

NITRACE PROTEINŮ REAKTIVNÍMI FORMAMI DUSÍKU

IVETA HNÍZDOVÁ, LENKA LUHOVÁ
a MAREK PETŘIVALSÝ*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
marek.petrivalsky@upol.cz*

Došlo 29.1.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: nitrace proteinů, nitrotyrosin, nitrační činidla, reaktivní formy dusíku

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus nitrace proteinů
 - 2.1. Nitrační činidla *in vivo*
 - 2.2. Přístupnost proteinů k posttranslační modifikaci a selektivita nitrace
 - 2.3. Reverzibilita nitrace a odbourávání nitrovaných proteinů
3. Význam nitrace proteinů
 - 3.1. Specifické nitrace proteinů v mitochondriích
 - 3.2. Vztah nitrace a fosforylace v signálních drahách buněk
 - 3.3. Nitrace proteinů při patologických stavech
4. Metody analýzy nitrovaných proteinů
5. Závěr

1. Úvod

Posttranslační kovalentní modifikace ovlivňují a kontrolují strukturu, funkci, buněčnou lokalizaci a odbourávání proteinů. Mezi nejznámější a nejlépe prostudované posttranslační modifikace proteinů patří *N*- a *O*-glykosylace, fosforylace a methylace lysinů, výzkumy posledních let však ukazují na významnou úlohu celé řady dalších kovalentních modifikací proteinů jako acetylace, sulfatace, isoprenylace, ubikvitinace, sumoylace, glutationylace, citrulinace a polyglutamylace^{1,2}. Významná role byla také prokázána u nitračních a nitrosačních modifikací, při kterých reakce reaktivních forem dusíku (RNS) s postranními řetězci proteinových aminokyselin vede k jejich nitraci, nitrosylaci a oxidaci. Nejvíce prozkoumané reakce *in vivo* představují nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu a nitrosylace thiolových skupin cysteinů na *S*-nitrosocystein. V prvotních fázích studia byly tyto posttranslační modifikace považovány za vedlejší produkt nadměrné a nekont-

rolované produkce RNS při určitých patologických stavech buněk. Dnes však aktuální znalosti jasně prokazují, že za normálních podmínek je nitrace bílkovin v biologických systémech regulována jako selektivní proces, kdy dochází ke kontrolované modifikaci malé skupiny proteinů pouze na jednom nebo omezeném počtu proteinových tyrosinů^{3,4}.

Navázáním nitroskupiny na tyrosin často dochází ke změně konformace modifikovaných proteinů a následněmu ovlivnění biologické aktivity proteinů. Vnesení nitroskupiny do *ortho*-polohy vzhledem k hydroxylu na benzenovém jádře také významně snižuje možnost fosforylace tyrosinu, což ovlivňuje rychlost přenosu informace v mnoha signálních drahách založených na regulaci aktivity enzymů reverzibilní fosforylací.

Vedle regulační funkce za fyziologických podmínek byla potvrzena souvislost zvýšené nitrace proteinů s celou řadou patologických procesů následkem zvýšené produkce RNS. Detekce nitrovaných proteinů může vést k rychlé diagnostice různých onemocnění, neboť vyšší hladina nitrotyrosinu byla prokázána v časných i pokročilých stádiích kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob^{5,6}.

2. Mechanismus nitrace proteinů

2.1. Nitrační činidla *in vivo*

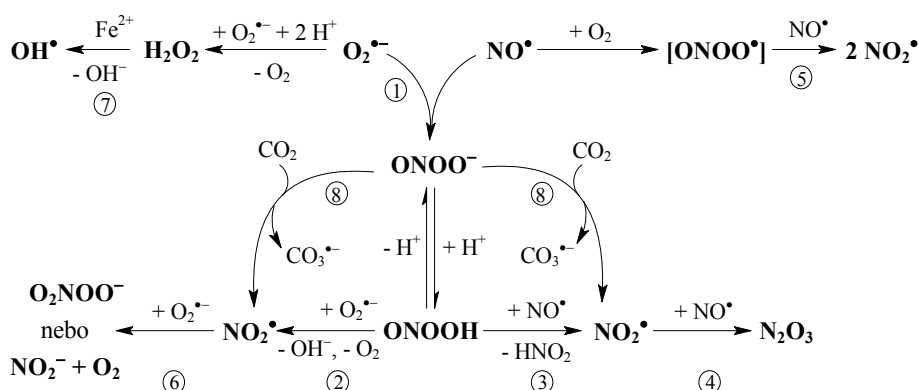
Na nitraci proteinů se do značné míry společně podílí reaktivní formy dusíku a kyslíku, jejichž vzájemnými reakcemi vzniká řada nitračních činidel způsobujících specifickou nitraci aminokyselinových zbytků, případně při zvýšené produkci nitračních činidel tzv. nitrosační stres^{4,5}. Mezi nejvýznamnější nitrační činidla *in vivo*, které mohou nitrovat volné i v proteinech vázané aminokyseliny, patří oxid dusnatý (NO) a dusičitý (NO₂), peroxydusitan (ONOO⁻) a sloučeniny odvozené od dusitanu (tab. I, obr. 1).

Podle současných poznatků probíhá nitrace proteinů nejpravděpodobněji působením peroxydusitanu a hemové peroxidasy, které se podílejí na vzniku vysoce reaktivního nitračního činidla NO₂. Byly však popsány i jiné mechanismy vzniku nitračních činidel, např. rozklad dusitanů hemoproteiny s pseudoperoxidasovou aktivitou nebo přímá reakce radikálu NO s tyrosylovými radikály. Významný vliv na tvorbu nitračních činidel má současná tvorba NO a superoxidu v blízkých buněčných oddílech^{4,7} (obr. 1).

Nejvýznamnější nitrační činidlo *in vivo*, peroxydusitanový anion ONOO⁻, vzniká nejenom reakcí radikálu oxidu dusnatého (NO[•]) a superoxidového anionradikálu (O₂^{•-}), ale může vzniknout také redukcí nitrosyldioxylového radikálu (ONOO[•]) superoxidem nebo reakcí nitrosylo-

Tabulka I
Přehled nejvýznamnějších nitračních činidel *in vivo*

Název	Vzorec	Mechanismus nitrace tyrosinu	Příklad nitrovaného proteinu
Oxid dusnatý	$\text{NO}^\bullet$	radikálový	prostaglandinsynthasa
Oxid dusičitý	$\text{NO}_2^\bullet$	radikálový	sérový albumin
Peroxydusitan	ONOO^-	radikálový elektrofilní substituce	cytochrom c
Kyselina dusitá	HNO_2	radikálový	sérový albumin
Nitrylchlorid	NO_2Cl	radikálový	sérový albumin



Obr. 1. **Reakce mezi superoxidem a oxidem dusnatým.** 1) Hlavním produktem reakce ekvivalentního množství $\text{NO}^\bullet$ a $\text{O}_2^{\bullet-}$ je peroxydusitan. 2) a 3) Při mírném nadbytku jednoho z reaktantů vzniká $\text{NO}_2^\bullet$. 4) Vyšší nadbytek NO vede ke vzniku N_2O_3 . 5) Při vysoké koncentraci NO a O_2 dochází k autooxidaci NO . 6) Jestliže koncentrace $\text{O}_2^{\bullet-}$ převažuje nad $\text{NO}^\bullet$, vzniká peroxydusičnan nebo dusitan. 7) Při nadbytku $\text{O}_2^{\bullet-}$ dochází ke vzniku $\text{OH}^\bullet$ a následnému vyvolání oxidativního stresu. 8) Vysoká koncentrace CO_2 způsobuje vznik $\text{NO}_2^\bullet$ (upraveno podle cit.⁷)

vého aniontu (NO^-) s molekulárním kyslíkem. Za fyziologického pH existuje peroxydusitan v protonované formě jako kyselina peroxydusitá, která se rozkládá na hydroxylový radikál ($\text{HO}^\bullet$) a oxid dusičitý $\text{NO}_2^\bullet$ (cit.⁸).

Mezi charakteristické reakce těchto nitračních činidel s proteiny patří nitrace tyrosinu, kdy dochází k navázání nitroskupiny v *ortho*-poloze aromatického kruhu této aminokyseliny (obr. 2). Peroxydusitan se podílí také na vzniku jiných kovalentních modifikací proteinů, zahrnujících nitraci tryptofanu za vzniku 6-nitrotryptofanu, případně jeho oxidaci za vzniku *N*-formylkynureninových residuí, ale mechanismus a význam těchto modifikací je ve srovnání s nitrací tyrosinu nepříliš objasněn⁹.

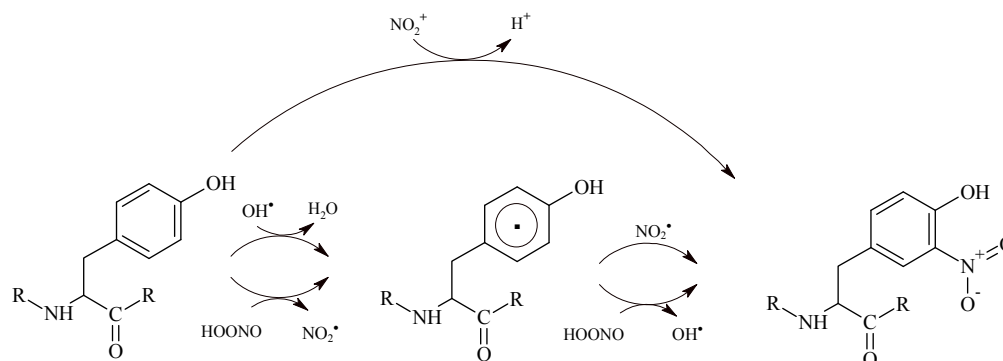
Zvýšený výskyt nitrovaných tyrosinových residuí byl zaznamenán v přítomnosti oxidu uhličitého. Reakcí peroxydusitanu s CO_2 vzniká nitrosoperoxykarbonát, který se rozpadá opět za vzniku reaktivního oxidu dusičitého.

Vznik vysoce reaktivního nitračního činidla $\text{NO}_2^\bullet$ může být také enzymově katalyzován peroxidasou (EC 1.11.1.-) v přítomnosti dusitanů. Hemové peroxidasy katalyzují redukci peroxidu vodíku a organických peroxidů a zároveň oxidaci organických sloučenin, anorganických

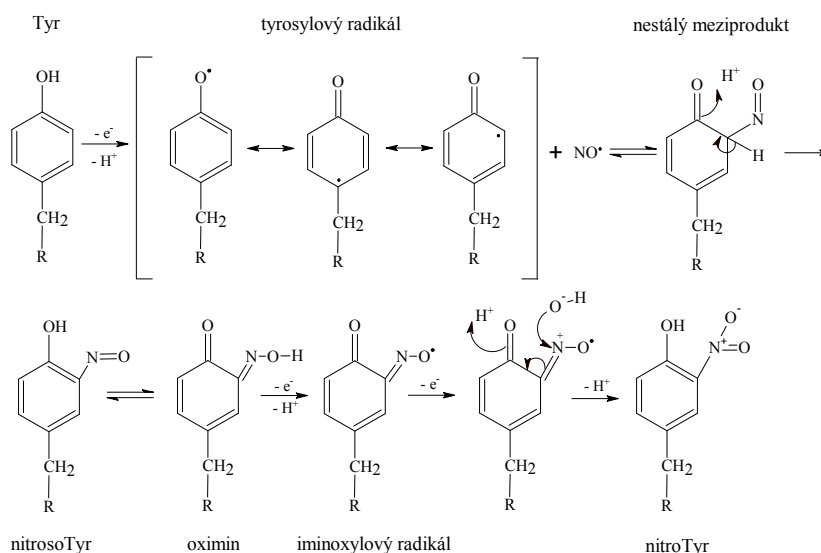
aniontů a halogenidů. V přítomnosti dusitanu a peroxidu vodíku katalyzují nitraci proteinů díky oxidaci dusitanu a tyrosinu na NO_2 a tyrosylový radikál. Reakce těchto dvou radikálů vede k tvorbě nitrotyrosinu (nitroTyr), což může být inhibováno katalasou a azidem. Radikál tyrosinu může být také tvořen reakcí tyrosinu s jinými radikály jako $\text{NO}_2^\bullet$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$ nebo $\text{OH}^\bullet$.

Další možnou cestou nitrace proteinů je neenzymový rozklad dusitanů v prostředí se sníženým pH. Při hodnotě $\text{pH} < 6,0$ vzniká ve zvýšené míře kyselina dusitá (HNO_2), která kromě nitrace tyrosinů velmi ochotně reaguje i s lysinovými, histidinovými a argininovými residuí¹¹. Také reakcí dusitanu s kyselinou chlornou (HOCl) vznikají potenciální nitrační, oxidační a chlorační činidla. *In vitro* bylo zjištěno, že mezi takové látky patří NO_2Cl , který je schopen nitrovat tyrosinová residua v hovězím sérovém albuminu. Rovněž toto nitrační činidlo reaguje i s jinými aminokyselinovými residuí jako Cys, Met a Trp (cit.¹²).

Nitrotyrosin také vzniká v souvislosti s výskytem tyrosylového radikálu v proteinech, vznikajícího jednoelektronovou redukcí tyrosinu jako intermediátu metabolických drah^{5,13}. Předpokládá se, že prvním produktem reakce



Obr. 2. Schéma vzniku nitroTyr reakcí peroxydisitanu s tyrosinovým residuem; PN může podléhat heterolytickému štěpení katalyzovanému kovy za vzniku elektrofilního činidla NO₂⁺ nebo reaguje přímo s tyrosinem radikálovým mechanismem (upraveno podle cit.¹⁰)



Obr. 3. Mechanismus vzniku nitroTyr reakcí NO s tyrosinovým radikálem; upraveno podle cit.¹³

NO s tyrosinovým radikálem je po reverzibilní radikálové reakci 3-nitrosotyrosin, který se může rozkládat zpět na tyrosinový radikál a NO. 3-Nitrosotyrosin se nachází v tautomerní rovnováze s oximinovou formou, která může být oxidována jedním elektronem za vzniku iminoxylového radikálu. Jednoelektronovou oxidací iminoxylového radikálu s následným odštěpením vodíkového protonu vzniká nitroTyr (obr. 3).

Tyrosinové radikály jsou součástí katalytického místa nebo kofaktoru řady enzymů např. ribonukleotidreduktasy (EC 1.17.4.1), prostaglandinsynthasy (EC 1.14.99.1) a fotosystému II. Bylo prokázáno, že tyrosinový radikál v ribonukleotidreduktase působí jako lapač NO *in vivo* za současné reverzibilní inhibice tohoto enzymu.

2.2. Přístupnost proteinů k posttranslační modifikaci a selektivita nitrace

Nitrace proteinů je selektivní modifikace. Selektivita se vztahuje na nitraci některých proteinů a na modifikaci určitých tyrosinových residuí. Existují tři hlavní faktory ovlivňující selektivitu nitrace: blízkost proteinů k místu tvorby nitrálních činidel, množství proteinu a tyrosinových residuí a primární sekvence v okolí tyrosinu¹¹.

Proteiny, které se vyskytují ve vyšších koncentracích, jsou dobrými cíli pro modifikaci RNS, nicméně ani větší množství proteinu ani vysoký počet tyrosinových residuí není určujícím faktorem pro vznik nitroTyr. Příkladem může být albumin, protein hojně se vyskytující v krevní

plasmě, který může být nitrován vznikajícími RNS. Množství nitrovaných tyrosinových residuí je ale daleko menší než u jiných proteinů krevní plasmy¹⁵. Jestliže je protein lokalizován v blízkosti místa vzniku nitračních činidel, bude se s vysokou pravděpodobností nitrovat. U řady buněčných modelů byla prokázána prostorová asociace myeloperoksidasy a nitrovaných proteinů¹⁶.

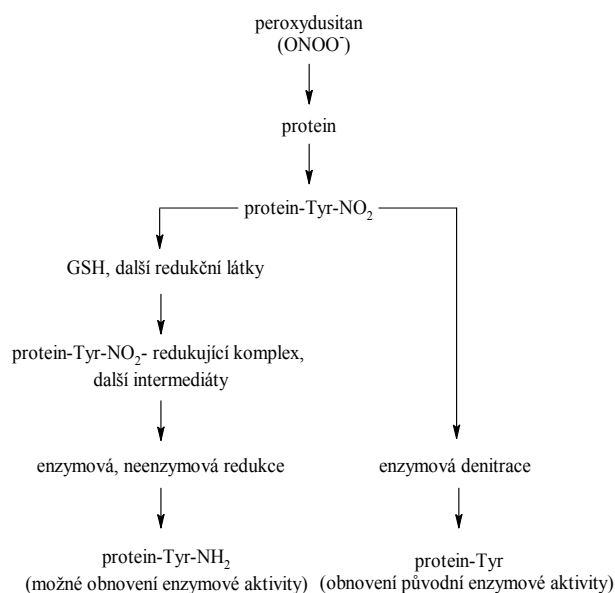
Jeden z možných mechanismů specifické nitrace je založen na její katalýze kovem v aktivním místě proteinu. Např. peroxydusitan může proniknout do aktivního místa Cu, Zn nebo Mn-superoxiddismutasy, kde reaguje s kovovým centrem enzymu za tvorby nitračních činidel v blízkosti tyrosinových residuí vzdálených od povrchu proteinu¹⁷. Selektivní nitrace tyrosinových residuí může být pravděpodobně řízena podobným mechanismem jako fosforylace a sulfonace. Kritickým faktorem pro selektivní fosforylaci tyrosinu je přítomnost specifické proteinové sekvence, která je rozpoznává tyrosinkinasou. Tyrosinkinasa rozpoznává sekvenční motiv [K/R]-X-X-X-[D/E]-X-X-X-Y, kde X je libovolná aminokyselina. Sulfotransferasa nevyžaduje přítomnost specifického peptidu, ale na aminokyselině předcházející Tyr musí být negativní náboj. Další podmínkou pro sulfonaci je absence sterické zábrany. Při nitraci jsou Cys a Met alternativními cíly pro nitrační činidla a mohou působit jako limitující faktory pro nitraci blízkých tyrosinů. Blízká lokalizace disulfidových můstků je sterickou zábranou pro sulfonaci a zřejmě i nitraci tyrosinu^{18,19}.

2.3. Reverzibilita nitrace a odbourávání nitrovaných proteinů

Nitrace proteinů nastává za normálních fyziologických podmínek a ovlivňuje funkci mnoha proteinů. Aby mohla být nitrace považována za regulační mechanismus biologické aktivity proteinů, je nutná existence mechanismů zaručujících reverzibilitu této kovalentní modifikace. Analogicky s aktivitou fosfatas byla navržena možnost katalýzy denitrační reakce specifickým enzymem denitrasou (nitratasou). Denitrace proteinových nitrotyrosinů by měla hypoteticky vést k obnově tyrosinu a odštěpení dusičnanového aniontu²⁰. Přítomnost denitrasové aktivity byla detegována v krevní plasmě²¹, slezině a plicích²². Jako jediný potenciální substrát denitrazy *in vivo* byl doposud identifikován histon H 1.2 (cit.²³) a identita a reakční mechanismus enzymu zatím zůstává neznámou.

Pro odstranění nitrovaných proteinů mohou biologické systémy využívat kromě denitrace i takové mechanismy, které přemění nitrotyrosin na aminotyrosin, což může vést k návratu aktivity některých proteinů a buněčné obnově (obr. 4). Redukcí nitroskupiny na aminoskupinu dochází ke zvýšení pK_a na hodnotu 10, což může obnovit přístupnost proteinů pro působení tyrosinkinas^{21,24}.

U většiny nitrovaných proteinů je ale upřednostňována jejich proteolytická degradace, která oproti nemodifikovaným proteinům probíhá rychleji. Urychlená degradace lehce oxidovaných proteinů je normální funkcí buňky, ale u silně nitrovaných a oxidovaných proteinů dochází k tvorbě proteinových agregátů, které jsou špatnými substráty proteas a účinnost odbourávání je tak snížena⁵.



Obr. 4. Schéma vzniku nitrovaných proteinů a jejich metabolismu denitrací nebo redukcí; upraveno podle cit.²⁴

3. Význam nitrace proteinů

Oxidativní, zánětlivé, mutagenní a cytotoxické vlastnosti peroxydusitanu jsou odlišné v porovnání s převážně antioxidantními a protizánětlivými vlastnostmi jeho prekursoru NO. Toxicita peroxydusitanu souvisí nejen s modifikací proteinů, ale také peroxidací lipidů a poškozením nukleových kyselin. Za normálních fyziologických podmínek je však peroxydusitan vychytáván většinou nízkomolekulárními antioxidanty. Pro působení peroxydusitanu v buňkách je významná jeho hydrofobicita, díky které může procházet lipidovými membránami a zprostředkovávat nitraci v hydrofobním prostředí, buněčných membránách, organelách a lipoproteinech²⁵.

3.1. Specifická nitrace proteinů v mitochondriích

K nitraci proteinů dochází synergickým působením reaktivních forem kyslíku a dusíku vznikajících ve zvýšené míře při mitochondriální respiraci. Komplexy I a III respiračního řetězce produkují superoxid jako vedlejší produkt redoxních pochodů. Tento děj nastává v případě, jestliže redukované formy flavinů, Fe-S center nebo semibichinolové radikály reagují s molekulárním kyslíkem. Za patologických podmínek dochází v mitochondriích snadno k tvorbě peroxydusitanu kvůli zvýšené syntéze NO a superoxidu. NO může být vytvořen přímo v mitochondriích, kde je přítomná specifická mitochondriální forma NO syntázy, nebo může do této organely vstupovat z cytosolu²⁶.

V mitochondriích peroxydusitan způsobuje inhibici energetického metabolismu, narušení distribuce vápníku a otevření póru permeability mitochondriální membrány. Peroxydusitan také poškozuje mitochondrie modifikací

DNA a lipidů a účastní se tak pochodů vedoucích k buněčné smrti²⁷. Působení peroxydusitanu bylo studováno na enzymové úrovni u komplexu I, II, III a ATPasy. Bylo zjištěno, že peroxydusitan způsobuje úplnou inhibici komplexu I, II a ATPasy, částečnou inhibici komplexu IV a má malý vliv na aktivitu komplexu III. Protože každý z těchto komplexů obsahuje řadu tyrosinů a cysteinů, ovlivnění jejich aktivity je spojeno s reaktivitou jednotlivých residuí a jejich účastí v enzymové funkci. Bylo zjištěno, že ireverzibilní inhibice komplexu I je způsobena specifickou modifikací tyrosinových residuí. Ačkoliv komplex I obsahuje 45–46 různých podjednotek, byla nalezena modifikace tyrosinu pouze u pěti z nich, přičemž dvě z nich se přímo účastní enzymové funkce²⁸.

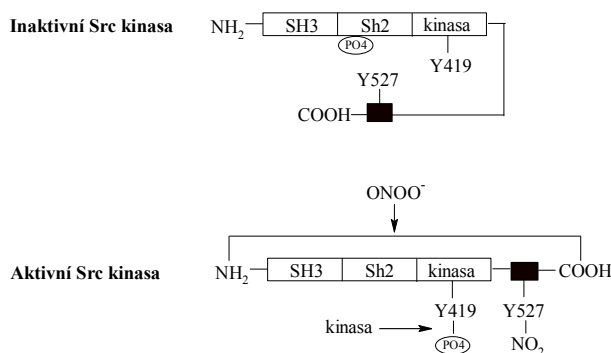
Za podmínek rychlé tvorby ROS a NO také dochází k nitraci Mn-superoxiddismutasy a cytochromu c, který se v mitochondrii vyskytuje ve vysoké koncentraci. Nitrace cytochromu c může sloužit jako marker mitochondriálního poškození nitračním stresem a je součástí signálního mechanismu vedoucího k aktivaci kaspas a zahájení buněčné apoptózy²⁹.

3.2. Vztah nitrace a fosforylace v signálních drahách buněk

Nitrace tyrosinu způsobuje snížení pK_a hydroxylové skupiny z 10,1 na 7,2, což může vést ke změně struktury a funkce proteinů. Následkem této modifikace dochází nejčastěji ke snížení aktivity nebo biologické funkce proteinů, ale v některých případech se může enzymová aktivita zvýšit nebo funkce daného proteinu nemusí být vůbec ovlivněna. Jedním z biologických procesů, které nitrace často ovlivňuje, je fosforylace tyrosinových zbytků⁵. Nitrace a fosforylace tyrosinových residuí mohou být navzájem kompetitivními procesy v závislosti na lokální koncentraci RNS. Bylo zjištěno, že tyrosinová fosforylace je odpovědí na mírné oxidující podmínky vyvolané peroxydusitanem. Tento děj nastává, jestliže je koncentrace peroxydusitanu v buňce mikromolární. Pokud je hladina peroxydusitanu milimolární, je znemožněna tyrosinová fosforylace, dochází k nitraci tyrosinových residuí a následně k inhibici buněčných odpovědí závislých na fosforylaci tyrosinu a zahájení apoptické kaskády³⁰.

Nitrace inhibuje cyklickou přeměnu tyrosinových residuí proteinů signálních drah mezi fosforylovaným a nefosforylovaným stavem. Návázáním nitroskupiny na tyrosin může dojít k zabránění jeho fosforylace, např. u cyklindependentní kinasy (EC 2.7.11.1) nebo je znemožněno spojení podjednotek proteinu, který poté zůstává inaktivní, např. nitrace regulační podjednotky p85 enzymu inositol-3-kinasy (EC 2.7.1.64) inhibuje její spojení s katalytickou podjednotkou p110 (cit.^{15,21}). Dalším dějem, který mění stav tyrosinových zbytků v signálních kaskádách, je inhibice fosfatasové aktivity, čímž dochází k narušení regulace přenosu signálu v buňce následkem zvýšené fosforylace tyrosinů.

Nitrace v některých případech může simulovat fosforylaci, protože tato modifikace vede k přidání negativního



Obr. 5. Nitrace a fosforylace tyrosinových residuí u Src kinasy; upraveno podle cit.³²

náboje s podobnou elektronovou hustotou. Vliv nitrace tyrosinových residuí na aktivitu proteinů byl zjištěn u Src kinasy (EC 2.7.10.2), kdy nitrace tyrosinových residuí v Src kinase může regulovat jejich aktivitu. Nitrace tyrosinu 527 v C-koncovém regulačním regionu Src kinasy vede k destabilizaci uzavřené inaktivní formy, následné fosforylaci tyrosinu 419 lokalizovaného v kinasové doméně a přechodu na aktivní formu enzymu^{31,32} (obr. 5).

3.3. Nitrace proteinů při patologických stavech

Současné poznatky ukazují na přímou souvislost mezi zvýšeným oxidativním a nitračním stresem a iniciací a rozvojem některých důležitých patologických procesů. Zvýšená nitrace je způsobena zvýšenou tvorbou reaktivních nitračních činidel, často spojená se zvýšenou aktivitou indukovatelné formy NO synthasy. Současně jsou pozorovány snížená kapacita detoxifikačních systémů, které za normálních podmínek udržují nízkou hladinu oxidačních a nitračních činidel, a snížená aktivita systémů odbourávajících nitrované proteiny^{4,11}. Zvýšená nitrace proteinů doprovází proces stárnutí organismu a rozvoj řady degenerativních chorob jako Parkinsonova, Alzheimerova a Huntingtonova choroba a amyotrofni laterální skleróza, kde je možno imunohistochemickými metodami prokázat zvýšené množství nitrovaných proteinů lokalizovaných v postižených tkáních nervové soustavy³³. V případě dopaminergních neuronů postižených při Parkinsonově chorobě byla prokázána specifická oxidace a nitrace několika proteinů, které vedou ke změně jejich biologické aktivity a ovlivňují postup a rozvoj neurodegenerativní choroby⁶. Peroxydusitan je považován za důležitý činitele rozvoje také dalších poruch v kardiovaskulárním, dýchacím a imunitním systému. Snížení hladiny peroxydusitanu s využitím specifických lapačů, jako např. kyseliny močové, představuje do budoucna slibný farmakologický postup při léčbě těchto chorob³⁴. Nitrované proteiny jsou detegovány v mnoha tkáních i za nepatologických podmínek, např. v kardiovaskulárním systému, myocytech, endoteliálních buňkách a fibroblastech⁵. Úloha nitrovaných proteinů za fyziologických podmínek není ale dosud zcela objasněna.

4. Metody analýzy nitrovaných proteinů

Analýza nitrovaných proteinů je založena na specifické detekci nitrotyrosinové skupiny s využitím imunochemických nebo hmotnostně-spektrometrických metod. Zvláštní pozornost je potřeba věnovat přípravě analyzovaného vzorku, protože výskyt nitrotyrosinu může být výrazně zvýšen *in vitro* vznikem nitračních činidel při rozkladu dusitanů v kyselém prostředí, např. během kyselý hydrolyzy proteinů nebo při použití kyselých mobilních fází při kapalinové chromatografii. Naopak často používané silně redukující látky v extračních pufrech, jako např. dithiothreitol, mohou vést k redukci nitroskupiny na aminoskupinu³⁵.

Imunochemické metody využívají komerčně dostupné polyklonální a monoklonální protilátky proti proteinově vázanému nitrotyrosinu. Monoklonální protilátky na nitrotyrosin se obecně vyznačují vyšší specifičtostí, ale slabší imunoreaktivitou. Imunochemická detekce nitroTyr může být snížena, pokud během zpracování vzorku dochází k jeho přeměně na aminotyrosin nebo tyrosin, které nejsou primárními protilátkami rozpoznávány³⁶. Pro kvantifikaci nitrovaných proteinů ve vzorku mohou být použita různá uspořádání metod ELISA nebo separační metody jedna- a dvourozměrné gelové elektroforézy s následným blotováním proteinů na teflonovou či nitroceluloseovou membránu a jejich detekci anti-nitroTyr protilátkami. Vzhledem k omezené specifičtosti imunohistochemické detekce je možno přítomnost nitrovaných proteinů ve vzorku následně potvrdit hmotnostní spektrometrií³⁷.

Identifikace nitrovaných proteinů se provádí hmotnostní spektrometrií, přičemž nejčastěji používanou metodou je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií nebo MALDI-TOF analýza^{38,39}. Identifikace proteinů se potvrzuje srovnáním naměřených hmotností tryptických peptidů s daty v dostupných databázích. Při analýzách nitrace se využívá typického nárůstu hmotnosti tryptických štěpů peptidů obsahujících nitrované tyrosiny o 45 Da odpovídajících přidané nitroskupině. Využití MALDI-TOF MS pro identifikaci nitrovaných proteinů je značně omezeno, neboť při ionizačním procesu dochází k fotodekompozici nitroTyr, která je způsobena ztrátou jednoho nebo dvou kyslíkových atomů. Proto jsou v hmotnostním spektru zaznamenány menší píky ve srovnání s intaktním peptidem, který je používán jako vzor pro rozpoznání peptidů s nitroTyr⁴⁰.

Vzhledem ke zmíněným nevýhodám při analýze MALDI-TOF MS je vhodnější LC-MS analýza. Tryptické štěpy jsou obvykle separovány na kapilární koloně s reverzní fází, ionizovány elektrosprejem a v detektoru analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Identifikace nitrovaných peptidů může být při chromatografické separaci navíc podpořena jejich specifickou detekcí při 340 nm. Úspěšnost identifikace nitrovaných tyrosinů v jednotlivých proteinech i jejich komplexních směsích lze dále zvýšit redukcí nitroskupiny na aminoskupinu a její acetylací, které zvyšují fragmentaci tryptických peptidů při disociaci indukované kolizí a tím i úspěšnost identifikace peptidů v databázích proteinových sekvencí⁴¹.

5. Závěr

Nitrace tyrosinu je důležitou posttranslační modifikací proteinů, při níž s aminokyselinovými zbytky reagují nitrační činidla. Mezi nejvýznamnější patří oxid dusnatý, oxid dusičitý, peroxydusitan a látky odvozené od dusitanu. Tyto sloučeniny reagují s tyrosinem za vzniku nitroTyr. Míra nitrace proteinů je v biologických systémech citlivě regulována. Navázáním na nitroskupiny na tyrosin se může měnit konformace modifikovaných proteinů. Tato modifikace tedy v některých případech slouží k regulaci enzymové aktivity a přenosu signálu v buňce. Poznatky o identitě, lokalizaci, funkci a mechanismu vzniku nitrovaných proteinů jsou známy pouze u živočichů, zatímco u rostlin je tato problematika teprve v počátcích.

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 6198959215.

Seznam zkratk

nitroTyr	3-nitrotyrosin
NO	oxid dusnatý
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku

LITERATURA

1. Jensen O. N.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 391 (2006).
2. Hoffman M. D., Sniatynski M. J., Kast J.: *Anal. Chim. Acta* 627, 50 (2008).
3. Rubbo H., Radi R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1318 (2008).
4. Souza J. M., Peluffo G., Radi R.: *Free Radical Biol. Med.* 45, 357 (2008).
5. Turko I. V., Murad F.: *Pharmacol. Rev.* 54, 619 (2002).
6. Danielson S. R., Andersen J. K.: *Free Radical Biol. Med.* 44, 1787 (2008).
7. Frein D., Schildknecht S., Bachschmid M., Ullrich V.: *Biochem. Pharmacol.* 70, 811 (2005).
8. Goldstein S., Merenyi G.: *Methods Enzymol.* 436, 49 (2008).
9. Suzuki T., Mower H. F., Friesen M. D., Gilibert I., Sawa T., Ohshima H.: *Free Radical Biol. Med.* 37, 671 (2004).
10. Sarver A., Scheffler N. K., Shetlar M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
11. Ischiropoulos H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 776 (2003).
12. Ischiropoulos H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 1 (1998).
13. Gunther M. R., Sturgeon B. E., Mason R. P.: *Toxicology* 177, 1 (2002).
14. Guittet O., Roy B., Lepoivre M.: *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1054 (1999).
15. Souza J. M., Daikhin E., Yudkoff M., Raman C. S.,

- Ischiropoulos H.: Arch. Biochem. Biophys. 371, 169 (1999).
16. Baldus S., Eiserich J. P., Brennan M. L., Jackson R. M., Alexander C. B., Freeman B. A.: Free Radical Biol. Med. 33, 1010 (2002).
 17. Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J. C., Smith C. D., Beckman J. S.: Arch. Biochem. Biophys. 298, 431 (1992).
 18. Alvarez B., Ferrer-Sueta G., Freeman B. A., Radi R.: J. Biol. Chem. 274, 842 (1999).
 19. Lin H. L., Kent U. M., Zhang H. M., Waskell L., Hollenberg P. F.: Chem. Res. Toxicol. 16, 129 (2003).
 20. Kuo W. N., Kanadia R. N., Shanbhag V. P., Toro R.: Mol. Cell. Biochem. 201, 11 (1999).
 21. Gow A. J., Duran D., Malcolm S., Ischiropoulos H.: FEBS Lett. 385, 63 (1996).
 22. Kamisaki Y., Wada K., Bian K., Balabanli B., Davis K., Martin E., Behbod F., Lee Y. C., Murad F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 11584 (1998).
 23. Irie Y., Saeki M., Kamisaki Y., Martin E., Murad F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 5634 (2003).
 24. Kuo W. N., Kocis J. M.: Mol. Cell. Biochem. 233, 57 (2002).
 25. Zhang H., Bhargava K., Keszler A., Feix J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B.: J. Biol. Chem. 278, 8969 (2003).
 26. Brown G. C., Borutaite V.: Cardiovasc. Res. 75, 283 (2007).
 27. Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C., Castro L.: Free Radical Biol. Med. 33, 1451 (2002).
 28. Murray J., Taylor S. W., Zhang B., Ghosh S. S., Capaldi R. A.: J. Biol. Chem. 278, 37223 (2003).
 29. Cassina A. M., Hodara R., Souza J. M., Thomson L., Castro L., Ischiropoulos H., Freeman B. A., Radi R.: J. Biol. Chem. 275, 21409 (2000).
 30. Klotz L. O., Schroeder P., Sies H.: Free Radical Biol. Med. 33, 737 (2002).
 31. Mallozzi C., Di Stasi, A. M. M., Minetti M.: FEBS Lett. 503, 189 (2001).
 32. Monteiro H. P., Klotz L. O., Schroeder P., Sies H.: Free Radical Biol. Med. 33, 765 (2002).
 33. Beal M. F.: Klotz L. O., Schroeder P., Sies H.: Free Radical Biol. Med. 32, 797 (2002).
 34. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L.: Physiol. Rev. 87, 315 (2007).
 35. Moore K. P., Mani A. R.: Methods Enzymol. 359, 256 (2002).
 36. Frost M. T., Halliwell B., Moore K. P.: Biochem. J. 345, 453 (2000).
 37. Viera L., Ye Y. Z., Estevez A. G., Beckman J. S.: Methods Enzymol. 301, 373 (1999).
 38. Aslan M., Ryan T. M., Townes T. M., Coward L., Kirk M. C., Barnes S., Alexander C. B., Rosenfeld S. S., Freeman B. A.: J. Biol. Chem. 278, 4194 (2003).
 39. Miyagi M., Sakaguchi H., Darrow R. M., Yan L., West K. A., Aulak K. S., Stuehr D. J., Hollyfield J. G., Organisciak D. T., Crabb J. W.: Mol. Cell. Proteomics 1, 293 (2002).
 40. Petersson A. S., Steen H., Kalume D. E., Caidahl K., Roepstorff P.: J. Mass Spectrom. 36, 616 (2001).
 41. Ghesquiere B., Goethals M., Van Damme J., Staes A., Timmerman E., Vandekerckhove J., Gevaert K.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 2885 (2006).

I. Hnízdořá, L. Luhová, and M. Petřivalský
(Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic): Protein Nitration by Reactive Nitrogen Species

Protein nitration and nitrosylation have recently emerged as important post-translational modifications of proteins. This review summarizes the current knowledge of nitration of tyrosine residues in proteins and the sources, fates and roles of nitrated proteins *in vivo*. Tyrosine residues are nitrated to 3-nitrotyrosine residues by reactive compounds like nitric oxide, nitric dioxide, peroxynitrite and nitrite metabolites as well as by other reactive nitrogen and oxygen species. Peroxynitrites are probably the most important nitration agents *in vivo*, though other nitrations have also been described. The introduced nitro group influences pK_a of the tyrosine residue and its accessibility to phosphorylation as well as protein structure, stability and biological activity. The enhanced nitration of proteins is a consequence of a higher production of reactive nitrogen and oxygen species and/or their lower scavenging. Nitrated proteins are observed in many cardiovascular, neurodegenerative and inflammatory pathologies. The nitrated proteins can be detected by immunohistochemical methods *in situ* or detected and identified by chromatography and mass spectrometry.