

**НИТРОВАНИЕ ТИРОЗИНА И ТИРОЗИЛЬНЫХ ОСТАТКОВ МИОГЛОБИНА  
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВИДИМОГО СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ  
РИБОФЛАВИНА И НИТРИТА\*\***

**И. И. Степуро<sup>1</sup>, С. А. Агейко<sup>1</sup>, В. И. Степуро<sup>2\*</sup>, А. В. Янцевич<sup>3</sup>**

УДК 543.42:547.96

<sup>1</sup> Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларусь,  
Гродно, Беларусь; e-mail: scepura@gmail.com

<sup>2</sup> Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,  
Минск, Беларусь; e-mail: stsiapura@gmail.com

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларусь, Минск, Беларусь

(Поступила 10 апреля 2023)

Нитрование тирозильных остатков в белках рассматривается как один из видов посттрансляционной модификации белков, свидетельствующей о развитии окислительного нитрозативного стресса при нарушениях метаболизма и сигнальной функции монооксида азота  $\bullet\text{NO}$ . Рассмотрен неэнзиматический путь нитрования белков под действием видимого света в присутствии рибофлавина и нитрита. С использованием метода масс-спектрометрии показано, что фотосенсибилизованные рибофлавином окислительно-восстановительные процессы с участием нитрита и тирозина/тирофилла приводят к нитрованию тирозильных остатков Tyr-103 и Tyr-146 полипептидной цепи миоглобина из сердца лошади. Обсуждается возможная роль рибофлавина и других природных фотосенсибилизаторов в модификации и повреждении белков при воздействии на организм интенсивного видимого света в присутствии в крови нитритов.

**Ключевые слова:** нитрование тирозина, нитротирозин, рибофлавин, миоглобин, дитирозин, активные формы кислорода.

Protein tyrosine nitration is considered as one of the types of post-translational modification of proteins, indicating disruptions in metabolic and signaling functions of nitric oxide  $\bullet\text{NO}$  and development of oxidative nitrosative stress. We have considered the non-enzymatic pathway of protein nitration under the action of visible light in the presence of riboflavin and nitrite. Using mass spectrometry method, it is shown that redox processes photosensitized by riboflavin and involving nitrite and tyrosine/tyrosyl residues lead to nitration of tyrosyl residues Tyr-103 and Tyr-146 in polypeptide chain of horse heart myoglobin. Possible role of riboflavin and other natural photosensitizers in modification and damage of proteins in conditions when the body is exposed to intense visible light in the presence of nitrates in the blood is discussed.

**Keywords:** tyrosine nitration, nitrotyrosine, riboflavin, myoglobin, dityrosine, reactive oxygen species.

---

**NITRATION OF TYROSINE AND TYROSYL RESIDUES IN MYOGLOBIN UNDER THE ACTION OF VISIBLE LIGHT IN THE PRESENCE OF RIBOFLAVIN AND NITRITE**

**И. И. Степуро<sup>1</sup>, С. А. Агейко<sup>1</sup>, В. И. Степуро<sup>2\*</sup>, А. В. Янцевич<sup>3</sup>** (<sup>1</sup> Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus, e-mail: scepura@gmail.com; <sup>2</sup> International Sakharov Environmental State Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus; e-mail: stsiapura@gmail.com; <sup>3</sup> Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus)

\*\* Доложено на II Международном семинаре по молекулярной спектроскопии и фотохимии макрогетероциклических соединений, 18—19 октября 2022 г., г. Минск, Беларусь.

**Введение.** Исследования в области молекулярной биологии позволили установить, что протеом человека — совокупность всех белков организма с суммарным количеством более 1 млн протеоформ — значительно превышает число генов, кодирующих белковые последовательности (~20 тыс.) [1, 2]. Это возможно при условии, что один и тот же ген используется при кодировании многих белков. При этом увеличение разнообразия белковых форм достигается за счет таких механизмов, как альтернативный сплайсинг и пост-трансляционная модификация белков [1, 3, 4]. В настоящее время известно более 200 видов пост-трансляционной модификации, наиболее часто встречаются фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, гликозилирование, S-нитрозилирование и т. д. [3—5].

Нитрование тирозилов белков рассматривается как один из видов пост-трансляционной модификации [6], маркер развития окислительного нитrozативного стресса в организме вследствие нарушения метаболизма и сигнальной функции монооксида азота  $\bullet\text{NO}$  [7, 8]. Нитрование оказывается на изменении величины  $pK_a$  фенольной группы, что может приводить к нарушению процессов фолдинга полипептидных цепей и дестабилизации третичной структуры белков [9].

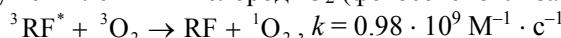
Предложен ряд механизмов, которые могут отвечать за нитрование тирозина и тирозильных остатков белков при физиологических условиях и включают в себя образование пероксинитрита в качестве промежуточного соединения при реакции  $\bullet\text{NO}$  и супероксид-аниона [7, 8, 10] либо при окислении нитрита  $\text{NO}_2^-$  в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ /пероксидаз [11—15]. Гемсодержащие белки миоглобин ( $\text{Mb}$ ) и гемоглобин ( $\text{Hb}$ ) помимо своей основной функции способны проявлять псевдопероксидазную активность, и их оксоферрильные формы катализируют окисление фенолов [11, 16], тиамина [17, 18], сульфидов [19] и нитрование тирозина (Туг) [11, 16, 20, 21].

Миоглобин представляет собой мономерный белок, содержащий одну полипептидную цепь и один гем. Его концентрация, например, в сердце составляет ~0.2—0.3 мМ. Как известно,  $\text{Mb}$  в кардиомиоцитах аутоокисляется с образованием супероксид-анионов и пероксида водорода [22—25]. При взаимодействии метмиоглобина ( $\text{metMb}$ ) с пероксидом водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуются оксоферрильные формы белка:  $^+\bullet\text{Mb}(\text{IV=O})$  (соединение I) и  $\text{Mb}(\text{IV=O})$  (соединение II), которые легко регистрируются спектрофотометрически [11, 18, 19, 26]. При нормальных физиологических условиях эти аутоокислительные реакции очень медленные и протекают с низкой скоростью. Однако если кардиомиоциты функционируют в условиях ишемии (низкий показатель  $\text{pH}$ , низкое давление кислорода в тканях), то резко возрастает образование активных форм кислорода ( $\text{A}\text{Ф}\text{К}$ ) и оксоферрильных форм  $\text{Mb}$ . Предполагается, что образование 3-нитротирозина может происходить в процессе реперфузии сердца в отсутствие пероксинитрита. Оксоферрильные формы  $\text{Mb}$  окисляют нитрит с образованием диоксида азота, который затем взаимодействует с Туг с образованием 3-нитротирозина. Изучение механизма этих реакций представляет большой интерес, так как нитрованные белки, содержащие остатки 3-нитротирозина, регистрируются при многих патологических состояниях [27].

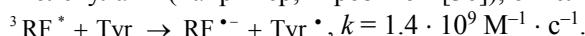
В дополнение к процессам аутоокисления гемсодержащих белков источником пероксида водорода в организме могут служить также фотохимические реакции. Множество эндогенных и экзогенных фотосенсибилизаторов [28—30], таких как флавины, протопорфирины, могут быть триггерами фототоксических и фотоаллергических реакций в живых организмах, приводящих к окислительным повреждениям биоструктур. Photoхимические реакции сенсибилизаторов с участием кислорода можно в общем случае представить в виде процессов переноса электронов (тип I) или переноса энергии (тип II), вследствие которых происходит образование радикалов гидропероксила  $\text{HO}_2^\bullet$  и супероксидиона  $\text{O}_2^\bullet-$ , превращающихся в  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакциях диспропорционирования, или синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$  [29, 31]. Похожие реакции возможны для многих молекул красителей, некоторых лекарств, витаминов и т. д., которые могут быть активированы светом, например, для метиленового синего, бенгальского розового, рибофлавина [32, 33]. Кроме того, нитрование тирозина и тирозильных остатков белков может происходить неэнзиматически (без участия энзимов) и условием его протекания является наличие свободных радикалов тирозина/тирозила и  $\bullet\text{NO}_2$ , способных образовывать при рекомбинации 3-нитротирозин и 3-нитротирозил [8]. Таким образом, вклад в нитрование белков может вноситься любым окислительным процессом, в том числе фотохимическим, при протекании которого могут образовываться  $\bullet\text{NO}_2$  и свободные радикалы тирозина/тирозила.

В настоящей работе в качестве процесса, приводящего к нитрованию, рассматриваются окислительные реакции, фотосенсибилизированные рибофлавином (RF), с участием АФК и активных форм азота (АФА). Молекула RF (витамин  $\text{B}_2$ ), имеющая спектр поглощения с максимумами 374 и 445 нм, является эффективным природным фотосенсибилизатором [33, 34]. При фотовозбуждении молекула RF (рис. 1)

вследствие интеркомбинационной конверсии (ISC) с высоким квантовым выходом ( $\Phi_{\text{ISC}} \sim 0.7$ ) переходит в триплетное состояние  $^3\text{RF}^*$  [33—35], которое с высокой скоростью может реагировать с растворенным кислородом, образуя синглетный кислород  $^1\text{O}_2$  (фотосенсибилизация II типа):



либо с фенолсодержащими молекулами (например, тирозином [36]), окисляя их



Дальнейшая реакция молекулярного кислорода с семихионной формой рибофлавина  $\text{RF}^\bullet$  приводит к образованию супероксид-аниона  $\text{O}_2^\bullet$ .

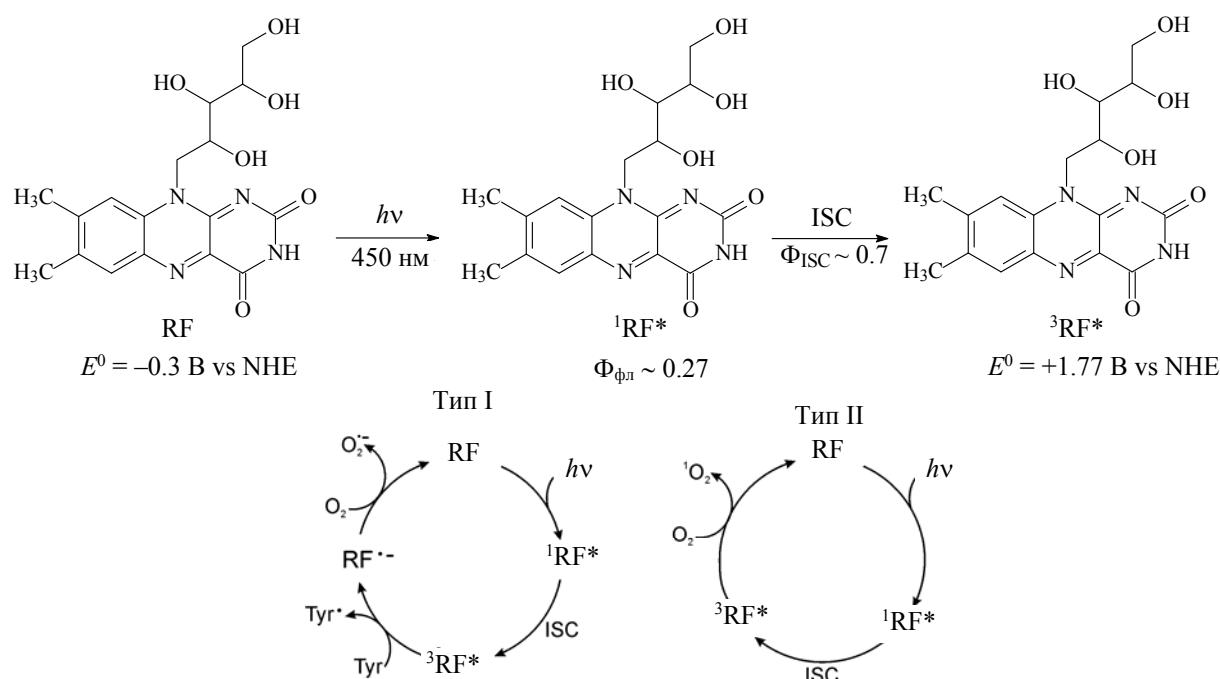


Рис. 1. Схема фотоиндуктированных процессов с участием молекулы рибофлавина, адаптированная из [35]: структура молекулы RF и переходы в возбужденные синглетное  $^1\text{RF}^*$  и триплетное  $^3\text{RF}^*$  состояния, ISC — интеркомбинационная конверсия,  $\Phi_{\text{ISC}}$  и  $\Phi_{\text{фл}}$  — квантовые выходы интеркомбинационной конверсии и флуоресценции,  $E^0$  — стандартный электродный потенциал; механизмы фотосенсибилизации I и II типов с участием молекулы RF

Сенсибилизованные рибофлавином фотохимические реакции, вероятно, протекают также *in vivo*. Содержание RF в коже и глазной жидкости 7.9 и 4.5 мкМ [35], и воздействие солнечного облучения способно инициировать фотосенсибилизированные рибофлавином окислительные процессы в коже и структурных компонентах глаза, приводящие к патологиям [34].

Цель настоящей работы — исследование механизма фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тирозина и тирозильных остатков Mb под действием видимого света в присутствии нитрита, идентификация 3-нитротирозильных остатков в полипептидной цепи макромолекулы и оценка вклада окислительных процессов, фотосенсибилизируемых рибофлавином, в нитрование белков.

**Материалы и методы.** Использован Mb из сердца лошади, L,D-тироzin (Sigma-Aldrich, США). RF со степенью очистки 99.5 % (Chem-Impex Int., США). Реагенты нитрит натрия, азид натрия, пероксид водорода производства России и Беларусь. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary-100 (Agilent, США), флуоресценции — на спектрофлуориметре CM2203 (“Солар”, Беларусь). Концентрацию раствора пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения при 240 нм ( $\varepsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [37]. Образование дитирозина регистрировали методом абсорбционной спектроскопии, используя молярный коэффициент поглощения  $\varepsilon_{315} = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (pH 7.5) [38, 39], а также флуоресцентным методом. Интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм с возбуждением при  $\lambda_{\text{возб}} = 315 \text{ nm}$  [39, 40].

Концентрацию 3-нитротирозина определяли спектрофотометрически [16]. В кислой среде концентрацию 3-нитротирозина определяли по поглощению при 360 нм, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{360} = 2790 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . В щелочных растворах при pH 9.0 поглощение измеряли при 428 нм,  $\epsilon = 4200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Концентрацию metMb в нейтральной или слабокислой среде определяли по поглощению при 408 и 630 нм ( $\epsilon_{408} = 188000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ,  $\epsilon_{630} = 3900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), в щелочной среде с pH 9.5 — по поглощению полосы Соре при 411 нм ( $\epsilon_{411} = 119000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) [41]. Концентрацию оксоферрильных форм Mb определяли, измеряя поглощение при 421 нм ( $\epsilon_{421} = 111000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) [42]. Источником облучения видимым светом служила ртутная лампа ДРК-120 со светофильтром ЖС-11, выделяющим длинноволновую область с  $\lambda > 420$  нм (коэффициент пропускания  $T_{420} = 50\%$ ).

Нитрование тирозильных остатков Mb при фотохимической реакции проводили путем облучения видимым светом ртутной лампы растворов 20 мкМ Mb в смеси с 50 мкМ RF, 1 мМ тирозином и 1 мМ нитритом в фосфатном буфере с pH 6.5 в атмосфере воздуха. Время облучения 60 мин. Нитрование Mb в темновой реакции проводилось путем инкубации 20 мкМ metMb с 1 мМ пероксидом водорода и 1 мМ нитритом в течение 6 ч в темноте.

Образцы белка после нитрования подвергались триптическому гидролизу, масс-спектры полученных пептидов регистрировали после разделения на обращенно-фазовой колонке Hypersil Gold C18 (2.1×100 мм, 1.9 мкм) с использованием хроматографической системы Agilent 1290, оснащенной квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Agilent Q-TOF 6550 в режиме ионизации электrosпрай (ESI<sup>+</sup>).

**Результаты и их обсуждение.** *Фотосенсибилизированное рибофлавином образование дитирозина и 3-нитротирозина.* Рассмотрим окислительно-восстановительные процессы с участием тирозильных свободных радикалов и  $\bullet\text{NO}_2$ , инициируемые облучением видимым светом водных растворов тирозина и нитрита в атмосфере воздуха в присутствии фотосенсибилизатора RF. При фотооблучении водных растворов 0.2 мМ тирозина в присутствии 0.02 мМ RF в спектре поглощения смеси возникает новая полоса с максимумом при 315 нм, которая соответствует поглощению образующегося при фотолизе дитирозина. Об образовании дитирозина в облученном растворе также свидетельствует появление полосы флуоресценции 410 нм с максимумом спектра возбуждения при 315 нм (рис. 2). На хроматограмме продуктов фотолиза кроме исходного тирозина с  $m/z = 181.074$  а.е.м. появляется пик с  $m/z = 361.137$  а.е.м., соответствующий дитирозину.

По мере фотооблучения водной смеси RF с тирозином концентрация тирозина снижается и при возбуждении светом с  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм снижается интенсивность флуоресценции тирозина при 305 нм, тогда как интенсивность эмиссии дитирозина при 410 нм возрастает (рис. 2). Так, облучение водного раствора 0.2 мМ тирозина в присутствии 0.02 мМ RF в течение 10 и 20 мин приводит к снижению концентрации тирозина на 35 и 57 % и росту концентрации продуктов фотолиза.

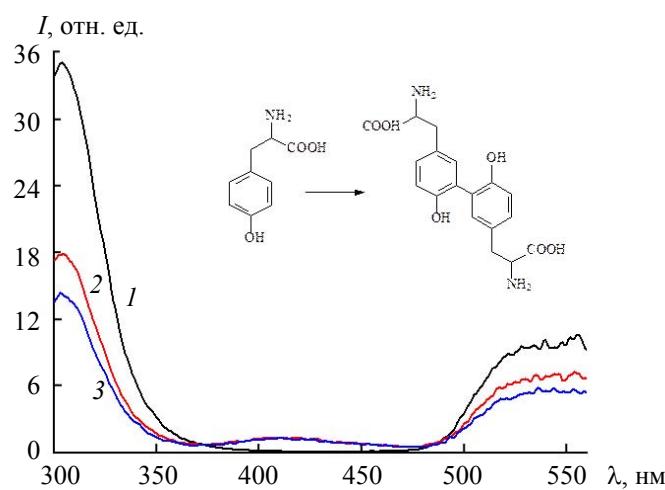


Рис. 2. Спектры флуоресценции водных растворов 0.2 мМ тирозина в смеси с 0.02 мМ RF после облучения видимым светом 0 (1), 10 (2) и 20 мин (3);  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм; полосы флуоресценции с максимумами при 305, 410 и 550 нм принадлежат тирозину, дитирозину и RF; растворы облучали светом ртутной лампы ДРК-120, используя светофильтр ЖС-11

Облучение проводилось в атмосфере воздуха, и при указанных экспериментальных условиях концентрация растворенного кислорода в растворе составляла  $\sim 0.25$  мМ, т. е. RF может выступать в качестве фотосенсибилизатора I и II типов, приводя к образованию продуктов окисления тирозина как при прямом взаимодействии с тирозином, так и опосредованно, путем генерации синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$ . Кроме синглетного кислорода фотооблучение RF может также инициировать реакционные процессы с участием таких АФК, как  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$  (рис. 3, табл. 1).

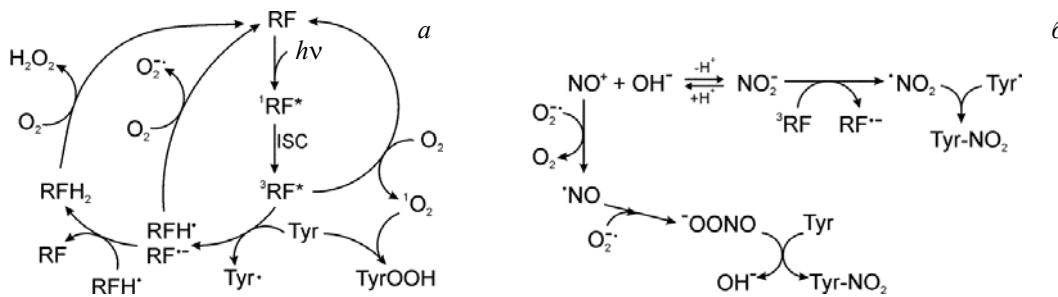


Рис. 3. Предполагаемая схема образования радикалов тирозина (a), пероксинитрита и  $\bullet\text{NO}_2$  (б) при воздействии видимого света на водные растворы тирозина, нитрита и рибофлавина в аэробных условиях

**Т а б л и ц а 1. Окислительно-восстановительные потенциалы  $E^{\circ'}$  при pH 7 для реакций с участием RF, АФК и АФА, ароматических аминокислот [43]**

Реакция восстановления	$E^{\circ'}$ vs NHE при 298 К, pH 7
$\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$	-0.18*
$^1\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^\bullet$	+0.81*
$\text{O}_2^\bullet + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+0.91
$\text{HO}_2^\bullet + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+1.05
$\text{H}_2\text{O}_2 + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	+0.39
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+1.35
$\text{HO}^\bullet + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+2.31
$\bullet\text{NO}_2 + e^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+1.04 [44, 45]
$\text{NO}^+ + e^- \rightarrow \bullet\text{NO}$	+1.21 [44]
$\text{Tyr}^\bullet + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Tyr}$	+0.93 [46]
$\text{Trp}^\bullet + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Trp}$	+1.015 [46]
$\text{RF} + e^- \rightarrow \text{RF}^\bullet$	-0.3 [35]
$^3\text{RF} + e^- \rightarrow \text{RF}^\bullet$	+1.77 [35]

\*С учетом растворимости в воде.

Основным путем образования дитирозина [47] считается димеризация тирозильных радикалов Тир $^\bullet$ , образованных в реакции с молекулой RF в триплетном состоянии  $^3\text{RF}$  (рис. 3). Редокс-потенциал восстановления для синглетного кислорода недостаточен (табл. 1) для окисления тирозина до Тир $^\bullet$ , и при взаимодействии молекулы тирозина с  $^1\text{O}_2$  образуется гидропероксид тирозина ТирOOH в качестве интермедиата с последующим формированием ряда стабильных продуктов окисления [48]. Дополнительным процессом, ведущим к образованию гидропероксидов тирозина, является реакция рекомбинации радикала тирозина Тир $^\bullet$  и супероксид-аниона  $\text{O}_2^-$  [49, 50]. Таким образом, основными продуктами фотолиза тирозина являются дитирозин, обладающий интенсивной флуоресценцией, а также гидропероксид тирозина и продукты его дальнейшей трансформации.

Участие синглетного кислорода в реакции фотолиза тирозина подтверждается экспериментами по тушению синглетного кислорода с помощью азота. Азот натрия известен как эффективный тушитель  $^1\text{O}_2$  с константой скорости тушения  $(1.5-2) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [31, 51]. При добавлении высоких концентраций азота ( $\geq 1.0$  мМ) в облучаемые растворы, содержащие RF и тирозин с низкой концен-

трацией ( $\leq 0.1$  мМ), выход продуктов фотолиза снижается в  $\sim 10$ — $15$  раз (табл. 2). По мере роста концентрации тирозина в облучаемой смеси влияние добавки тушителя (1 мМ азода) на снижение выхода фотопродуктов тирозина становится менее значительным. Это указывает, что с ростом концентрации тирозина в облучаемом растворе основной вклад в образование фотопродуктов вносят процессы прямого окисления тирозина в реакции с  ${}^3\text{RF}$ , а вклад реакций с участием  ${}^1\text{O}_2$  снижается. На основании констант скоростей реакций  ${}^3\text{RF}$  с тирозином ( $k = 1.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [36]) и кислородом ( $k = 0.98 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [35]) можно оценить вклад фотохимических процессов с участием  ${}^1\text{O}_2$  в образование фотопродуктов тирозина в зависимости от начальной концентрации тирозина в растворе (тушение  ${}^3\text{RF}$ -состояния азидом при этом не принималось в расчет как незначительное [31]). Как видно из табл. 2, несмотря на корреляцию вкладов синглетного кислорода в процесс фотолиза тирозина, экспериментальные величины несколько ниже расчетных, что может свидетельствовать о расходовании молекул растворенного  $\text{O}_2$  в ходе фотоиндированных окислительных процессов.

**Таблица 2. Влияние добавления азода  $\text{NaN}_3$  к водному раствору тирозина и 0.02 мМ RF на образование продуктов фотолиза тирозина**

Исходная концентрация тирозина, мкМ	Концентрация тирозина при фотолизе в присутствии азода, мкМ		Вклад ${}^1\text{O}_2$ в образование фотопродуктов тирозина, %	
	$[\text{N}_3^-] = 0$ мМ	$[\text{N}_3^-] = 1$ мМ	экспериментальный	расчетный
10	8.6	0.8	91	95
50	21.0	6.0	71	78
100	25.6	10.4	59	64

Причение. Растворы облучали светом ртутной лампы ДРК-120 в течение 20 мин с использованием светофильтра ЖС-11.

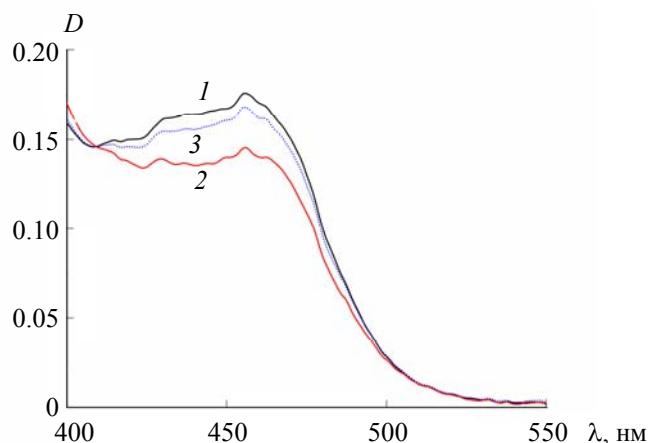
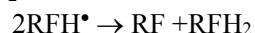


Рис. 4. Спектры поглощения водных растворов 20 мкМ RF в смеси с 1 мМ Туг в закрытых кюветах при фотооблучении: 1 — без облучения, 2 — 30 мин облучения, 3 — после запуска воздуха в кювету с облученным в течение 30 мин раствором

Фотооблучение растворов RF и тирозина в закрытых кюветах приводит к снижению концентрации растворенного кислорода и обратимому обесцвечиванию раствора вследствие перехода RF в метастабильные семихинонную  $\text{RF}^{\bullet-}$  и лейкоформу  $\text{RFH}_2$ . При введении воздуха в кювету и аэрировании облученных растворов происходит реокисление лейкоформы  $\text{RFH}_2$  кислородом и частичное восстановление спектра поглощения RF (рис. 4).

При окислении тирозина до Туг $^\bullet$  молекула  ${}^3\text{RF}$  переводится в протонированную  $\text{RFH}^\bullet$  или депротонированную  $\text{RF}^{\bullet-}$  семихинонные формы, которые далее могут быть окислены кислородом с образованием супероксид-аниона  $\text{O}_2^\bullet-$  и  $\text{HO}_2^\bullet$  либо диспропорционировать, давая исходный рибофлавин RF и восстановленную лейкоформу  $\text{RFH}_2$



При взаимодействии с кислородом восстановленная лейкоформа RFH<sub>2</sub> окисляется до исходной молекулы RF с образованием пероксида водорода (рис. 3, а).

Таким образом, в наших экспериментальных условиях фотосенсибилизированный рибофлавином фотолиз тирозина происходит по двум механизмам: при взаимодействии тирозина с <sup>1</sup>O<sub>2</sub> и при окислении тирозина молекулой RF в триплетном состоянии <sup>3</sup>RF. Однако образование тирозильных радикалов Туг<sup>•</sup> преимущественно происходит по второму механизму (рис. 3, а).

Добавление в облучаемую инкубационную смесь нитрита приводит к образованию дополнительного продукта фотолиза тирозина — 3-нитротирозина, поглощающего в области 360 нм (рис. 5). В смеси, содержащей 0.1 мМ тирозина, 1 мМ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 0.02 мМ RF, после 20 мин фотооблучения обнаруживается 3-нитротирозин с концентрацией ~8 мкМ. Максимальный выход 3-нитротирозина наблюдается при pH ~ 4.5—5.0.

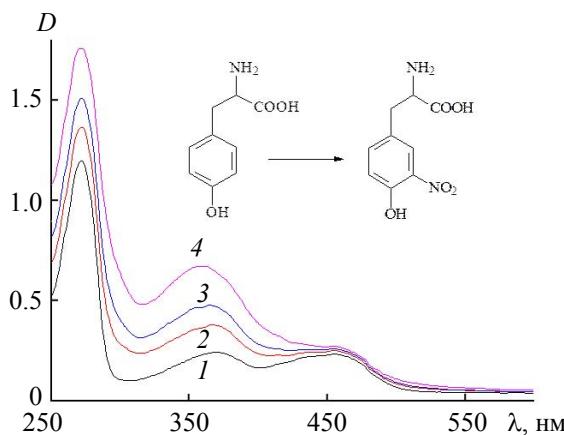


Рис. 5. Спектры поглощения водных растворов 0.1 мМ тирозина и 1 мМ нитрита в смеси с 0.02 мМ RF после облучения видимым светом ртутной лампы (светофильтр ЖС-11) в течение 0 (1), 10 (2), 20 (3) и 60 мин (4)

Нитрующим агентом при образовании 3-нитротирозина может выступать пероксинитрит ONOO<sup>-</sup> [8, 52] либо диоксид азота <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> [8]. В первом случае реакция нитрования протекает при взаимодействии пероксинитрита с тирозином, тогда как во втором диоксид азота должен прореагировать с радикалом тирозина Туг<sup>•</sup> [8].

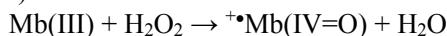
В качестве источника пероксинитрита обычно рассматривается высокоэффективная диффузионно-контролируемая реакция монооксида азота <sup>•</sup>NO с супероксид-анионом O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Как отмечено выше, при фотосенсибилизированном рибофлавином фотолизе тирозина образуются супероксид-анионы (рис. 3, а), которые могут принять участие в данной реакции.

При уменьшении pH раствора происходит протонирование нитрита с pK<sub>a</sub> ~ 3.3 и образование нестабильной азотистой кислоты, которая в кислой среде способна образовывать ион нитрозония NO<sup>+</sup>

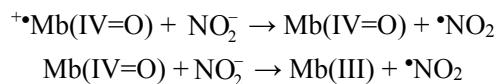
$$\text{HNO}_2 \leftrightarrow \text{NO}^+ + \text{OH}^-$$

Ион нитрозония может быть далее восстановлен до монооксида азота <sup>•</sup>NO в реакции, например, с супероксид-анионом. При низких pH данный путь образования <sup>•</sup>NO и далее пероксинитрита может быть доминирующим механизмом при нитровании тирозина, однако можно ожидать, что его вклад несуществен в средах с нейтральным pH. Кроме того, данные о потенциале восстановления для <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> (табл. 1) свидетельствуют о возможности прямого окисления нитрита до <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> при взаимодействии с RF в триплетном состоянии <sup>3</sup>RF. В [53] показана возможность фотосенсибилизированного рибофлавином нитрования белков с участием данного механизма.

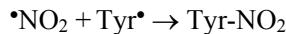
Еще один путь образования диоксида азота, имеющий отношение к обсуждению дальнейших результатов по нитрованию белка, может быть обусловлен окислением нитрита в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и гемсодержащих белков (таких, как Mb), проявляющих псевдопероксидазную активность. Данные [11, 16] свидетельствуют о том, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> взаимодействует с metMb с образованием оксоферрильной формы <sup>+</sup>Mb(IV=O) (соединение I)



Оксоферрильные формы Mb<sup>+</sup>Mb(IV=O) (соединение I) и Mb(IV=O) (соединение II) окисляют нитрит до диоксида азота в реакциях:



Схематично процессы нитрования тирозина в реакциях, фотосенсибилизованных RF, показаны на рис. 3, б. Доминирующий путь нитрования Туг при облучении видимым светом может быть представлен в виде двухстадийного механизма, включающего в себя окисление молекул Туг до тирозильных радикалов Туг<sup>•</sup>, молекул нитрита — до диоксида азота  $\bullet\text{NO}_2$ , а затем образование 3-нитротирозина вследствие взаимодействия диоксида азота с тирозильными радикалами



Альтернативный путь с участием пероксинитрита в качестве нитрующего агента дает заметный вклад в нитрование при снижении pH раствора, поскольку в нем фигурирует ион нитрозония  $\text{NO}^+$ , вероятность образования которого низка при нейтральных pH.

*Фотосенсибилизированное рибофлавином нитрование тирозина миоглобина.* Нитрование тирозильных остатков Mb из сердца лошади проводилось фотохимически — фотооблучением раствора 20 мкМ Mb, 1 мМ NaNO<sub>2</sub>, 1 мМ Туг в присутствии 50 мкМ RF светом ртутной лампы с  $\lambda > 420$  нм (фильтр ЖС-11) в течение 60 мин, а также химически — инкубацией в темноте 20 мкМ Mb, 1 мМ NaNO<sub>2</sub>, 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 6 ч.

Все растворы белков нормировали по содержанию основного белка до концентрации 1 мг/мл. К раствору, содержащему 50 мкг белка (20 мкл), добавляли 10 мкл 50 мМ водного раствора дитиотреитола, перемешивали и оставляли в термостате при температуре 50 °C на 30 мин. Затем добавляли 10 мкл 150 мМ водного раствора йодацетамида и оставляли на 1 ч в темноте при комнатной температуре. Полученную смесь разбавляли 960 мл аммоний-бикарбонатного буфера (pH 8.0), перемешивали и обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин, после чего вносили 2 мкл раствора трипсина в 50 мМ уксусной кислоты с концентрацией 0.5 мг/мл. Трипсинолиз проводили в течение 16 ч при температуре 37°C. Для выделения пептидов проводили твердофазную экстракцию с помощью картриджей SampliQ C18 (EC), содержащих 100 мг сорбента. Картриджи последовательно промывали 2 мл ацетонитрила, 2 мл воды, 2 мл 0.2 % муравьиной кислоты, затем наносили раствор с продуктами трипсинолиза. Колонку промывали 2 мл 0.2 % муравьиной кислоты. Пептиды элюировали 1 мл смесью ацетонитрил-вода (3:2, v/v), содержащей 0.2 % муравьиной кислоты. Полученный раствор использовали для ВЭЖХ-МС анализа.

*Хромато-масс-спектрометрический анализ.* Для разделения смеси пептидов использовали колонку ZORBAX Extend-C18 (2.1×50 мм, 1.8 мкм). Подвижная фаза А — 0.2 % раствор муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В — 0.2 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. В течение 35 мин градиент от 3 до 25 % В, 10 мин — градиент от 25 до 40 % В, 10 мин — градиент от 40 до 90 % В, 15 мин — 90 % В. Скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин. Температура термостата колонки 40 °C. Объем ввода 0.5 мкл. Каждый образец подвергался анализу два раза.

Для детекции использовали масс-спектрометрический детектор Q-TOF 6550 с источником ионизации электроспрей (APESI). Параметры источника ионизации: температура оболочечного газа 400 °C; поток оболочечного газа 9 л/мин; напряжение на капилляре 2 кВ; напряжение на фрагменторе 360 В. Режим работы масс-анализатора: Auto-MS/MS; диапазон  $m/z$  в режиме MS: 275-1700; диапазон  $m/z$  в режиме MS/MS: 275—1700; энергия фрагментации: для  $z = 2$ —3.1 ( $m/z$ ) + 1, для  $z \geq 3$ —3.6 ( $m/z$ ) — 4.8; изотопная модель — пептиды. Для идентификации модификаций данные обрабатывали в программном пакете PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions).

Молекула Mb имеет два тирозильных остатка Туг-103 и Туг-146 (или Y103 и Y146 при однобуквенном обозначении), способных подвергнуться нитрованию. Как видно из рис. 6 и табл. 3, среди пептидов, полученных после гидролиза, обнаруживаются фрагменты полипептидной цепи белка, нитрованные по обоим тирозильным остаткам. Нитрования триптофанильных остатков в Mb не наблюдалось. Обнаружено, что в фотосенсибилизированной рибофлавином реакции нитрования Mb модификация остатка Туг-103 происходит в ~10 раз менее эффективно, чем для Туг-146 (табл. 3), и количество образовавшихся Туг-103-NO<sub>2</sub> составляет ~9 % от количества Туг-146-NO<sub>2</sub>.

В случае темновой реакции нитрования в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> количество нитрованных остатков Туг-103-NO<sub>2</sub> составляет <2 % от числа Туг-146-NO<sub>2</sub>. Таким образом, вероятность нитрования остатка Туг-103 Mb возрастает при фотохимической реакции в присутствии RF.



Рис. 6. Последовательность первичной структуры миоглобина из сердца лошади и пептидные фрагменты, полученные после трипсинового гидролиза белка. Символом **■** выделены фрагменты с увеличенной массой за счет нитрования

**Т а б л и ц а 3. Относительное количество тирозилсодержащих пептидов миоглобина после реакций нитрования**

Остаток тирозина	Обнаруженные пептиды	Нитрование белка при темновой реакции с $\text{H}_2\text{O}_2$	Нитрование белка при фотохимической реакции
Туг-103	Y(+45.00)LEFISDAIH Y(+45.00)LEFISDAI	35 —	105 —
Туг-146	Y(+45.00)KELGFQG NDIAAKY(+45.00)KELGFQG	2670 —	1230

Нитрование тирозильных остатков в Mb, обнаруженное при темновой реакции, противоречит результатам [11], согласно которым нитрования тирозильных остатков metMb не происходит или оно незначительно даже после длительной инкубации с пероксидом водорода и нитритом. Однако при высоких концентрациях нитрита в растворе может образовываться комплекс иона Fe(III) гема с пероксинитритом Mb(III)-N(O)OO (что проявляется в сдвиге полосы Соре до 416 нм), который с высокой эффективностью нитрует гем и находящийся вблизи остаток Туг-146 в конкурентной реакции [20]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в темновой реакции нитрование пре-терпевает главным образом Туг-146, а модификация Туг-103 составляет <2 %, что хорошо согласуется с [20]. Отметим, что при нитровании в ходе фотохимической реакции увеличивается доля модифицированных остатков Туг-103, находящихся вдали от гема (до ~9 % от числа Туг-146-NO<sub>2</sub>). Это может свидетельствовать о том, что нитрованию подвергаются преимущественно тирозильные остатки вблизи источника образования нитрующего агента (диоксида азота или пероксинитрита). В случае темновой реакции источником \*NO<sub>2</sub> служит комплекс иона железа гема с пероксинитритом [20], что и определяет преимущественное нитрование ближайшего к гему остатка Туг-146. В случае фотохимической реакции источником молекул \*NO<sub>2</sub> может также служить реакция окисления нитрита при взаимодействии с RF в триплетном состоянии <sup>3</sup>RF [53]. С данным процессом связываем рост вероятности нитрования удаленного от гема остатка Туг-103.

Как RF, так и его производные — flavin mononucleotide (FMN) и flavin adenine dinucleotide (FAD) — выступают в качестве фотосенсибилизаторов, инициируя при фотооблучении процессы окисления липидов и белков [34, 35]. Содержание flavинов в сетчатке глаза является высоким и для крысы достигает ~46 пмоль FAD, 18 пмоль FMN, 4.8 пмоль RF на 1 мг белка [54]. Типичная концентрация RF в коже и глазной жидкости человека 7.9 мкмоль/(кг сухого вещества) и 4.5 мкМ [35]. При этом кожа и глаза постоянно подвержены воздействию солнечного облучения и протекающие в них фотохимические процессы рассматриваются в качестве фактора риска и причины развития с возрастом ряда патологических состояний, таких как рак кожи, катаракта [55], макулодистрофия [34, 35].

Кристаллины — основной белковый компонент хрусталика глаза — при фотооблучении в присутствии RF претерпевают структурные изменения [56], испытывают нитрование тирозильных остатков в присутствии нитрита [53], что может вести к патологическим изменениям — образованию амилоидных фибрилл и развитию катаракты [55]. Концентрация нитрита в плазме крови находится на микромолярном уровне, но может увеличиваться при хронических воспалительных процессах [57]. Это позволяет предположить, что фотосенсибилизированные флавинами реакции нитрования тирозильных остатков белков могут протекать при физиологических условиях в коже и клеточных структурах глаза. Важно также отметить, что процесс обмена структурных компонентов хрусталика глаза (кристаллина) и кожи (эластина) довольно медленный и структурные модификации белков при нитрозильном и окислительном стрессах могут накапливаться в течение нескольких лет [53].

**Заключение.** С помощью метода масс-спектрометрии показано, что при облучении видимым светом водных растворов рибофлавина в смеси с нитритом, тирозином и метмиоглобином из сердца лошади происходит нитрование тирозильных остатков Туг-103 и Туг-146 белка. Нитрования остатков триптофана не обнаружено. Модификации подвергается преимущественно остаток Туг-146, а количество нитрованных остатков Туг-103-NO<sub>2</sub> составляет ~9 % от числа Туг-146-NO<sub>2</sub>. В темновой реакции нитрования миоглобина при инкубации белка с нитритом и пероксидом водорода, согласно описанному ранее механизму [20] с образованием комплекса пероксинитрита с гемом, количество нитрованных остатков Туг-103-NO<sub>2</sub> составляет <2 % от числа Туг-146-NO<sub>2</sub>. Таким образом, механизмы модификации тирозилов белка при темновой и фотохимической реакциях нитрования существенно различаются, что проявляется в изменении вероятности нитрования остатка Туг-103 миоглобина. В экспериментах по фотосенсибилизированному рибофлавином образованию 3-нитротирозина в растворе с нитритом показано, что фотохимический путь нитрования может дополнительно включать в себя образование •NO<sub>2</sub> из нитрита при реакции с молекулой фотосенсибилизатора в триплетном состоянии <sup>3</sup>RF, как было предложено ранее [53], либо формирование вначале •NO, а далее пероксинитрита при взаимодействии иона нитрозона NO<sup>+</sup> с супероксид-анионами. Вероятность образования пероксинитрита по второму пути существенна только при низких pH.

Авторы выражают благодарность М. Травкиной за пробоподготовку и регистрацию масс-спектров, Л. Г. Кирюхиной — за помощь в подготовке статьи.

Работа выполнена при поддержке программы “Трансляционная медицина” на 2021—2025 гг. (подпрограмма “Экспериментальная медицина”) по договору от 17 февраля 2021 г. № 04/21/2021-29-019 и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Ф22ТУРЦ-007).

- [1] K. Chandramouli, P.-Y. Qian. Hum. Genom. Proteom., **2009** (2009) 239204
- [2] Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, J. R. Yates III. Chem. Rev., **113**, N 4 (2013) 2343—2394
- [3] O. N. Jensen. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **7**, N 6 (2006) 391—403
- [4] S. Prabakaran, G. Lippens, H. Steen, J. Gunawardena. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med., **4**, N 6 (2012) 565—583
- [5] G. A. Khoury, R. C. Baliban, C. A. Floudas. Sci. Rep., **1**, N 1 (2011) 1—5
- [6] E. Gianazza, J. Crawford, I. Miller. Amino Acids, **33** (2007) 51—56
- [7] R. Radi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, N 12 (2004) 4003—4008
- [8] R. Radi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **115**, N 23 (2018) 5839—5848
- [9] L. A. Abriata, A. Cassina, V. Tortora, M. Marín, J. M. Souza, L. Castro, A. J. Vila, R. Radi. J. Biol. Chem., **284**, N 1 (2009) 17—26
- [10] C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi. Nat. Rev. Drug Disc., **6**, N 8 (2007) 662—680
- [11] S. Herold. Free Radical Biol. Med., **36**, N 5 (2004) 565—579
- [12] J. B. Sampson, Y. Ye, H. Rosen, J. S. Beckman. Arch. Biochem. Biophys., **356**, N 2 (1998) 207—213
- [13] K. Bian, Z. Gao, N. Weisbrodt, F. Murad. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, N 10 (2003) 5712—5717
- [14] A. Van Der Vliet, J. P. Eiserich, B. Halliwell, C. E. Cross. J. Biol. Chem., **272**, N 12 (1997) 7617—7625
- [15] J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, A. van der Vliet. Nature, **391**, N 6665 (1998) 393—397
- [16] K. Kilinc, A. Kilinc, R. E. Wolf, M. B. Grisham. Biochem. Biophys. Res. Commun., **285**, N 2 (2001) 273—276

- [17] I. Stepuro, A. Y. Oparin, V. Stsiapura, S. Maskevich, V. Y. Titov. Biochemistry (Moscow), **77**, N 1 (2012) 41—55
- [18] С. Лабор, В. Степуро, И. Степуро, В. Смирнов. Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук, № 2 (2017) 55—65
- [19] T. Spolitak, P. F. Hollenberg, D. P. Ballou. Arch. Biochem. Biophys., **600** (2016) 33—46
- [20] S. Nicolis, E. Monzani, R. Roncone, L. Gianelli, L. Casella. Chem. Eur. J., **10**, N 9 (2004) 2281—2290
- [21] S. Nicolis, A. Pennati, E. Perani, E. Monzani, A. M. Sanangelantoni, L. Casella. Chem. Eur. J., **12**, N 3 (2006) 749—757
- [22] K. Shikama, Y. Sugawara. Eur. J. Biochem., **91**, N 2 (1978) 407—413
- [23] Y. Sugawara, K. Shikama. Eur. J. Biochem., **110**, N 1 (1980) 241—246
- [24] G.-I. Tajima, K. Shikama. J. Biol. Chem., **262**, N 26 (1987) 12603—12606
- [25] M. R. Gunther, V. Sampath, W. S. Caughey. Free Radical Biol. Med., **26**, N 11-12 (1999) 1388—1395
- [26] И. Степуро, В. Степуро. Окисленные производные тиамина, Lambert Academic Publishing (2014)
- [27] H. Ischiropoulos. Arch. Biochem. Biophys., **356**, N 1 (1998) 1—11
- [28] M. S. Baptista, J. Cadet, A. Greer, A. H. Thomas. Photochem. Photobiol., **97**, N 6 (2021) 1456—1483
- [29] M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas. Photochem. Photobiol., **93**, N 4 (2017) 912—919
- [30] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross. J. Phys. Chem. Ref. Data, **22**, N 1 (1993) 113—262
- [31] C. S. Foote. In: Free Radicals in Biology, Ed. W. Pryor, New York, Academic Press (1976) 85—133
- [32] A. M. Edwards, E. Silva. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **63**, N 1 (2001) 126—131
- [33] M. Insińska-Rak, M. Sikorski. Chem. Eur. J., **20**, N 47 (2014) 15280—15291
- [34] T. Sinha, M. I. Naash, M. R. Al-Ubaidi. Front. Cell Dev. Biol., **8** (2020) 861
- [35] D. R. Cardoso, S. H. Libardi, L. H. Skibsted. Food Funct., **3**, N 5 (2012) 487—502
- [36] C.-Y. Lu, Y.-Y. Liu. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj., **1571**, N 1 (2002) 71—76
- [37] H. Ostdal, B. Daneshvar, L. H. Skibsted. Free Radical Res., **24**, N 6 (1996) 429—438
- [38] G. S. Bayse, A. W. Michaels, M. Morrison. Biochim. Biophys. Acta, Enzymol. Biol. Oxid., **284**, N 1 (1972) 34—42
- [39] S. O. Anderson. Acta Physiol. Scand. Suppl., **263** (1966) 1—81
- [40] I. Stepuro. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, **72**, N 2 (2005) 115—127
- [41] E. Antonini, M. Brunori. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, North-Holland Publishing Company (1971)
- [42] C. W. Fenwick, A. M. English, J. F. Wishart. JACS, **119**, N 20 (1997) 4758—4764
- [43] W. H. Koppenol, D. M. Stanbury, P. L. Bounds. Free Rad. Biol. Med., **49**, N 3 (2010) 317—322
- [44] D. M. Stanbury. In: Adv. Inorg. Chem., Ed. A. G. Sykes, Academic Press (1989) 69—138
- [45] M. D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K. M. Miranda, C. Switzer, J. M. Fukuto, P. J. Farmer, D. A. Wink, K. N. Houk. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, N 17 (2002) 10958—10963
- [46] A. Harriman. J. Phys. Chem., **91**, N 24 (1987) 6102—6104
- [47] D. A. Malencik, S. R. Anderson. Amino Acids, **25**, N 3 (2003) 233—247
- [48] A. Wright, W. A. Bubb, C. L. Hawkins, M. J. Davies. Photochem. Photobiol., **76**, N 1 (2002) 35—46
- [49] P. Nagy, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn. J. Biol. Chem., **284**, N 22 (2009) 14723—14733
- [50] M. N. Möller, D. M. Hatch, H.-Y. H. Kim, N. A. Porter. JACS, **134**, N 40 (2012) 16773—16780
- [51] J. R. Harbour, S. L. Issler. JACS, **104**, N 3 (1982) 903—905
- [52] W. Koppenol, J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, J. Beckman. Chem. Res. Toxicol., **5**, N 6 (1992) 834—842
- [53] M. Fontana, C. Blarzino, L. Pecci. Amino Acids, **42**, N 5 (2012) 1857—1865
- [54] D. W. Batey, C. D. Eckhert. Anal. Biochem., **188**, N 1 (1990) 164—167
- [55] A. M. Alperstein, J. S. Ostrander, T. O. Zhang, M. T. Zanni. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **116**, N 14 (2019) 6602—6607
- [56] G. Viteri, A. M. Edwards, J. De la Fuente, E. Silva. Photochem. Photobiol., **77**, N 5 (2003) 535—540
- [57] E. L. Padgett, S. B. Pruett. Biochem. Biophys. Res. Commun., **186**, N 2 (1992) 775—781