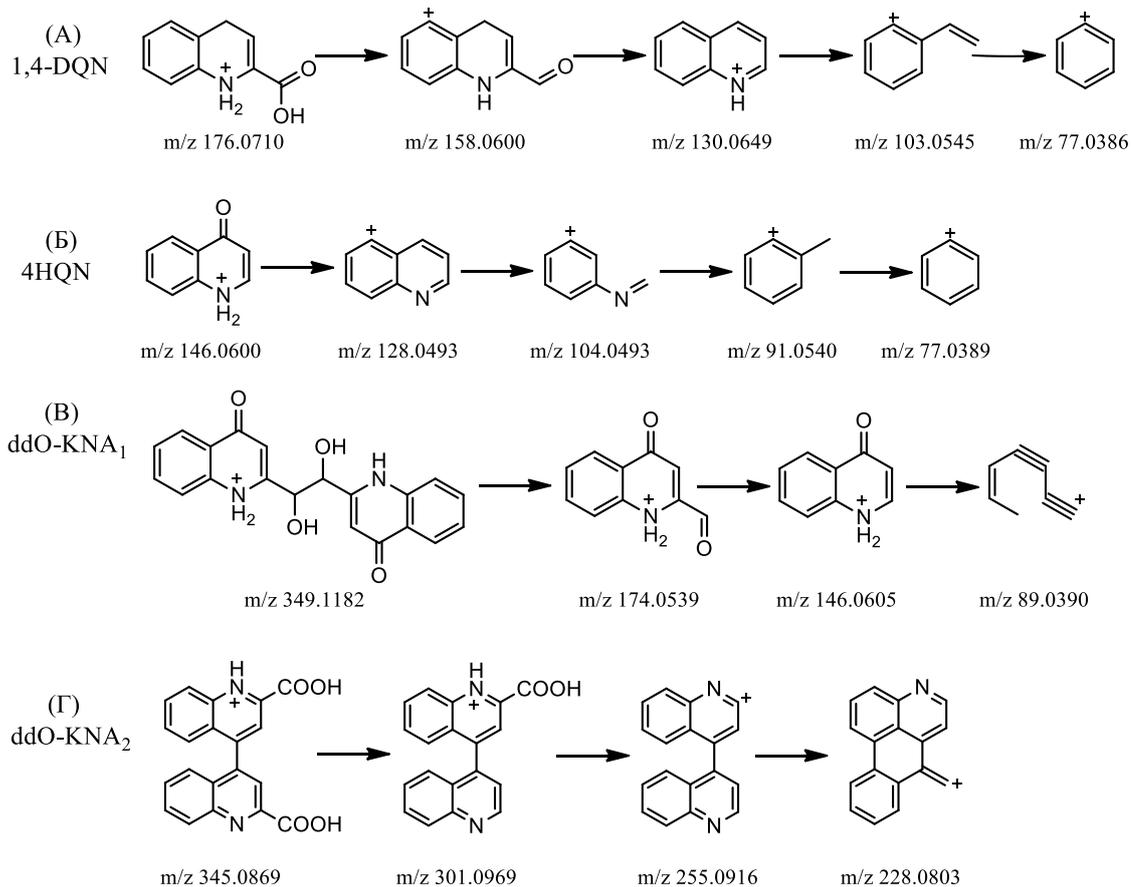


Схема 4.1. Предполагаемые структуры и пути фрагментации для продуктов, полученных при деградации KNA: (А) - 1,4-DHQ, m/z 176.0710; (Б) - 4HQN, m/z 146.0600; (В) - ddO-KNA₁, m/z 349.1182; (Г) - ddO-KNA₂, m/z 345.0869.

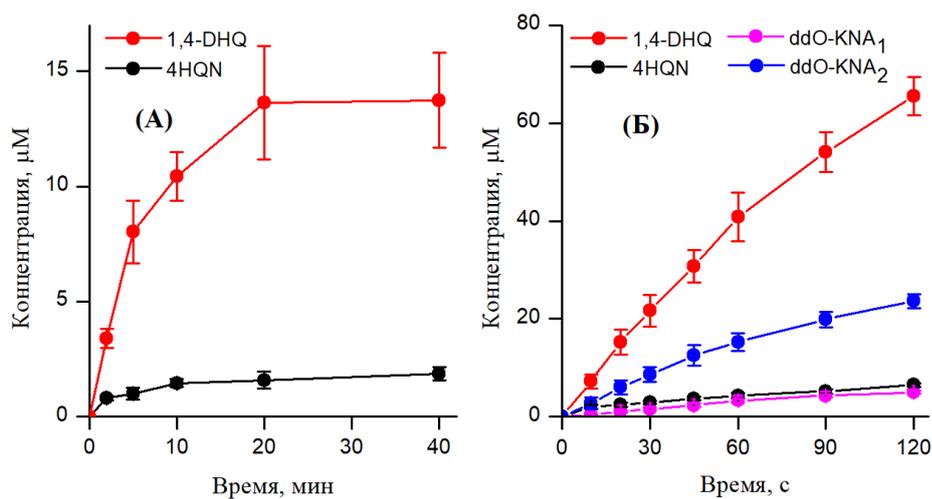


Рис. 4.5. Зависимости концентраций продуктов KNA, образующихся в результате УФ-А фотолиза 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTгрН в PBS, (А) тип Ib (облучение лампой) и (Б) тип Ia (облучение лазером, 355 нм, 3 мДж/импульс). Каждая точка представляет собой среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Все остальные пики на хроматограмме относятся к продуктам фоторазложения аминокислоты триптофан. Продукты с m/z 263.1026 (RT 14.9 мин и RT 15.1 мин) и m/z 279.0973 (RT 16.1 мин и RT 16.8 мин) соответствуют одно- и двукратно окисленным формам NTrp, соответственно. Обе формы элюируются в виде двух отдельных пиков. Структуры продуктов были определены на основании совпадения их спектров оптического поглощения с литературными данными по окисленным формам Trp. Таким образом, однократно окисленным (m/z 263.1026) производным NTrp соответствуют: N-ацетил-оксиндолаланин (NOIA) [208] и N-ацетил-3 α -гидроксипирролоиндол (NHPI) [235-237]. К двукратно окисленным (m/z 279.0973) относятся: N-ацетил-N-формилкинуренин (NNFK) и N-ацетил-3 α -гидропероксипирролоиндол (NHPPi) [235-237] (Рис. 4.6). Продукты окисления NTrpH практически отсутствуют в исходном растворе и их содержание увеличивается в зависимости от времени облучения. В аэробных условиях (атмосфера кислорода) выходы NHPI, NNFK и NHPPi увеличиваются в несколько раз, в то время как NOIA показывает увеличение содержания только на 30%. Графики зависимости концентрации продуктов от времени облучения в атмосфере аргона и кислорода приведены в Приложении 5 (Рис. П7 и П8).

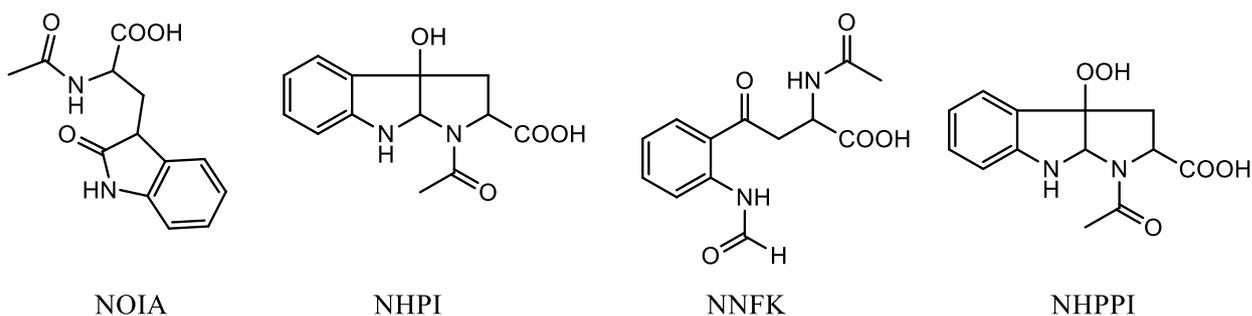


Рис. 4.6. Структуры продуктов окисления NTrpH.

Продукты с m/z 491,1926 представлены на хроматограмме в виде шести пиков с RT 19.0, 20.6, 21.4, 21.8, 21.9 и 22.8 мин (Рис. 4.7 (А)). Эти сигналы следует отнести к димерам NTrp, ковалентно связанным по различным положениям индольного кольца и/или аминокислотного остова. Сравнение МС/МС спектров и спектров оптического поглощения этих соединений (см. Приложение 6 Рис. П9 и П10) показывает образование трех типов димеров NTrp на основании близости их спектров поглощения и МС/МС фрагментации. Таковыми парами можно считать продукты с RT 20.6 и 21.9 мин, 19.0 и 21.4 мин, а также RT 21.8 и 22.8 мин. Возможно, некоторые из этих пар являются диастереоизомерами. На Рис. 4.7 (Б) и 4.8 в качестве примеров приведены спектры оптического поглощения и МС/МС спектры для каждой группы димеров. Полные характеристики (УФ-спектры, МС/МС спектры и химические формулы МС/МС фрагментов) для всех типов димеров NTrp приведены на рисунках Приложения 6 и в Таблице П2 Приложения 7.

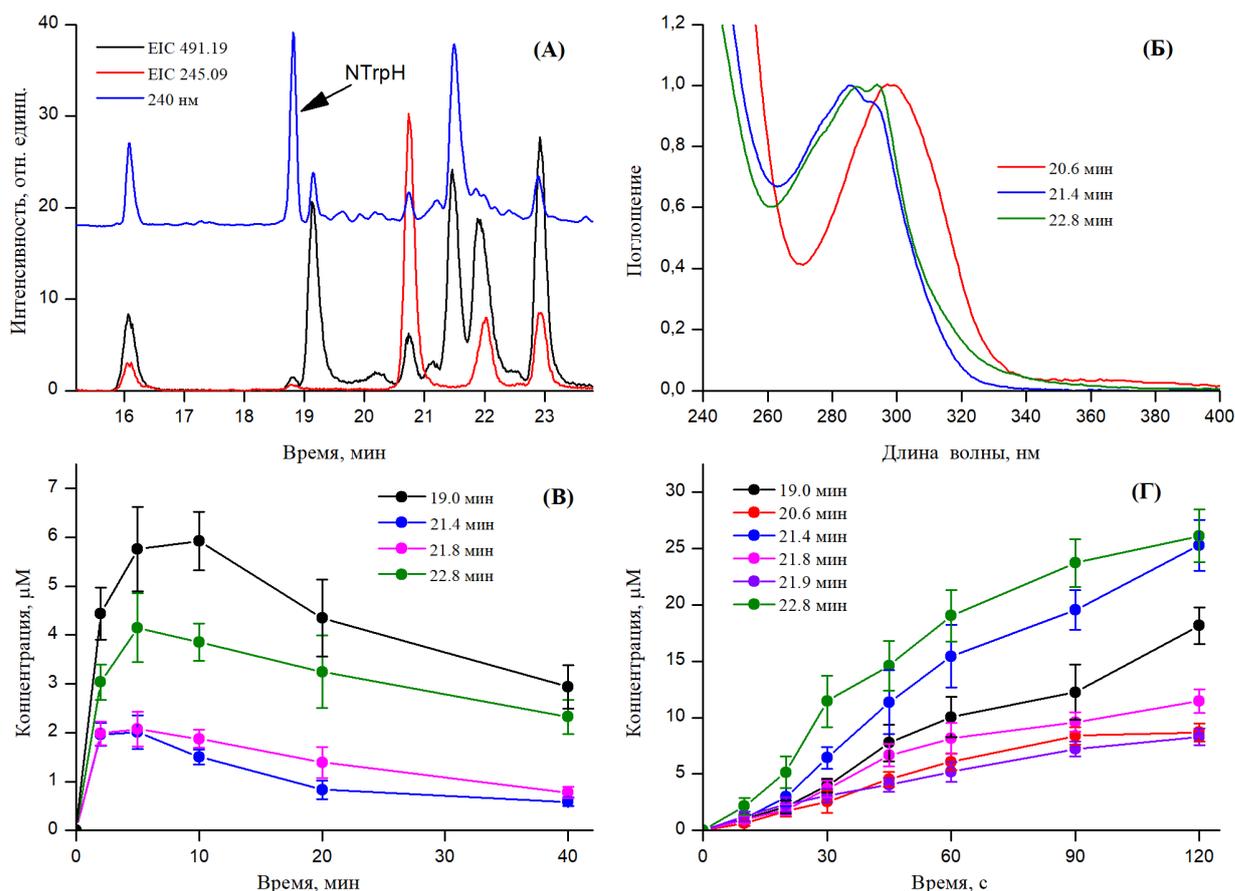


Рис. 4.7. (А) – Хроматограмма оптического поглощения, наблюдаемая на длине волны 240 нм и МС хроматограммы по выделенному иону (EIC) для ионов с m/z 491.1926 и m/z 245.0920 во время анализа методом ВЭЖХ-МС 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTrpH в PBS после 120 секунд анаэробного фотолиза типа Ia. (Б) - Спектры поглощения димеров NTrp (m/z 491.1926) с RT 20.6, 21.4 и 22.8 минут. (В, Г) – Зависимости концентраций димеров NTrp, образующихся при анаэробном УФ-А фотолизе (В) типа Ib и (Г) типа Ia от времени облучения. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

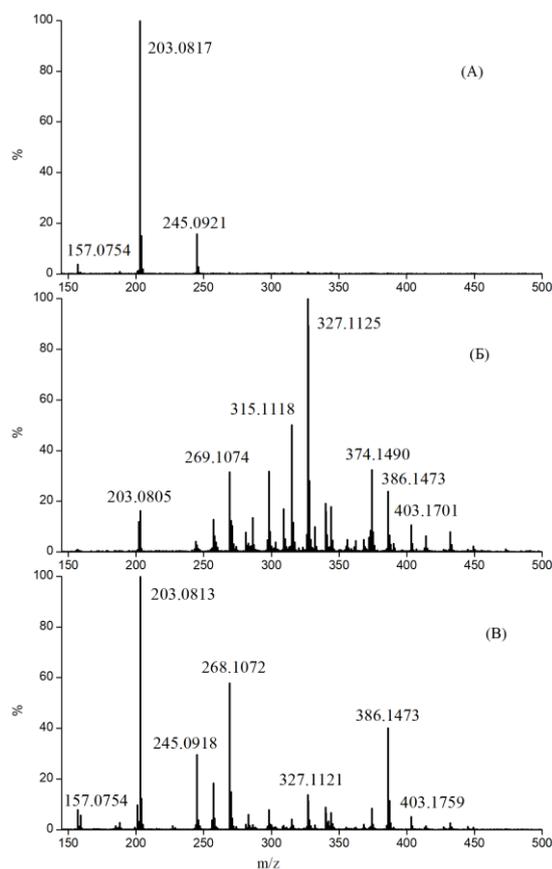


Рис. 4.8. МС/МС спектры ионов, соответствующих димерам NTgr (m/z 491.1025) с RT: (А) – 20.6 мин; (Б) – 21.4 мин; (В) – 22.8 мин.

Кроме того, были обнаружены ионы с m/z 245.0914, время удержания которых совпало с RT для некоторых димеров NTgr (см. Рис. 4.7 (А)). Вероятно, эти сигналы принадлежат фрагментам соответствующих димеров, которые образуются при записи МС спектра, а именно ионам NTgr с потерей двух атомов водорода. Это предположение подтверждается МС/МС спектрами димеров с RT 20.6, 21.8, 21.9 и 22.8 мин, на которых наблюдается интенсивный сигнал с m/z 245.0914 (см. Рис. П9 Приложения 6). Тогда как фрагментация димеров с RT 19.0 и 21.4 мин в основном соответствует фрагментации пептидной связи.

Концентрации димеров NTgr при разных временах облучения оценивали по их поглощению на 280 нм, как описано в главе II (раздел 2.7). На Рис. 4.7 (В) приведены зависимости концентрации димеров от времени облучения. Для некоторых димеров оптическое поглощение было ниже предела чувствительности прибора. Для таких продуктов зависимость их концентрации от дозы УФ-А излучения была определена полуколичественно по интенсивности соответствующего МС сигнала (см. Рис. П11 (А) Приложения 8). При фотолизе типа Ib все димеры NTgr демонстрируют быстрое накопление на начальных этапах фотолиза с монотонным уменьшением содержания в растворе на поздних временах облучения (Рис. 4.7 (В)). Такая зависимость указывает на их участие в последующих фотохимических реакциях, в

том числе в реакциях образования тримеров, тетрамеров и других олигомерных форм. Олигомеры NTGr, кроме димеров, обладают низкими интенсивностями МС сигналов, поэтому провести для них МС/МС анализ не удалось (см. Рис. П12 (В-Г) Приложения 9). Другими путями разложения димеров являются реакции окисления, вклад которых возрастает при переходе к аэробным условиям. МС сигналы от одно- и двукратно окисленных димеров и тримеров NTGr были зарегистрированы, но их интенсивность снова оказалась не достаточной для установления их структуры методом тандемной МС-спектрометрии. В присутствии кислорода наблюдается значительное снижение количества димеров NTGr и увеличение их окисленных производных (см. Рис. П11 (Б) Приложения 8).

Следует отдельно отметить, что все продукты фотореакций практически не поглощают в области излучения, используемом в эксперименте (355-380 нм) (см. Рис. 4.3, Приложение 5 и Рис. П10 Приложения 6). Поэтому даже при длительном облучении KNA остается единственной молекулой, способной поглощать на выбранном диапазоне длин волн. Таким образом, можно утверждать, что вклад от вторичной фотохимии (фотоиндуцированных реакций с участием продуктов фотолиза) минимален.

Аналогичный анализ продуктов был проведен для эксперимента по фотолизу типа Ia растворов KNA с NTGrH (облучение лазером, 355 нм, энергия ~3 мДж/импульс, частота 10 Гц). Основное различие фотолиза типа Ia от типа Ib заключалось в значительном увеличении выхода димерных форм аминокислоты (Рис. 4.7 (Г)) и снижении количества окисленных продуктов (Приложение 5). В частности, в данном эксперименте были обнаружены только два продукта окисления NTGr - NHPI и NNFК, количество которых увеличивалось с дозой облучения (Приложение 5). Кроме того, был обнаружен ещё один димер NTGr (m/z 491.1926) с RT 16.0 мин.

Следует отметить образование двух новых продуктов распада KNA с RT 16.1 мин (m/z 349.1182) и RT 21.5 мин (m/z 345.0869), которые были отнесены к димерам дезоксигенированной KNA (ddO-KNA) 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 Рис. 4.3 показаны спектры оптического поглощения этих продуктов. На спектре для ddO-KNA₁ наблюдается два пика с максимумами поглощения на 316 и 329 нм, что очень хорошо согласуется со спектром для 4HQН, а для ddO-KNA₂ только одна широкая полоса поглощения с максимумом на 310 нм. Так же, как и в случае некоторых димеров NTGr, ddO-KNA₁ подвергается частичной фрагментации при записи МС спектров с образованием иона с m/z 175.0631. Это указывает на нестабильность связи между мономерными фрагментами в этом соединении. На Рис. 4.4 (В) и (Г) представлены МС/МС спектры ионов с m/z 349.1182 и m/z 345.0869, на схеме 4.1 показаны предполагаемые структуры димеров и пути их фрагментации.

Полученные данные указывают на то, что образование димеров KNA происходит с потерей атома кислорода карбонильной или карбоксильной групп и димеризацией двух идентичных молекул с образованием связи через дезоксигенированные карбоксильные группы или через C4 атомы углерода. Подобно другим продуктам, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ отсутствуют в образцах до облучения, а их содержание монотонно увеличивается с дозой УФ-А излучения (Рис. 4.5 (Б)). Можно предполагать, что образование ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ происходит через комбинацию двух радикалов KNA[•], которые уже потеряли атомы кислорода.

Ещё одним продуктом, образованным при фотолизе типа Ia раствора KNA с NTrpH, является ковалентно связанный продукт KNA-NTrp (m/z 434.1349). Продукт элюируется в виде нескольких пиков, что говорит об образовании ковалентных связей по различным положениям ароматического кольца как в структуре KNA, так и в аминокислоте (см. Рис. П12 (А) Приложения 9). Структуры этих продуктов не были определены из-за низкой интенсивности сигнала.

Контрольные эксперименты по фотолизу типа Ib, (а) KNA с NTrpH без УФ-А света (в полной темноте) и (б) УФ-А фотолиз KNA без NTrpH в анаэробных условиях, показали, что все описанные выше продукты образуются только при фотоиндуцированных реакциях KNA с аминокислотой (см. Рис. П13 Приложения 10). Стоит отметить, что при анализе контрольных образцов методами ВЭЖХ с оптическим (на 240 нм) и МС детектированием были обнаружены: в случае (а) контрольных экспериментов незначительные количества NNFK и NHPPI и в случае (б) контрольных экспериментов многочисленные продукты разложения KNA, которые не наблюдали в вышеописанных экспериментах, включая окисленные формы KNA.

4.4. Механизмы реакций фотовозбужденной KNA с NTrpH

Основываясь на результатах, полученных в настоящей работе, можно сделать вывод, что фотолиз KNA с NTrpH зависит от соотношения концентрации радикалов и молекулярного кислорода в растворе. Если концентрация радикалов превышает концентрацию кислорода, то фотолиз протекает посредством прямых реакций между образующимися радикалами KNA и Trp (тип Ia), а в обратном случае происходит быстрое окисление радикала KNA кислородом с образованием супероксид-радикала, и дальнейшие реакции происходят между радикалами Trp и O₂^{•-} (Тип Ib).

В атмосфере аргона концентрация кислорода в растворе не превышает 5-10 мкМ. Оценка сделана с учётом времени жизни триплетного состояния ¹KNA ($\tau \approx 30-40$ мкс [12,152]) при облучении лазером, когда основным тушителем ¹KNA является кислород с константой скорости, определенной в главе III ($2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Поэтому при анаэробном фотолизе типа Ia концентрация O₂ значительно ниже концентрации NTrpH (1-5.5 мМ) и сопоставима с

концентрацией радикалов, образованных в фотохимических реакциях, 5-30 мкМ, в зависимости от энергии лазерного импульса. В таких условиях единственным тушителем ^1KNA является аминокислота NTrpH. Реакция 4.2 протекает по механизму переноса электрона от аминокислоты к ^1KNA и быстрым депротонированием катион-радикала NTrpH^+ по реакции 4.3 с образованием нейтрального радикала NTrp^\bullet . Последующие реакции радикалов 4.9-4.10 и 4.13-4.14 приводят к образованию продуктов.

Как видно из Таблицы 4.1, квантовые выходы разложения исходных веществ при фотолизе типа Ia ($5.7 \pm 1.1\%$ для KNA и $19.0 \pm 3.8\%$ для NTrpH) значительно ниже квантового выхода триплетного состояния ^1KNA ($\Phi_T \approx 80\%$ [12]). Это указывает на то, что основным путем гибели радикалов является обратный перенос электрона с восстановлением исходных соединений (реакция 4.10). Основными продуктами реакций 4.9 являются продукты ковалентного связывания KNA-NTrp, а также продукты фоторазложения KNA с потерей атома кислорода на карбонильной или карбоксильной группе (1,4-DHQ, 4HQ, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂). Димеры NTrp образуются по реакции 4.14.

Реакция 4.4, по которой происходит окисление KNA^- молекулярным кислородом с образованием основного состояния KNA, конкурирует с реакциями 4.9-4.10 и 4.13. Следовательно, увеличение энергии лазера и, соответственно, увеличение концентрации радикалов должно приводить к уменьшению отношения $\Phi_{\text{дег}}(\text{NTrpH})/\Phi_{\text{дег}}(\text{KNA})$. Однако, контрольный эксперимент показал, что увеличение энергии лазерного импульса с 3 мДж до 10 мДж не приводит к изменению соотношения квантовых выходов разложения (данные не приведены). Таким образом, $\Phi_{\text{дег}}(\text{NTrpH})/\Phi_{\text{дег}}(\text{KNA}) \approx 3$ не может быть объяснено участием только молекулярного кислорода.

Кроме того, димеры KNA не были обнаружены. Это говорит о том, что реакция 4.13 протекает со значительно меньшей константой скорости, чем реакция 4.14. Следовательно, можно предположить, что сразу после лазерного импульса концентрация радикалов выше, чем концентрация O_2 , и большинство радикалов NTrp^\bullet гибнет в реакциях 4.9-4.10 и 4.14, что приводит к образованию димеров аминокислоты как основных продуктов фотохимических реакций. Оставшиеся радикалы KNA^- вступают в реакцию 4.4 и восстанавливаются до KNA. Таким образом, низкая константа скорости реакции 4.13 и восстановление KNA молекулярным кислородом объясняет отношение квантовых выходов разложения реагентов ($\Phi_{\text{дег}}(\text{NTrpH})/\Phi_{\text{дег}}(\text{KNA}) \approx 3$).

При фотолизе типа Ib в анаэробных условиях концентрация образующихся радикалов значительно ниже концентрации остаточного O_2 , и реакция 4.4 становится основным путём гибели KNA^- . Это объясняет низкие значения квантового выхода разложения KNA при анаэробном фотолизе с использованием в качестве источника излучения ртутной лампы (см.

Таблицу 4.1). Супероксид $O_2^{\cdot-}$, образованный в реакции 4.4, способен реагировать с радикалами Trp^{\cdot} с константой скорости $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [229]. Эта реакция может приводить к образованию окисленной (реакция 4.11) или восстановленной форм $NTrp$ через перенос электрона (реакция 4.12).

В работе Fang и соавторов [229] был сделан вывод о том, что $O_2^{\cdot-}$ и Trp^{\cdot} в основном реагируют по реакции 4.11, хотя термодинамика процесса говорит в пользу реакции переноса электрона (4.12). Этот вывод был сделан из анализа продуктов радиолиза метилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана в аэробных условиях. Однако, существенный вклад реакции обратного переноса электрона (4.12) при восстановлении триптофана в условиях аэробного фотолиза был отмечен в работе Thomas и соавторов [227]. Результаты настоящей работы показывают, что, несмотря на высокую эффективность образования $O_2^{\cdot-}$ при анаэробных условиях, квантовый выход разложения $NTrpH$ составляет всего 1.6% (Таблица 4.1). Следовательно, реакция 4.12 является основным путём взаимодействия между $O_2^{\cdot-}$ и $NTrp^{\cdot}$, тогда как вклад от реакции 4.11 в фоторазложение аминокислоты крайне мал. В настоящее время механизм реакции между $O_2^{\cdot-}$ и радикалом аминокислоты остается неизвестным и требует дальнейших исследований. Результаты фотохимических работ хорошо согласуются между собой, указывая на то, что основным каналом гибели радикалов является их восстановление до исходных реагентов.

Таким образом, присутствие небольших количеств O_2 в растворе при фотолизе типа *Ib* значительно снижает разложение исходных соединений: молекулярный кислород выступает в роли эффективного переносчика электрона от $KNA^{\cdot-}$ на $NTrp^{\cdot}$ (реакции 4.4 и 4.15). Однако при анаэробном фотолизе типа *Ib* окисление $NTrpH$ происходит именно по реакции 4.11; эта реакция считается одним из основных путей окисления триптофана *in vitro* и *in vivo* [77,238]. Следует отметить, что окисление $NTrpH$ также может происходить в реакциях радикала $NTrp^{\cdot}$ с кислородом в основном состоянии (реакция 4.5). Однако, вклад этой реакции в окисление $NTrpH$ в анаэробных условиях, скорее всего, очень мал из-за низкой константы скорости $<10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [228,229].

Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают, что образование 1O_2 (реакция 4.15) не играет существенной роли при анаэробном фотолизе. Этот факт был подтвержден двумя контрольным экспериментами, описанными выше. Во-первых, замена H_2O на D_2O не влияет на $\Phi_{\text{дегр}}(NTrpH)$ в анаэробных условиях (Таблица 4.1, Рис. П5 Приложения 4), хотя время жизни 1O_2 увеличивается с 4 мкс до 64 мкс. Во-вторых, скорость разложения $NTrpH$ в атмосфере аргона не изменяется при изменении концентрации $NTrpH$ от 0.3 до 3 мМ (Рис. П6 Приложения 4), хотя концентрация образующегося 1O_2 уменьшается на порядок. При переходе к аэробным условиям концентрация кислорода становится сравнимой с концентрацией $NTrpH$ (в атмосфере воздуха и кислорода концентрация O_2 в водном растворе составляет 0.3 мМ и 1.4

мМ, соответственно). Поскольку константы скорости реакций 4.2 и 4.15 имеют близкие значения $2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, соответственно (см. главу III), то в аэробных условиях можно ожидать высокий выход $^1\text{O}_2$ по реакции 4.15. Как было показано в этой работе, в аэробных условиях скорость фоторазложения аминокислоты увеличивается в D_2O (Таблица 4.1). Таким образом, образование $^1\text{O}_2$ играет важную роль в фотоокислении NTGrH в аэробных условиях (реакции 4.15-4.16). Константа скорости реакции 4.16 между $^1\text{O}_2$ и Trp ($\sim 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [77,230]) является относительно низкой, но в отсутствие других возможных путей она становится одним из основных каналов гибели $^1\text{O}_2$.

Стоит отметить, что фоторазложение NTGrH в атмосфере воздуха происходит значительно быстрее, чем в атмосфере кислорода (Рис. 4.2 (А) и Таблица 4.1). Вероятно, этот эффект может быть объяснен тем, что в атмосфере кислорода концентрация O_2 в растворе выше, чем концентрация аминокислоты, и образование радикалов по реакции 4.2 в значительной степени подавляется реакцией 4.15. Таким образом, происходит уменьшение количества радикалов NTGr $^{\bullet}$ и $\text{O}_2^{\bullet-}$, что способствует уменьшению восстановления аминокислоты по реакции 4.12. Следовательно, как $^1\text{O}_2$, так и $\text{O}_2^{\bullet-}$ вносят значительный вклад в фотоокисление NTGrH в аэробных условиях.

Реакция между двумя радикалами NTGr $^{\bullet}$ приводит к образованию димеров NTGr (реакция 4.14). Имеется ограниченное количество работ, в которых сообщается о наблюдении димеров триптофана, образованных по радикальным реакциям [87,239,240], а также о ковалентных связях в пептидах [87,241] и белках [148,149]. МС/МС фрагментация как димеров Trp [239], так и ковалентно связанных пептидов [148,149,241] приводит к формированию незаряженного немодифицированного Trp и положительно заряженного Trp(-2H) с потерей двух протонов. Эти фрагменты образуются в результате разрыва связи между двумя Trp с переносом атома Н от одного к другому. В работе Medinas и соавторов [148] было высказано предположение, что наиболее вероятно ковалентная связь между остатками Trp в белках образуется между атомами C3 и N1. Домингес и соавторы [239] предположили, что связь между Trp в димерах может образовываться в положениях C2, C4, C5 и C7 индольных колец. В экспериментах, выполненных в рамках настоящего исследования, наблюдались по меньшей мере семь различных структур димеров NTGr, разделенных с помощью обратно-фазовой хроматографии (некоторые из них, вероятно, являются диастереоизомерами). Полученные данные указывают на то, что некоторые димерные структуры, вероятно, «менее стабильны», чем другие: при мягкой ионизации электро-спреем они подвергаются фрагментации с образованием иона с m/z 245.0920. Это предположение подтверждается динамикой накопления димеров NTGr (Рис. 4.7 (В) и (Г)): димеры, подвергающиеся фрагментации во время записи МС спектра (RT 20.6, 21.8 и 21.9 мин), содержатся в растворе в меньших количествах, чем «более стабильные» димеры (RT

19.0, 21.4 и 22.8 мин). Характерной особенностью «менее стабильных» димеров является смещение их полосы поглощения в красную область (Рис. 4.7 (Б) и Рис. П10 Приложения б).

Количество образовавшихся продуктов определяли по их поглощению, зарегистрированному с помощью ВЭЖХ (подробности см. в главе II раздел 2.7). На основании этих данных можно оценить вклад различных реакций в общее фоторазложение KNA и NTpH. В анаэробных условиях количество разложившейся KNA (Рис. 4.2 (Б) и (В)) приблизительно совпадает с количеством образующихся продуктов распада KNA (Рис. 4.5 (А) и (Б)) для обоих типов фотолизисов (Ia и Ib). Окисленные формы NTpH составляют приблизительно 10% и 20% от общего количества разложившегося NTpH на поздних стадиях фотолизисов типа Ia и Ib, соответственно (Рис. 4.2 (А) и (В), Рис. П7 и П8 Приложения 5). Уменьшение количества окисленных форм NTpH при облучении лазером, вероятно, вызвано снижением вклада реакции 4.4 в общую схему реакций из-за высоких концентраций образующихся радикалов и доминировании реакций 4.9-4.10 и 4.13-4.14. При аэробном фотолизисе на лампе (смесь тип I и II) окисленные формы NTpH составляют 90% продуктов фоторазложения NTpH (Рис. 4.2 (А), Рис. П7 и П8 Приложения 5); это подтверждает предложенный механизм деградации NTpH в реакциях с супероксидом и синглетным кислородом, реакции 4.11 и 4.16, соответственно. Вклад димеров NTpH в продукты разложения NTpH следует оценивать на ранних стадиях фотолиза из-за их быстрой деградации, особенно в случае облучения лампой (Рис. 4.7 (В)). В обоих типах фотолизисов (Ia и Ib) в анаэробных условиях общая концентрация димеров NTpH составляет ~50% от разложившегося NTpH (Рис. 4.2 (А) и (В), Рис. 4.7 (В) и (Г)). Таким образом, димеризацию триптофана следует рассматривать как основной путь УФ-А фотолиза триптофана в анаэробных условиях в присутствии KNA. Учитывая высокую константу скорости реакции 4.14 ($(4-8) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [87,229,238]), можно ожидать, что димеры TpH являются основными продуктами радикальных реакций как *in vitro*, так и *in vivo*.

На схеме 4.2 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 TpH посредством переноса электрона, включая KN и его производные [74,194]. Хотя химическая природа фотосенсибилизатора может оказывать сильное влияние на константы скорости и общую эффективность реакций, принципиальная схема не должна меняться. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что молекулярные УФ-фильтры могут участвовать в радикальных реакциях в тканях хрусталика глаза, приводя к ковалентному связыванию (кросс-сшивкам) белков, хотя и с небольшими выходами. С возрастом, накопление этих кросс-сшитых белков может давать значительный вклад в общие возрастные изменения кристаллинов, ведущие к катарактогенезу.

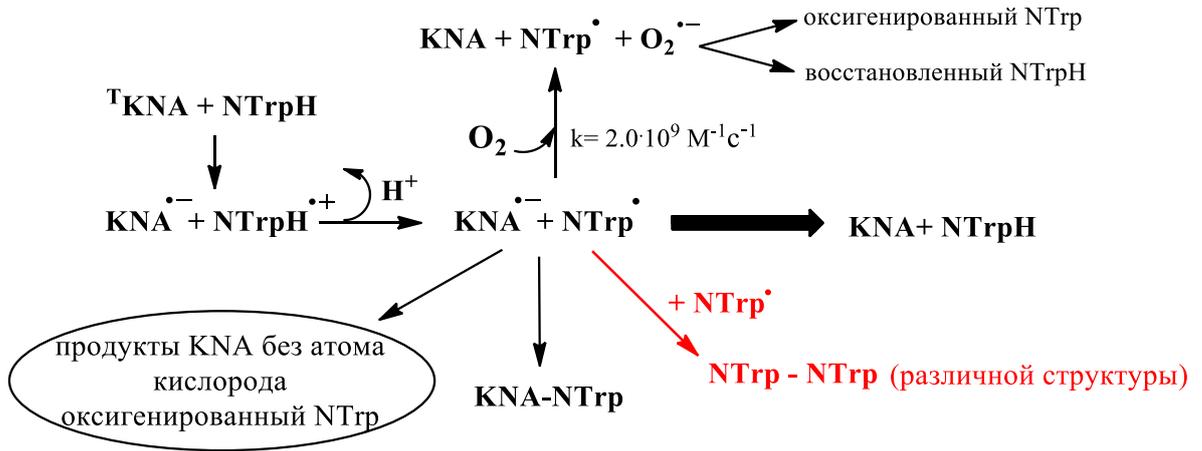


Схема 4.2. Продукты фотоиндуцированных реакций между ${}^1\text{KNA}$ и Trp.

Ковалентное связывание хромофоров хрусталика глаза с кристаллинами нарушает их четвертичную структуру [242,243] и повышает их фотохимическую активность [84,95]. Концентрации KN, связанных с кристаллинами, увеличиваются с возрастом [112]. Наблюдаемое УФ-индуцированное образование продуктов KNA-NTrp (Рис. П12 Приложения 9) также может способствовать этим модификациям. Количество KNA-NTrp можно приблизительно оценить путем сравнения сигналов MS для димеров NTrp и KNA-NTrp (Рис. П12 Приложения 9), предполагая близкую эффективность ионизации этих молекул. Эти оценки дают количество KNA-NTrp на три порядка ниже, чем димеров NTrp: 30-50 нМ и 15-25 мкМ для KNA-NTrp и димеров NTrp, соответственно, после 120 секунд фотолиза тип Ia (355 нм, 3мД/импульс). Принимая во внимание небольшие количества KNA в хрусталике человеческого глаза [13] и незначительные выходы KNA-NTrp, можно сделать предположение, что ковалентное связывание KNA с кристаллинами *in vivo* будет давать незначительный вклад в общее количество ПТМ белков хрусталика.

Заключение по материалам главы IV

На основании полученных результатов была установлена схема реакций, протекающих между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и $\text{NTrpH}^{\cdot+}$, образующимися под действием УФ-А излучения. Впервые были установлены механизмы реакций, показана роль остаточного кислорода в фотохимических реакциях типа I и проведена полная характеристика основных продуктов реакций. Опираясь на полученные результаты (глава IV), можно ожидать, что в ткани хрусталика при высоких концентрациях белков (до 300 мг / мл [1]) и незначительном присутствии O_2 (не более 2 мкМ [39]) образование ${}^1\text{O}_2$ *in vivo* в реакциях с фотовозбужденной KNA или с другими УФ-А хромофорами крайне маловероятно. Большинство триплетных состояний ${}^1\text{KNA}$ реагирует с аминокислотными остатками кристаллинов (в частности, с

остатками Trp), что приводит к образованию радикалов Trp[•] на белке и радикалов KNA^{•-} в клетках ткани. Реакция KNA^{•-} с остаточным молекулярным кислородом приводит к образованию супероксида O₂^{•-}, который может вступать в реакции окисления с радикалами Trp[•], тогда как реакция рекомбинации двух радикалов Trp[•] приводит к образованию ковалентных связей в структуре белка. Интересно, что присутствие в растворе даже следовых количеств кислорода приводит к окислению KNA^{•-} с образованием основного состояния KNA по реакции 4.4. Таким образом, под действием УФ-А излучения KNA способна сенсibilизировать образование радикалов на полипептидной цепи белков хрусталика, не подвергаясь фоторазложению.

Квантовые выходы продуктов окисления и димеризации Trp в анаэробных условиях относительно невелики, но длительное накопление таких модификаций может давать значительный вклад в общую модификацию белков хрусталика. Стоит отметить, что условия поставленных модельных экспериментов отличаются от естественных условий в хрусталике: концентрация остатков Trp в хрусталике намного выше, чем концентрация NTrpH в исследованиях, описанных в глава IV; диффузия ограничена высоким содержанием белка; в хрусталике присутствуют антиоксиданты в милли-молярных концентрациях [163], способные ингибировать нежелательные фотохимические реакции [152]. Таким образом, можно ожидать, что в хрусталике глаза квантовые выходы продуктов окисления и димеризации Trp будут значительно ниже значений, полученных в настоящей работе. Однако, ключевые этапы фотодегградации NTrpH, выявленные в работе, – фотоиндуцированное образование радикалов Trp[•] и O₂^{•-} в присутствии даже незначительного количества O₂ – скорее всего, играют важную роль в ПТМ кристаллинов.

ГЛАВА V ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА В РЕЗУЛЬТАТЕ УФ-А ФОТОЛИЗА ТИПА I В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

В клетках хрусталика глаза, содержащих высокие концентрации белков [1] и следовые количества кислорода [39], можно ожидать, что реакции фотовозбуждённых кинуренинов (триплетные состояния) с кристаллинами протекают по реакциям типа I, а именно между фотоиндуцированными радикалами без участия синглетного кислорода. Соотношение концентрации радикалов и кислорода оказывает непосредственное влияние на характер повреждения белков. К основным путям модификации относятся прямые реакции между образовавшимися радикалами KNA^{\bullet} и $\text{Trp}^{\bullet}/\text{Tyr}^{\bullet}$ (тип Ia) и реакции супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$ с радикалами аминокислот/ белка (тип Ib) (см. Главу IV). Константы скорости реакций типа Ia и Ib составляют величины $(1 \div 3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (глава IV, [229,244]), то есть они являются конкурирующими. Учитывая, что хрусталик является обескислороженной тканью, можно предположить, что реакции по типу Ia будут вносить основной вклад в повреждение белков. Однако, в естественных условиях (под действием солнечного излучения) можно ожидать, что концентрации образующихся радикалов существенно меньше концентрации остаточного кислорода в ткани. Кроме того, молекула кислорода благодаря своему малому размеру обладает значительно более высокой подвижностью в ткани, чем большинство молекул с невысокой молекулярной массой и белки. Следовательно, реакции по типу Ib могут также вносить заметный вклад в модификацию кристаллинов.

Повреждение белков может также происходить в реакциях рекомбинации $\text{Trp}^{\bullet}/\text{Tyr}^{\bullet}$ радикалов с образованием димеров различной структуры. Эти реакции протекают с константами скорости $(2 \div 6) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [87,229,244] и приводят к формированию прочных ковалентных связей между аминокислотными остатками в белках.

Строение молекул белка и взаимное влияние аминокислотных остатков может оказывать существенное влияние на механизм фотохимических реакций. Настоящая глава направлена на изучение того, как белковое окружение может влиять на механизмы радикальных реакций между KNA и триптофаном, на примере взаимодействия KNA с лизоцимом белка куриных яиц (HEWL). Основная цель исследования - сравнить повреждение HEWL при двух режимах фотолиза – (а) прямых реакций фотосенсибилизированных радикалов KNA и белка (тип Ia) и (б) реакций между супероксидом и радикалами белка (тип Ib). Сравнение будет проводиться с точки зрения деградации белка и накопления продуктов, образующихся под действием света.

5.1. УФ-А фотолиз KNA и HEWL

Реакция тушения возбужденного состояния ${}^1\text{KNA}$ белком HEWL (реакция 5.1) протекает с высокой константой скорости $(7.7 \pm 1.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ с образованием анион радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ и катион радикала остатка $\text{Trp}^{\cdot+}$, который по реакции 5.2 быстро переходит в нейтральный радикал (см. главу III). Предполагая, что механизм реакций с белком будет близок к механизму с одиночной аминокислотой, установленному в главе IV, ниже представлены основные реакции, которые могут протекать в результате фотолизом по типу Ia и Ib, в зависимости от соотношения концентраций радикалов и молекулярного кислорода в растворе:



Фотолиз 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL в растворе PBS pH 7.4 проводили в анаэробных условиях (в атмосфере аргона). В таких условиях концентрация кислорода в растворе составляет 5-10 мкМ (см. главу IV), что достаточно близко к физиологическим условиям в хрусталике (2 мкМ [39]). Концентрацию радикалов варьировали с использованием различных источников света: импульсного (лазер) и непрерывного излучения (лампа). Использование импульсного источника (лазер, $\lambda=355 \text{ нм}$, 3 мДж/импульс, 10 Гц, площадь поперечного сечения лазерного пучка 0.5 см^2) позволяет создать высокие концентрации радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и HEWL^{\cdot} на уровне 30 - 40 мкМ. В этом случае будут доминировать прямые реакции между радикалами (тип Ia, реакции 5.4). В случае источника непрерывного излучения (ртутная лампа, $\lambda=355\text{-}380 \text{ нм}$, 0.1 Дж/см^2 , площадь поперечного сечения излучения лампы 0.7 см^2), концентрации радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и HEWL^{\cdot} в объеме будут менее 0.1 мкМ. В таких условиях эффективно образуется супероксид $\text{O}_2^{\cdot-}$ (реакция 5.3), что приводит к протеканию реакций 5.8 и 5.9 (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

слишком мал по сравнению с типом Ia. Пробы образцов отбирали до и в процессе обоих типов фотолизисов и затем анализировали различными методами.

5.2. Ферментативная активность HEWL после УФ-А фотолиза

Поскольку лизоцим относится к ферментам класса гидролаз и способен разрушать клеточные стенки бактерий гидролизом пептидогликана, в работе было проведено исследование влияния фотоповреждения белка на его ферментативную активность по отношению к клеточной культуре *M. lysodeikticus*. На Рис. 5.1 показана ферментативная активность HEWL 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 (конечная концентрация 0.5-3 мкг/мл) 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 значительно ниже, чем в случае фотолиза типа Ib. Следовательно, прямые реакции между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и HEWL^{\cdot} приводят к большему повреждению белка, чем реакции между супероксидом $\text{O}_2^{\cdot-}$ и HEWL^{\cdot} . Следует отметить, что присутствие KNA в растворе не оказывает влияние на ферментативную активность HEWL как до, так и после фотолиза (данные не приведены).

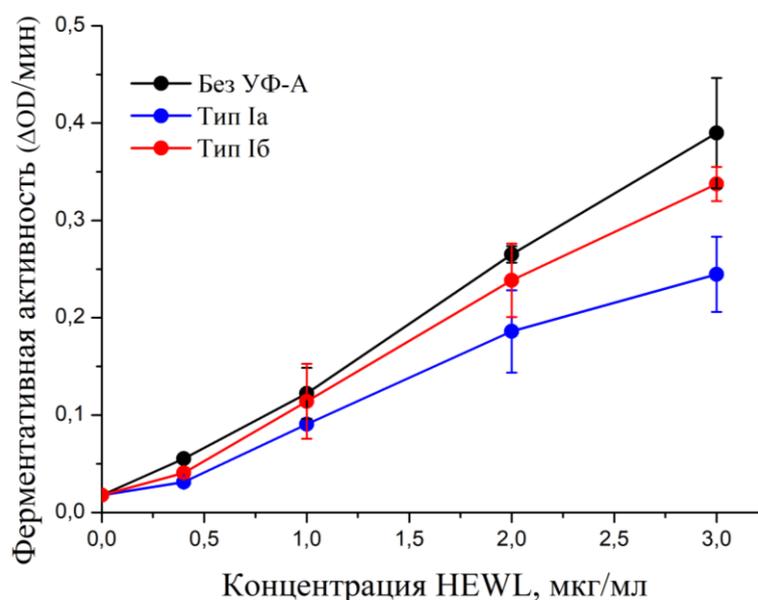


Рис. 5.1. Ферментативная активность HEWL до (черные кружки) и после фотолиза типа Ia (синие кружки) и типа Ib (красные кружки). Уменьшение светорассеяния суспензии клеток *M. lysodeikticus* на 450 нм контролировали в 50 мМ PBS (pH 6.2), содержащем различные концентрации HEWL. Активность выражается как скорость изменения поглощения в минуту.

5.3. Электрофоретический анализ ковалентных сшивок HEWL после УФ-А фотолиза

На Рис. 5.2 представлены результаты электрофоретического анализа (15% ПАА-гели с SDS) HEWL после фотолизиров типа Ia и Ib. Дорожка Stand соответствует смеси белковых стандартов («Thermo Fisher Scientific»), необходимых для определения приблизительных молекулярных масс белков. Дорожки 2-7 на гелях содержат пробы образцов, отобранные во время фотолиза, и соответствуют различному количеству поглощенных квантов света: 1.41 Дж/минуту в случае фотолиза типа Ia и 1.47 Дж/минуту в случае фотолиза типа Ib. На дорожках 2 (Рис. 5.2 (А) и (Б)) наблюдается полоса с $M \sim 12$ кДа, соответствующая белку до облучения. Отличие наблюдаемой массы белка на гелях от теоретической ($M \sim 14.3$ кДа, исходя из его аминокислотной последовательности), вероятно, связано с его неполной денатурацией под действием SDS. Белок остается в более компактной форме и движется в геле с большей скоростью. Подобное поведение описано в литературе для лизоцима [245] и некоторых других белков [246]. Можно видеть, что в обоих случаях наблюдается формирование полос, соответствующих олигомерным (димерным и тримерным) формам белка, интенсивность которых увеличивается с увеличением дозы облучения. Образование димеров и тримеров HEWL значительно более выражено в случае фотолиза типа Ia по сравнению с типом Ib.

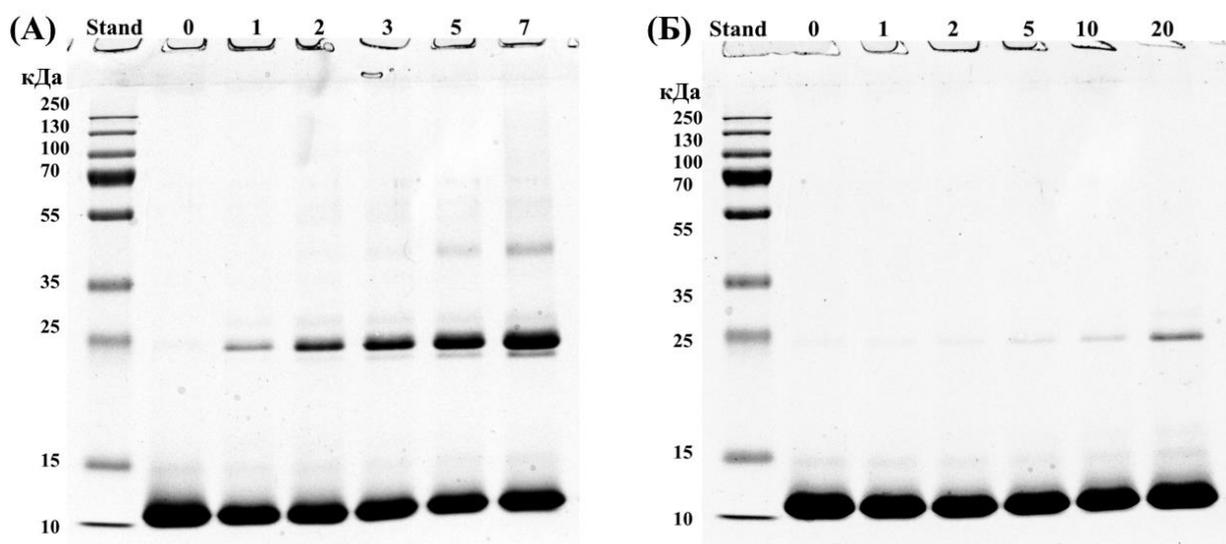


Рис. 5.2. 15%-SDS-ПАА гели, содержащие образцы, отобранные во время УФ-А фотолизиров типа Ia (А) и типа Ib (Б) растворов, содержащих 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4). Дорожки Stand – смесь стандартов для определения размера белка, дорожки 2-7 – содержат пробы образцов с различными дозами облучения, указанными в верхней части гелей (минуты фотолиза). После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Денситометрический анализ проводили на гелях, содержащих меньшие количества белка на дорожку (Рис. П14 Приложения П11) с целью получения корректных значений поглощения различных форм белка (на Рис. 5.2 количество мономерных форм находится вне линейного диапазона зависимости поглощения от количества белка). Содержание белков было определено путем интегрирования интенсивности соответствующих полос. Относительные содержания димеров HEWL составляли $27 \pm 4\%$ и $7 \pm 2\%$ после фотолизов типа Ia (10 Дж) и типа Ib (30 Дж), соответственно. Полученные значения относительного содержания димеров соответствуют квантовым выходам димеризации ($\Phi_{\text{димер}}$) $0.82 \pm 0.12\%$ и $0.074 \pm 0.021\%$ для типов Ia и Ib, соответственно. Зависимости концентраций мономерной и димерной форм белка от количества поглощённой энергии во время обоих типов фотолиза представлены на Рис. П15 (Приложение 11).

Контрольные эксперименты по фотолизу растворов: KNA с HEWL без УФ-А света (в полной темноте) и HEWL без KNA в анаэробных условиях под действием УФ-А излучения показали, что олигомерные формы лизоцима образуются только при фотоиндуцированных реакциях с KNA (Рис. П16 Приложения 11). В аминокислотной последовательности HEWL содержится 8 остатков Cys, связанных между собой четырьмя внутримолекулярными дисульфидными мостами (-S-S-). Во время фотолиза можно ожидать разрыва внутримолекулярных -S-S- связей с образованием межмолекулярных связей, что будет давать вклад в образование димерных структур белка. В работе было установлено, что межмолекулярные -S-S- связи дают незначительный вклад в общее содержание олигомеров HEWL, поскольку полосы на гелях, соответствующие димерам, в восстанавливающих (с добавлением β -меркаптоэтанола) и невосстанавливающих (без β -меркаптоэтанола) условиях имеют одинаковую интенсивность. Следовательно, мономеры в димерах в основном соединены ковалентными связями, отличными от дисульфидных связей (-S-S-) (Рис. П16 Приложения 11).

5.4. Спектры поглощения и флуоресценции HEWL после фотолиза

Спектры были записаны для белков, очищенных от молекул с низкими молекулярными массами (KNA и продукты её распада), до и после УФ-А фотолиза типа Ia и Ib. На нормализованных спектрах оптического поглощения (Рис. 5.3 (А)) наблюдается формирование новой полосы поглощения с максимумом на 335 нм после обоих типов фотолиза. Это указывает на образование продуктов радикальных реакций, поглощающих в УФ-А диапазоне.

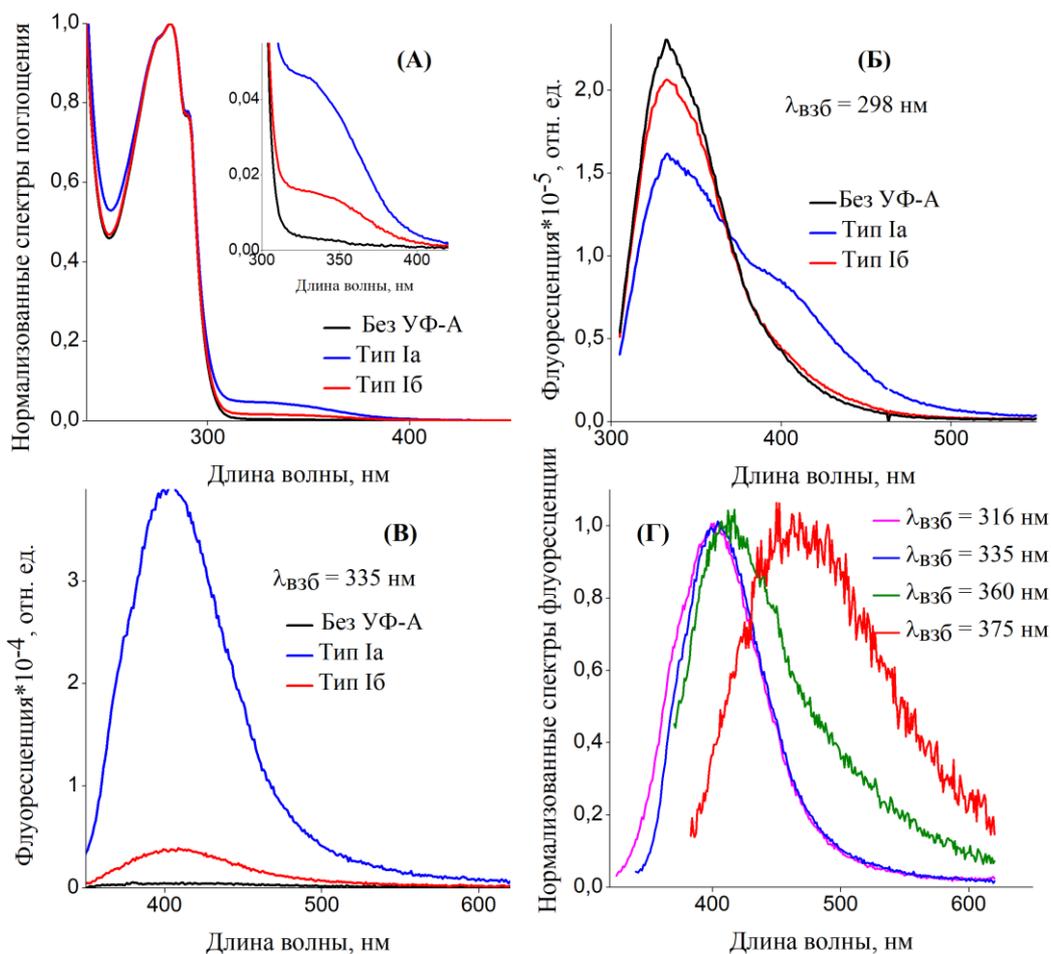


Рис. 5.3. (А) Нормализованные спектры поглощения и (Б) - (В) спектры флуоресценции очищенного от низкомолекулярной фракции HEWL до и после фотолизиса типа Ia и Ib, зарегистрированные на длинах волн возбуждения 298 и 335 нм, соответственно. На вставке графика (А) показаны те же данные в диапазоне длин волн 300-450 нм. (Г) Нормализованные спектры флуоресценции HEWL после УФ-А фотолиза типа Ia, возбужденного на разных длинах волн.

Флуоресцентный анализ показал, что после обоих типов фотолиза снижается интенсивность флуоресценции с максимумом на 332 нм, соответствующей флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков HEWL (Рис. 5.3 (Б)), и наблюдается формирование новой полосы флуоресценции с максимумом на 405 нм (Рис. 5.3 (Б) и (В)). Изменения спектральных свойств белка (поглощения и флуоресценции) более выражены в случае фотолиза типа Ia. В работе были также записаны спектры флуоресценции образцов при возбуждении на разных длинах волн в диапазоне 320-400 нм, соответствующем новой полосе поглощения. На Рис. 5.3 (Г) в качестве примера приведено несколько нормализованных спектров, записанных таким образом. Появление двух полос излучения с максимумами на 405 и 470 нм

свидетельствует о формировании по меньшей мере двух типов флуоресцентных модификаций в ходе фотолиза.

5.5. ВЭЖХ-МС анализ низкомолекулярных продуктов фотолиза

Молекулы с низкими молекулярными массами (KNA и продукты её распада) были очищены от высокомолекулярных соединений (HEWL и его продукты распада) и проанализированы с помощью методов ВЭЖХ с оптическим и масс-спектрометрическим детектированием. В обоих вариантах фотолиза основными низкомолекулярными продуктами реакции являются мономерные и димерные формы KNA с потерей атома кислорода на карбонильной и карбоксильной группах (Рис. 5.4). Спектры оптического поглощения наблюдаемых продуктов полностью совпали с ранее обнаруженными и охарактеризованными продуктами деградации KNA в случае её УФ-А фотолиза с аминокислотой NTpH (см. главу IV).

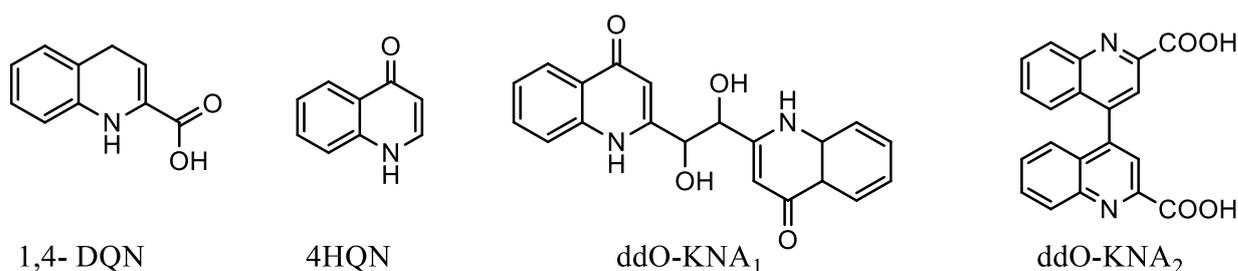


Рис. 5.4. Предполагаемые структуры продуктов деградации KNA.

Таблица 5.1. Квантовые выходы ($\Phi_{\text{дегр}}$) разложения KNA и HEWL в PBS (pH 7.4) при анаэробном УФ-А фотолизе типа Ia и типа Ib.

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

Все продукты были идентифицированы методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС анализа, за исключением ddO-KNA₂ (m/z 345.0871), который был обнаружен только при ВЭЖХ-МС анализе, что говорит о низких концентрациях этого соединения в растворе после фотолиза. Образование продуктов фотодегградации KNA более выражено в случае фотолиза типа Ia по сравнению с типом Ib (Рис. П17 Приложения 12). ВЭЖХ анализ показал, что наблюдается разложение исходной формы KNA на $35.5 \pm 6.2\%$ и $3.2 \pm 1.8\%$ после типа Ia и Ib фотолизом, соответственно. Кроме того, с помощью уравнений, представленных в главе II раздел 2.12,

были оценены значения квантовых выходов фотодеградации ($\Phi_{\text{дегр}}$) KNA (Таблица 5.1). Оценки были сделаны с учетом предположения, что количество KNA уменьшается линейно в зависимости от времени облучения.

5.6. Масс-спектрометрический анализ HEWL до и после УФ-А фотолиза

На Рис. 5.5 (А) показаны хроматограммы полного ионного тока, записанные с помощью метода ВЭЖХ-МС, для образцов до и после УФ-А фотолизиров типа Ia и Ib. Как видно из хроматограмм, белок до облучения элюируется в виде широкого пика (максимум поглощения на 19.3 минуте) с плечом на 18.9 минуте. После деконволюции МС сигнала, усредненного по пику, было установлено, что главный пик соответствует исходной форме белка с m/z 14304.875 $[M + H^+]$, а плечо – ряду его окисленным производных ($+16 \times i$ Да, где $i = 1, 2, \dots$), которые присутствуют в коммерческом образце. В результате УФ-А фотолизиров обоих типов происходит снижение интенсивности пика, соответствующего исходной форме белка, и образование второго широкого пика с RT 21.4 минуты. Масс-спектры белков, усредненные по двум основным пикам после деконволюции, представлены на Рис. 5.5 (Б) и (В). Рис. 5.5 (Б) показывает, что количество исходной формы HEWL значительно уменьшается во время обоих фотолизиров, в то время как количество его окисленных форм лишь немного увеличивается. Также было обнаружено существенное увеличение интенсивности сигнала для иона с m/z 14491.880 $[M + H^+]$ в случае фотолиза типа Ia (вставка на Рис. 5.5 (Б)). Поскольку масса этого иона отличается от исходного белка на 187.005 Да, то этот сигнал был отнесен к продукту ковалентного присоединения KNA, масса которой составляет 189.0060 Да, к HEWL с потерей двух атомов водорода, -2.0156 Да. В состав второго пика (RT 21.4 мин) входят различные формы димеров HEWL, а именно ковалентно связанные две мономерные формы белка с m/z 28607.690 $[M + H^+]$ в качестве основного компонента и окисленные формы этого димера ($+16 \times i$ Да, где $i = 1, 2, \dots$). Наиболее ярко изменения в хроматограмме полного ионного тока наблюдается в случае фотолиза типа Ia (Рис. 5.5 (А)).

На Рис. 5.5 (Г) показана зависимость концентрации исходной формы белка от количества поглощённой энергии света, а на Рис. 5.5 (Д) и (Е) – концентрации продуктов, образующихся после обоих типов фотолизиров. На основании данных, показанных на Рис. 5.5 (Г), были рассчитаны квантовые выходы фотодеградации белка ($\Phi_{\text{дегр}}$) для фотолизиров типа Ia и Ib (Таблица 5.1). Основываясь на квантовых выходах фотодеградации, можно сделать вывод, что фотолиз 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 фотолиза, как и в случае реакций с одиночной аминокислотной значительно меньше квантового выхода ${}^1\text{KNA}$ (82% [12]).

Следовательно, основным каналом гибели образовавшихся радикалов остаётся обратный перенос электрона с образованием исходных реагентов (реакции 5.5 и 5.8).

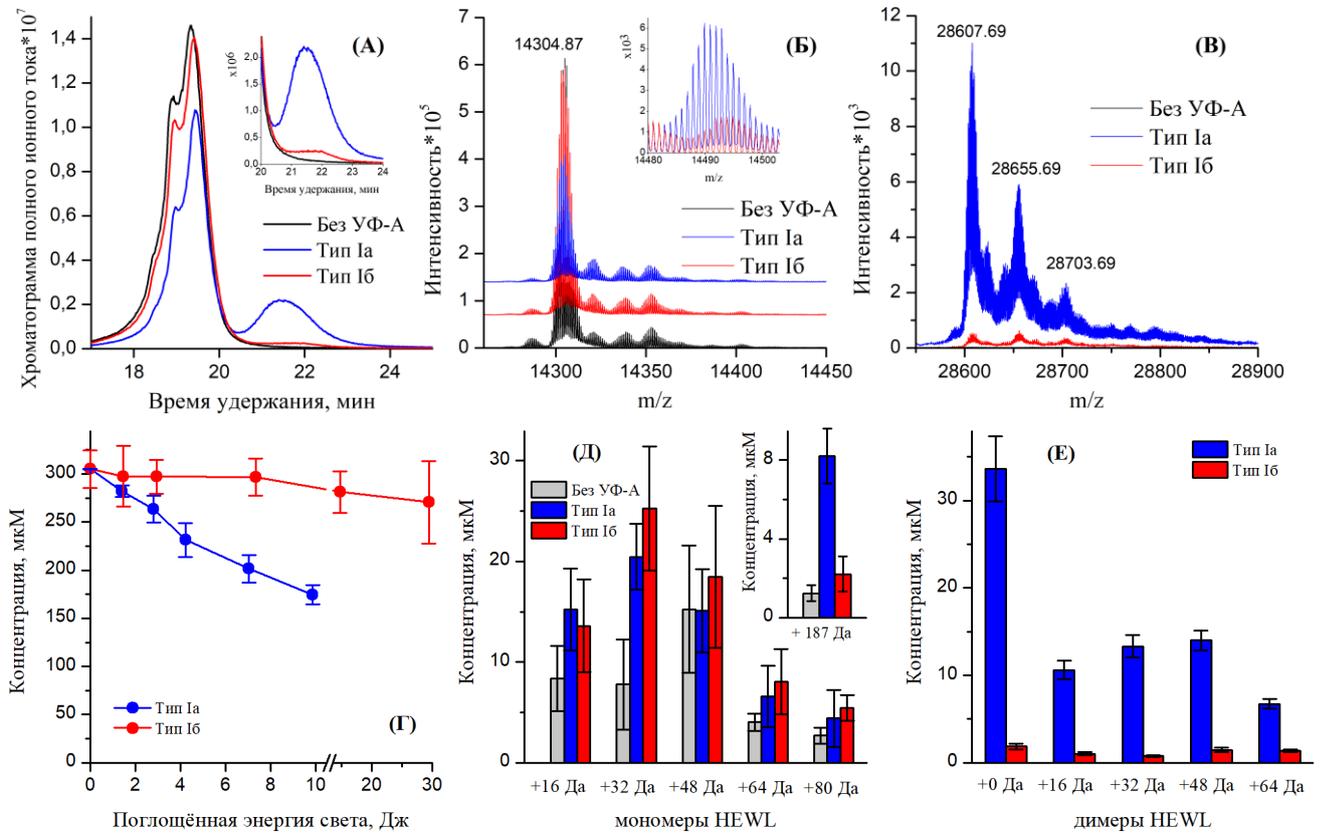


Рис. 5.5. ВЭЖХ-МС анализ HEWL до и после фотолиза типа Ia и типа Ib, 10 и 30 Дж поглощенной энергии света, соответственно. (А) Хроматограммы полного ионного тока. Вставка: пик, соответствующий димерным формам HEWL. (Б, В) Масс-спектры после деконволюции, полученные путем усреднения МС сигнала в временном диапазоне (Б) 19.0-20.0 минут и (В) 21.0-23.0 минут и соответствующие мономерной и димерной формам HEWL, соответственно. На вставке (Б) показан сигнал, соответствующий продукту KNA-HEWL (+187 Да). (Г) Зависимость концентрации исходного HEWL со средней массой 14303.85 Да от количества поглощённой энергии света во время обоих типов фотолиза. (Д, Е) Концентрации (Д) мономерных и (Е) димерных продуктов HEWL, образованных до и после фотолизатов типа Ia и типа Ib. На вставке рисунка (Д) показана концентрация продукта KNA-HEWL (+187 Да).

Незначительное фоторазложение белка в случае фотолиза типа Ib, по всей видимости, связано с преобладанием реакции 5.8 над реакцией 5.9. Аналогичный эффект наблюдался при фотолизе типа Ib KNA с одиночной аминокислотой NTrpH (см. главу IV) и других фотосенсибилизаторов [227,247]. Как уже упоминалось ранее, в литературе имеются исследования по импульсному радиолизу [87,88,229], в которых утверждается, что реакция 5.9 является основным каналом образования продуктов при фотолизе по типу Ib, а именно

пероксидов и других окисленных форм аминокислоты. Однако, результаты масс-спектрометрического анализа в одной из этих работ [88] не выявили образования высоких концентраций окисленных форм аминокислоты. На основании этого был сделан вывод, что эти окисленные продукты, по-видимому, не устойчивы и, в конечном счёте, распадаются с восстановлением исходных реагентов. В ходе исследований не удалось установить образование пероксидов в структурах белка и определить вклад от реакций 5.8 и 5.9 в общую картину модификаций. Однако, полученные результаты однозначно указывают на то, что присутствие кислорода в растворе значительно снижает повреждение HEWL в результате фотолиза типа Ib.

Концентрации продуктов фотолиза (Рис. 5.5 (Д) и (Е)) были рассчитаны с учётом предположения, что исходный и модифицированные белки обладают одинаковой эффективностью ионизации. Следовательно, их нужно рассматривать только как оценочные значения концентраций, иллюстрирующие различия между разными типами УФ-А фотолиза. Димеризация HEWL является основной фотоиндуцированной модификацией белка в результате обоих фотолизисов в присутствии KNA. При этом количество димерных форм значительно преобладает в случае фотолиза типа Ia по сравнению с типом Ib, в котором основным каналом гибели HEWL являются реакции 5.8 и 5.9. Полученные результаты хорошо согласуются с данными электрофоретического анализа (Рис. 5.2) и с результатами, описанными в главе IV. Стоит отметить, что в результате обоих типов фотолиза образуется примерно одинаковое количество окисленных производных белка. Вероятно, это может указывать на вклад реакций между HEWL и синглетным кислородом (реакция 5.11), который в незначительных количествах может образовываться по реакции 5.10 в условиях данного эксперимента.



5.7. Масс-спектрометрический анализ пептидов HEWL

Для идентификации положения и типа модификаций, образовавшихся в результате фотохимических реакций, а также установления динамики накопления модифицированных пептидов, пробы HEWL до и после УФ-А фотолиза подвергались ферментативному гидролизу трипсином и анализировались методом ВЭЖХ-МС. Анализ показал, что в фотохимических реакциях участвуют только пептиды HEWL, содержащие аминокислотные остатки Trp, Tyr и Met. В Таблице 5.2 приведён список пептидов, подвергшихся фотодеградации. Как видно из таблицы, для большинства из перечисленных пептидов степень деградации значительно выше в случае фотолиза типа Ia, что хорошо согласуется с предыдущими результатами, описанными в этой главе.

Таблица 5.2. Пептиды HEWL и степень их деградации после фотолизисов типа Ia и типа Ib. Данные представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Последовательность	[M+H ⁺]	Степень деградации / %	
		Тип Ia	Тип Ib
C ⁶ *ELAAAMK ¹³	893.4219	30 ± 10	13 ± 5
H ¹⁵ GLDNYR ²¹	874.4166	11 ± 3	5 ± 2
G ²² YSLGNWVC*AAK ³³	1325.6306	9 ± 5	15 ± 6
N ⁴⁶ TDGSTDYGILQINSR ⁶¹	1753.8351	14 ± 4	7 ± 3
W ⁶² WC*NDGR ⁶⁸	993.3995	36 ± 12	13 ± 4
I ⁹⁸ VSDGNGMNAWVAWR ¹¹²	1675.8009	50 ± 17	32 ± 12
G ¹¹⁷ TDVQAWIR ¹²⁵	1045.5425	8 ± 4	11 ± 5

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

Таблица 5.3. Пептиды HEWL и их идентифицированные модификации после фотолизисов типа Ia и типа Ib.

Последовательность	[M+H ⁺]	Модификации	
		Тип Ia	Тип Ib
C ⁶ *ELAAAMK ¹³	893.4219	–	–
H ¹⁵ GLDNYR ²¹	874.4166	–	–
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
N ⁴⁶ TDGSTDYGILQINSR ⁶¹	1753.8351	–	–
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 подтверждено МС/МС анализом.

Поиск модификаций вышеуказанных пептидов был проведён с учётом ранее описанных модификаций белков и аминокислот, сенсibilизированных KNA (глава IV, [152]): (1) однократное и двукратное окисление остатков Met и Trp; (2) образование ковалентных связей через остатки Trp и Tyr; (3) ковалентное присоединение KNA к аминокислотным остаткам Trp и (4) неизвестная модификация остатков Trp, приводящая к изменению массы аминокислоты на -2,015 Да. Процедура идентификации заключалась в расчёте теоретических масс ионов с разным зарядом ($[M+H]^+$, $[M+H^{2+}]^{2+}$ и так далее) и поиске этих ионов в масс-спектрометрических данных, полученных методом ВЭЖХ-МС. Для определения положения модификации и определения аминокислотной последовательности пептида, все обнаруженные модифицированные пептиды были подвергнуты МС/МС анализу. В Таблице 5.3 собрана краткая информация о найденных модификациях, полная характеристика которых приводится ниже. W, Y и M – однобуквенное обозначение аминокислотных остатков Trp, Tyr и Met, соответственно, с указанием порядкового номера (надстрочный символ) аминокислоты в последовательности HEWL без сигнальной последовательности (отсутствуют аминокислоты 1-19).

5.7.1. Окисление по аминокислотным остаткам Met и Trp

Среди всех изученных на сегодняшний день ПТМ белков, в частности кристаллинов, окисление является самой распространённой. Как указывалось в разделах 1.4.1-1.4.2, окисление аминокислотных остатков может происходить как в реакциях с реакционно-активными формами кислорода [52], так и через воздействие солнечных лучей на ткани организма [7,80]. Так или иначе, любой тип модификации может приводить к серьезным изменениям в структуре белка и его функционировании [75,76,79,248]. Известно, что аминокислотные остатки Met и Trp [7,75-77,80] являются одними из основных мишеней для окисления различными реакционно-активными частицами.

В аминокислотной последовательности HEWL содержится два остатка Met (Met12 и Met105). При масс-спектрометрическом анализе были обнаружены пептиды с окислением по обоим метионинам, как в образцах до фотолиза, так и после. Результаты работы показали, что только окисление по Met105 является фотоиндуцированной модификацией, содержание пептида с этой модификацией увеличивается в результате УФ-А фотолиза типа Ia и Ib (Таблица 5.3). МС/МС спектр пептида $I^{98}VSDGNGMNAWVAWR^{112}$, подтвердил окисление по остатку Met105 (Рис. П18 Приложения 13). Вероятно, окисление по остаткам Met105 белка происходит именно по реакции 5.11, поскольку, как было показано в главе III, метионин не является эффективным тушителем 1KNA . Константа скорости реакции Met с 1O_2 ($1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [249]) значительно выше, чем для реакции Met с 1KNA ($<1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, см. главу III).

Кроме того, были обнаружены пептиды с однократным и двукратным окислением по аминокислотным остаткам Trp28, Trp62 и Trp123 (см. Таблицу 5.3). Опираясь на результаты главы IV, обнаруженные продукты следует отнести к различным гидроксипирроиндольным и гидропероксидпирроиндольным продуктам окисления Trp [235,237,250]. Эти продукты также присутствуют в небольших количествах в исходных образцах. Количество всех описанных окисленных Trp-содержащих пептидов значительно повышается в результате обоих типов фотолиза. Единственным исключением являются пептиды с однократно и двукратно окисленным Trp28, количество которых заметно увеличивается только в результате фотолиза типа Ib. Подтверждение окисления по вышеуказанным остаткам было получено на основании анализа соответствующих MS/MS спектров (Рис. П19-П22 Приложения 13) с полной характеристикой идентифицированных b- и y- ионов.

5.7.2. Ковалентно связанные димеры HEWL через остатки Trp и Tyr

ВЭЖХ-МС анализ образцов после обоих типов фотолиза выявил присутствие в растворах пептидов с m/z 1983.7756, 2315.9900 и 2648.2378 $[M + H^+]$, которые были отнесены к пептидам с ковалентными связями между: двумя Trp62 ($W^{62}WCNDGR$) ($W^{62}WCNDGR$); Trp62-Tyr23 ($W^{62}WCNDGR$) ($GY^{23}SLGNWVCAAK$) и двумя Tyr23 ($GY^{23}SLGNWVCAAK$) ($GY^{23}SLGNWVCAAK$). Массы этих пептидов отличаются от суммы масс исходных пептидов на -2.0157 Да, что указывает на образование ковалентной связи между соответствующими остатками через реакции комбинации двух радикалов. Для подтверждения структур димеров, описанных выше, различные формы HEWL, разделенные на 15% ПААГ, были подвергнуты ферментативному гидролизу (см. Рис. 5.2). Полосы, соответствующие мономерным и димерным формам белка, вырезались из геля и подвергались селективному ферментативному гидролизу трипсином (методика описана в главе II, раздел 2.10), полученные смеси пептидов экстрагировались из геля 100% ACN и анализировались с помощью ВЭЖХ-МС. На Рис. 5.6 и Рис. П23-П25 (см. Приложение 13) представлены MS/MS спектры, подтверждающие структуры ковалентно связанных пептидов. Необходимо отметить, что в литературе отсутствуют сведения о таких ковалентных сшивках, то есть они были впервые обнаружены в данной работе.

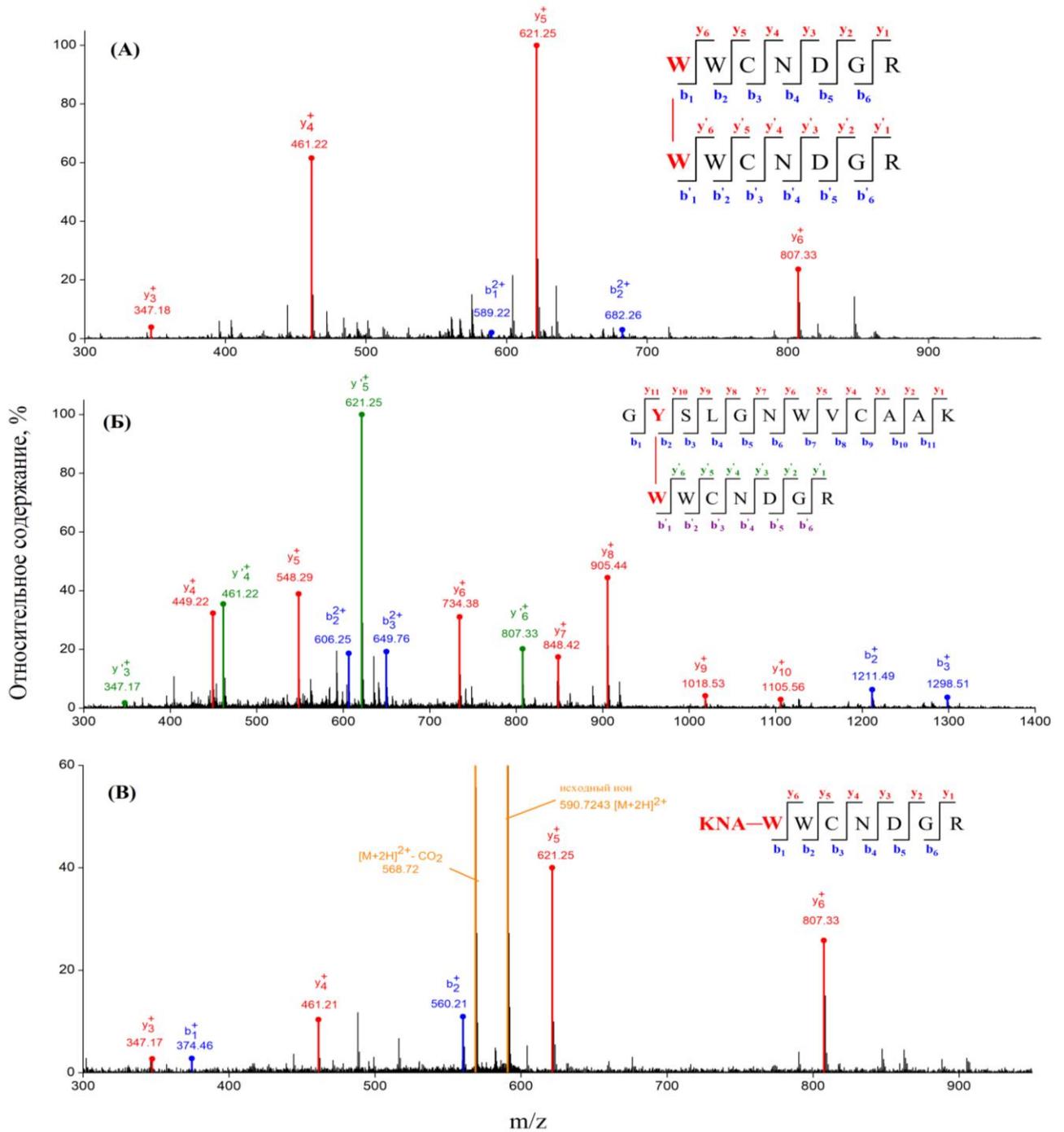


Рис. 5.6. MS/MS спектры (А, Б) димеров и (В) пептида с присоединением KNA к Trp62, полученные для образцов после фотолиза типа Ia (10 Дж) HEWL в присутствии KNA. (А) Trp62-Trp62 пептид (W⁶²WCNDGR) (W⁶²WCNDGR), фрагментируемый ион m/z [M + 4H⁺]⁴⁺ 496.7000; (Б) Trp62-Tyr23 пептид (W⁶²WCNDGR) (GY²³SLGNWVCAAK), фрагментируемый ион m/z [M + 4H⁺]⁴⁺ 579.7534 и (В) пептид KNA-Trp (KNA-W⁶²WCNDGR), фрагментируемый ион m/z [M + 2H⁺]²⁺ 590.7243. Синие b и красные y-ионы соответствуют α (более длинному) пептиду, а фиолетовые b и зеленые y-ионы - β (более короткому) пептиду. Исходный ион обозначен оранжевым цветом.

Полученные МС/МС спектры однозначно подтверждают образование ковалентных связей через Trp62 и Tyr23. Кроме того, эти пептиды были обнаружены только в экстрактах из полос, соответствующих димерным формам белка и отсутствуют в его мономерах. Полная характеристика идентифицированных b- и y- ионов приведена в Таблицах П8-П10 (см. Приложение 13). Следует отметить, что в структуре пептида ($W^{62}WCNDGR$) присутствуют два остатка Trp (Trp62 и Trp63) и ковалентное связывание может происходить по любому из них. Несмотря на то, что в условиях эксперимента фрагментация как исходного пептида, так и его димера (Trp62-Trp62) приводила к образованию b-ионов с интенсивностью на два порядка ниже, чем интенсивность y-ионов, обнаруженный нами ион y_6 , соответствующий немодифицированному Trp63, однозначно говорит об образовании ковалентной связи через остатки Trp62.

Для димеров, в структуру которых входит пептид ($GY^{23}SLGNWVCAAK$) (Рис. 5.6 (Б), Рис. П23 (см. Приложение 13)), были обнаружены полные наборы b- и y-ионов, однозначно подтверждающие предполагаемые структуры пептидов с ковалентными связями между Trp62-Tyr23 и Tyr23-Tyr23.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал наличие как минимум трех типов димеров HEWL, образующихся в результате УФ-А фотолиза в присутствии KNA. При этом один из них (Trp62-Tyr23) является продуктом обоих типов фотолизом, а два других (Trp62-Trp62 и Tyr23-Tyr23) были обнаружены только в случае фотолиза типа Ia. Стоит отметить, что для всех найденных пептидов интенсивность их МС сигналов была примерно одинакова (Рис. П27 Приложения 14). Следовательно, радикалы на аминокислотных остатках Tyr образуются также эффективно, как и на остатках Trp, несмотря на то, что на спектрах промежуточного поглощения для лизоцима (см. Рис. 3.5 в главе III) не наблюдается полосы поглощения на 410 нм, соответствующей радикалу Tyr[•]. Вероятно, радикал Tyr[•] образуется в результате внутримолекулярного переноса электрона от Tyr к радикалу Trp[•], расположенному на некотором расстоянии, что было ранее описано в литературе [89,223,224]. Однако в настоящее время остается не ясным, с какого из трех остатков тирозина происходит перенос электрона: с Tyr20 или Tyr23, расположенных на поверхности белка, или с Tyr53, спрятанного вглубь гидрофобного домена. В работе Bobrowski и коллег [89] было показано, что наиболее вероятно перенос происходит между Trp62 и Tyr53, и в меньшей степени от более доступных Tyr20 и Tyr23. Однако, расчеты авторов этой работы показывают, что флуктуации в структуре белка при его нахождении в водном растворе могут оказывать значительное влияние на процесс переноса электрона и на то, какие аминокислотные остатки будут в нем участвовать.

В настоящей работе были обнаружены димеры только с участием Tyr23, тогда как по литературным данным известно, что Tyr20 является более доступным для взаимодействия с

молекулами растворителя (расчёты с учётом статической структуры белка) [89]. Вероятно, что движение белка в растворе приводит к изменению его конформации, делая более предпочтительным перенос электрона между Trp62 и Tyr23, нежели между Trp62 и Tyr20. В недавних исследованиях по изучению фотохимических реакций лизоцима с бенгальским розовым [251] были установлены продукты димеризации через остатки Tyr20, Tyr23 и Trp62. Бенгальский розовый обладает способностью нековалентно связываться с белками в водных растворах [251,252]. Было обнаружено шесть различных сайтов связывания. Некоторые из этих сайтов находятся в непосредственной близости к остаткам Tyr20, Tyr23 и Trp62 [251]. Вероятно, обнаруженные димеры с участием Tyr (в частности Tyr20) образуются не только в результате внутримолекулярного переноса электрона на остатки Trp62, но и при прямом переносе одного электрона на фотосенсибилизатор. Результаты настоящей работы показывают, что в случае свободно диффундирующих молекул белка и фотосенсибилизатора в водном растворе перенос электрона от Tyr23 к Trp62 с последующим образованием димеров через Tyr23 протекает наиболее эффективно. Схема 5.1 иллюстрирует механизмы радикальных реакций, приводящих к димеризации HEWL.

Стоит упомянуть ещё одно исследование, в котором были найдены димеры лизоцима через аминокислотные остатки Trp28, образующие в результате взаимодействия с $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [149]. Однако, согласно исследованиям [89,253], Trp28 находится в гидрофобном домене с очень ограниченным доступом для молекул растворителя. Вероятно, различия между настоящей работой и результатами Raviani и коллег [149] можно объяснить тем, что размер $\text{CO}_3^{\cdot-}$ значительно меньше, чем KNA, что делает возможным перенос электрона между $\text{CO}_3^{\cdot-}$ и Trp28.

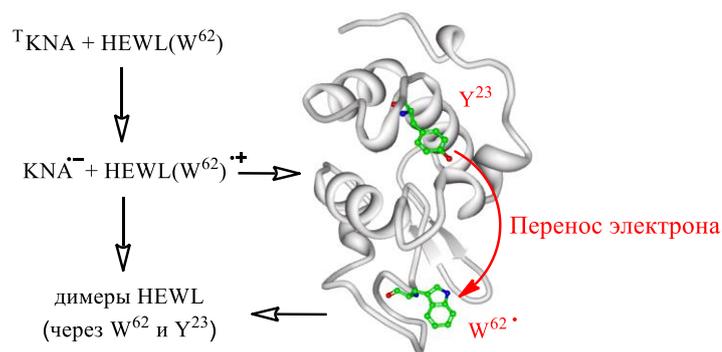


Схема 5.1. Механизм образования димеров белка.

5.7.3. Другие модификации остатков Trp

Помимо продуктов окисления и димеризации при масс-спектрометрическом анализе были также обнаружены другие модификации по остаткам Trp, а именно ковалентное присоединение KNA и модификация с изменением массы на -2.015 Да. Последняя была

обнаружена для пептида I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹², который в своей последовательности содержит два остатка триптофана, Trp108 и Trp111. К сожалению, из-за низкой интенсивности сигнала установить точное положение модификации не удалось.

Ковалентное присоединение KNA к аминокислотным остаткам Trp было обнаружено для трёх пептидов: W⁶²WCNDGR⁶⁸, G¹¹⁷TDVQAWIR¹²⁵ и N⁴⁶TDGSTDYGILQINSRWWCNDGR⁶⁸ (пептид с пропуском места расщепления, R⁶¹-W⁶²) с m/z 1180.4263, 1232.5693 и 2915.2436, соответственно. На хроматограмме каждый пептид дает два пика с близкими временами удержания (Рис. П27 Приложения 14). Поскольку все они обладают сигналами с низкой интенсивностью, определить положения модификации с помощью MS/MS фрагментации удалось только для пептида с m/z 1180.4263 (Рис. 5.6 (B) и Рис. 26 Приложения 13). Полная характеристика идентифицированных b- и y- ионов приведена в Таблице П11 (Приложение 13). Как и в случае других модификаций пептида W⁶²WCNDGR⁶⁸ (Рис. 5.6 (A) и (B)), на MS/MS спектре для продукта KNA- (W⁶²WCNDGR⁶⁸) наблюдаются интенсивные сигналы от y-ионов и низкоинтенсивные b-ионы. Однако, присутствие сигнала от иона y₆ однозначно указывает на то, что присоединение происходит именно по Trp62, а не по Trp63. Следует отметить, что присоединение KNA к Trp-содержащими пептидами HEWL было обнаружено только в растворах после фотолиза типа Ia, что подтверждает предложенный механизм.

Продукты ковалентного присоединения KNA к остаткам Trp62 и Trp123 HEWL, которые, вероятно, образуются в результате реакции 5.4 с участием радикалов KNA[•] и Trp62[•] / Trp123[•], были обнаружены впервые в случае белковых молекул. В случае одиночной аминокислоты, как было показано в главе IV, количество продуктов KNA-Trp примерно в три раза меньше количества димеров Trp, в то время как для реакций с HEWL в случае фотолиза типа Ia разница между ними составляет один порядок. Это указывает на то, что белковая среда значительно повышает эффективность реакции рекомбинации между KNA[•] и HEWL[•] с образованием KNA-HEWL. Последнее следует связать с тем, что в силу значительно большего размера белка константа скорости димерзации HEWL существенно меньше, чем аналогичная константа скорости для одиночной аминокислоты Trp. В результате происходит существенное замедление реакции 5.6 (по сравнению с одиночным Trp), что существенно увеличивает число контактов между радикалами KNA[•] и HEWL[•], приводя к увеличению выхода продуктов KNA-HEWL.

Как указывалось ранее (в главе I раздел 1.4.3 и главе IV), ковалентное присоединение кинуренинов к белкам хрусталика является нормальной пост-трансляционной модификацией, которая накапливается с возрастом [112,254]. Данные исследования показывают, что связывание KNA с белками также может вносить вклад в возрастные модификации кристаллинов. Согласно исследованиям, после присоединения KN к кристаллинам [84,95] и

HEWL [106] его фотохимическая активность увеличивается. Вероятно, это связано с тем, что в связанном состоянии возбужденные молекулы KN менее доступны для взаимодействия с молекулами растворителя, что увеличивает время жизни и выход его триплетного состояния [106]. Следовательно, можно ожидать, что присоединение KNA к белкам хрусталика также может изменять её фотохимические свойства и приводить к дополнительным повреждениям белков при нормальном старении или развитии катаракты.

Заключение по материалам главы V

УФ-А фотолиз по типу I в присутствии KNA приводит к появлению многочисленных модификаций на белке: модификаций, поглощающих в ближней УФ-области; ковалентной сшивки белков и потере ферментативной активности. Степень повреждения белка в фотореакциях типа Ia (прямые реакции между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и HEWL^{\cdot}) в 10 раз выше, чем в фотореакциях типа Ib (реакции между супероксидом $\text{O}_2^{\cdot-}$ и радикалом HEWL^{\cdot}). Суммарный квантовый выход фотодеградации белка от обоих типов фотолиза в присутствии KNA не превышает 3%, что указывает на обратный перенос электрона в качестве основного канала гибели образующихся радикалов.

Фотолиз раствора KNA и HEWL приводит к формированию радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ и радикала на аминокислотных остатках Trp белка. Масс-спектрометрический анализ показал, что реакции между ^1KNA и HEWL протекают через реакции с аминокислотным остатком Trp62, поскольку большинство наблюдаемых модификаций, как было описано выше, образуются именно на этом остатке.

Основными продуктами обоих типов фотолизом являются димеры HEWL, образованные через остатки Trp62 и Trp23. Радикалы Trp не образуются при тушении ^1KNA лизоцимом в количествах, позволяющих их зарегистрировать, но в структуре белка они могут появляться в результате внутримолекулярного переноса электрона с остатков Trp на Trp^{\cdot} . Ковалентное присоединение KNA к HEWL является отличительной особенностью фотолиза типа Ia. Выход ковалентно связанных продуктов в случае HEWL значительно выше, чем в реакции KNA со свободным Trp. На основании этих результатов можно ожидать, что KNA будет эффективно присоединяться к белкам хрусталика - кристаллинам, особенно к β - и γ -кристаллинам, содержащим большое количество аминокислотных остатков Trp (Таблица П1 Приложения 1).

Стоит отметить, что в предыдущих исследованиях (глава IV, [87,147,255]) было установлено, что реакции между $\text{Trp}^{\cdot}/\text{Trp}^{\cdot}$ приводят к образованию димеров с ковалентной связью по различным положениям индольного/ фенольного кольца, которые могут быть разделены хроматографически. В главе IV также было продемонстрировано образование продуктов KNA-Trp с ковалентной связью по различным положениям ароматической системы.

В этой работе удалось установить, что димеры и продукты KNA-HEWL на хроматограмме выходят в виде одного или двух пиков (Рис. П27 Приложения 14). Это указывает на то, что белковое окружение оказывает сильное влияние на положение модификаций, допуская образование ковалентных связей только по определенным положениям. К сожалению, полученных данных недостаточно для определения по каким именно позициям в индольном/фенольном кольце Trp/Tyr образуется связь.

Важно отметить, что фотолиз типа Iб с участием супероксида $O_2^{\cdot-}$ приводит к небольшим повреждениям белка. Хотя механизмы реакций между радикалами HEWL \cdot и $O_2^{\cdot-}$ на сегодняшний день остаются неизвестными, можно сделать вывод, что остаточный кислород может выполнять защитную функцию, приводя к уменьшению УФ-А индуцированных повреждений белков за счёт перенаправления радикальных реакций в относительно безвредный канал. Несмотря на то, что хрусталик представляет собой обескислороженную ткань [39], концентрация радикалов, образующихся в естественных условиях под действием солнечного излучения, как минимум на два порядка ниже. Поэтому можно ожидать, что вклад реакций типа Iб будет достаточно значительным в общий механизм радикальных реакций, протекающих внутри хрусталика.

ГЛАВА VI ФОТОЛИЗ КРИСТАЛЛИНОВ В ПРИСУТСТВИИ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Под действием УФ-А излучения (315-400 нм) природные метаболиты хрусталика, кинуренины и их производные, в частности кинуреновая кислота (KNA), переходят в триплетные состояния, которые в анаэробных условиях реагируют с белками в реакциях по типу I (см. главы IV и V). Результаты главы V однозначно показали, что модификация белка значительно увеличивается при переходе от реакций радикалов белка с супероксидом (тип Ib) к прямым реакциям между радикалами белка и радикалами кинуренинов (тип Ia). Остаточный кислород в растворе может играть роль «защитного агента», снижающего модификации белков за счёт восстановления радикалов аминокислот в реакциях с супероксидом. Как было показано, основными тушителями ^1KNA являются аминокислотные остатки белков - Trp и Tyr, которые и подвергаются химической модификации: окислению, димеризации и ковалентному присоединению KNA.

Данная глава посвящена исследованию характера модификации белков хрусталика, вызванных взаимодействиями с фотовозбужденной KNA в анаэробных условиях, а также установлению насколько структура кристаллинов может влиять на выявленные ранее механизмы радикальных реакций. 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/ 6M мочевины) с целью сравнения динамики фотоиндуцированной модификации кристаллинов в нативной мультимерной и денатурированной мономерной формах.

6.1. Спектры поглощения белков после фотолиза

Растворы 17.5 мг/мл β - и 12.1 мг/мл γ -кристаллинов в присутствии 0.3 мМ KNA были подвергнуты фотолизу типа Ia (лазер, $\lambda=355$ нм, 1 мДж/импульс, 10 Гц). Концентрации белков подобраны таким образом, чтобы реакция тушения ^1KNA по скорости в два-три раза превосходила реакцию триплет-триплетной аннигиляции. Пробы, отобранные в результате фотолиза, были разделены на фракции с низкой молекулярной массой (менее 3 кДа, KNA и продукты ее разложения) и высокой молекулярной массой (более 3 кДа, белки). Спектры оптического поглощения водных растворов кристаллинов после фотолиза типа Ia представлены на Рис. 6.1. Можно видеть образование новой полосы поглощения с максимумом на 335 нм, что указывает на формирование модификаций в структуре белка, поглощающих в области ближнего УФ. При этом интенсивность поглощения от этих модификаций заметно выше для образцов в денатурирующих условиях. Необходимо отметить, что на всех спектрах не

наблюдается изменений в положении и форме полосы поглощения на 280 нм, соответствующей поглощению остатков Trp и Tyr. Это свидетельствует о том, что модификации Trp и Tyr обладают спектральными свойствами, сильно отличающимися от исходных соединений.

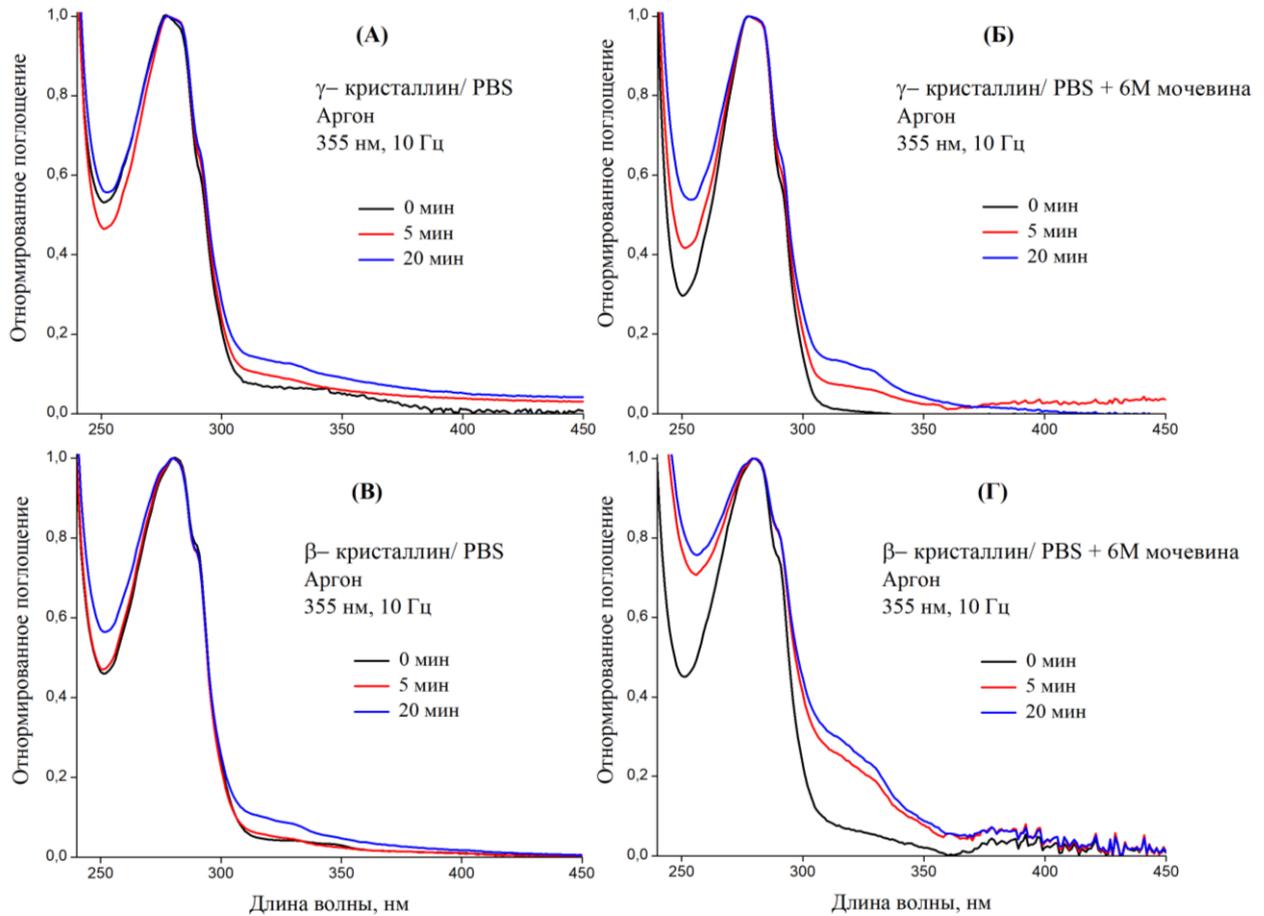


Рис. 6.1. Нормализованные спектры оптического поглощения β - и γ -кристаллинов после KNA -сенсibilизированного УФ-А фотолиза типа Ia с разным временем облучения: (А) γ -кристаллин в нативных условиях, (Б) γ -кристаллин в денатурирующих условиях (с добавлением 6 М мочевины), (В) β -кристаллин в нативных условиях, (Г) β -кристаллин в денатурирующих условиях (с добавлением 6 М мочевины).

Спектры поглощения модифицированных белков очень похожи на спектры, полученные в случае HEWL (Рис. 5.3, глава V), а также при фотолизе типа Ib α -кристаллина [152]. Это указывает на общий характер модификации белков, независимо от их структуры. В случае α -кристаллина было показано уменьшение флуоресценции от остатков триптофана и образование модификаций, которые характеризуются спектрами эмиссии с максимумами на 405 и 470 нм, которые были отнесены к двум типам модификации α -кристаллина с различными флуоресцентными свойствами [152]. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными при фотолизе HEWL (Рис. 5.3, глава V).

Спектры флуоресценции, аналогичные HEWL, были получены в случае β - и γ -кристаллинов (данные не приведены). Как и в случае с HEWL и α -кристаллином, наблюдается уменьшение сигнала флуоресценции от остатков триптофана и образование новых полос эмиссии с максимумами на 405 и 470 нм. Таким образом, полученные данные как по поглощению, так и по флуоресценции однозначно указывают на образование флуоресцентных модификаций на белках хрусталика, спектральные свойства которых заметно отличаются от свойств остатков Trp и Tug.

6.2. Анализ низкомолекулярных продуктов фотолиза

Поскольку концентрации низкомолекулярных продуктов реакции были заметно выше в случае фотолиза типа Ia (см. главы IV и V), образцы, содержащие 0.3 мМ KNA и 5 мг/мл β - или γ -кристаллина в растворе PBS были подвергнуты именно этому типу УФ-А фотолиза. В случае 6.0 мг/мл α -кристаллина в растворе 0.3 мМ KNA фотолиз проводился с использованием ртутной лампы в качестве источника излучения (тип Ib). Концентрацию кристаллинов в образцах оценивали по поглощению на 280 нм, используя молярные коэффициенты экстинкции (ϵ_{280}), полученные в работе студента Сеницына С.А. (см. главу III раздел 3.2, [256]).

После фотолиза образцы были очищены от белков, а фракцию, содержащую только низкомолекулярные соединения, анализировали с помощью ВЭЖХ-МС. В реакции с тремя основными семействами кристаллинов основными продуктами распада KNA являлись 1,4-DHQ, 4HQ, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂, которые были обнаружены как в случае фотохимических реакций KNA с одиночной аминокислотой Trp, так и с HEWL (см. главы IV и V). На Рис. 6.2 в качестве примера показана зависимость концентрации 1,4-DHQ от времени облучения в случае фотолиза типа Ib α -кристаллина в нативных условиях. Остальные продукты содержались в количествах, недостаточных для их измерения методом оптического поглощения. Для этих продуктов была получена полуколичественная зависимость от времени методом масс-спектрометрии, который является значительно более чувствительным методом. Как можно видеть, количество всех четырёх продуктов монотонно увеличивается с дозой облучения (Рис. 6.2). Полученные результаты показывают, что фотохимические реакции KNA с кристаллинами и с модельными системами (NTTrpH и HEWL) протекают по сходным механизмам.

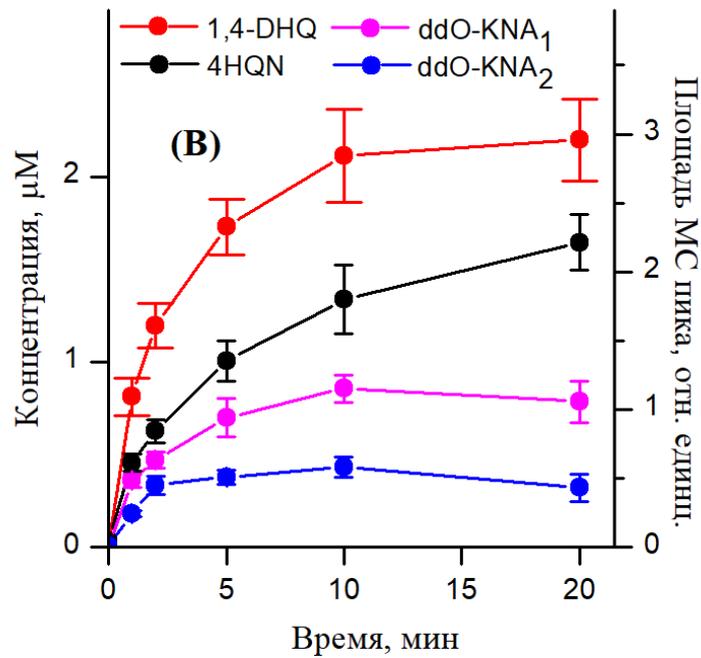


Рис. 6.2. Динамика накопления продуктов фоторазложения KNA, образующихся в результате УФ-А фотолиза типа Ib 0.3 мМ KNA и 6.0 мг/мл α -кристаллина в PBS. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

6.3. Электрофоретический анализ белков хрусталика после фотолиза

На Рис. 6.3 представлены 15% ПАА-гели, содержащие образцы γ - и β -кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях (с добавлением 6М мочевины) до и после различных доз фотолиза типа Ia.

При облучении γ - и β -кристаллинов в нативных условиях (Рис. 6.3 (А) и (В)) на гелях наблюдается уменьшение количества мономерной формы белков и пропорциональное увеличение количества олигомерных форм белков с увеличением дозы УФ-А излучения. В случае γ -кристаллина ярко проявляются не только димеры, но и олигомеры более высокого порядка – тримеры, тетрамеры и так далее. В случае β -кристаллинов можно видеть только димеры и следовые количества тримеров.

Эти различия в количестве образующихся ковалентно-сшитых белков, по-видимому, надо связать с мультимерностью комплексов, которые образуют эти белки в водных растворах. γ -Кристаллины, единственные из трех семейств кристаллинов, находятся в мономерной форме и являются наиболее эффективными тушителями ^1KNA (Таблица 3.2, глава III). В силу мономерности, его ароматические остатки являются более доступными для атаки ^1KNA , а также для последующих реакций радикал-радикальной комбинации по сравнению с другими семействами кристаллинов.

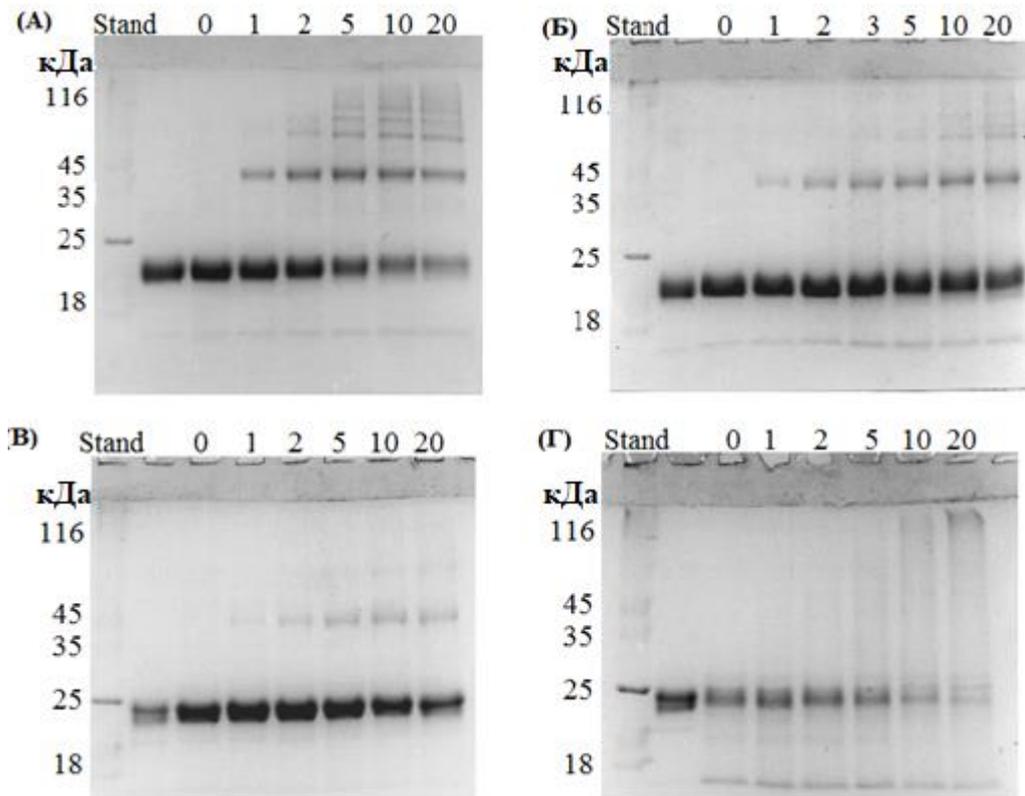


Рис. 6.3. 15%-SDS-ПАА гель γ - и β -кристаллина после УФ-А фотолиза типа Ia 0.3 мМ KNA 12.1 и 17.5 мг/мл белка, соответственно, в отсутствии (А, В) и в присутствии 6 М мочевины (Б, Г): дорожка Stand соответствует стандарту, следующая дорожка соответствует образцу без барботирования и засветки. Для остальных дорожек указана продолжительность фотолиза (в минутах). После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

β -Кристаллины в водных растворах образуют нековалентно связанные комплексы из димеров, тетрамеров и октомеров. Это приводит как к более медленной реакции с ^1KNA (Таблица 3.2, глава III), так и дальнейшим радикальным реакциям. Итоговым результатом является существенное снижение эффективности образования кросс-сшитых белков, см. Рис. 6.3 (А) и (В).

Денатурирующие условия по-разному влияют на олигомеризацию белков. В случае γ -кристаллинов наблюдается существенное снижение числа олигомерных форм с сохранением количества мономерной формы, см. Рис. 6.3 (Б). По-видимому, это связано с разупорядочиванием природной структуры белка в присутствии детергента, что замедляет реакции радикал-радикальной комбинации с образованием ковалентных связей. В случае β -кристаллина (Рис. 6.3 (Г)) присутствие 6М мочевины приводит к быстрой деградации мономерной формы без образования четких полос олигомеров. При больших дозах засветки можно видеть наличие диффузных пятен с молекулярной массой более 150 кДа. Вероятно,

происходит образование большого числа разнообразных кросс-сшитых олигомеров разного порядка, которые образуют диффузную полосу слабой интенсивности.

Столь разительные изменения в фотолизе β -кристаллина в присутствии 6М мочевины необходимо связывать не только с распадом мультимерных комплексов β -кристаллинов, но и потерей их третичной и (возможно частично) вторичной структур, что многократно увеличивает доступность триптофановых и тирозиновых остатков для атаки ^1KNA и последующих радикальных реакций. Кроме того, β -кристаллины содержат наибольшее количество триптофановых остатков (5-9 в зависимости от белка, Таблица III Приложения 1) среди остальных кристаллинов (1-2 для α -кристаллинов и 4-5 для γ -кристаллинов). В результате наблюдается быстрая деградация мономерных форм белка с образованием большого разнообразия кросс-сшитых белков с высокой молекулярной массой.

Для γ -кристаллина (2.9 мг/мл) были проведены эксперименты по фотолизу типов Iб и II в присутствии 0.3 мМ KNA с целью определения того, как наличие кислорода в растворе изменяет динамику образования ковалентно-сшитых белков. В случае Iб фотолиза (Рис. 6.4 А) можно видеть быструю гибель мономерной формы белков с образованием олигомерных форм. Последние при малых дозах облучения проявляют себя в виде четких полосок, однако, при больших дозах облучения образуют диффузные пятна малой интенсивности. Поскольку при реакциях типа Iб прямые реакции между радикалами KNA и белков не исключены, то можно предполагать, что эти реакции ответственны за образование четко структурированных димеров и тримеров на начальных этапах фотолиза. Однако, основной реакцией является реакция супероксида с радикалами белка. Сравнивая наблюдаемые картины с HEWL (Рис. 5.2, глава V), можно предполагать, что в случае γ -кристаллина белковое окружение уменьшает константу скорости и итоговую эффективность реакции обратного переноса электрона с образованием исходных реагентов. В результате происходит более эффективное образование пероксидов белка (реакция 5.11), которые изменяют его структуру и предрасполагают к образованию кросс-сшивок по большему количеству аминокислотных остатков. Важно отметить, что механизм ускорения кросс-сшивки белков после их окисления был недавно продемонстрирован на примере HEWL [150]. Образование кросс-сшивок через окисленные остатки, по-видимому, приводит к большому разнообразию ковалентно-сшитых γ -кристаллинов в широком диапазоне молекулярных масс, что приводит к образованию растянутых диффузных полос малой интенсивности на гелях, приведенных на Рис. 6.4 А.

При фотолизе типа II в целом наблюдается похожая картина процессов (Рис. 6.4 (Б)). Но, олигомерные формы менее выражены на промежуточных интервалах фотолиза и отчетливо выражены в виде олигомеров с высокой молекулярной массой более 250 кДа на поздних интервалах фотолиза. Эти изменения показывают, что реакции синглетного кислорода с

белками существенно ускоряют образование ковалентно-сшитых белков. Результаты на Рис. 6.4 хорошо согласуются с ускорением распада субстрата в присутствии кислорода (глава IV, раздел 4.1). Поскольку в аэробных условиях имеет место конкуренция между кислородом и белком за ^1KNA , то в данных условиях помимо синглетного кислорода также происходит образование радикалов по реакциям типа I. Таким образом, участие синглетного кислорода в фотоиндуцированных реакциях, исследованных ранее (тип Ia и Ib), другими словами смеси реакции типов I и II, приводит к быстрой и эффективной деградации исходного белка и образованию агрегатов с высокой молекулярной массой (Рис. 6.4 (Б)).

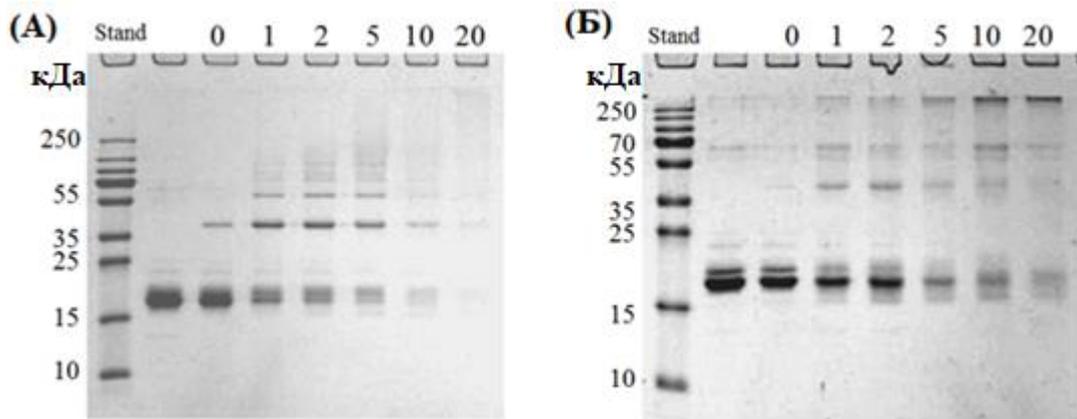


Рис. 6.4. 15%-SDS-ПАА гель γ -кристаллина после фотолиза типа Ib (А) и типа II (Б). Дорожка Stand соответствует стандарту, следующая дорожка соответствует образцу без барботирования и засветки. Для остальных дорожек указана продолжительность фотолиза (в минутах). После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

Таким образом, было показано, что фотолиз белков хрусталика в присутствии KNA приводит к ковалентному сшиванию кристаллинов, что хорошо согласуется с результатами, полученными для HEWL. Однако, для кристаллинов эффективность образования кросс-сшитых белков существенно выше по сравнению с HEWL. Наиболее наглядно это можно видеть в случае γ -кристаллина. Образование мультимерных нековалентно связанных комплексов α - и β -кристаллинов существенно снижает эффективность кросс-сшивки белков. В присутствии кислорода в растворе деградация кристаллинов существенно ускоряется, что сопровождается образованием агрегатов с высокой молекулярной массой. По-видимому, аналогичная агрегация белков происходит в случае пост-травматической катаракты, когда в хрусталик глаза попадает значительное количество кислорода в результате его травмы.

6.4. Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов кристаллинов

Как говорилось в разделе 1.3 главы I каждое семейство белков хрусталика состоит из нескольких кристаллинов: два белка в случае α -кристаллинов и по семь в случаях β - и γ -кристаллинов [1,61]. Внутри каждого семейства белки имеют схожее строение (аминокислотная последовательность и вторичная/третичная структуры), молекулярный вес, заряд и выполняют одинаковые функции [1,52,58,59,64]. В связи с этим выделение индивидуальных белков является достаточно трудоемкой задачей, и в настоящем исследовании кристаллины были разделены только по семействам.

6.4.1. Деградация белков при УФ-А фотолизе.

Анализ образцов β - и γ -кристаллинов после УФ-А фотолиза типа Ia в присутствии KNA в PBS и PBS/6M мочевины и очистки от низкомолекулярных молекул проводился методом ВЭЖХ-МС. Анализ образцов, содержащих γ -кристаллины, показал, что в растворе присутствует около 70 белков, молекулярные массы которых находятся в диапазоне от 10.5 до 80 кДа. Содержание большей части белков уменьшается с увеличением времени облучения. Часть белков идентифицируются с помощью данных о кристаллинах, опубликованных в базах данных белков (SwissProt). Оставшиеся, вероятно, содержат большое количество природных модификаций, что затрудняет их точное определение. Для корректной идентификации необходимо выделение каждого белка в отдельную фракцию с последующим анализом, что требует использования иных методов хроматографического разделения, чем обращенно-фазовая хроматография, использованная в данной работе.

Для белков с наиболее интенсивными МС сигналами (около 20 белков) были получены зависимости их относительного содержания от дозы УФ-А излучения. Для всех этих белков наблюдается монотонное уменьшение концентрации с увеличением времени облучения. В качестве примера на Рис. 6.5 представлены зависимости относительного содержания для трех идентифицированных белков: γ A-кристаллин ($M=21008$ Да), γ B-кристаллин с дисульфидным мостом ($M=20964$ Да), γ D-кристаллин с двумя дисульфидными мостами ($M=20731$ Да) от времени фотолиза.

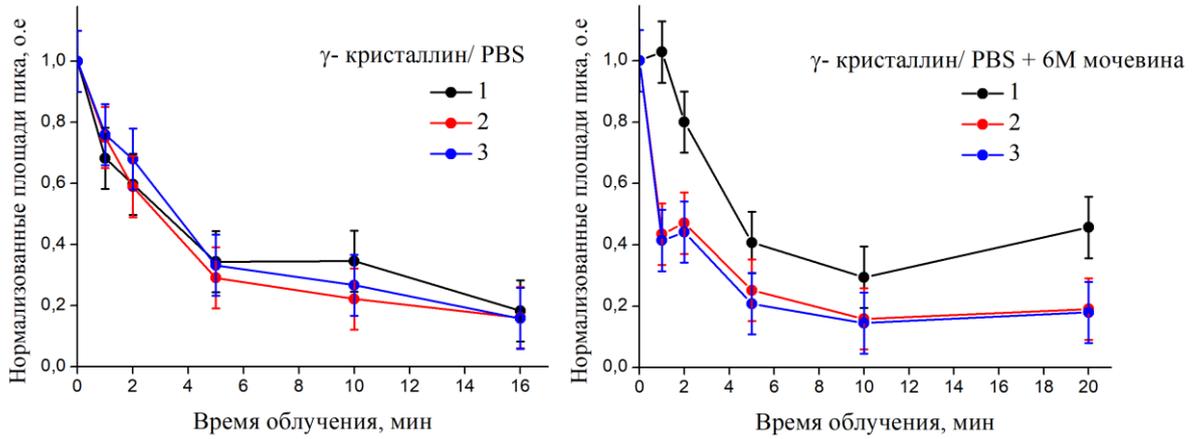


Рис. 6.5. Относительное содержание (1) γ A-кристаллина, (2) γ B-кристаллина с дисульфидным мостом и (3) γ D-кристаллина с двумя дисульфидными мостами, в зависимости от времени засветки в отсутствии и присутствии 6 М мочевины.

Из графиков видно, что в денатурированном состоянии исходная мономерная форма γ -кристаллина деградирует значительно быстрее, чем в нативных условиях. Однако, данные гель-электрофореза показывают, что кросс-сшивка белков в денатурирующих условиях происходит с низкой эффективностью, и большинство белков сохраняют мономерную форму на всем протяжении фотолиза. Следовательно, данные гель-электрофореза и МС анализа указывают на то, что в денатурирующих условиях основная деградация белка происходит в результате модификаций его мономерной формы без образования ковалентно-сшитых белков. Основными модификациями, по-видимому, являются модификации с малым увеличением молекулярной массы, например, окисление, присоединение KNA и иные. Последнее подтверждается существенным увеличением интенсивности полосы поглощения с максимумом на 335 нм, см. Рис. 6.1 (Б). Таким образом, в денатурирующих условиях происходит замедление процесса олигомеризации и ускорение модификации белков с незначительным изменением молекулярной массы белка и образованием различных продуктов, включая поглощающие в УФ-А диапазоне. В отсутствие детергента данные по масс-спектрометрии и электрофорезу хорошо согласуются, указывая на то, что олигомерные формы белков являются основными продуктами фотолиза. Последнее хорошо согласуется с результатами по аминокислоте NTpH и модельному белку HEWL (главы IV и V).

Анализ исходного β -кристаллина показал наличие ещё более богатой смеси белков, чем в случае с γ -кристаллином. Как и в предыдущем случае, наблюдаемые белки, по-видимому, должны быть отнесены к β -кристаллинам с различными природными модификациями. Также для всех β -кристаллинов наблюдается монотонное снижение концентрации мономерной формы с увеличением времени облучения. В силу качественного совпадения зависимостей для β - и γ -

кристаллинов, данные для β -кристаллинов не приведены. Стоит отметить, что многообразие β -кристаллинов и их более сложное строение по сравнению с γ -кристаллинами сильно затрудняет масс-спектрометрический анализ. Поэтому дальнейшие поиски аминокислот, по которым проходят модификации белков, проводились только для представителей семейства γ -кристаллинов.

Стоит отметить, что идентифицировать ионы, соответствующие окисленным и димерным формам белка, в данной работе не удалось. Это связано со следующими причинами: (1) присутствие в смеси большого количества белков с близкими молекулярными массами и (2) низкая интенсивность сигнала от модифицированных белков по сравнению с сигналами для мономерных форм белков. Кроме того, на сегодняшний день неизвестно, в каких соотношениях по концентрации присутствует тот или иной представитель семейства, что делает невозможным определение его точной концентрации в смеси белков. Таким образом, это делает невозможным определение квантовых выходов УФ-А-индуцированного разложения каждого белка, как это было сделано в случае модельного белка.

6.4.2. Анализ белков после ферментативного гидролиза

Очищенные от метаболитов пробы, содержащие γ -кристаллины до и во время фотолиза типа Ia, были подвергнуты ферментативному гидролизу трипсином по методике, описанной в главе II раздел 2.10. Полученная смесь пептидов была проанализирована с помощью ВЭЖХ-МС. Для идентификации пептидов были использованы теоретические массы пептидов, рассчитанные с помощью базы данных Uniprot. Были заданы следующие условия для расчета: (а) пептиды, полученные в процессе гидролиза немодифицированного белка трипсином, (б) с одним пропуском вероятного места расщепления белка и (в) гидролиза без или с одним пропуском белков со всеми известными природными модификациями (6 различных модификаций), а также карбодометилированием, в качестве искусственно введенной модификации в процессе приготовления образцов (эта модификация цистеиновых остатков была введена для предотвращения образования $-C-C-$ связей в белке, что существенно улучшает эффективность ферментативного гидролиза белка).

Большинство наблюдаемых пептидов не показали явной зависимости уменьшения исходной формы с увеличением времени облучения. Однако, были обнаружены пептиды, которые в процессе фотолиза подвергаются деградации. Идентификация этих пептидов по теоретически предсказанным массам показала, что эти пептиды содержат остатки Туг. В качестве примера на Рис. 6.6 приведены зависимости относительного содержания трех пептидов γ В-кристаллина: IYERDDFR (93-100 аминокислота, M=1113 Да), ITFYEDR (4-10 аминокислота, M=943 Да), QYLLRPGEYR (144-153 аминокислота, M=1295 Да) от времени

фотолиза. С увеличением дозы УФ-излучения происходит монотонная деградация Туг-содержащих пептидов. При этом в присутствии детергента (6 М мочевины) деградация происходит значительно быстрее, чем в его отсутствии. Вероятно, в этих реакциях происходит модификация Туг-содержащих пептидов с образованием продуктов, поглощающих в УФ-области, что также наблюдается на спектрах оптического поглощения (Рис. 6.1 (Б)). Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что в присутствии детергента происходит нарушение в укладке структурных доменов белков хрусталика, триптофановые и тирозиновые аминокислотные остатки становятся более доступными для атаки возбужденными молекулами. При этом для γ -кристаллина значительно меняется соотношение итоговой модификации при переходе от нативных к денатурирующим условиям: в нативных условиях преобладает агрегация в высокомолекулярные комплексы, тогда как в денатурирующих условиях становится заметным вклад от «окрашивающих» модификаций.

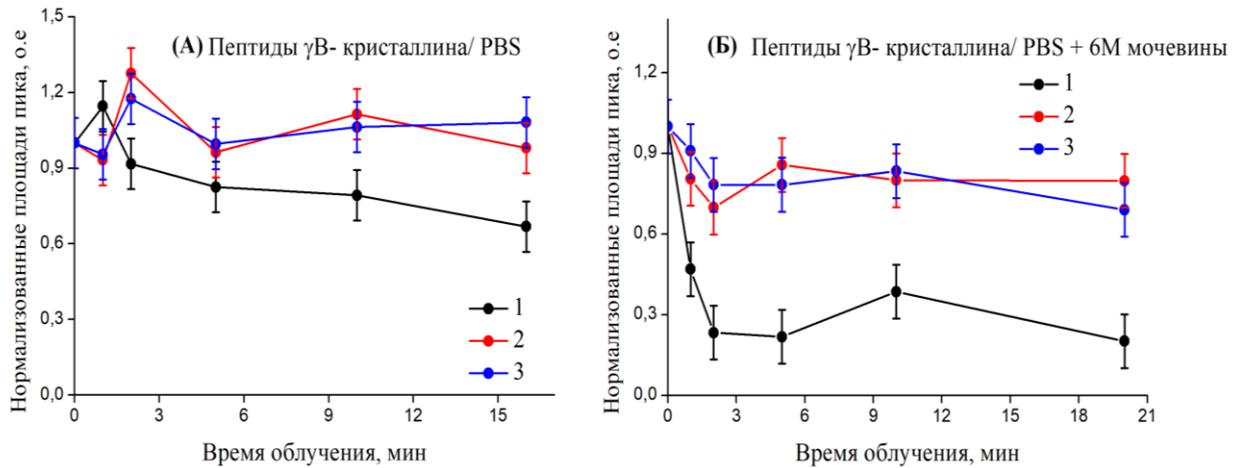


Рис. 6.6. Зависимость относительного содержания (1) пептида 93-100, (2) пептида 4-10 и (3) пептида 144-153 γ В-кристаллина от времени фотолиза в отсутствии и присутствии 6 М мочевины.

В работе Sherin и соавторов [152] был проведён масс-спектрометрический анализ 34 пептидов, полученных при ферментативном гидролизе смеси α -кристаллинов. Было установлено, что содержание 8 пептидов α А-кристаллина и 10 α Б-кристаллина не изменяется в процессе УФ-А фотолиза, что говорит о том, что аминокислоты, входящие в эти пептиды, не участвуют в реакциях с ^1KNA . В тоже время пептиды, в аминокислотную последовательность которых входят Тгр и Туг, демонстрировали уменьшение содержания с увеличением дозы облучения. Присутствие антиоксидантов предотвращает деградацию Тгр- и Туг-содержащих пептидов.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают механизм, который был предложен в главе III. Согласно этому механизму, тушение ^1KNA белками хрусталика происходит за счёт взаимодействия с остатками Trp и Tug в случае α -кристаллина и с остатками Tug в случае γ -кристаллина. Деграция соответствующих пептидов, Trp- и Tug-содержащих в случае α -кристаллинов и Tug-содержащих для γ -кристаллина, говорит об их активном участии в фотоповреждении белков. Учитывая, что β -кристаллин также, как и α -кристаллин, взаимодействует с ^1KNA через остатки Trp и Tug, следует ожидать, что при анализе его фотоиндуцированных модификаций пептиды, содержащие эти аминокислотные остатки, будут основными мишенями для фотоповреждения.

Кроме того, для α -кристаллина были установлены основные фотоиндуцированные модификации и их положения в аминокислотной последовательности. Так, было показано, что в процессе фотолиза Типа Ib (в нативных и денатурирующих условиях) происходит: (1) однократное окисление (+15.995 Да) остатков Met1 αA - и αB -кристаллина, Met68 αB -кристаллина, Trp9 αA - и αB -кристаллина, и Trp60 αB - кристаллина; (2) двухкратное окисление (+31.988 Да) Trp9 α -кристаллина и (3) образование ранее неизвестной модификации -2.017 Да на всех трех Trp, содержащихся в α -кристаллинах, и имеющей максимум поглощения на 335 нм. Скорее всего, окисление остатков Trp α -кристаллина, наблюдаемое при фотолизе типа Ib происходит по реакции 5.9 (см. главу V). Стоит отметить, что в работе были найдены и другие пептиды с модификациями, из-за низкой интенсивности которых точное положения повреждения определить не удалось. Так, например, были обнаружены Trp-содержащие пептиды с двойной модификацией (-2.017 Да + однократное окисление) и димер Tug-содержащего пептида αA -кристаллина, в котором, предположительно, образуется сшивка между двумя Tug [152].

Аналогичные модификации белка были обнаружены в случае УФ-А фотолиза типа Ia и Ib лизоцима. Несмотря на то, что высокомолекулярные агрегаты белков хрусталика, как и в случае лизоцима, являются основными продуктами фотолиза типа Ia, идентифицировать аминокислотные остатки, по которым происходит ковалентное связывание белков, в данной работе не удалось. Аминокислоты, по которым происходит окисление β - и γ -кристаллинов, а также присоединение KNA, к сожалению, установить не удалось. По-видимому, широкое многообразие природных белков и низкие интенсивности сигналов от модифицированных пептидов делают невозможным поиск и установление положения модификации на белках хрусталика в данных экспериментальных условиях.

Заключение по материалам главы VI

В главе VI представлены результаты исследования KNA-сенсibilизированного УФ-А фотолиза кристаллинов, экстрагированных из хрусталика *Bos taurus*, в анаэробных и аэробных условиях. Основываясь на данных, полученных в настоящей диссертационной работе, может быть предположен механизм взаимодействия ^1KNA с белками хрусталика. Триплетное состояние ^1KNA реагирует с аминокислотными остатками Tgr и Tug кристаллинов, которые, как было установлено ранее, являются эффективными тушителями возбужденных молекул с образованием радикалов на этих аминокислотах. Дальнейшие реакции образованных радикалов приводят к формированию различных пост-трансляционных модификаций: окислению, димеризации, ковалентному присоединению KNA к белкам и образованию иных продуктов, поглощающих в УФ-А диапазоне. Димеры белков, по-видимому, могут выступать в качестве структурных блоков для формирования агрегатов с высокой молекулярной массой. Квантовый выход деградации Tug-содержащих пептидов γ -кристаллинов (раздел 6.4.2) не превышает 5%, что хорошо согласуется с аналогичными оценками для распада Tug/Tgr-пептидов в случае α -кристаллинов [152]. Эти результаты подтверждают, что основным механизмом гибели радикалов является обратный перенос электрона.

Основным продуктом фотолиза типа I с участием KNA и кристаллинов является ковалентная сшивка белков. В настоящем исследовании не удалось определить положения ковалентных сшивок в структурах β - и γ -кристаллинов из-за широкого многообразия природных модификаций и низкой интенсивности модифицированных пептидов по сравнению с пептидами без модификаций. Предполагается, что в результате фотолиза происходит формирование ковалентных связей по остаткам Tug и Tgr, как это было обнаружено в случае модельного белка лизоцима (глава V).

Участие реакционных форм кислорода, супероксид радикала и в особенности синглетного кислорода существенно ускоряет модификацию белков, по-видимому, за счёт образования промежуточных пероксидных форм и финальных окисленных форм белков. Быстрое и эффективное образование белковых агрегатов с высокой молекулярной массой в случае фотолиза типа II указывает на то, что окисление белков существенно способствует ковалентному связыванию белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы, полученные с помощью широкого набора биохимических и физико-химических методов, позволяют сделать заключения важные для понимания роли фотоиндуцированных радикальных реакций в ткани хрусталика при нормальном старении и развитии катаракты. Многообразие протекающих реакций существенно зависит от присутствия в среде кислорода, который способен окислять радикалы KNA^{\bullet} с образованием супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$ и основного состояния KNA. В средах с низким содержанием кислорода, например, в хрусталике, радикалы KNA^{\bullet} будут преимущественно вступать в прямые реакции с радикалами белков и образованием различных продуктов реакции (тип Ia), в основном ковалентно сшитых форм белков и белок-KNA. Несмотря на низкое содержание молекулярного кислорода в ткани хрусталика, образование супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$ не исключено, что будет приводить к реакциям непрямого фотоповреждения белков (тип Ib). Реакции тип Ia приводят к значительно большим повреждениям белков, чем реакции типа Ib, в результате которых в основном происходит эффективное восстановление реагентов. Таким образом, кислород может выступать в роли защитного агента, перенаправляя радикальные реакции на восстановление системы. Несмотря на то, что в результате фотохимических реакций в клетках могут образовываться различные олигомерные и окисленные формы кристаллинов и несколько дезоксигенированных продуктов KNA, выход этих продуктов остается малым, поскольку основным каналом гибели радикалов белков и УФ-хромофоров остается обратный перенос электрона с образованием исходных реагентов. Важно отметить, что большую часть жизни индивида, в молодом и среднем возрасте, в хрусталике успешно действует система антиоксидантной защиты, которая эффективно подавляет радикальные реакции, предотвращая необратимую модификацию белков. К сожалению, в старшем возрасте эта система защиты существенно ослабевает, что делает белки значительно более восприимчивыми к фотоиндуцированным повреждениям и предрасполагает ткань хрусталика к развитию светорассеивающих областей, то есть катаракте.

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 (Trp) и тирозина (Tyr) с образованием соответствующих нейтральных радикалов. В случае α - и β -кристаллинов в реакциях участвуют сопоставимые количества остатков Trp и Tyr, в случае γ -кристаллина реакция протекает через остатки Tyr, а в случае лизоцима – остатки Trp.
2. Радикалы KNA^{\cdot} и Trp^{\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 Trp^{\cdot} с образованием димерных и олигомерных форм Trp, 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 KNA^{\cdot} и Trp^{\cdot} с образованием ковалентно связанных продуктов KNA-Trp.
3. Кислород эффективно окисляет радикал 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 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) дегградации Trp и Tyr остатков белков, (б) образованию продуктов, поглощающих в диапазоне 320-400 нм, (в) образованию димерных, тримерных и других мультимерных

форм, ковалентно связанных через остатки Thr и Tyr, (г) ковалентному присоединению КНА к белкам хрусталика.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**Статьи:**

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. **Savina E.D.**, Tsentalovich Yu.P., Sherin P.S. 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

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bloemendal H., de Jong W., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C., Tardieu A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins // *Prog Biophys Mol Biol.* - 2004. - V. 86, No. 3. - P. 407-485.
2. Truscott R.J.W., Friedrich M.G. The etiology of human age-related cataract. Proteins don't last forever // *BBA-Gen Subjects.* - 2016. - V. 1860, No. 1, Part B. - P. 192-198.
3. Bova L.M., Sweeney M.H.J., Jamie J.F., Truscott R.J.W. Major Changes in Human Ocular UV Protection with Age // *Invest Ophth Vis Sci.* - 2001. - V. 42, No. 1. - P. 200-205.
4. Heath H. The distribution and possible functions of ascorbic acid in the eye // *Exp. Eye Res.* - 1962. - V. 1, No. 4. - P. 362-367.
5. T Tsentalovich Y.P., Verkhovod T.D., Yanshole V.V., Kiryutin A.S., Yanshole L.V., Fursova A.Z., Stepanov D.A., Novoselov V.P., Sagdeev R.Z. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses // *Exp. Eye Res.* - 2015. - V. 134. - P. 15-23.
6. Truscott R.J.W., Zhu X. Presbyopia and cataract: A question of heat and time // *Prog Retin Eye Res.* - 2010. - V. 29, No. 6. - P. 487-499.
7. Pattison D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. , Photo-oxidation of proteins // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2012. - V. 11, No. 1. - P. 38-53.
8. Van Heyningen R. Fluorescent glucoside in the human lens // *Nature.* - 1971. - V. 230, No. 5293. - P. 393-394.
9. Sherin P.S., Grilj J., Tsentalovich Y.P., Vauthey E. Ultrafast excited-state dynamics of kynurenine, a UV filter of the human eye // *J. Phys. Chem. B.* - 2009. - V. 113, No. 14. - P. 4953-4962.
10. Sherin P.S., Tsentalovich Y.P., Snytnikova O.A., Sagdeev R.Z. Photoactivity of kynurenine-derived UV filters // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* - 2008. - V. 93, No. 3. - P. 127-132.
11. Tsentalovich Y.P., Snytnikova O.A., Sherin P.S., Forbes M.D.E. Photochemistry of kynurenine, a tryptophan metabolite: properties of the triplet state // *J. Phys. Chem. A.* - 2005. - V. 109, No. 16. - P. 3565-3568.
12. Zelentsova E.A., Sherin P.S., Snytnikova O.A., Kaptein R., Vauthey E., Tsentalovich Y.P. Photochemistry of aqueous solutions of kynurenic acid and kynurenine yellow // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2013. - V. 12, No. 3. - P. 546-558.
13. Źarnowski T., Rejdak R., Zielińska-Rzecka E., Zrenner E., Grieb P., Zagórski Z., Junemann A., Turski W.A. Elevated concentrations of kynurenic acid, a tryptophan derivative, in dense nuclear cataracts // *Curr. Eye Res.* - 2007. - V. 32, No. 1. - P. 27-32.
14. McCaa C.S. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. // *Environ. Health Perspect.* - 1982. - V. 44, No. - P. 1-8.

15. Kaplan H.J. Anatomy and function of the eye // *Chem Immunol Allergy*. - 2007. - V. 92.- P. 4-10.
16. Malhotra A., Minja F.J., Crum A., Burrowes D. Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye // *Semin Ultrasound CT MR*. - 2011. - V. 32, No. 1. - P. 2-13.
17. Smerdon D. Anatomy of the eye and orbit // *Current Anaesthesia & Critical Care* - 2000. - V. 11, No. 6. - P. 286-292.
18. Taylor A., Jacques P.F., Epstein E.M. Relations among aging, antioxidant status, and cataract // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1995. - V. 62, No. 6. - P. 1439S-1447S.
19. Allen D., Vasavada A. Cataract and surgery for cataract // *BMJ* - 2006. - V. 333, No. 7559. - P. 128-132.
20. Thylefors B., Négrel A.D., Pararajasegaram, R., Dadzie, K.Y. Global data on blindness. // *Bull. World Health Organ.* - 1995. - V. 73, No. 1. - P. 115-121.
21. Bron A.J., Sparrow J., Brown N.A.P., Harding J.J., Blakytyn R. The lens in diabetes // *Eye*. - 1993. - V. 7, No. 2. - P. 260-275.
22. Rowe N., Mitchell P., Cumming R.G., Wans J.J. Diabetes, fasting blood glucose and age-related cataract: the Blue Mountains Eye Study // *Ophthal Epidemiol.* - 2000. - V. 7, No. 2. - P. 103-114.
23. Kelly S.P., Thornton J., Edwards R., Sahu A., Harrison R. Smoking and cataract: Review of causal association // *J Cataract Refr Surg.* - 2005. - V. 31, No. 12. - P. 2395-2404.
24. Raju P., George R., Ramesh S.V., Arvind H., Baskaran M., Vijaya L. Influence of tobacco use on cataract development // *Br. J. Ophthalmol.* - 2006. - V. 90, No. 11. - P. 1374-1377.
25. Cumming R.G., Mitchell P., Leeder S.R. Use of Inhaled Corticosteroids and the Risk of Cataracts // *N Engl J Med.* - 1997. - V. 337, No. 1. - P. 8-14.
26. Smeeth L., Boullis M., Hubbard R., Fletcher A.E. A population based case-control study of cataract and inhaled corticosteroids // *Br. J. Ophthalmol.* - 2003. - V. 87, No. 10. - P. 1247-1251.
27. Appleby P.N., Allen N.E., Key T.J. Diet, vegetarianism, and cataract risk // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2011. - V. 93, No. 5. - P. 1128-1135.
28. Cumming R.G., Mitchell P., Smith W. Diet and cataract: The blue mountains eye study // *Ophthalmology* - 2000. - V. 107, No. 3. - P. 450-456.
29. Theodoropoulou S., Samoli E., Theodossiadis, P.G., Papathanassiou, M., Lagiou, A., Lagiou, P., Tzonou, A. Diet and cataract: a case-control study // *Int Ophthalmol.* - 2014. - V. 34, No. 1. - P. 59-68.
30. Roberts J.E. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration // *Eye & Contact Lens.* - 2011. - V. 37, No. 4. - P. 246-249.

31. Taylor H.R., West S.K., Rosenthal F.S., Muñoz B., Newland H.S., Abbey H., Emmett E.A. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation // *N Engl J Med.* - 1988. - V. 319, No. 22. - P. 1429-1433.
32. Karadag O., Kugu S., Erdogan G., Kandemir B., Eraslan O.S., Dogan O.K. Incidence of and risk factors for increased intraocular pressure after penetrating keratoplasty // *Cornea.* - 2010. - V. 29, No. 3. - P. 278–282.
33. Li L., Fan D.-B., Zhao Y.-T., Li Y., Cai F.-F., Zheng G.-Y. Surgical treatment and visual outcomes of cataract with persistent hyperplastic primary vitreous // *Int J Ophthalmol.* - 2017. - V. 10, No. 3. - P. 391-399.
34. Augusteyn R.C., Stevens A. Macromolecular structure of the eye lens // *Prog Polym Sci.* - 1998. - V. 23, No. 3. - P. 375-413.
35. de Jong W.W., Hendriks W., Mulders J.W.M., Bloemendal H. Evolution of eye lens crystallins: the stress connection // *Trends Biochem Sci.* - 1989. - V. 14, No. 9. - P. 365-368.
36. McAvoy J.W., Chamberlain C.G., de Longh R.U., Hales A.M., Lovicu F.J. Lens development // *Eye.* - 1999. - V. 13, No. 3. - P. 425-437.
37. Bassnett S. Lens organelle degradation // *Exp. Eye Res.* - 2002. - V. 74, No. 1. - P. 1-6.
38. Hoehenwarter W., Klose J., Jungblut P. R. Eye lens proteomics // *Amino Acids* - 2006. - V. 30, No. 4. - P. 369-389.
39. McNulty R., Wang H., Mathias R. T., Ortwerth B. J., Truscott R. J. W., Bassnett S. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens // *J. Physiol.* - 2004. - V. 559, No. 3. - P. 883-898.
40. Fitch C.L., Swedberg S.H., Livesey J.C. Measurement and manipulation of the partial pressure of oxygen in the rat anterior chamber // *Curr. Eye Res.* - 2000. - V. 20, No. 2. - P. 121-126.
41. Sakaue H., Negi A., Honda Y. Comparative study of vitreous oxygen tension in human and rabbit eyes. // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1989. - V. 30, No. 9. - P. 1933-1937.
42. Balasubramanian D. Ultraviolet Radiation and cataract // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* - 2000. - V. 16, No. 3. - P. 285-297.
43. Wondrak G.T., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2006. - V. 5, No. 2. - P. 215-237.
44. Stevenson K.L., Papadantonakis G.A., LeBreton P.R., Nanosecond UV laser photoionization of aqueous tryptophan: temperature dependence of quantum yield, mechanism, and kinetics of hydrated electron decay // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* - 2000. - V. 133, No. 3. - P. 159-167.
45. Tsentalovich Y.P., Snytnikova O.A., Sagdeev R.Z., Properties of excited states of aqueous tryptophan // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* - 2004. - V. 162, No. 2. - P. 371-379.

46. Collman G.W., Shore D.L., Shy C.M., Checkoway H., Luria A.S. Sunlight and other risk factors for cataracts: an epidemiologic study. // *Am. J. Public Health.* - 1988. - V. 78, No. 11. - P. 1459-1462.
47. Neale R.E., Purdie J.L., Hirst L.W., Green A.C. Sun exposure as a risk factor for nuclear cataract // *Epidemiology.* - 2003. - V. 14, No. 6. - P. 707–712.
48. West S.K., Duncan D.D., Muñoz B., Rubin G.S., Fried L.P., Bandeen-Roche K., Schein O.D. Sunlight Exposure and Risk of Lens Opacities in a Population-Based Study: The Salisbury Eye Evaluation Project // *JAMA.* - 1998. - V. 280, No. 8. - P. 714-718.
49. Francis P.J., Berry V., Moore A.T., Bhattacharya S. Lens biology: development and human cataractogenesis // *Trends Genet.* - 1999. - V. 15, No. 5. - P. 191-196.
50. Andley U.P. Crystallins in the eye: Function and pathology // *Prog Retin Eye Res.* - 2007. - V. 26, No. 1. - P. 78-98.
51. Horwitz J. The function of alpha-crystallin in vision // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2000. - V. 11, No. 1. - P. 53-60.
52. Sharma K.K., Santhoshkumar P. Lens aging: Effects of crystallins // *BBA – General Subjects.* - 2009. - V. 1790, No. 10. - P. 1095-1108.
53. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone // *PNAS.* - 1992. - V. 89, No. 21. - P. 10449-10453.
54. Bhat S.P., Nagineni C.N. α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1989. - V. 158, No. 1. - P. 319-325.
55. Dubin R.A., Wawrousek E.F., Piatigorsky J. Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. // *Mol. Cell. Biol.* - 1989. - V. 9, No. 3. - P. 1083-1091.
56. Bloemendal H., de Jong W.W. Lens proteins and their genes // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* - 1991. - V. 41. - P. 259-281.
57. Schoenmakers J.G.G., Gerding J.J.T., Bloemendal H. The subunit structure of α -crystallin // *Eur J Biochem.* - 1969. - V. 11, No. 3. - P. 472-481.
58. Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б. Структура и свойства малых белков теплового шок // *Успехи биологической химии* - 2003. - V. 43. - P. 59-98.
59. Derham B.K., Harding J.J. α -Crystallin as a molecular chaperone // *Prog Retin Eye Res.* - 1999. - V. 18, No. 4. - P. 463-509.
60. Haley D. A., Horwitz J., Stewart P. L. The small heat-shock protein, α b-crystallin, has a variable quaternary structure // Edited by P. E. Wright // *J. Mol. Biol.* - 1998. - V. 277, No. 1. - P. 27-35.

61. Andley U.P. Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology. // *Curr. Mol. Med.* - 2009. - V. 9. - P. 887-892.
62. Jobby M.K., Sharma Y. Calcium-binding to lens β B2- and β A3-crystallins suggests that all β -crystallins are calcium-binding proteins // *FEBS J.* - 2007. - V. 274, No. 16. - P. 4135-4147.
63. Liu B.-F., Liang J.J.-N. Protein-protein interactions among human lens acidic and basic β -crystallins // *FEBS Letters.* - 2007. - V. 581, No. 21. - P. 3936-3942.
64. Asomugha C.O., Gupta R., Srivastava O.P. Identification of crystallin modifications in the human lens cortex and nucleus using laser capture microdissection and CyDye labeling // *Mol. Vis.* - 2010. - V. 16. - P. 476-494.
65. Kubiak K., Kowalska M., Nowak W., Molecular dynamics study of early events during photooxidation of eye lens protein γ B-crystallin // *J. Mol. Struct.: Theochem.* - 2003. - V. 630, No. 1. - P. 315-325.
66. Slingsby C., Bateman O.A., Quaternary interactions in eye lens .beta.-crystallins: basic and acidic subunits of .beta.-crystallins favor heterologous association // *Biochemistry.* - 1990. - V. 29, No. 28. - P. 6592-6599.
67. Zhang, Z., Smith, D.L., Smith, J.B. Human β -crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate // *Exp. Eye Res.* - 2003. - V. 77, No. 3. - P. 259-272.
68. Trinkl S., Glockshuber R., Jaenicke R., Dimerization of β B2-crystallin: The role of the linker peptide and the N- and C-terminal extensions // *Protein Sci.* - 1994. - V. 3, No. 9. - P. 1392-1400.
69. Bateman, O.A., Sarra, R., van Genesen, S.T., Kappé, G., Lubsen, N.H., Slingsby, C. The stability of human acidic β -crystallin oligomers and hetero-oligomers // *Exp. Eye Res.* - 2003. - V. 77, No. 4. - P. 409-422.
70. Hejtmancik, J.F., Wingfield, P.T., Sergeev, Y.V. β -Crystallin association // *Exp. Eye Res.* - 2004. - V. 79, No. 3. - P. 377-383.
71. Liu B.-F., Liang J. J.-N. Interaction and biophysical properties of human lens Q155* betaB2-crystallin mutant // *Mol. Vis.* - 2005. - V. 11. - P. 321-327.
72. Lampi, K.J., Oxford, J.T., Bachinger, H.P., Shearer, T.R., David, L.L., Kapfer, D.M. Deamidation of Human β B1 Alters the Elongated Structure of the Dimer // *Exp. Eye Res.* - 2001. - V. 72, No. 3. - P. 279-288.
73. Wang X., Garcia C.M., Shui Y.-B., Beebe D.C. Expression and Regulation of α -, β -, and γ -Crystallins in Mammalian Lens Epithelial Cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2004. - V. 45, No. 10. - P. 3608-3619.
74. Снытникова О.А., Шерин П.С., Копылова Л.В., Центалович Ю.П. Кинетика и механизм реакций фотовозбужденного кинуренина с молекулами биологических соединений // *Известия Академии Наук. Серия Химическая* - 2007. - No. 4. - P. 704-711.

75. Hägglund P., Mariotti M., Davies M.J. Identification and characterization of protein cross-links induced by oxidative reactions // *Expert Review of Proteomics* - 2018. - V. 15, No. 8. - P. 665-681.
76. Paviani V., Galdino G.T., dos Prazeres J.N., Queiroz R.F., Augusto O. Dityryptophan Cross-Links as Novel Products of Protein Oxidation // *J. Braz. Chem. Soc.* - 2018. - V. 29, No. 5. - P. 925-933.
77. Davies M.J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2004. - V. 3, No. 1. - P. 17-25.
78. Wistow G., Turnell B., Summers L., Slingsby C., Moss D., Miller L., Lindley P., Blundell T. X-ray analysis of the eye lens protein γ -II crystallin at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* - 1983. - V. 170, No. 1. - P. 175-202.
79. Truscott R.J.W. Age-related nuclear cataract—oxidation is the key // *Exp. Eye Res.* - 2005. - V. 80, No. 5. - P. 709-725.
80. Davies M.J., Truscott R.J.W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* - 2001. - V. 63, No. 1. - P. 114-125.
81. Grossweiner L.I. Photochemistry of proteins: a Review // *Curr. Eye Res.* - 1984. - V. 3, No. 1. - P. 137-144.
82. Pileni M.P., Walrant P., Santus R. Electronic properties of N-formylkynurenine and related compounds // *J. Phys. Chem.* - 1976. - V. 80, No. 16. - P. 1804-1809.
83. Korlimbinis A., Truscott R.J.W. Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. a possible role in age-related nuclear cataract // *Biochemistry.* - 2006. - V. 45, No. 6. - P. 1950-1960.
84. Mizdrak J., Hains P.G., Truscott R.J.W., Jamie J.F., Davies M.J. Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage // *Free Radic. Biol. Med.* - 2008. - V. 44, No. 6. - P. 1108-1119.
85. Parker N.R., Korlimbinis A., Jamie J.F., Davies M.J., Truscott R.J.W. Reversible binding of kynurenine to lens proteins: potential protection by glutathione in young lenses // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2007. - V. 48, No. 8. - P. 3705-3713.
86. Vazquez S., Aquilina J.A., Jamie J.F., Sheil M.M., Truscott R.J.W. Novel protein modification by kynurenine in human lenses // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277, No. 7. - P. 4867-4873.
87. Carroll L., Pattison D.I., Davies J.B., Anderson R.F., Lopez-Alarcon C., Davies M.J. Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins // *Free Radic. Biol. Med.* - 2017. - V. 113, No. - P. 132-142.
88. Carroll L., Pattison D.I., Davies J.B., Anderson R.F., Lopez-Alarcon C., Davies M.J. Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products // *Free Radic. Biol. Med.* - 2018. - V. 118. - P. 126-136.

89. Bobrowski K., Holcman J., Poznanski J., Wierzchowski K.L. Pulse radiolysis studies of intramolecular electron transfer in model peptides and proteins. 7. Trp• → TyrO• radical transformation in hen egg-white lysozyme. Effects of pH, temperature, Trp62 oxidation and inhibitor binding // *Biophys Chem.* - 1997. - V. 63, No. 2. - P. 153-166.
90. Butler J., Land E.J., Prütz W.A., Swallow A.J. Charge transfer between tryptophan and tyrosine in proteins // *Biochim. Biophys. Acta. - Protein Structure and Molecular Enzymology.* - 1982. - V. 705, No. 2. - P. 150-162.
91. Faraggi M., DeFelippis M.R., Klapper M.H. Long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in peptides // *J. Am. Chem. Soc.* - 1989. - V. 111, No. 14. - P. 5141-5145.
92. Prütz W.A., Siebert F., Butler J., Land E.J., Menez A., Montenay-Garestier T. Charge transfer in peptides: Intramolecular radical transformations involving methionine, tryptophan and tyrosine // *Biochim. Biophys. Acta. - Protein Structure and Molecular Enzymology.* - 1982. - V. 705, No. 2. - P. 139-149.
93. Grosvenor A.J., Morton J.D., Dyer J.M. Profiling of residue-level photo-oxidative damage in peptides // *Amino Acids.* - 2010. - V. 39, No. 1. - P. 285-296.
94. Grosvenor A.J., Morton J.D., Dyer J.M. Isobaric labeling approach to the tracking and relative quantitation of peptide damage at the primary structural level // *J. Agric. Food Chem.* - 2010. - V. 58, No. 24. - P. 12672-12677.
95. Parker N.R., Jamie J.F., Davies M.J., Truscott R.J.W. Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage // *Free Radic. Biol. Med.* - 2004. - V. 37, No. 9. - P. 1479-1489.
96. Balasubramanian D., Du X., Zigler J.S. The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins // *J. Photochem. Photobiol.* - 1990. - V. 52, No. 4. - P. 761-768.
97. Fujimori E. Crosslinking and blue-fluorescence of photo-oxidized calf-lens α -crystallin // *Exp. Eye Res.* - 1982. - V. 34, No. 3. - P. 381-388.
98. Grover D., Zigman S. Coloration of human lenses by near ultraviolet photo-oxidized tryptophan // *Exp. Eye Res.* - 1972. - V. 13, No. 1. - P. 70-76.
99. Borkman R.F., Knight G., Obi B. The molecular chaperone α -crystallin inhibits uv-induced protein aggregation // *Exp. Eye Res.* - 1996. - V. 62, No. 2. - P. 141-148.
100. McDermott M., Chiesa R., Roberts J.E., Dillon J. Photooxidation of specific residues in α -crystallin polypeptides // *Biochemistry.* - 1991. - V. 30, No. 35. - P. 8653-8660.
101. Finley E.L., Busman M., Dillon J., Crouch R.K., Schey K.L. Identification of photooxidation sites in bovine α -crystallin // *J. Photochem. Photobiol.* - 1997. - V. 66, No. 5. - P. 635-641.
102. Truscott R.J.W., Wood A.M., Carver J.A., Sheil M.M., Stutchbury G.M., Zhu J., Kilby G.W. A new UV-filter compound in human lenses // *FEBS Letters.* - 1994. - V. 348, No. 2. - P. 173-176.

103. Wood A.M., Truscott R.J.W. UV filters in human lenses: tryptophan catabolism // *Exp. Eye Res.* - 1993. - V. 56, No. 3. - P. 317-325.
104. Kopylova L.V., Snytnikova O.A., Chernyak E.I., Morozov S.V., Tsentalovich Y.P. UV filter decomposition. A study of reactions of 4-(2-aminophenyl)-4-oxocrotonic acid with amino acids and antioxidants present in the human lens // *Exp. Eye Res.* - 2007. - V. 85, No. 2. - P. 242-249.
105. Taylor L.M., Aquilina J.A., Jamie J.F., Truscott R.J.W. UV filter instability: consequences for the human lens // *Exp. Eye Res.* - 2002. - V. 75, No. 2. - P. 165-175.
106. Sherin P.S., Grilj J., Kopylova L.V., Yanshole V.V., Tsentalovich Y.P., Vauthey E. Photophysics and photochemistry of the uv filter kynurenine covalently attached to amino acids and to a model protein // *J. Phys. Chem. B.* - 2010. - V. 114, No. 36. - P. 11909-11919.
107. Staniszewska M., Nagaraj R.H. Detection of kynurenine modifications in proteins using a monoclonal antibody // *J Immunol Methods.* - 2007. - V. 324, No. 1. - P. 63-73.
108. Tsentalovich Y.P., Sherin P.S., Kopylova L.V., Cherepanov I.V., Grilj J., Vauthey E. Photochemical properties of uv filter molecules of the human eye // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2011. - V. 52, No. 10. - P. 7687-7696.
109. Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Kynurenine binds to the peptide binding region of the chaperone α B-crystallin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2001. - V. 285, No. 5. - P. 1107-1113.
110. Vazquez S., Parker N.R., Sheil M., Truscott R.J.W. Protein-bound kynurenine decreases with the progression of age-related nuclear cataract // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2004. - V. 45, No. 3. - P. 879-883.
111. Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Identifying sites of attachment of UV filters to proteins in older human lenses // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology.* - 2002. - V. 1596, No. 1. - P. 6-15.
112. Korlimbinis A., Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Protein-bound and free UV filters in cataract lenses. The concentration of UV filters is much lower than in normal lenses // *Exp. Eye Res.* - 2007. - V. 85, No. 2. - P. 219-225.
113. Chiesa R., Gawinowicz-Kolks M.A., Spector A. The phosphorylation of the primary gene products of alpha-crystallin // *J Biol Chem.* - 1987. - V. 262, No. 4. - P. 1438-1441.
114. Spector A., Chiesa R., Sredy J., Garner W. cAMP-dependent phosphorylation of bovine lens alpha-crystallin // *PNAS.* - 1985. - V. 82, No. 14. - P. 4712-4716.
115. Voorter C.E.M., Mulders J.W.M., Bloemendal H., de Jong W.W. Some aspects of the phosphorylation of α -crystallin A // *Eur J Biochem.* - 1986. - V. 160, No. 1. - P. 203-210.
116. Miesbauer L.R., Zhou X., Yang Z., Yang Z., Sun Y., Smith D.L., Smith J.B. Post-translational modifications of water-soluble human lens crystallins from young adults // *J Biol Chem.* - 1994. - V. 269, No. 17. - P. 12494-12502.

117. Chiesa R., Gawinowicz-Kolks M.A., Kleiman N.J., Spector A. Definition and comparison of the phosphorylation sites of the A and B chains of bovine α -crystallin // *Exp. Eye Res.* - 1988. - V. 46, No. 2. - P. 199-208.
118. Chiesa R., Spector A. The dephosphorylation of lens α -crystallin a chain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1989. - V. 162, No. 3. - P. 1494-1501.
119. Chiesa R., Gawinowicz-Kolks M.A., Kleiman N.J., Spector A. The phosphorylation sites of the B2 chain of bovine α -crystallin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1987. - V. 144, No. 3. - P. 1340-1347.
120. Smith J.B., Sun Y., Smith D.L., Green B. Identification of the posttranslational modifications of bovine lens α B-crystallins by mass spectrometry // *Protein Sci.* - 1992. - V. 1, No. 5. - P. 601-608.
121. Voorter C.E.M., de Haard-Hoekman W.A., Roersma E.S., Meyer H.E., Bloemendal H., de Jong W.W. The in vivo phosphorylation sites of bovine α B-crystallin // *FEBS Letters.* - 1989. - V. 259, No. 1. - P. 51-52.
122. Kleiman N.J., Chiesa R., Kolks M.A., Spector A. Phosphorylation of beta-crystallin B2 (beta Bp) in the bovine lens. // *J Biol Chem.* - 1988. - V. 263, No. 29. - P. 14978-14983.
123. MacCoss M.J., McDonald W.H., Saraf A., Sadygov R., Clark J.M., Tasto J.J., Gould K.L., Wolters D., Washburn M., Weiss A., Clark J.I., Yates J.R. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue // *PNAS.* - 2002. - V. 99, No. 12. - P. 7900-7905.
124. Hains P.G., Truscott R.J.W. Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses // *J. Proteome Res.* - 2007. - V. 6, No. 10. - P. 3935-3943.
125. Gupta R., Srivastava O.P. Deamidation affects structural and functional properties of human α A-crystallin and its oligomerization with α B-crystallin // *J Biol Chem.* - 2004. - V. 279, No. 43. - P. 44258-44269.
126. Srivastava O.P., Srivastava K. Existence of deamidated α B-crystallin fragments in normal and cataractous human lenses // *Mol. Vis.* - 2003. - V., No. - P. 9.
127. Wilmarth P.A., Tanner S., Dasari S., Nagalla S.R., Riviere M.A., Bafna V., Pevzner P. A., David L.L., Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? // *J. Proteome Res.* - 2006. - V. 5, No. 10. - P. 2554-2566.
128. Lampi K.J., Amyx K.K., Ahmann P., Steel E.A., Deamidation in human lens β B2-crystallin destabilizes the dimer // *Biochemistry.* - 2006. - V. 45, No. 10. - P. 3146-3153.
129. Lund A.L., Smith J.B., Smith D.L. Modifications of the water-insoluble human lens α -crystallins // *Exp. Eye Res.* - 1996. - V. 63, No. 6. - P. 661-672.

130. Chaves J.M., Srivastava K., Gupta R., Srivastava O.P., Structural and functional roles of deamidation and/or truncation of n- or c-termini in human α A-crystallin // *Biochemistry*. - 2008. - V. 47, No. 38. - P. 10069-10083.
131. Gupta R., Srivastava O.P. Effect of deamidation of asparagine 146 on functional and structural properties of human lens α B-crystallin // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2004. - V. 45, No. 1. - P. 206-214.
132. Feng J., Smith D.L., Smith J.B. Human lens β -crystallin solubility // *J Biol Chem.* - 2000. - V. 275, No. 16. - P. 11585-11590.
133. Hanson S.R.A., Smith D.L., Smith J.B. Deamidation and disulfide bonding in human lens γ -crystallins // *Exp. Eye Res.* - 1998. - V. 67, No. 3. - P. 301-312.
134. Groenen P.J.T.A., Merck K.B., de Jong W.W., Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone α -crystallin. From lens transparency to molecular pathology // *Eur. J. Biochem.* - 1994. - V. 225. - P. 1-19.
135. Kamei A., Iwase H., Masuda K. Cleavage of amino acid residue(s) from the n-terminal region of α A- and α B-crystallins in human crystalline lens during aging // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1997. - V. 231, No. 2. - P. 373-378.
136. Takemoto L.J. Identification of the in vivo truncation sites at the C-terminal region of alpha-A crystallin from aged bovine and human lens // *Curr. Eye Res.* - 1995. - V. 14, No. 9. - P. 837-841.
137. Takemoto L.J., Quantitation of specific cleavage sites at the C-terminal region of alpha-A crystallin from human lenses of different age // *Exp. Eye Res.* - 1998. - V. 66, No. 2. - P. 263-266.
138. Ma Z., Hanson S.R.A., Lampi K.J., David L.L., Smith D.L., Smith J.B. Age-related changes in human lens crystallins identified by hplc and mass spectrometry // *Exp. Eye Res.* - 1998. - V. 67, No. 1. - P. 21-30.
139. Hanson S.R.A., Hasan A., Smith D.L., Smith J.B. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage // *Exp. Eye Res.* - 2000. - V. 71, No. 2. - P. 195-207.
140. David L.L., Lampi K.J., Lund A.L., Smith J.B. The sequence of human B1-crystallin cDNA allows mass spectrometric detection of B1 protein missing portions of its N-terminal extension // *J Biol Chem.* - 1996. - V. 271, No. 8. - P. 4273-4279.
141. Lampi K.J., Ma Z., Shih M., Shearer T. R., Smith J., Smith D.L., David L.L. Sequence analysis of β A3, β B3, and β A4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens // *J Biol Chem.* - 1997. - V. 272, No. 4. - P. 2268-2275.
142. Ajaz M.S., Ma Z., Smith D.L., Smith J.B. Size of human lens β -crystallin aggregates are distinguished by N-terminal truncation of β B1 // *J Biol Chem.* - 1997. - V. 272, No. 17. - P. 11250-11255.

143. Kim Y.H., Kapfer D.M., Boekhorst J., Lubsen N.H., Bächinger H.P., Shearer T.R., David L.L., Feix J.B., Lampi K.J. Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, β 1-crystallin // *Biochemistry*. - 2002. - V. 41, No. 47. - P. 14076-14084.
144. Lampi K.J., Kim Y.H., Bächinger H.P., Boswell B.A., Lindner R.A. Decreased heat stability and increased chaperone requirement of modified human β B1-crystallins // *Mol. Vis.* - 2002. - V. 8, No. - P. 359-366.
145. Truscott R.J.W., Schey K.L., Friedrich M.G. Old Proteins in man: A field in its infancy // *Trends Biochem Sci.* - 2016. - V. 41, No. 8. - P. 654-664.
146. Aeschbach R., Amadò R., Neukom H. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1976. - V. 439, No. 2. - P. 292-301.
147. Shen H.-R., Spikes J.D., Smith C.J., Kopeček J. Photodynamic cross-linking of proteins: V. Nature of the tyrosine-tyrosine bonds formed in the FMN-sensitized intermolecular cross-linking of N-acetyl-l-tyrosine // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* - 2000. - V. 133, No. 1. - P. 115-122.
148. Medinas D.B., Gozzo F.C., Santos L.F.A., Iglesias A.H., Augusto O. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity // *Free Radic. Biol. Med.* - 2010. - V. 49, No. 6. - P. 1046-1053.
149. Paviani V., Queiroz R.F., Marques E.F., Di Mascio P., Augusto O. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme // *Free Radic. Biol. Med.* - 2015. - V. 89, No. - P. 72-82.
150. Marques E.F., Medeiros M.H.G., Mascio P.D., Singlet oxygen-induced protein aggregation: Lysozyme crosslink formation and nLC-MS/MS characterization // *J. Mass Spectrom.* - 2019. - V. 54, No. 11. - P. 894-905.
151. Linetsky M., Hill J.M.W., LeGrand R.D., Hu F. Dehydroalanine crosslinks in human lens // *Exp. Eye Res.* - 2004. - V. 79, No. 4. - P. 499-512.
152. Sherin P.S., Zelentsova E.A., Sormacheva E.D., Yanshole V.V., Duzhak T.G., Tsentalovich Y.P. Aggregation of α -crystallins in kynurenic acid-sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2016. - V. 18, No. 13. - P. 8827-8839.
153. Kanwar R., Balasubramanian D. Structure and stability of the dityrosine-linked dimer of γ b-crystallin // *Exp. Eye Res.* - 1999. - V. 68, No. 6. - P. 773-784.
154. Li D.-Y., Borkman R.F., Wang R.-H., Dillon J. Mechanisms of photochemically produced turbidity in lens protein solutions // *Exp. Eye Res.* - 1990. - V. 51, No. 6. - P. 663-669.
155. Jedziniak J.A., Kinoshita J.H., Yates E.M., Hocker L.O., Benedek G.B. Calcium-induced aggregation of bovine lens alpha crystallins // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1972. - V. 11, No. 11. - P. 905-915.

156. Mach H., Trautman P.A., Thomson J.A., Lewis R.V., Middaugh C.R. Inhibition of alpha-crystallin aggregation by gamma-crystallin // *J Biol Chem.* - 1990. - V. 265, No. 9. - P. 4844-4848.
157. Sharma K.K., Kester K. Peptide hydrolysis in lens: role of leucine aminopeptidase, aminopeptidase III, prolyloligopeptidase and acylpeptidehydrolase // *Curr. Eye Res.* - 1996. - V. 15, No. 4. - P. 363-369.
158. Sharma K.K., Ortwerth B.J. Aminopeptidase III activity in normal and cataractous lenses // *Curr. Eye Res.* - 1986. - V. 5, No. 5. - P. 373-380.
159. Srivastava O.P. Age-related increase in concentration and aggregation of degraded polypeptides in human lenses // *Exp. Eye Res.* - 1988. - V. 47, No. 4. - P. 525-543.
160. Srivastava O.P., Srivastava K., Silney C. Levels of crystallin fragments and identification of their origin in water soluble high molecular weight (HMW) proteins of human lenses // *Curr. Eye Res.* - 1996. - V. 15, No. 5. - P. 511-520.
161. Santhoshkumar P., Udupa P., Murugesan R., Sharma K. K. Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation // *J Biol Chem.* - 2008. - V. 283, No. 13. - P. 8477-8485.
162. Santhoshkumar P., Raju M., Sharma K.K. α A-crystallin peptide SDRDKFVIFLDVKHF accumulating in aging lens impairs the function of α -crystallin and induces lens protein aggregation // *PloS One.* - 2011. - V. 6, No. 4. - P. e19291.
163. Rose R.C., Richer S.P., Bode A.M. Ocular oxidants and antioxidant protection // *Exp Biol Med.* - 1998. - V. 217, No. 4. - P. 397-407.
164. Boscia F., Grattagliano I., Vendemiale G., Micelli-Ferrari T., Altomare E. Protein oxidation and lens opacity in humans // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2000. - V. 41, No. 9. - P. 2461-2465.
165. Stefek M., Kyselova Z., Rackova L., Krizanova L. Oxidative modification of rat eye lens proteins by peroxy radicals in vitro: Protection by the chain-breaking antioxidants stobadine and Trolox // *BBA – Molecular Basis of Disease.* - 2005. - V. 1741, No. 1. - P. 183-190.
166. Varma S.D., Beachy N.A., Richards R.D. Photoperoxidation of lens lipids: prevention by vitamin E // *J. Photochem. Photobiol.* - 1982. - V. 36, No. 6. - P. 623-626.
167. Rathbun W.B., Murray D.L. Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens // *Exp. Eye Res.* - 1991. - V. 53, No. 2. - P. 205-212.
168. Goodenough D.A. The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication // *Semin. Cell Biol.* - 1992. - V. 3, No. 1. - P. 49-58.
169. Reim M., Heuvels B., Cattepoel H. Glutathione Peroxidase in some ocular tissues // *Ophthal Res.* - 1974. - V. 6, No. 2-4. - P. 228-234.

170. Yu B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species // *Physiol. Rev.* - 1994. - V. 74, No. 1. - P. 139-162.
171. Thiagarajan R., Manikandan R. Antioxidants and cataract // *Free Radic. Res.* - 2013. - V. 47, No. 5. - P. 337-345.
172. Varma S.D., Ets T.K., Richards R.D. Protection against Superoxide Radicals in Rat Lens // *Ophthal Res.* - 1977. - V. 9, No. 6. - P. 421-431.
173. Linetsky M., Raghavan C.T., Johar K., Fan X., Monnier V.M., Vasavada A.R., Nagaraj R. H. UVA light-excited kynurenines oxidize ascorbate and modify lens proteins through the formation of advanced glycation end products implications for human lens aging and cataract formation // *J Biol Chem.* - 2014. - V. 289, No. 24. - P. 17111-17123.
174. Fan X., Reneker L.W., Obrenovich M.E., Strauch C., Cheng R., Jarvis S.M., Ortwerth B.J., Monnier V.M. Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model // *PNAS.* - 2006. - V. 103, No. 45. - P. 16912-16917.
175. Christen W.G., Glynn R.J., Sesso H.D., Kurth T., MacFadyen J., Bubes V., Buring J.E., Manson J.E., Gaziano J.M., Age-related cataract in a randomized trial of vitamins E and C in men // *Arch Ophthalmol.* - 2010. - V. 128, No. 11. - P. 1397-1405.
176. Fan X., Xiaoqin L., Potts B., Strauch C.M., Nemet I., Monnier V.M. Topical application of L-arginine blocks advanced glycation by ascorbic acid in the lens of hSVCT2 transgenic mice // *Mol. Vis.* - 2011. - V. 17. - P. 2221-2227.
177. Garland D., Zigler J.S., Kinoshita J. Structural changes in bovine lens crystallins induced by ascorbate, metal, and oxygen // *Arch Biochem Biophys.* - 1986. - V. 251, No. 2. - P. 771-776.
178. Cooper G. F., Robson J. G. The yellow colour of the lens of man and other primates // *J. Physiol.* - 1969. - V. 203, No. 2. - P. 411-417.
179. van Heyningen R. Photo-oxidation of lens proteins by sunlight in the presence of fluorescent derivatives of kynurenine, isolated from the human lens // *Exp. Eye Res.* - 1973. - V. 17, No. 2. - P. 137-147.
180. Takikawa O., Littlejohn T.K., Truscott R.J.W. Indoleamine 2,3-dioxygenase in the Human Lens, the First Enzyme in the Synthesis of UV Filters // *Exp. Eye Res.* - 2001. - V. 72, No. 3. - P. 271-277.
181. Wood A.M., Truscott R.J.W. Ultraviolet filter compounds in human lenses: 3-hydroxykynurenine glucoside formation // *Vision Res.* - 1994. - V. 34, No. 11. - P. 1369-1374.
182. Chen Y., Guillemin G.J. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States // *Int J Tryptophan Res.* - 2009. - V. 2. - P. 1-19.

183. Nakazawa Y., Takehana M., Oka M., Shibuya F., Katakawa J., Sano Y. UV-B irradiation-induced electron transfer between 3-hydroxy-kynurenine and tryptophan // *J. Biol. Macromol.* - 2009. - V. 9, No. 1. - P. 13-22.
184. Pawlak D., Brzóska M., Zwierz K., Stypułkowska A., Moniuszko-Jakoniuk J. Can kynurenine pathway tryptophan metabolites be used to monitor cadmium exposure? // *Pol J Environ Stud.* - 2005. - V. 14, No. 2. - P. 209-215.
185. Robotka H., Toldi J., Vécsei L. L-kynurenine: metabolism and mechanism of neuroprotection // *Future Neurology.* - 2008. - V. 3, No. 2. - P. 169-188.
186. Moffat B.A., Landman K.A., Truscott R.J.W., Sweeney M.H.J., Pope J.M., Age-related changes in the kinetics of water transport in normal human lenses // *Exp. Eye Res.* - 1999. - V. 69, No. 6. - P. 663-669.
187. Sweeney M.H.J., Truscott R.J.W. An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract // *Exp. Eye Res.* - 1998. - V. 67, No. 5. - P. 587-595.
188. Dillon J., Atherton S.J. Time resolved spectroscopic studies on the intact human lens // *J. Photochem. Photobiol.* - 1990. - V. 51, No. 4. - P. 465-468.
189. Lerman S., Borkman R. Spectroscopic evaluation and classification of the normal, aging, and cataractous lens. (With 1 color plate) // *Ophthal Res.* - 1976. - V. 8, No. 5. - P. 335-353.
190. Truscott R.J.W. Human cataract: the mechanisms responsible; light and butterfly eyes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2003. - V. 35, No. 11. - P. 1500-1504.
191. Egorov S., Babizhaev M., Krasnovsky Jr A., Shvedova A. Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by endogenous substances of the eye lens // *Biofizika.* - 1987. - V. 32. - P. 169-71.
192. Krishna C. M., Uppuluri S., Riesz P. r., Samuel Zigler Jr J., Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents // *J. Photochem. Photobiol.* - 1991. - V. 54, No. 1. - P. 51-58.
193. Tsentalovich Y.P., Snytnikova O.A., Forbes M.D.E., Chernyak E.I., Morozov S.V. Photochemical and thermal reactivity of kynurenine // *Exp. Eye Res.* - 2006. - V. 83, No. 6. - P. 1439-1445.
194. Sherin P.S., Gritsan N.P., Tsentalovich Y.P. Experimental and quantum chemical study of photochemical properties of 4-hydroxyquinoline // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2009. - V. 8, No. 11. - P. 1550-1557.
195. Zelentsova E.A., Sherin P.S., Tsentalovich Y.P., Sagdeev R.Z., Influence of medium viscosity on photophysical properties of kynurenic acid and kynurenine yellow // *Russian Chemical Bulletin.* - 2017. - V. 66, No. 2. - P. 267-272.

196. Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Cysteine Is the initial site of modification of α -crystallin by kynurenine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2000. - V. 276, No. 1. - P. 216-223.
197. Zádori D., Klivényi P., Vámos E., Fülöp F., Toldi J., Vécsei L. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies // *J. Neural Transm.* - 2009. - V. 116, No. 11. - P. 1403-1409.
198. Lugo-Huitrón R., Blanco-Ayala T., Ugalde-Muñiz P., Carrillo-Mora P., Pedraza-Chaverrí J., Silva-Adaya D., Maldonado P. D., Torres I., Pinzón E., Ortiz-Islas E., López T., García E., Pineda B., Torres-Ramos M., Santamaría A., La Cruz V. P.-D. On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress // *Neurotoxicol. Teratol.* - 2011. - V. 33, No. 5. - P. 538-547.
199. Milart P., Urbanska E.M., Turski W.A., Paszkowski T., Sikorski R., Kynurenine aminotransferase I activity in human placenta // *Placenta.* - 2001. - V. 22, No. 2. - P. 259-261.
200. Moroni F., Russi P., Lombardi G., Beni M., Carlà V. Presence of Kynurenic Acid in the Mammalian Brain // *J. Neurochem.* - 1988. - V. 51, No. 1. - P. 177-180.
201. Stone T.W. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2000. - V. 21, No. 4. - P. 149-154.
202. Turski W.A., Nakamura M., Todd W.P., Carpenter B.K., Whetsell W.O., Schwarcz R. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue // *Brain Res.* - 1988. - V. 454, No. 1. - P. 164-169.
203. Kanth V.R., Lavanya K., Srinivas J. Elevated expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and accumulation of kynurenic acid in the pathogenesis of stz-induced diabetic cataract in wistar rats // *Curr. Eye Res.* - 2009. - V. 34, No. 4. - P. 274-281.
204. Pileni M.P., Giraud M., Santus R. Kynurenic acid — I. Spectroscopic properties // *J. Photochem. Photobiol.* - 1979. - V. 30, No. 2. - P. 251-256.
205. Pileni M.P., Giraud M., Santus R. Kynurenic acid — II. Photosensitizing properties // *J. Photochem. Photobiol.* - 1979. - V. 30, No. 2. - P. 257-261.
206. Zhuravleva Y.S., Tsentalovich Y.P. Acid-alkaline properties of triplet state and radical of kynurenic acid // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* - 2018. - V. 365, No. - P. 7-12.
207. Эмануэль Н.М., Кузьмина М.Г. Экспериментальные методы химической кинетики // Изд-во Московского университета. - 1985 - Москва.
208. Rousseva L.A., Gaillard E.R., Paik D.C., Merriam J.C., Ryzhov V., Garland D., Dillon J.P. Oxindolealanine in age-related human cataracts // *Exp. Eye Res.* - 2007. - V. 85, No. 6. - P. 861-868.
209. Nakagawa M., Kato, S., Kataoka, S., Kodato, S., Watanabe, H., Okajima, H., Hino, T., Witkop, B. Dye-sensitized photooxygenation of tryptophan:3 α -hydroperoxypyrroloindole as a labile precursor of formylkynurenine // *Chem. Pharm. Bull.* - 1981. - V. 29, No. 4. - P. 1013-1026.

210. Nakagawa M., Kato S., Kataoka S., Hino T. 3a-Hydroperoxypyrroloindole from tryptophan. Isolation and transformation to formylkynurenine // *J. Am. Chem. Soc.* - 1979. - V. 101, No. 11. - P. 3136-3137.
211. Fabian W.M.F., Niederreiter K.S., Uray G., Stadlbauer W. Substituent effects on absorption and fluorescence spectra of carbostyrils // *J. Mol. Struct.* - 1999. - V. 477, No. 1. - P. 209-220.
212. Mason S.F. The tautomerism of N-heteroaromatic hydroxy-compounds. Part II. Ultraviolet spectra // *J. Chem. Soc. (Resumed)*. - 1957. - P. 5010-5017.
213. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. - 1970. - V. 227, No. 5259. - P. 680-685.
214. Ibrahim H.R., Matsuzaki T., Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function // *FEBS Letters*. - 2001. - V. 506, No. 1. - P. 27-32.
215. Medzihradszky K.F., In-solution digestion of proteins for mass spectrometry, methods in enzymology // *Academic Press*. - 2005. - V. 405. - P. 50-65.
216. UniProt <https://www.uniprot.org/>.
217. Yanshole V.V., Snytnikova O.A., Kiryutin A.S., Yanshole L.V., Sagdeev R.Z., Tsentalovich Y.P. Metabolomics of the rat lens: A combined LC-MS and NMR study // *Exp. Eye Res.* - 2014. - V. 125. - P. 71-78.
218. Bassnett S., Duncan G. Direct measurement of pH in the rat lens by ion-sensitive microelectrodes // *Exp. Eye Res.* - 1985. - V. 40, No. 4. - P. 585-590.
219. Kawahara K., Tanford C. Viscosity and density of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride // *J Biol Chem.* - 1966. - V. 241, No. 13. - P. 3228-3232.
220. Bent D.V., Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan // *J. Am. Chem. Soc.* - 1975. - V. 97, No. 10. - P. 2612-2619.
221. Bryant F.D., Santus R., Grossweiner L.I. Laser flash photolysis of aqueous tryptophan // *J. Phys. Chem.* - 1975. - V. 79, No. 25. - P. 2711-2716.
222. Bent D.V., Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. I. Tyrosine // *J. Am. Chem. Soc.* - 1975. - V. 97, No. 10. - P. 2599-2606.
223. Stuart-Audette M., Blouquit Y., Faraggi M., Sicard-Roselli C., Houée-Levin C., Jollès P. Re-evaluation of intramolecular long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in lysozymes // *Eur J Biochem.* - 2003. - V. 270, No. 17. - P. 3565-3571.
224. Weinstein M., Alfassi Z.B., DeFelippis M.R., Klapper M.H., Faraggi M. Long range electron transfer between tyrosine and tryptophan in hen egg-white lysozyme // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. - 1991. - V. 1076, No. 2. - P. 173-178.

225. Morozova O.B., Hore P.J., Sagdeev R.Z., Yurkovskaya A.V. Intramolecular Electron transfer in lysozyme studied by time-resolved chemically induced dynamic nuclear polarization // *J. Phys. Chem. B.* - 2005. - V. 109, No. 46. - P. 21971-21978.
226. Tsentalovich Y.P., Morozova O.B., Yurkovskaya A.V., Hore P.J. Kinetics and mechanism of the photochemical reaction of 2,2'-dipyridyl with tryptophan in water: time-resolved CIDNP and laser flash photolysis study // *J. Phys. Chem. A.* - 1999. - V. 103, No. 27. - P. 5362-5368.
227. Thomas A.H., Serrano M.P., Rahal V., Vicendo P., Claparols C., Oliveros E., Lorente C. Tryptophan oxidation photosensitized by pterin // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. - V. 63. - P. 467-475.
228. Candeias L.P., Wardman P., Mason R.P. The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid // *Biophys Chem.* - 1997. - V. 67, No. 1. - P. 229-237.
229. Fang X., Jin F., Jin H., von Sonntag C. Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from N -acetyltryptophan methyl ester // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* - 1998. - P. 259-264.
230. Matheson I.B.C., Etheridge R.D., Kratowich N.R., Lee J. The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins // *J. Photochem. Photobiol.* - 1975. - V. 21, No. 3. - P. 165-171.
231. Pileni M.-P., Santus R., Land E.J. On the photosensitizing properties of n-formylkynurenine and related compounds // *J. Photochem. Photobiol.* - 1978. - V. 28, No. 4-5. - P. 525-529.
232. Posener M.L., Adams G.E., Wardman P., Cundall R.B. Mechanism of tryptophan oxidation by some inorganic radical-anions: a pulse radiolysis study // *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1.* - 1976. - V. 72. - P. 2231-2239.
233. Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. an expanded and revised compilation // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* - 1995. - V. 24, No. 2. - P. 663-677.
234. MassBank Record (www.massbank.jp), KO003170.
235. Gracanin M., Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products // *Free Radic. Biol. Med.* - 2009. - V. 47, No. 1. - P. 92-102.
236. Ronsein G.E., de Oliveira M.C.B., de Medeiros M.H.G., Di Mascio P. Characterization of O₂ (1Δg)-derived oxidation products of tryptophan: A combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* - 2009. - V. 20, No. 2. - P. 188-197.
237. Ronsein G.E., Oliveira M.C.B., Miyamoto S., Medeiros M.H.G., Di Mascio P. Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O₂ (1Δg)]: mechanistic studies using ¹⁸O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements // *Chem. Res. Toxicol.* - 2008. - V. 21, No. 6. - P. 1271-1283.

238. Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // *Biochem. J.* - 2016. - V. 473, No. 7. - P. 805-825.
239. Domingues M.R.M., Domingues P., Reis A., Fonseca C., Amado F.M.L., Ferrer-Correia A.J.V. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* - 2003. - V. 14, No. 4. - P. 406-416.
240. Maskos Z., Rush J.D., Koppenol W.H. The hydroxylation of tryptophan // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1992. - V. 296, No. 2. - P. 514-520.
241. Leo G., Altucci C., Bourgoïn-Voillard S., Gravagnuolo A.M., Esposito R., Marino G., Costello C.E., Velotta R., Birolo L. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* - 2013. - V. 27, No. 14. - P. 1660-1668.
242. Andley U.P., Sutherland P., Liang J.N., Chakrabarti B. Changes in tertiary structure of calf-lens α -crystallin by near-uv irradiation: Role of hydrogen peroxide // *J. Photochem. Photobiol.* - 1984. - V. 40, No. 3. - P. 343-349.
243. Mandal K., Kono M., Bose S.K., Thomson J., Chakrabarti B. Structure and stability of γ -crystallins-IV. Aggregation and structural destabilization in photosensitized reactions // *J. Photochem. Photobiol.* - 1988. - V. 47, No. 4. - P. 583-591.
244. Jin F., Leitich J., Sonntag C. The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* - 1993. - V., No. 9. - P. 1583-1588.
245. Dunker A.K., Kenyon A.J. Mobility of sodium dodecyl sulphate - protein complexes // *Biochem. J.* - 1976. - V. 153, No. 2. - P. 191-197.
246. Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins // *PNAS.* - 2009. - V. 106, No. 6. - P. 1760-1765.
247. Silva E., Barrias P., Fuentes-Lemus E., Tirapegui C., Aspee A., Carroll L., Davies M.J., López-Alarcón C. Riboflavin-induced Type 1 photo-oxidation of tryptophan using a high intensity 365 nm light emitting diode // *Free Radic. Biol. Med.* - 2019. - V. 131, No. - P. 133-143.
248. Borkman R.F., McLaughlin J. The molecular chaperone function of α -crystallin is impaired by uv photolysis // *J. Photochem. Photobiol.* - 1995. - V. 62, No. 6. - P. 1046-1051.
249. Davies M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2003. - V. 305, No. 3. - P. 761-770.
250. Nakagawa M., Watanabe H., Kodato S., Okajima H., Hino T., Flippen J.L., Witkop B. A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine—25 years later // *PNAS.* - 1977. - V. 74, No. 11. - P. 4730-4733.

251. Fuentes-Lemus E., Mariotti M., Hägglund P., Leinisch F., Fierro A., Silva E., López-Alarcón C., Davies M.J. Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and cross-linking reactions involving tyrosine and tryptophan // *Free Radic. Biol. Med.* - 2019. - V. 143. - P. 375-386.
252. Alarcón E., Edwards A.M., Aspée A., Borsarelli C.D., Lissi E.A. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2009. - V. 8, No. 7. - P. 933-943.
253. Blake C.C., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C., Phillips D.C., Sarma V.R. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution // *Nature.* - 1965. - V. 206, No. 4986. - P. 757-761.
254. Garner B., Shaw D.C., Lindner R.A., Carver J.A., Truscott R.J.W. Non-oxidative modification of lens crystallins by kynurenine: a novel post-translational protein modification with possible relevance to ageing and cataract // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology.* - 2000. - V. 1476, No. 2. - P. 265-278.
255. Ludvíková L., Štacko P., Sperry J., Klán P. Photosensitized Cross-Linking of Tryptophan and Tyrosine Derivatives by Rose Bengal in Aqueous Solutions // *J. Org. Chem.* - 2018. - V. 83, No. 18. - P. 10835-10844.
256. Putilina T., Skouri-Panet F., Prat K., Lubsen N.H., Tardieu A. Subunit exchange demonstrates a differential chaperone activity of calf α -crystallin toward β low- and individual γ -crystallins // *J Biol Chem.* - 2003. - V. 278, No. 16. - P. 13747-13756.

Таблица III. Содержание аминокислот в белках хрусталика *Bos taurus* и лизоциме [20-147].

	Trp	Tyr	His	Met	Cys	Gln	Asn	Ser	Lys
αA	1	6	7	2	1	6	2	23	7
αB	2	1	9	2	-	3	2	17	10
βA2	6	9	7	2	4	13	6	21	5
βA3	9	11	7	7	8	18	10	17	9
βA4	8	7	10	4	5	14	4	23	5
βB1	8	9	3	6	4	13	7	17	10
βB2	5	9	8	3	2	18	7	18	13
βB3	8	8	10	3	2	11	7	16	9
γA	4	15	5	8	6	13	6	13	2
γB	4	15	5	8	7	10	6	13	2
γC	4	15	3	4	10	12	5	14	3
γD	4	15	5	8	7	10	6	13	2
γF	5	15	8	5	5	9	7	14	1
γS	4	12	7	7	6	8	6	12	9
HEWL	6	3	1	2	8	3	14	10	5

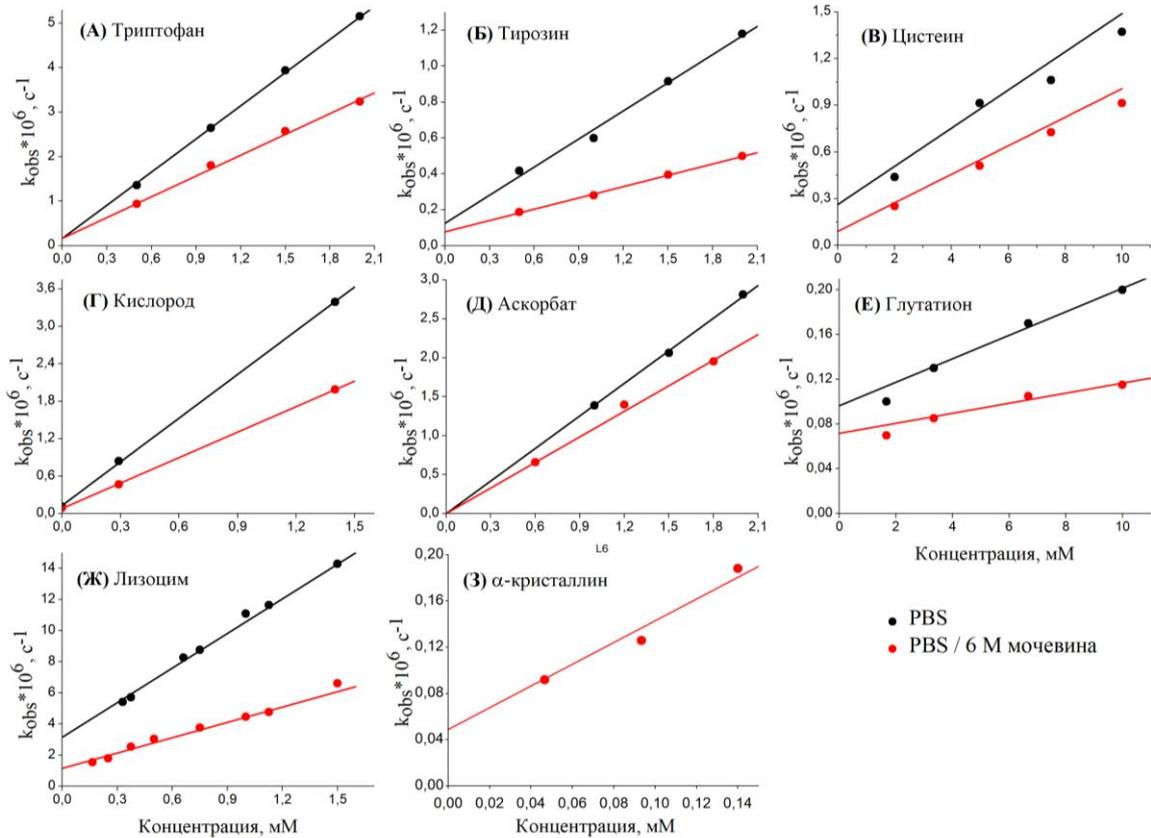


Рис. П1. Концентрационные зависимости наблюдаемой константы скорости тушения (k_{obs}) TUNA в реакциях с (А) L-триптофаном, (Б) L-тирозином, (В) L-цистеином, (Г) кислородом, (Д) аскорбиновой кислотой, (Е) глутатион, (Ж) лизоцимом и (З) α -кристаллин в PBS (черные кружки) и PBS / 6 М раствор мочевины (красные кружки).

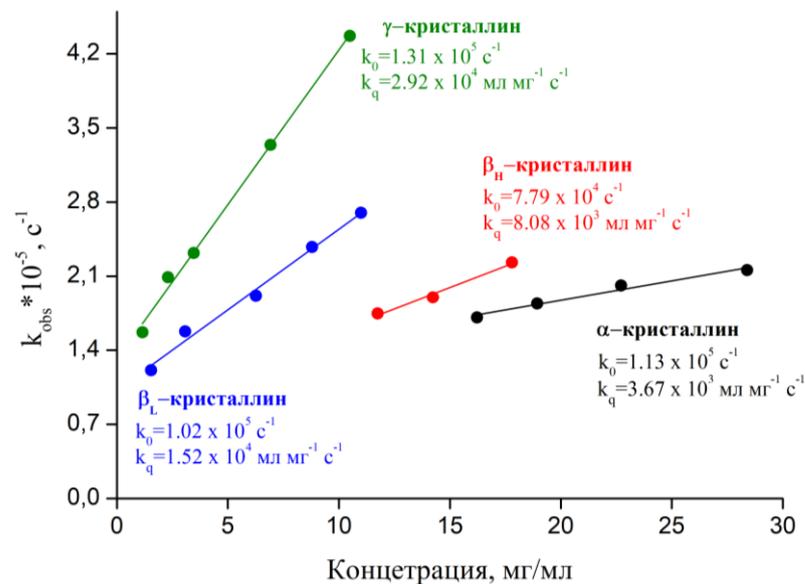


Рис. П2. Концентрационные зависимости наблюдаемой константы скорости тушения (k_{obs}) TUNA в реакциях с белками хрусталика.

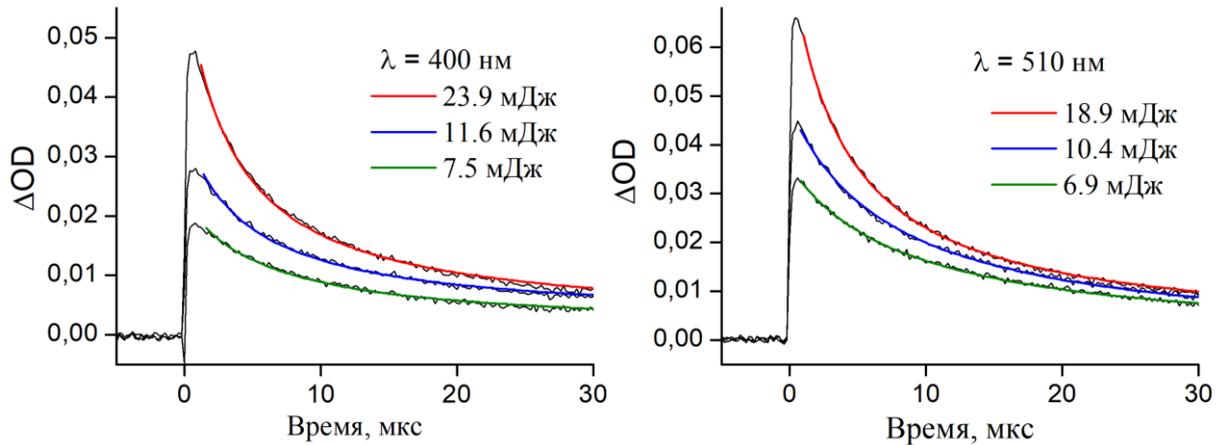
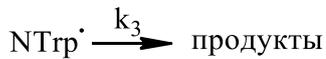
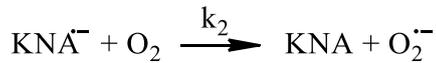


Рис. ПЗ. Кинетики промежуточного поглощения, зарегистрированные на длине волны 400 и 510 нм после облучения лазером (355 нм, 3 мДж/импульс) раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 5.5 мМ NTrpH в PBS в атмосфере аргона с различными энергиями лазерного импульса.

Расчёт константы скорости реакции между $\text{KNA}^{\cdot-}$ и молекулярным кислородом

Кинетические кривые на 400 и 510 нм описывались согласно следующей модели:



где $k_1 = k_{\text{Trp}} \times [\text{NTrpH}]$ - константа скорости тушения псевдо-первого порядка ${}^1\text{KNA}$ аминокислотой NTrpH, $k_2 = k_{\text{O}_2} \times [\text{O}_2]$ - константа скорости тушения псевдо-первого порядка радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ кислородом, а k_3 - константа скорости гибели NTrp^{\cdot} . В данном случае гибель NTrp^{\cdot} описывается экспоненциальной зависимостью, хотя в целом он должен быть описан константой второго порядка. Решение системы дифференциальных уравнений дало уравнение, описывающее кинетики спада оптического поглощения на 400 нм и 510 нм:

$$[\text{KNA}^{\cdot-}] = [{}^1\text{KNA}]_0 \times \frac{k_1}{k_1 - k_2} \times (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \quad (1)$$

$$[\text{NTrp}^{\cdot}] = [{}^1\text{KNA}]_0 \times \frac{k_1}{k_1 - k_3} \times (e^{-k_3 t} - e^{-k_1 t}) \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \Delta A(\lambda) &= (\varepsilon_{\text{KNA}^{\cdot-}}(\lambda) \times [\text{KNA}^{\cdot-}] + \varepsilon_{\text{NTrp}^{\cdot}}(\lambda) \times [\text{NTrp}^{\cdot}]) \times l = \\ &= A(\lambda) \times \frac{k_1}{k_1 - k_2} \times (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) + B(\lambda) \times \frac{k_1}{k_1 - k_3} \times (e^{-k_3 t} - e^{-k_1 t}) \quad (3) \end{aligned}$$

где $[{}^1\text{KNA}]_0$ - концентрация триплетного состояния KNA, образованного сразу после лазерного импульса, $\varepsilon_{\text{KNA}^{\cdot-}}(\lambda)$ и $\varepsilon_{\text{NTrp}^{\cdot}}(\lambda)$ - коэффициенты экстинкции радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTrp^{\cdot} , $A(\lambda)$ и $B(\lambda)$ - предэкспоненциальные множители, $l = 1$ см - оптический путь. Значения k_2 ,

представленные на Рис. П4, являются средними значениями для 4-6 измерений с разными энергиями лазерного импульса.

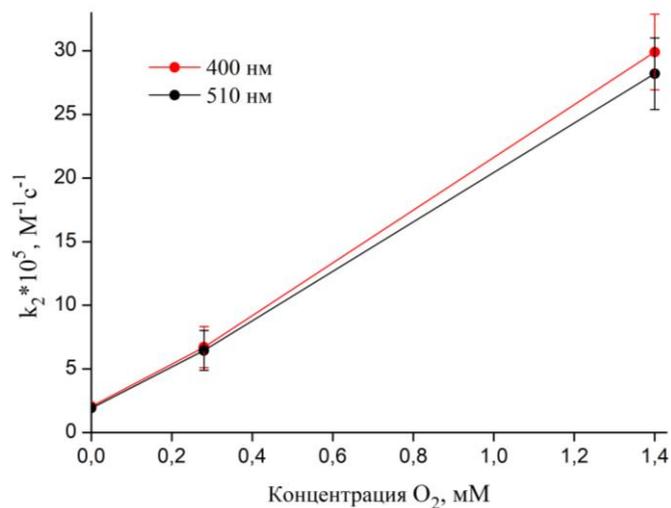


Рис. П4. Концентрационная зависимость константы скорости (k_2) восстановления радикала KNA^\bullet молекулярным кислородом, полученным из уравнения (3) кинетики, зарегистрированной на длине волны 400 и 510 нм (красные и черные кружки соответственно) после облучения лазером (355 нм) раствора, содержащего 0,3 мМ KNA и 5,5 мМ NTrpH.

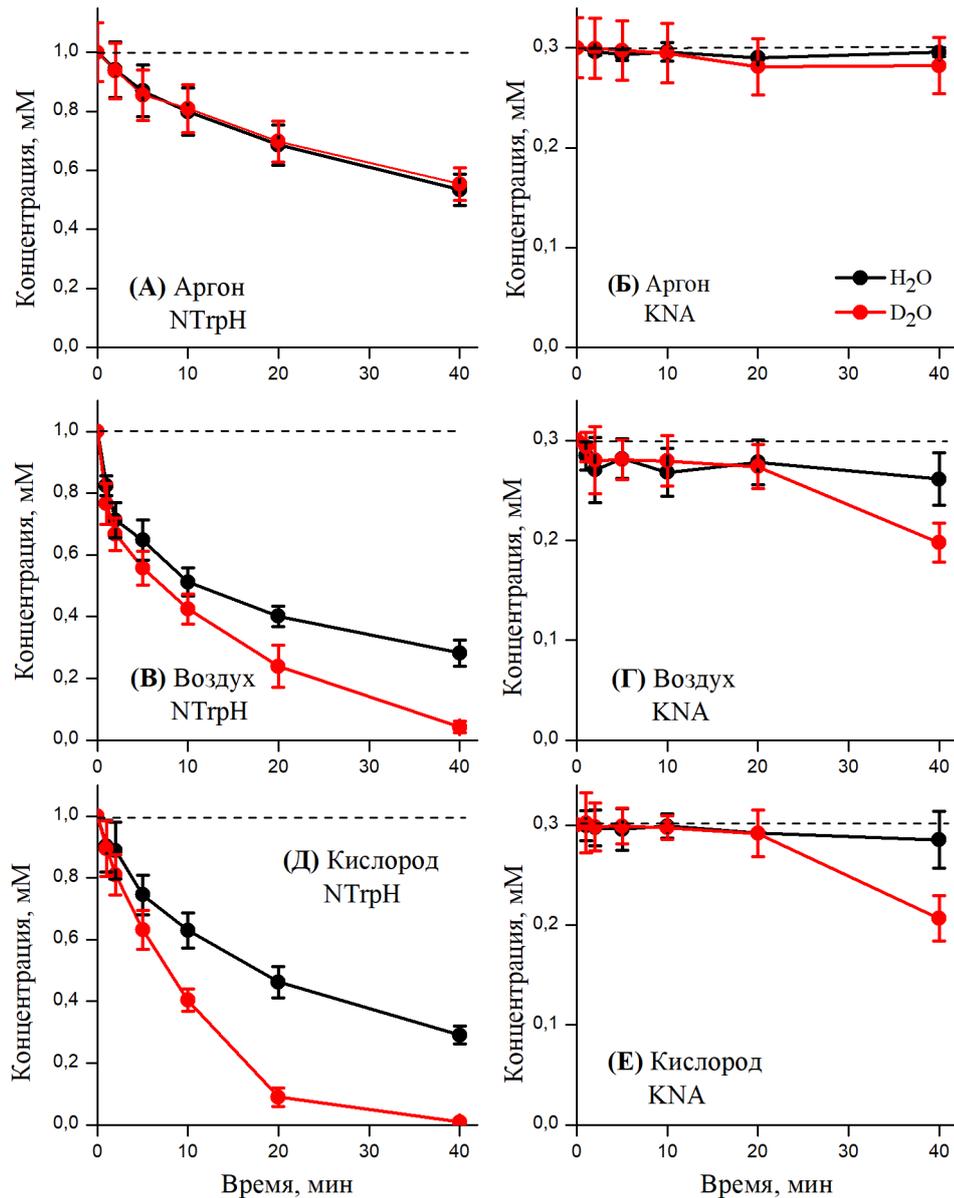


Рис. П5. Зависимость концентрации NTrpH (левая колонка) и KNA (правая колонка) от времени облучения при УФ-А фотолизе раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTrpH в H₂O / PBS (черные точки) и D₂O / PBS (красные точки) в атмосфере аргона (А и Б), воздуха (В и Г) и кислорода (Д и Е). Каждая точка представляет собой среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

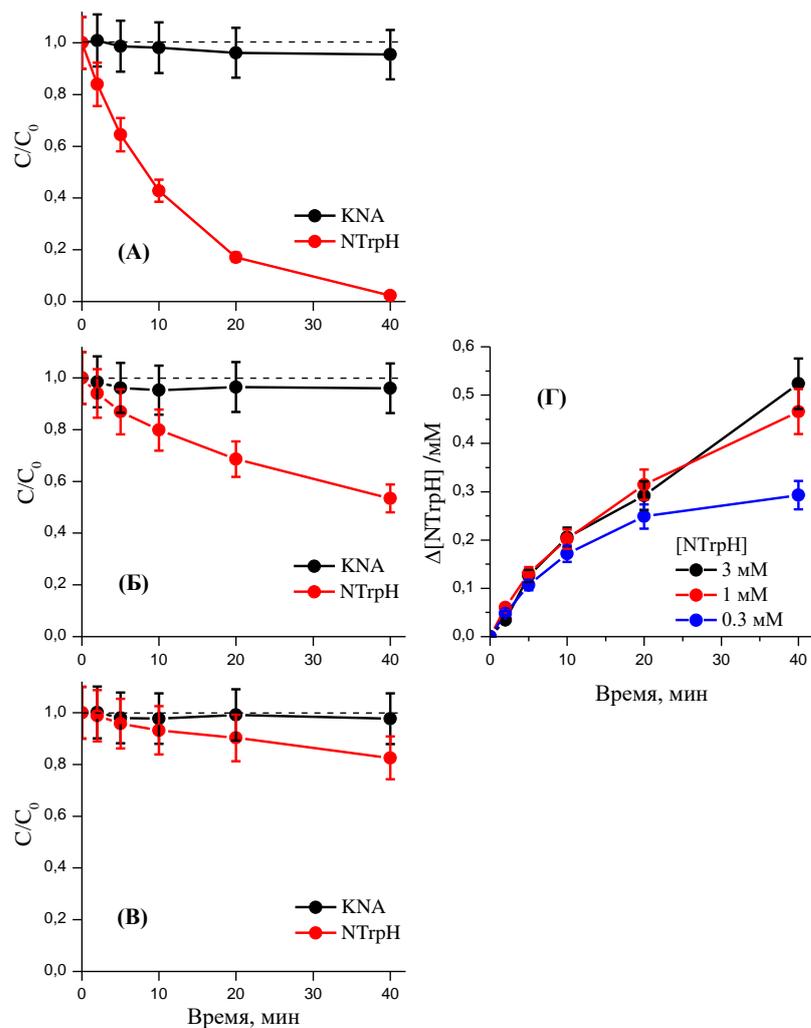


Рис. П6. Зависимость относительных концентраций KNA и NTrpH от времени облучения при анаэробном УФ-А фотолизе 0.3 мМ KNA и NTrpH с разными концентрациями: (А) 0.3, (Б) 1.0 и (В) 3.0 мМ в PBS. (Г) Временная зависимость разложения NTrpH, $\Delta [\text{NTrpH}] = [\text{NTrpH}]_0 - [\text{NTrpH}]$, рассчитанная по данным, представленным на графиках (А) - (В). Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

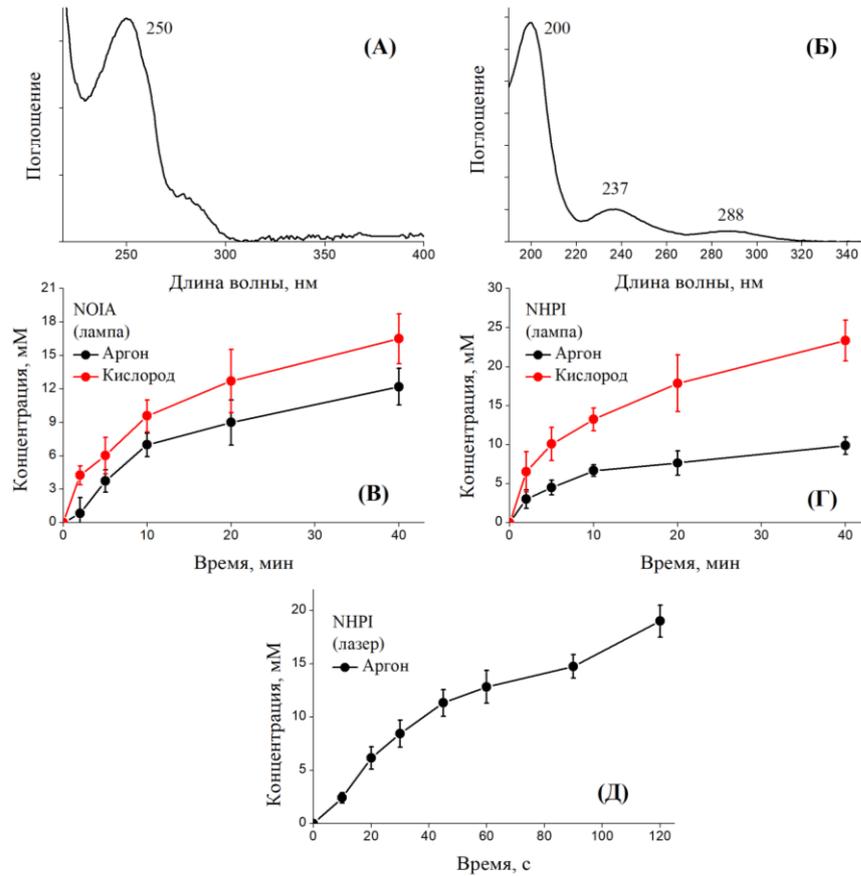


Рис. П7. (А, Б): спектры поглощения (А) NOIA и (Б) NHPI, полученные с помощью метода ВЭЖХ. (В, Г): Зависимость концентраций (В) NOIA и (Г) NHPI от времени облучения, образующихся во время фотолиза типа Iб в атмосфере аргона (черные кружки) и кислорода (красные кружки) 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTrpH в PBS. (Д) Зависимость концентраций NHPI от времени, образующегося во время фотолиза типа Ia в атмосфере аргона тех же образцов KNA и NTrpH. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

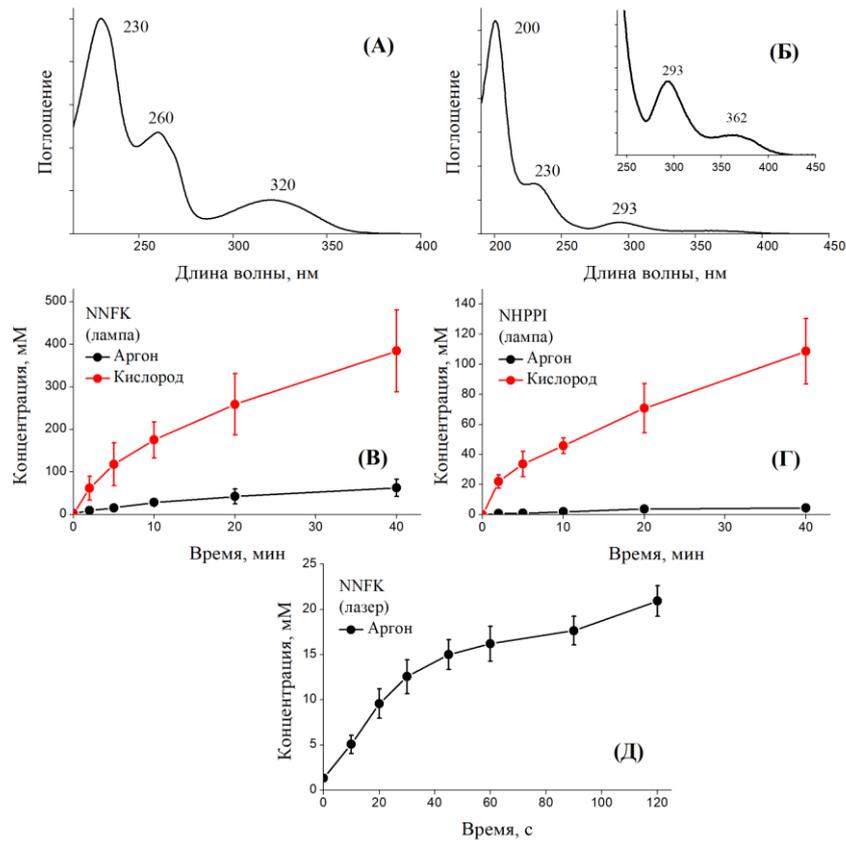


Рис. П8. (А, Б): спектры поглощения (А) NNFK и (Б) NHPPI, полученные с помощью метода ВЭЖХ. (В, Г): Зависимость концентраций (В) NNFK и (Г) NHPPI от времени, образующихся во время УФ-А фотолиза типа Iб в атмосфере аргона (черные кружки) и кислорода (красные кружки) 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTгрНв PBS. (Д) Временная зависимость концентрации NNFK, образующегося во время фотолиза типа Ia в атмосфере аргона тех же образцов KNA и NTгрН. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

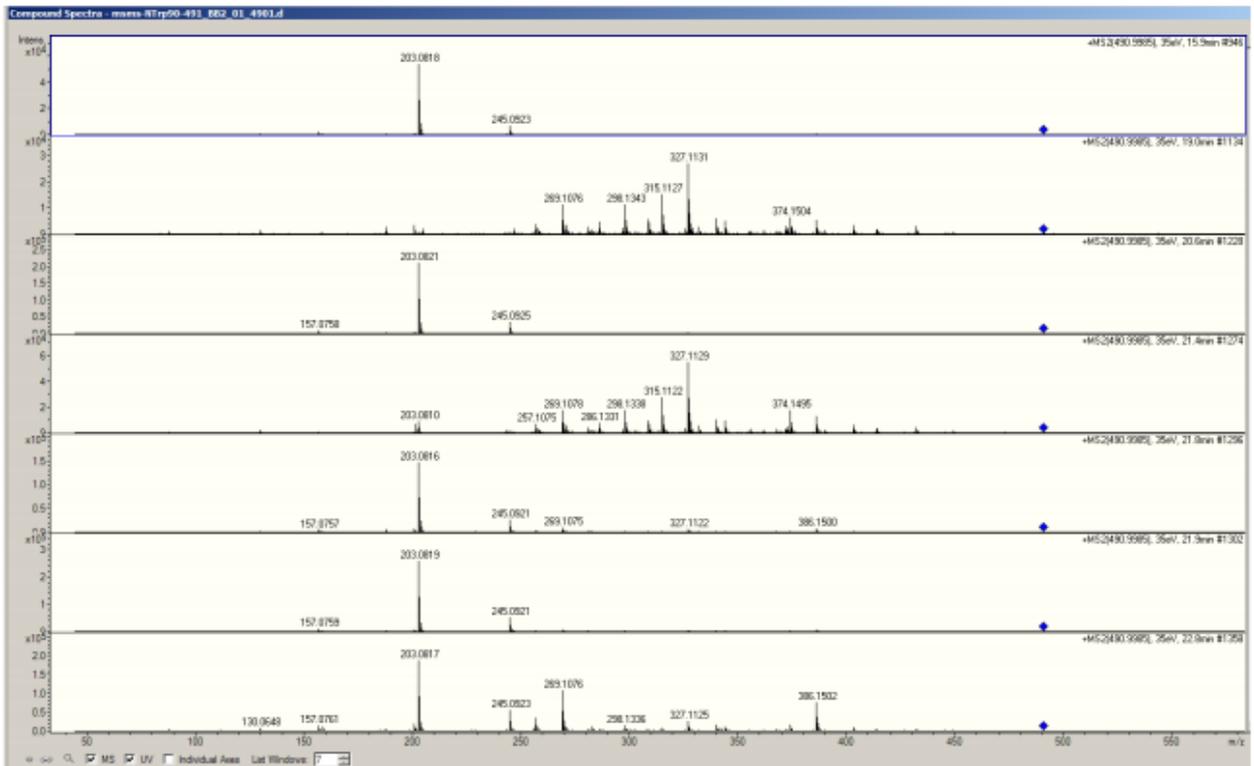


Рис. П9. MS/MS спектры ионов с m/z 491,1025 и временами выхода: 16.0, 19.0, 20.6, 21.4, 21.8, 21.9 и 22.8 мин.

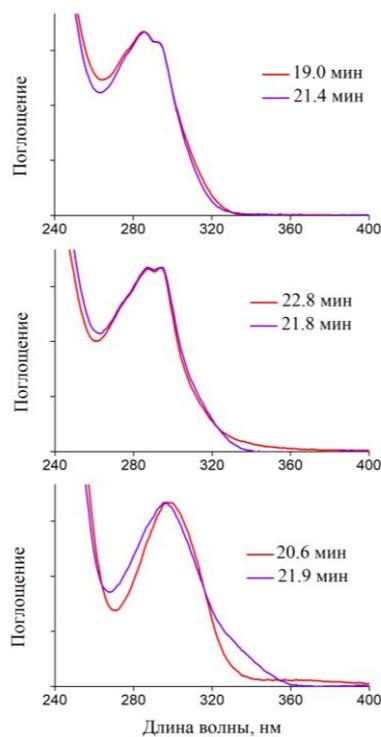


Рис. П10. Спектры поглощения димеров NTGr, полученные с помощью метода ВЭЖХ при анализе образцов 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTGrH, подвергнутых облучению лазером в течение 120 секунд (355 нм, 3 мДж/импульс).

Таблица П2 Экспериментальные массы, идентифицированная химическая формула и рассчитанные массы для фрагментов, наблюдаемых при МС/МС анализе димеров NTpP, образованных при фотолизе типа Ia 0.3 mM KNA и 1.0 mM NTpP в PBS в атмосфере аргона

Основной ион [M+H ⁺]	Время удержания/ мин	Эксп. масса [M+H ⁺]	Химическая формула	Теор. масса [M+H ⁺]
491.1926	16.0 20.6 22.8	245.0912	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁺	245.0920
		203.0810	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ ⁺	203.0815
		188.0693	C ₁₁ H ₁₀ NO ₂ ⁺	188.0706
		157.0753	C ₁₁ H ₁₁ N ⁺	157.0886
		130.0647	C ₉ H ₈ N ⁺	130.0651
491.1926	19.1 21.4 21.9	473.1746	C ₂₆ H ₂₅ N ₄ O ₅ ⁺	473.1819
		449.1765	C ₂₄ H ₂₅ N ₄ O ₅ ⁺	449.1819
		432.1549	C ₂₄ H ₂₂ N ₃ O ₅ ⁺	432.1554
		414.1435	C ₂₄ H ₂₀ N ₃ O ₄ ⁺	414.1448
		403.1759	C ₂₃ H ₂₃ N ₄ O ₃ ⁺	403.1765
		390.1435	C ₂₂ H ₂₀ N ₃ O ₄ ⁺	390.1448
		386.1491	C ₂₃ H ₂₀ N ₃ O ₃ ⁺	386.1499
		374.1493	C ₂₂ H ₂₀ N ₃ O ₃ ⁺	374.1499
		344.1399	C ₂₁ H ₁₈ N ₃ O ₂ ⁺	344.1394
		340.1440	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ⁺	340.1444
		332.1392	C ₂₀ H ₁₈ N ₃ O ₂ ⁺	332.1393
		327.1126	C ₂₁ H ₁₅ N ₂ O ₂ ⁺	327.1128
		315.1125	C ₂₀ H ₁₅ N ₂ O ₂ ⁺	315.1128
		309.1020	C ₂₁ H ₁₃ N ₂ O ⁺	309.1022
		298.1335	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₃ ⁺	298.1312
		286.1328	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃ ⁺	286.1312
		283.1218	C ₂₀ H ₁₅ N ₂ ⁺	283.1230
		281.1068	C ₂₀ H ₁₃ N ₂ ⁺	281.1073
		271.1214	C ₁₉ H ₁₅ N ₂ ⁺	271.1230
		269.1068	C ₁₉ H ₁₃ N ₂ ⁺	269.1073
		257.1065	C ₁₈ H ₁₃ N ₂ ⁺	257.1073
		245.0912	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ ⁺	245.0920
		205.0957	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂ ⁺	205.0972
		203.0803	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ ⁺	203.0815
		201.1017	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ⁺	201.1022
		188.0703	C ₁₁ H ₁₀ NO ₂ ⁺	188.0706
		159.0906	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ ⁺	159.0917
130.0493	C ₉ H ₈ N ⁺	130.0651		
88.0387	C ₇ H ₄ ⁺	88.0308		
245.0920	20.6 21.8 22.8	203.0807	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ ⁺	203.0815
		188.0687	C ₁₁ H ₁₀ NO ₂ ⁺	188.0706
		170.0597	C ₁₁ H ₈ NO	170.0600
		159.0906	C ₁₁ H ₁₃ N ⁺	159.1042
		157.0754	C ₁₁ H ₁₁ N ⁺	157.0886
		146.0594	C ₉ H ₈ NO ⁺	146.0600
		144.0800	C ₁₀ H ₁₀ N ⁺	144.0808
		142.0643	C ₁₀ H ₈ N ⁺	142.0651
		132.0807	C ₉ H ₁₀ N ⁺	132.0808
		130.0648	C ₉ H ₈ N ⁺	130.0651
		118.0645	C ₈ H ₈ N ⁺	118.0651
115.0548	C ₉ H ₇ ⁺	115.0542		

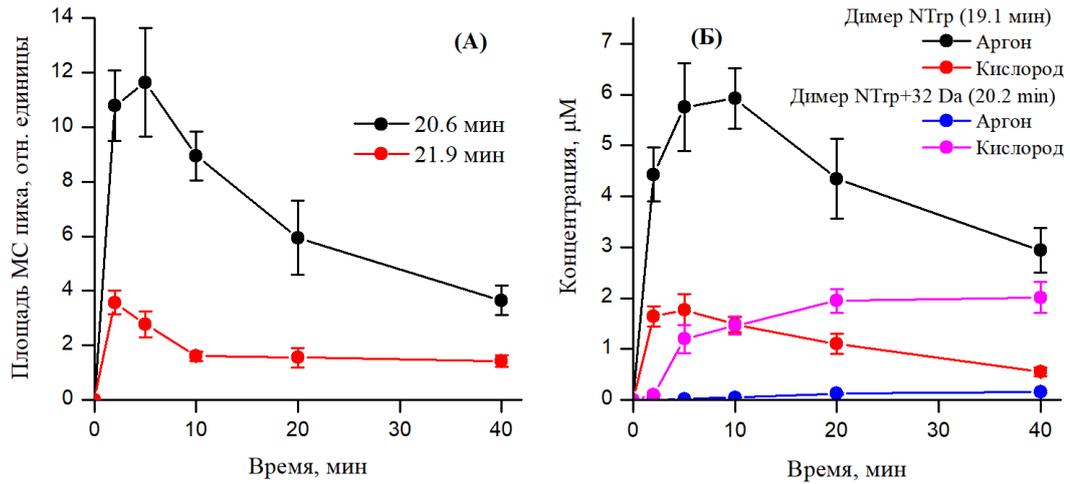


Рис. П11. (А) Зависимость площадей пиков МС сигнала от времени с m/z 245,092, соответствующим димерам NTTr (RT 20.6 и 21.9 минута), образующихся во время УФ-А фотолиза типа Ib 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTTrH в PBS в атмосфере аргона. (Б) Зависимость концентраций димера NTTr (RT19.1 минута) от времени облучения, и окисленного димера NTTr, +31,990 Да (RT20.2 минута), образующихся во время УФ-А фотолиза типа Ib того же раствора в атмосфере аргона (черный и синий точки соответственно) и кислород (красные и пурпурные точки соответственно). Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

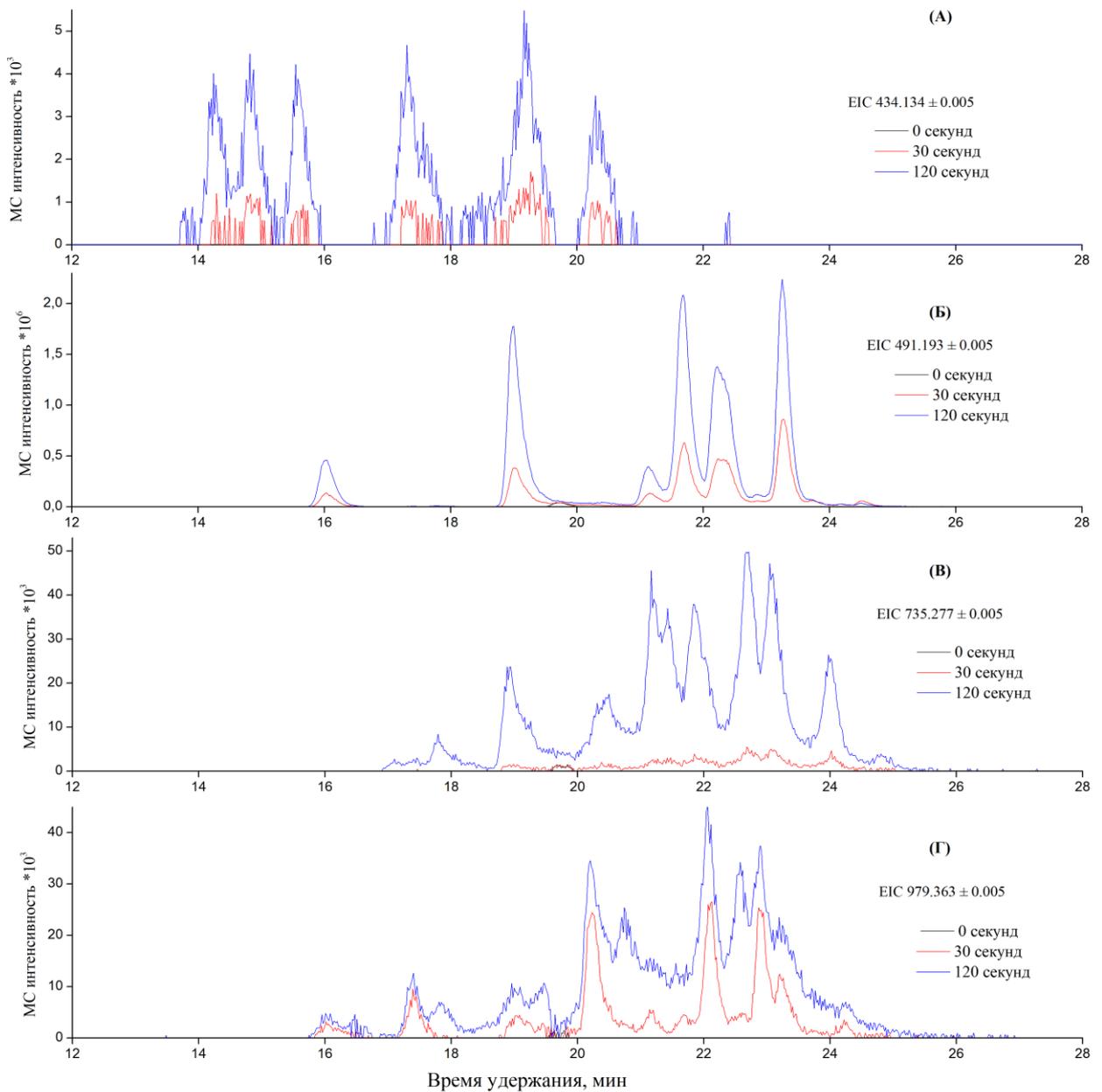


Рис. П12. Хроматограммы по выделенному иону во время анализа методом ВЭЖХ-МС 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTrpH в PBS после анаэробного фотолиза типа Ia для ионов: (А) с m/z 434.134 – продукт ковалентного связывания KNA-NTrp, (Б) с m/z 491.193 – димеры NTrp, (B) с m/z 735.277 - тримеры NTrp и (Г) с m/z 979.363 - тетрамеры NTrp.

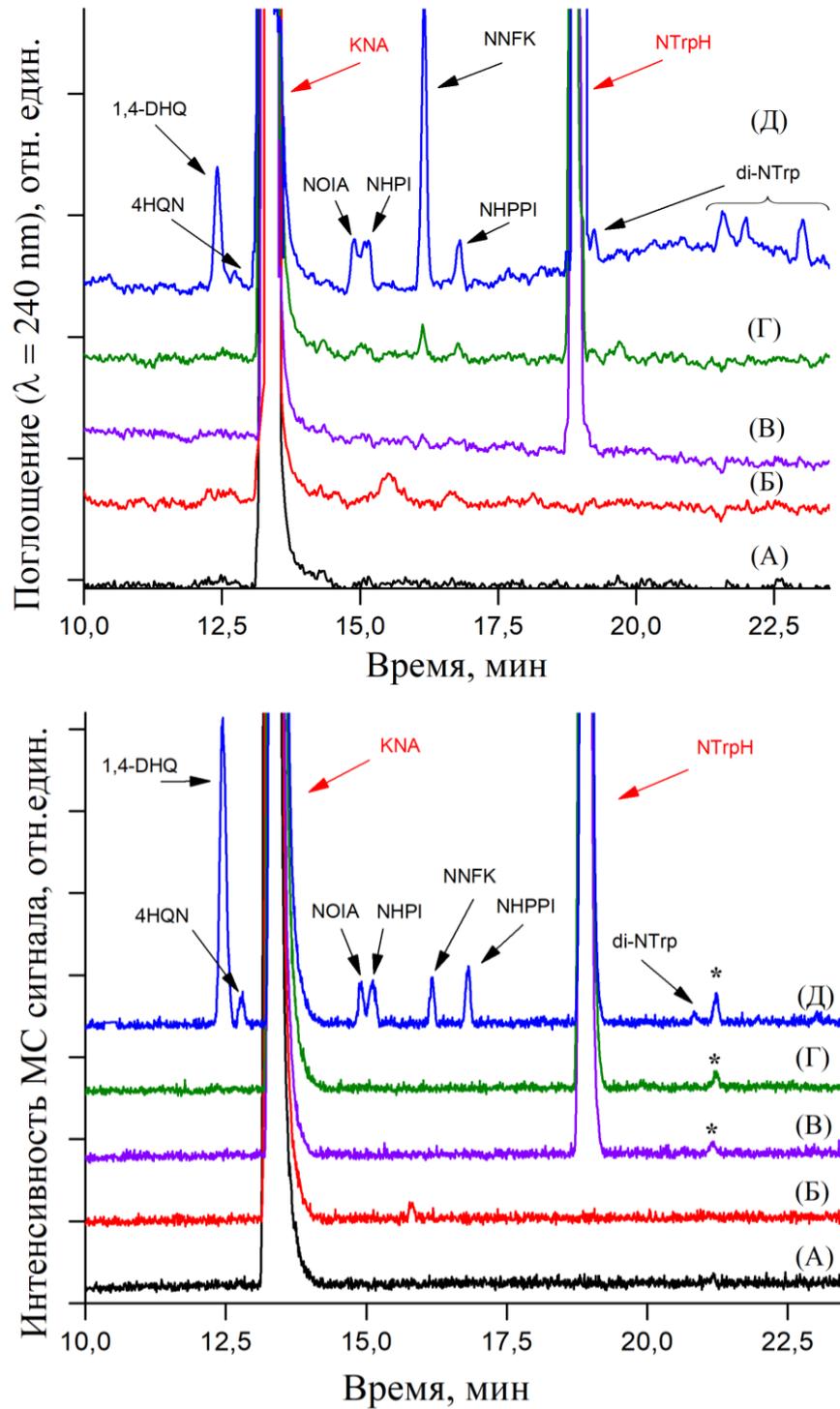


Рис. П13. Хроматограммы образцов, полученные с помощью метода ВЭЖХ (сверху) и ВЭЖХ-МС (снизу), до и после анаэробного УФ-А фотолиза типа Iб: 0.3 мМ KNA в PBS (А) до и (Б) через 40 минут УФ-А облучения; 0.3 мМ KNA и 1.0 мМ NTpH в PBS (В) перед облучением, (Г) через 40 минут в темноте и (Д) после 40 минут УФ-А облучения. Примеси, присутствующие в NTpH обозначены на хроматограммах символом *.

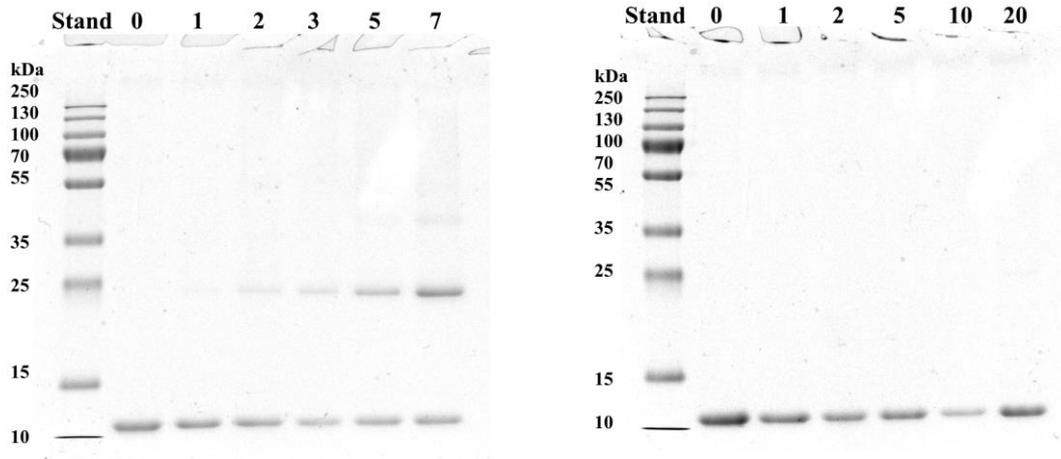


Рис. П14. 15%-SDS-ПАА гели, содержащие в дорожках образцы, отобранные во время УФ-А фотолиза типа Ia (слева) и типа Ib (справа) раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4). Дорожки Stand – смесь стандартов для определения размера белка, дорожки 2-7 – содержат пробы образцов с различными дозами облучения, указанными в верхней части гелей (минуты фотолиза). После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

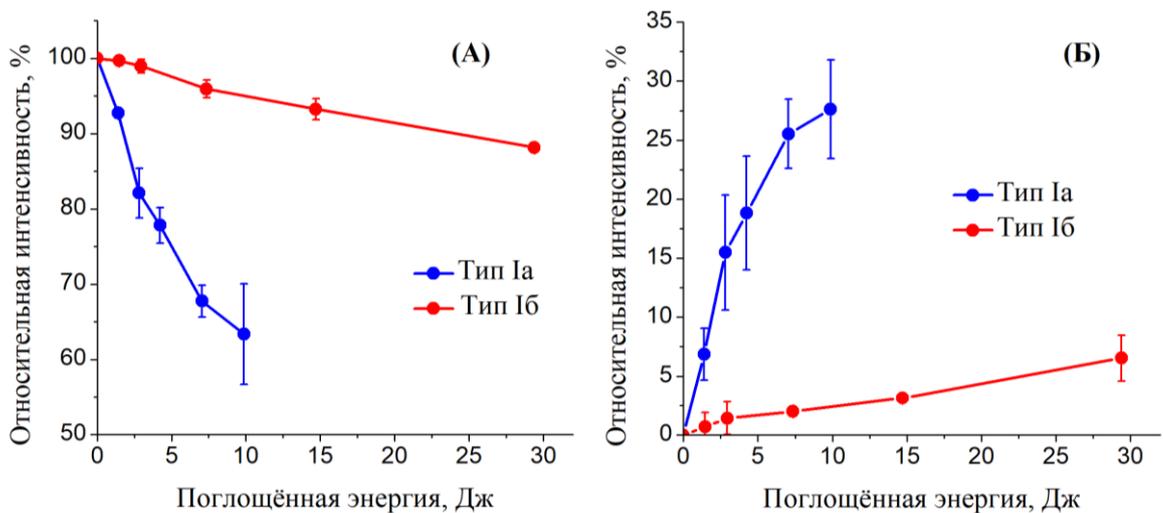


Рис. П15. Денситометрический анализ деградации мономерной формы HEWL (А) и образования димера HEWL (Б) во время фотолиза типа Ia и Ib. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

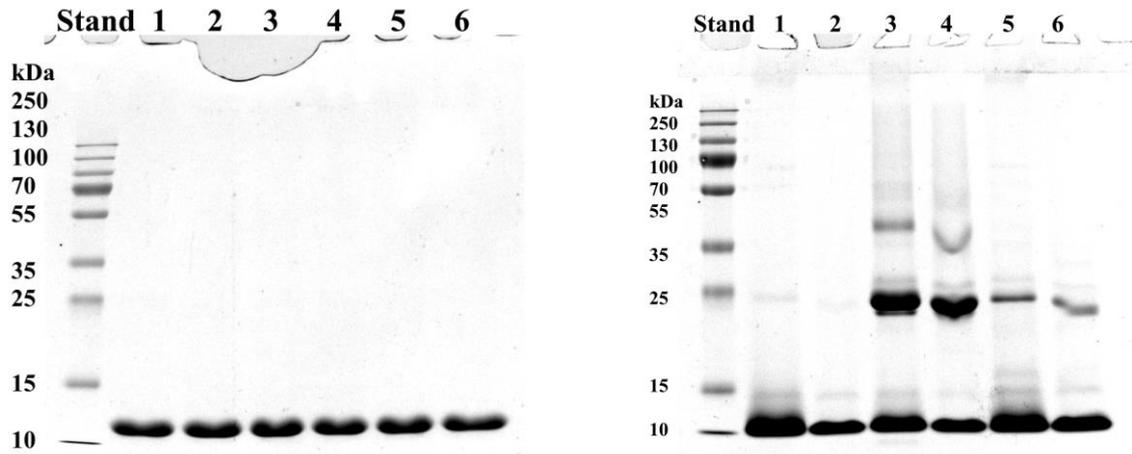


Рис. П16. 15%-SDS-ПАА гели контрольного эксперимента. Дорожки Stand – смесь стандартов для определения размера белка. После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте.

(Слева): дорожка 1 и 2 – 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4), до и после 40 минут барботирования аргоном; дорожки 3-6 – 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4), до и после фотолиза типа Ia (дорожки 3 и 4) и типа Ib (дорожки 5 и 6).

(Справа): пробы образцов отобранные до и во время УФ-А фотолиза типа Ia и Ib раствора, содержащего 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4) в восстанавливающих условиях (с добавлением β -меркаптоэтанола, дорожки 1,3 и 5) и невосстанавливающих условиях (без β -меркаптоэтанола, дорожки 2, 4 и 6). Дорожки 1 и 2 – до УФ-А фотолиза, дорожки 3 и 4 – после фотолиза типа Ia; дорожки 5 и 6 – после фотолиза типа Ib.

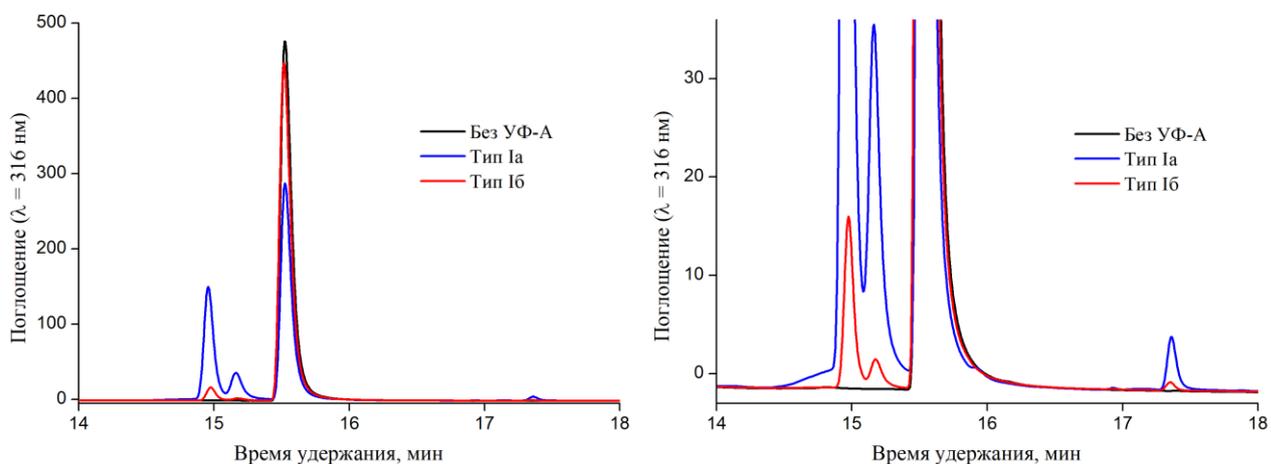


Рис. П17. ВЭЖХ-хроматограммы, записанные на длине волны 316 нм, для низкомолекулярной фракции, полученной из образцов содержащих 0.3 мМ KNA и 0.35 мМ HEWL (PBS, pH 7.4): черная кривая - до облучения; синяя и красная кривая после фотолиза типа Ia и Ib соответственно. Правый рисунок - это увеличение левого рисунка.

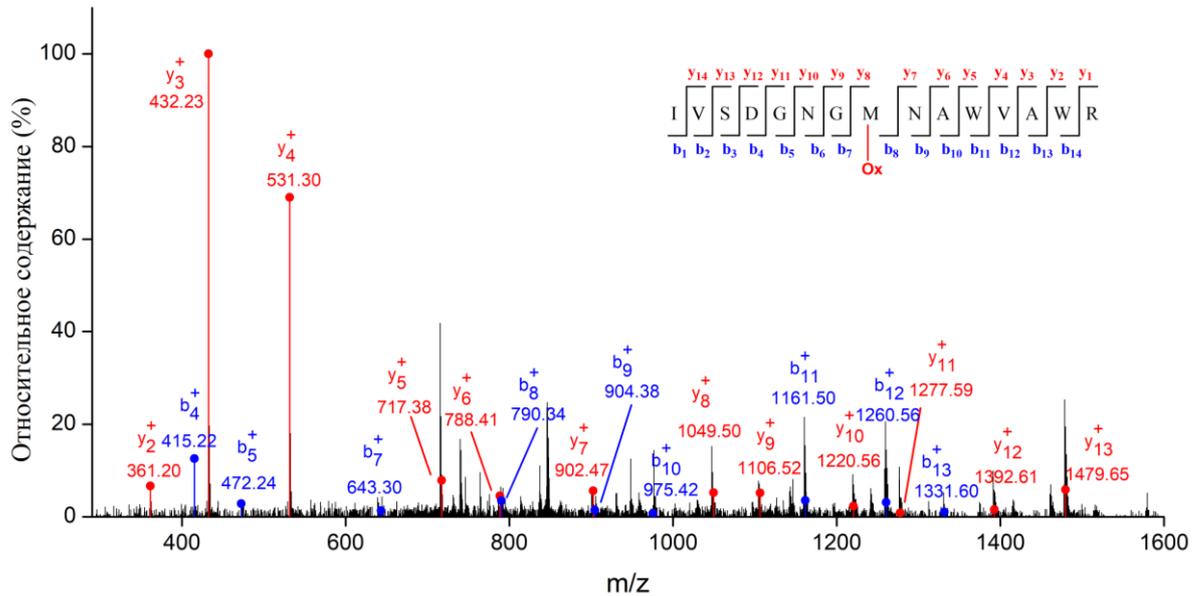


Рис. П18. MS/MS спектр окисленного по Met105 пептида IVSDGNGM¹⁰⁵(Ox)NAWVAWR, m/z [M + 2H⁺]²⁺ 846.4001 – фрагментируемый ион.

Таблица П3. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с [M + H⁺]⁺ = 1691.7958.

Ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₄	IVSD	415.2188	415.2174	y ₁₃	SDGNGM(Ox)NAWVAWR	1479.6434	1479.6489
b ₅	IVSDG	472.2402	472.2358	y ₁₂	DGNGM(Ox)NAWVAWR	1392.6114	1392.6127
b ₇	IVSDGNG	643.3046	643.2986	y ₁₁	GNGM(Ox)NAWVAWR	1277.5844	1277.5857
b ₈	IVSDGNGM(Ox)	790.3400	790.3384	y ₁₀	NGM(Ox)NAWVAWR	1220.5630	1220.5648
b ₉	IVSDGNGM(Ox)N	904.3829	904.3815	y ₉	GM(Ox)NAWVAWR	1106.5200	1106.5223
b ₁₀	IVSDGNGM(Ox)NA	975.4201	975.4183	y ₈	M(Ox)NAWVAWR	1049.4986	1049.4933
b ₁₁	IVSDGNGM(Ox)NAW	1161.4994	1161.4984	y ₇	NAWVAWR	902.4632	902.4595
b ₁₂	IVSDGNGM(Ox)NAWV	1260.5678	1260.5638	y ₆	AWVAWR	788.4203	788.4212
b ₁₃	IVSDGNGM(Ox)NAWVA	1331.6049	1331.6018	y ₅	WVAWR	717.3832	717.3824
				y ₄	VAWR	531.3038	531.3014
				y ₃	AWR	432.2354	432.2333
				y ₂	WR	361.1983	361.1957

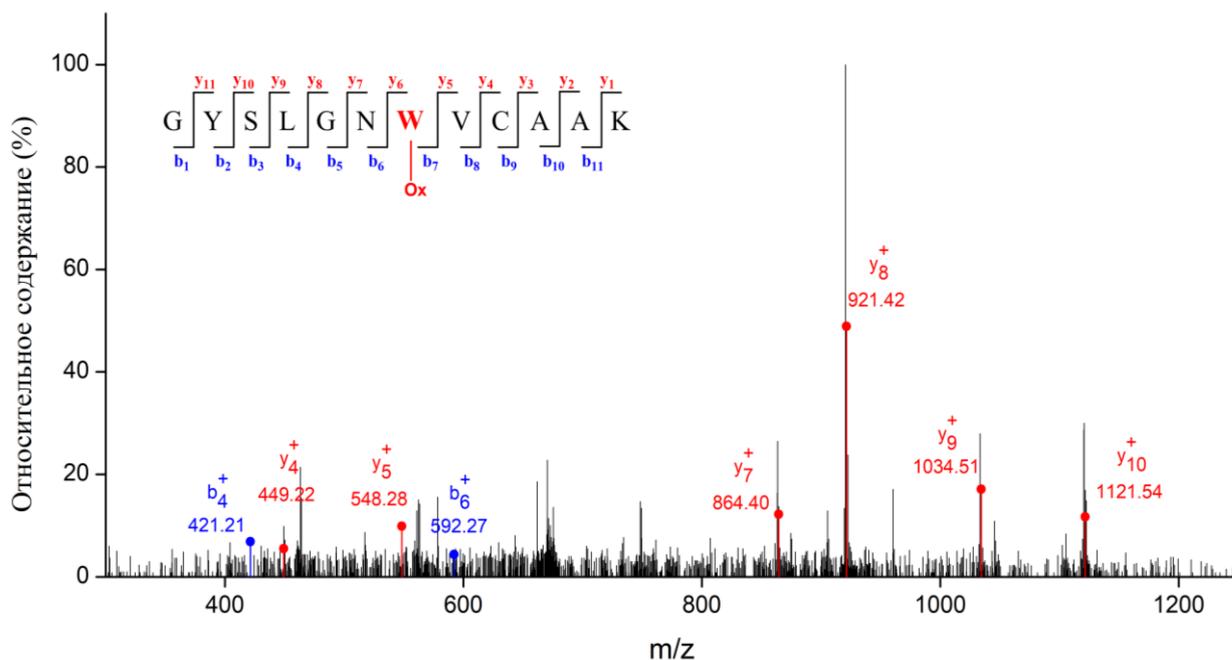


Рис. П19. MS/MS спектр окисленного по Trp28 пептида GYSLGNW²⁸(Ox)VCAAK, m/z [M + 2H]²⁺671.3159– фрагментируемый ион.

Таблица П4. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с [M + H]⁺ = 1341.6255.

b ион	Последовательность пептида	Теор.m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₄	GYSL	421.2082	421.2069	y ₁₀	SLGNW(Ox)VCAAK	1121.5394	1121.5340
b ₆	GYSLGN	592.2726	592.2707	y ₉	LGNW(Ox)VCAAK	1034.5073	1034.5048
				y ₈	GNW(Ox)VCAAK	921.4233	921.4222
				y ₇	NW(Ox)VCAAK	864.4018	864.4085
				y ₅	VCAAK	548.2847	548.2880
				y ₄	CAAK	449.2163	449.2138

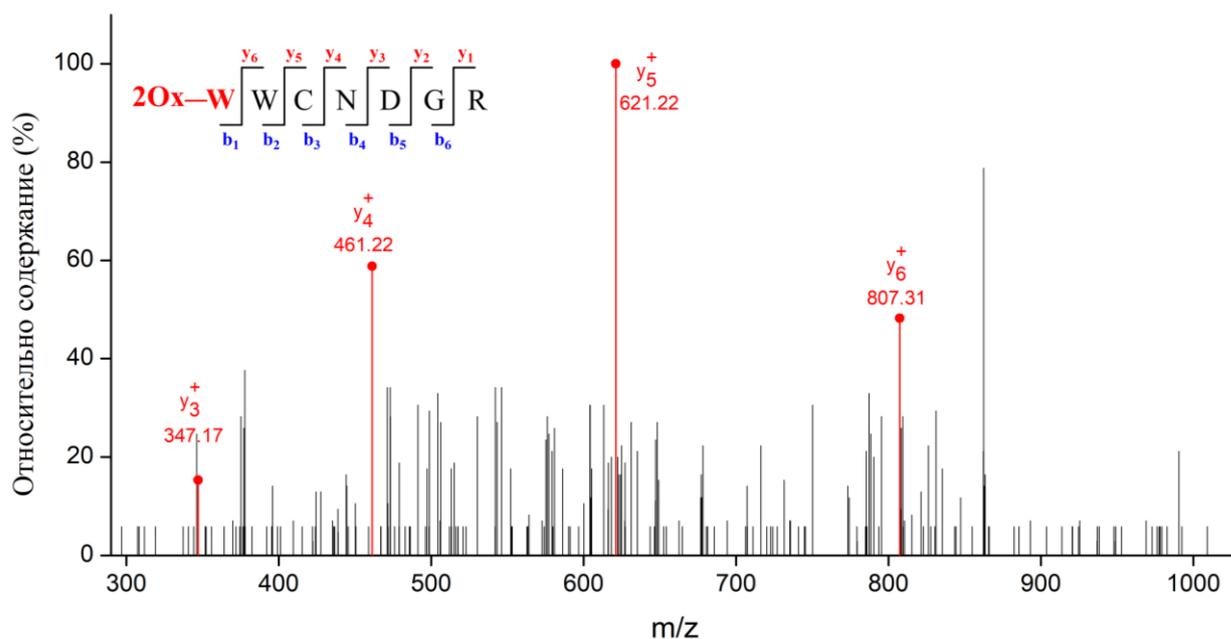


Рис. П20. MS/MS спектр дважды окисленного по Trp62 пептида $W^{62}(Ox_2)WCNDGR$, $m/z [M + 2H^+]^{2+} 513.1988$ – фрагментируемый ион.

Таблица П5. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с $[M + H^+]^+ = 1025.3893$.

b ион	Последовательность пептида	Теор.m/z z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор.m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z [M+nH] ⁿ⁺
				y ₆	WCNDGR	807.3219	807.3277
				y ₅	CNDGR	621.2418	621.2401
				y ₄	NDGR	461.2124	461.2076
				y ₃	DGR	347.1686	347.1681

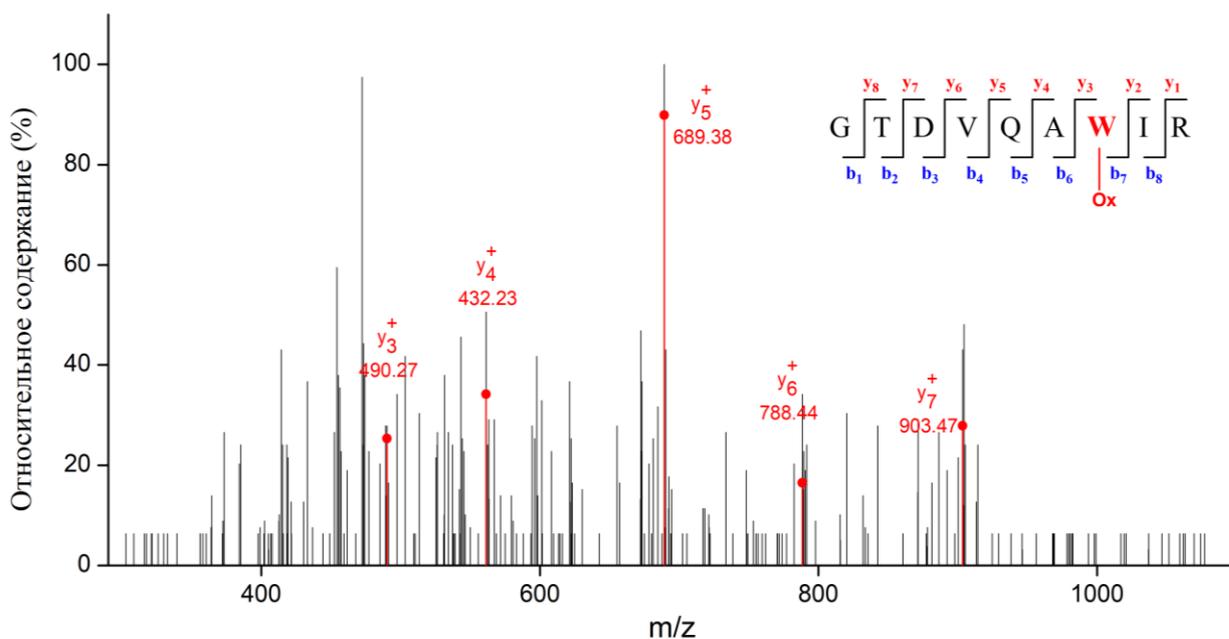


Рис. П21. MS/MS спектр окисленного по Trp123 пептида GTDVQAW¹²³(Ox)IR, m/z [M + 2H]²⁺531.2732 – фрагментируемый ион.

Таблица П6. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с [M + H]⁺ = 1061.5374.

б ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺
				y ₇	DVQAW(Ox)IR	903.4683	903.4812
				y ₆	VQAW(Ox)IR	788.4414	788.4414
				y ₅	QAW(Ox)IR	689.3730	689.3696
				y ₄	AW(Ox)IR	561.3144	561.3179
				y ₃	W(Ox)IR	490.2773	490.2743

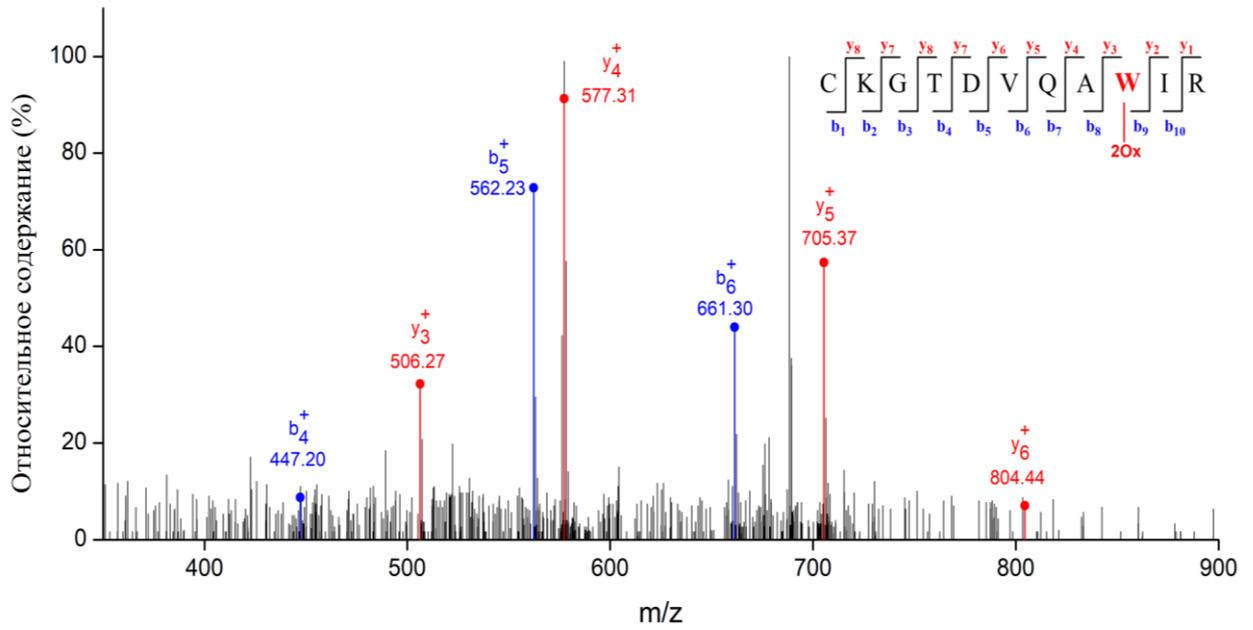


Рис. П22. MS/MS спектр дважды окисленного по Trp123 пептида CKGTDVQAW¹²³(Ox₂)IR, m/z [M + 2H⁺]²⁺ 455.8910– фрагментируемый ион.

Таблица П7. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с [M + H⁺]⁺ = 1365.6579.

b ион	Последовательность пептида	Теор.m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор.m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп.m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₄	CKGT	447.2006	447.2011	y ₆	VQAW(Ox ₂)IR	804.4465	804.4373
b ₅	CKGTD	562.2276	562.2282	y ₅	QAW(Ox ₂)IR	705.3781	705.3703
b ₆	CKGTDV	661.2960	661.2942	y ₄	AW(Ox ₂)IR	577.3195	577.3157
				y ₃	W(Ox ₂)IR	506.2824	506.2676

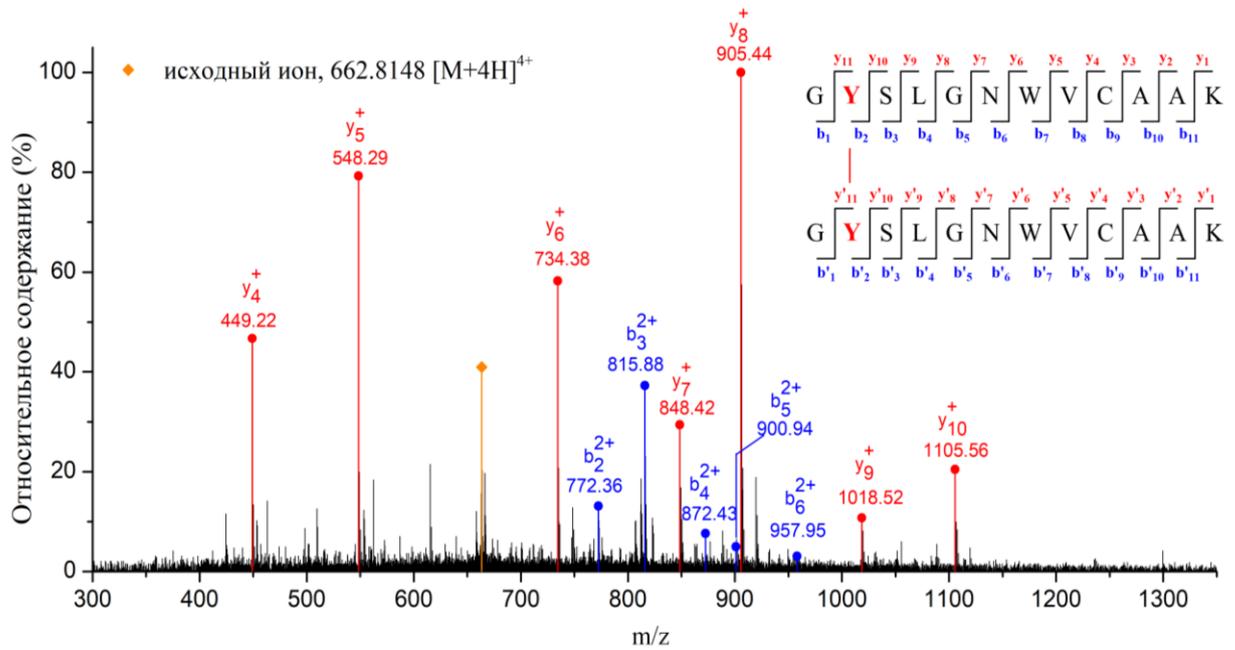


Рис. П23. MS/MS спектр димера Tyr23-Tyr23 пептида ($GY^{23}SLGNWVCAAK$) ($GY^{23}SLGNWVCAAK$), $m/z [M + 4H^+]^{4+}662.8148$ – фрагментируемый ион.

Таблица П8. Идентифицированные b- и y-ионы в MS/MS анализе пептида с $[M+H^+]^+=2648.2378$.

b ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксп. m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₂	GY ²³ (GY ²³ SLGNWVCAAK)	772.3522 (n=2)	772.3621 (n=2)	y ₁₀	SLGNWVCAAK	1105.5445	1105.5651
b ₃	GY ²³ S (GY ²³ SLGNWVCAAK)	815.8682 (n=2)	815.8783 (n=2)	y ₉	LGNWVCAAK	1018.5124	1018.5180
b ₄	GY ²³ SL (GY ²³ SLGNWVCAAK)	872.4102 (n=2)	872.4273 (n=2)	y ₈	GNWVCAAK	905.4284	905.4453
b ₅	GY ²³ SLG (GY ²³ SLGNWVCAAK)	900.9210 (n=2)	900.9428 (n=2)	y ₇	NWVCAAK	848.4069	848.4169
b ₆	GY ²³ SLGN (GY ²³ SLGNWVCAAK)	957.9424 (n=2)	957.9486 (n=2)	y ₆	WVCAAK	734.3640	734.3787
				y ₅	VCAAK	548.2847	548.2920
				y ₄	CAAK	449.2462	449.2221

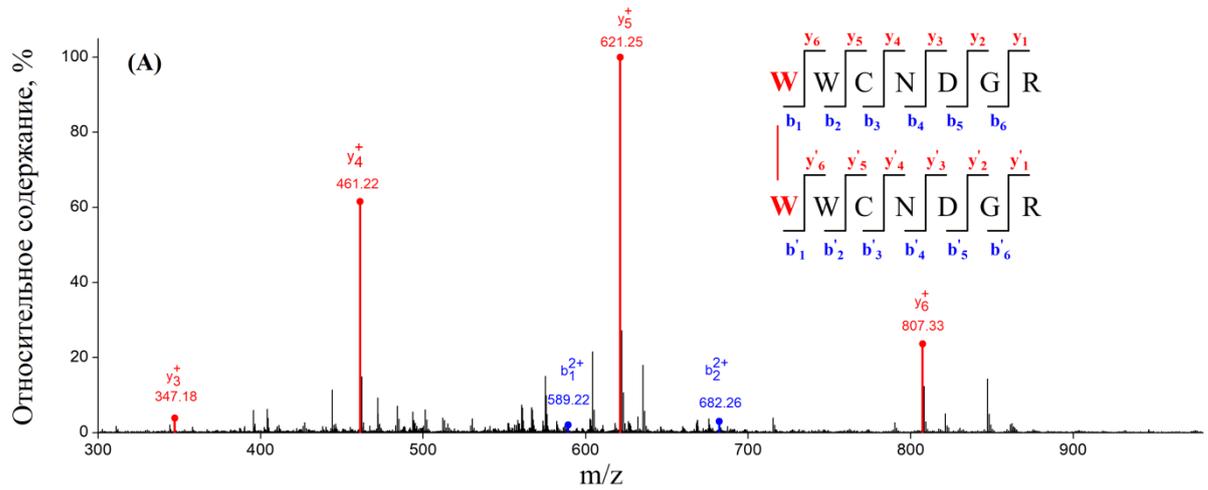


Рис. П24. MS/MS спектр димера Trp62-Trp62 пептида ($(W^{62})_2WCNDGR$) ($(W^{62})_2WCNDGR$), m/z $[M + 4H]^4+$ 496.6998 – фрагментируемый ион.

Таблица П9. Идентифицированные b- и y-ионы при MS/MS анализе пептида с $[M + H]^+ = 1983.7756$.

b ион	Последовательность пептида	Теор. m/z $[M+nH]^{n+}$	Эксп. m/z $[M+nH]^{n+}$	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z $[M+nH]^{n+}$	Эксп. m/z $[M+nH]^{n+}$
b₁	W ⁶² (W ⁶² WCNDGR)	589.2220 (n=2)	589.2222 (n=2)	y₆	WCNDGR	807.3219	807.3325
b₂	W ⁶² W (W ⁶² WCNDGR)	682.2716 (n=2)	682.2731 (n=2)	y₅	CNDGR	621.2418	621.2524
				y₄	NDGR	461.2124	461.2151
				y₃	DGR	347.1686	347.1719

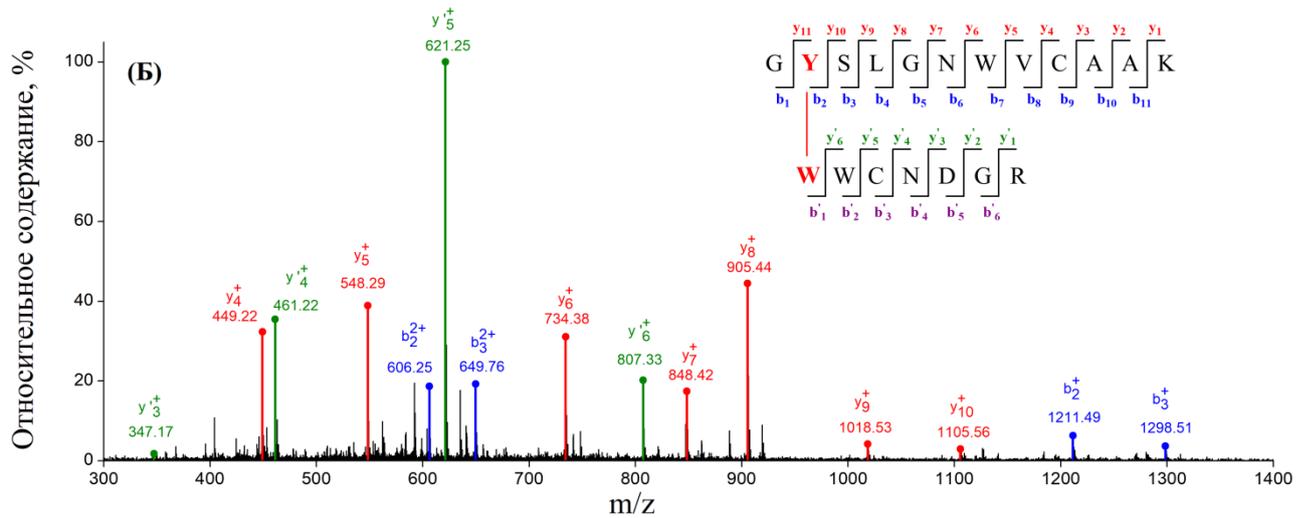


Рис. П25. MS/MS спектр димера Tyr23-Trp62 пептида ($\text{GY}^{23}\text{SLGNWVCAAK}$) ($\text{W}^{62}\text{WCNDGR}$), m/z $[\text{M} + 4\text{H}^+]^{4+}$ 579.7534 – фрагментируемый ион.

Таблица П10. Идентифицированные b- и y-ионы при MS/MS анализе пептида с $[\text{M} + \text{H}]^+ = 2315.9900$.

b ион	Последовательность пептида	Теор.m/z $[\text{M} + n\text{H}]^{n+}$	Эксп.m/z $[\text{M} + n\text{H}]^{n+}$	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z $[\text{M} + n\text{H}]^{n+}$	Эксп. m/z $[\text{M} + n\text{H}]^{n+}$
b ₂	GY^{23} ($\text{W}^{62}\text{WCNDGR}$)	1211.4921	1211.4874	y ₁₀	SLGNWVCAAK	1105.5445	1105.5589
b ₃	GY^{23}S ($\text{W}^{62}\text{WCNDGR}$)	1298.5241	1298.5139	y ₉	LGNWVCAAK	1018.5124	1018.5314
b ₂ ²⁺	GY^{23} ($\text{W}^{62}\text{WCNDGR}$)	606.2397 (n=2)	606.2460 (n=2)	y ₈	GNWVCAAK	905.4284	905.4393
b ₃ ²⁺	GY^{23}S ($\text{W}^{62}\text{WCNDGR}$)	649.7557 (n=2)	649.7641 (n=2)	y ₇	NWVCAAK	848.4069	848.4199
				y ₆	WVCAAK	734.3640	734.3772
				y ₅	VCAAK	548.2847	548.2939
				y ₄	CAAK	449.2462	449.2237
				y' ₆	WCNDGR	807.3219	807.3318
				y' ₅	CNDGR	621.2418	621.2480
				y' ₄	NDGR	461.2124	461.2179
				y' ₃	DGR	347.1686	347.1744

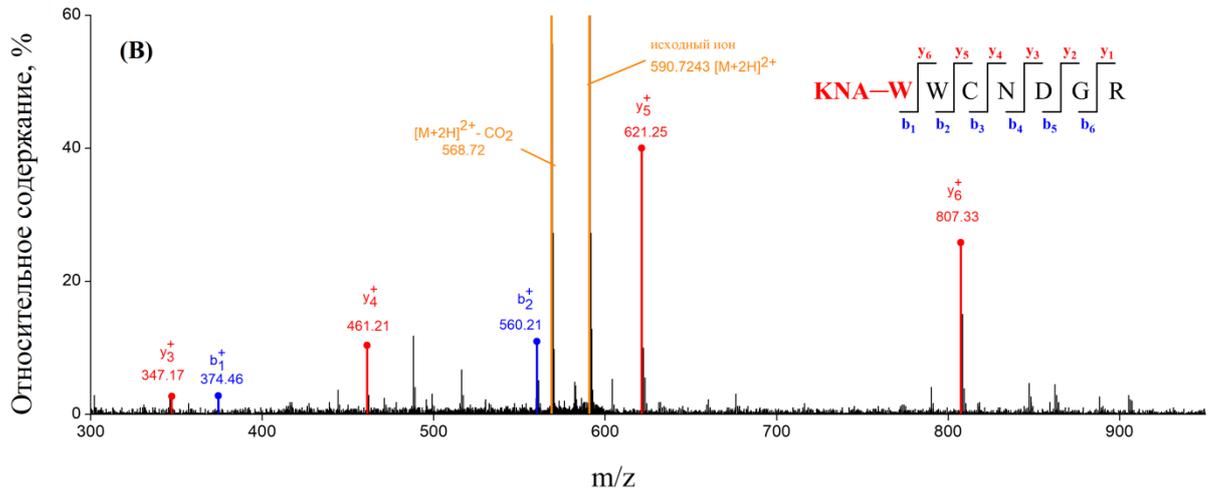


Рис. П26. MS/MS спектр продукта присоединения KNA к Trp62 пептида ($W^{62}WCNDGR$), m/z $[M + 2H]^+ 590.7243$ – фрагментируемый ион.

Таблица П11. Идентифицированные b- и y-ионы при MS/MS анализе пептида $c[M + H]^+ = 1180.5514$.

b ион	Последовательность пептида	Теор. m/z $[M+nH]^{n+}$	Эксп. m/z $[M+nH]^{n+}$	y ион	Последовательность пептида	Теор. m/z $[M+nH]^{n+}$	Эксп. m/z $[M+nH]^{n+}$
b₁	$KNA-W^{62}$	374.4366	374.4585	y₆	WCNDGR	807.3219	807.3303
b₂	$KNA-W^{62}W$	560.2159	560.2130	y₅	CNDGR	621.2418	621.2464
				y₄	NDGR	461.2124	461.2129
				y₃	DGR	347.1686	347.1756

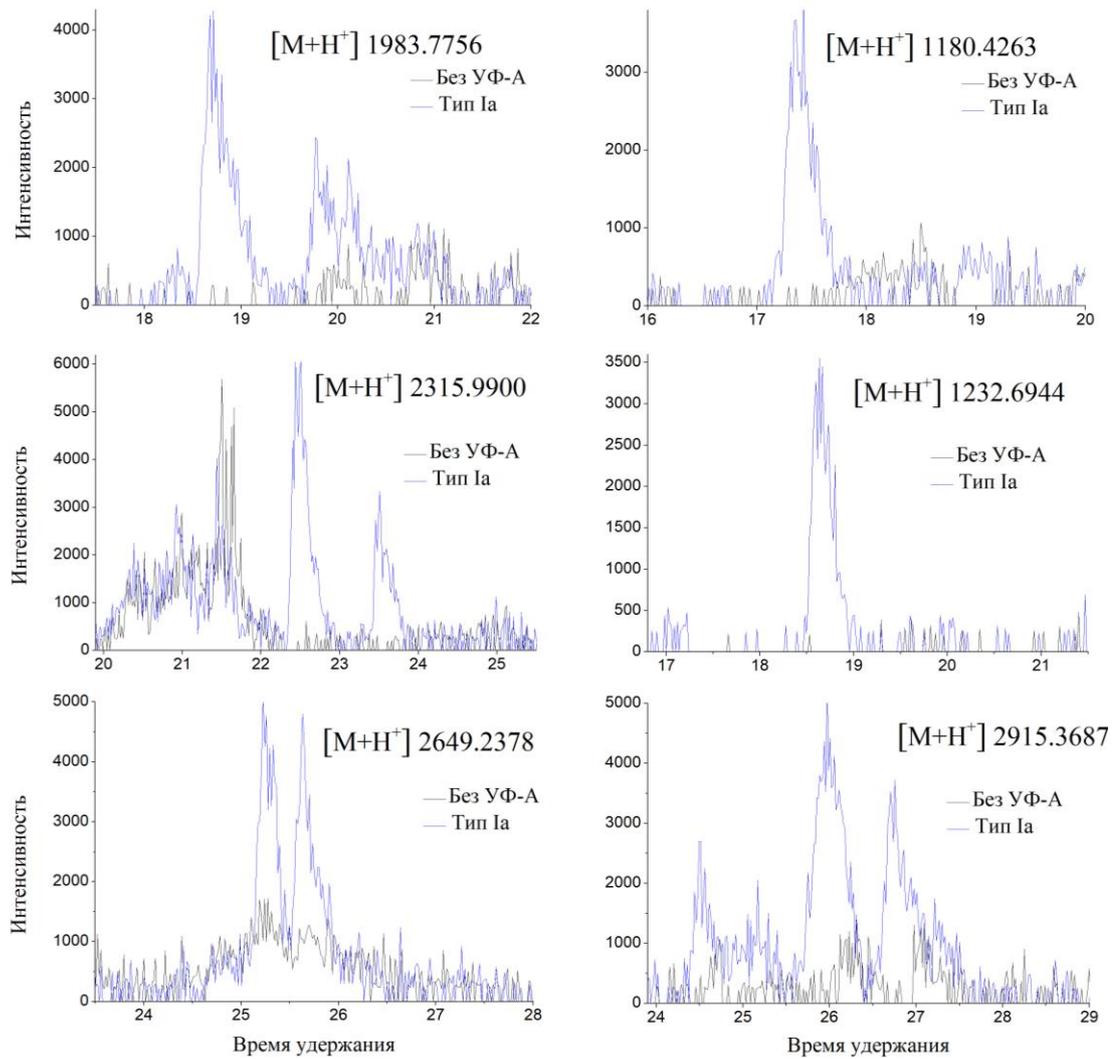


Рис. П27. Хроматограммы по выделенному ионному току для димеров (левая колонка, [M + H⁺] 1983.7756, 2315.9900 и 2648.2378) и KNA-связанных (правая колонка, [M + H⁺] 1180.4263, 1232.6944 и 2915.3687) пептидов, полученных после ВЭЖХ-МС-анализа пептидов HEWL до и после фотоллиза типа Ia.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям к.физ.-мат.н. Шерину Петру Сергеевичу и д.х.н., профессору Центаловичу Юрию Павловичу за неоценнимую помощь в постановке целей и задач, обсуждении полученных результатов и поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы. Отдельная благодарность коллективам Лаборатории протеомики и метаболомики и Группы фотоиндуцированных процессов за создание дружелюбной атмосферы, способствующей плодотворной работе.