

На правах рукописи

АВРАМЧУК ТАТЬЯНА ВИТАЛЬЕВНА

**МЕХАНИЗМЫ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ
n-НИТРОЗАМЕЩЁННЫХ АРИЛАЗИДОВ В УСЛОВИЯХ
ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОАФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук



Новосибирск, 2005 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.х.н. Годовикова Татьяна Сергеевна

Научный консультант:

д.х.н., академик РАН Кнорре Дмитрий
Георгиевич

Официальные оппоненты:

д.х.н., профессор Грицан Нина Павловна
д.х.н. Сильников Владимир Николаевич

Ведущая организация:

Новосибирский институт органической химии
СО РАН

Защита состоится « 2 » декабря 2005 г. в 9³⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 28 » октября 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
д.х.н.

Фёдорова О.С.



2006-4
22883

2219825

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

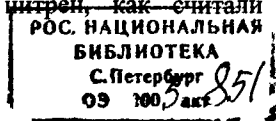
Актуальность проблемы. Огромная роль химических методов в изучении белков, нуклеиновых кислот и их комплексов общеизвестна и бесспорна. Особенно привлекательны в этом аспекте фотохимические методы, поскольку фотохимическое превращение можно осуществить за доли секунд, а именно в этом временном диапазоне происходят многие биологические события. Кроме того, использование фотореагентов в сочетании с техникой быстрого смешивания компонентов исследуемой системы и последующего импульсного облучения открывает перспективу для изучения динамики функционирования надмолекулярных структур.

Несмотря на большое количество времени, прошедшее с начала использования фотоаффинных реагентов на основе ароматических азидов, значительная часть вопросов, связанных с особенностями превращения арилазидов в условиях проведения фотоаффинной модификации до настоящего времени остается без ответов. Чаще всего интерпретация результатов фотоаффинной модификации биополимеров арилазидными реагентами базируется на сведениях о фотохимических превращениях арилазидов в органических средах. Однако некоторые экспериментальные факты свидетельствуют о том, что в ряде случаев в модификации белков принимают участие не арилнитрены, а частицы, время жизни которых значительно превосходит время жизни первичных продуктов фотолиза. Неполная информация о механизмах фотопревращения арилазидов в водных растворах, а также отсутствие сведений о строении продуктов фотовзаимодействия арилазидных реагентов с функциональными группами белков, затрудняют интерпретацию результатов фотоаффинной модификации биополимеров.

Целью настоящей работы является установление механизма фотоаффинной модификации белков при использовании фотореагентов на основе *п*-нитрозамещенных арилазидов. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) изучить природу реакционно-способных частиц, принимающих участие в модификации белков; 2) установить структуру продуктов фотовзаимодействия 5-азидо-2-нитробензоильного остатка с некоторыми функциональными группами белков.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые показано, что «темновые» процессы в фотоаффинной модификации белков при использовании *п*-нитрозамещенных арилазидных реагентов обусловлены образованием в ходе облучения реакционноспособного ароматического нитрозосоединения. Установлено, что в водных растворах предшественником его является *N*-замещенный арилгидроксиламин, а не триплетный нитрен, как считали ранее.



Выявлено, что при модификации белков реагентами на основе 5-азидо-2-нитробензойной кислоты наиболее «уязвимыми» мишенями в белковой молекуле являются функциональные группы ароматических аминокислот. Установлено, что при модификации остатка триптофана образуется производное кинуренина. Предложен механизм образования его на стадии «темновых» реакций. Выявлена возможность образования неустойчивых аддуктов сульфиминовой природы при использовании *n*-нитрозамещённых арилазидов в качестве фотореагентов.

Результаты данной работы, бесспорно, окажутся полезными при планировании экспериментов с использованием реагентов на основе *n*-нитрозамещённых арилазидов, а также при интерпретации данных по фотоаффинной модификации белков.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Результаты работы были представлены на III Съезде Биохимического Общества, Санкт-Петербург, 2002 г. и международных конференциях: «Trends in Nucleic Acid Chemistry», Москва, Россия, 2000; Forum of Young Scientists Protein Structure-Function, Trafficking and Signalling, satellite meeting of the 27th FEBS/PABMB, Ойерас, Португалия, 2001; 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Лиссабон, Португалия, 2001; «RNA as Therapeutic And Genomics Target», Новосибирск, Россия, 2001; VI Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes». Новосибирск, Россия, 2002; «Targeting RNA: Artificial Ribonucleases, Conformational Traps and RNA interference», Новосибирск, Россия, 2003; «Chemical & Biological Problems of Proteomics», Новосибирск, Россия, 2004.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 16 рисунков, 45 схем и 6 таблиц. Библиография включает 150 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Долгоживущие интермедиаты ответственные за «темновые» процессы, протекающие при фотоаффинной модификации белков реагентами на основе 5-азидо-2-нитробензойной кислоты

С использованием стрептавидин-биотиновой системы, предложенной ранее, нами были исследованы «темновые» реакции функциональных групп белка с продуктами фотолиза аналогов биотина, несущих 5-азидо-2-нитробензоильную группу, присоединённую к остатку биотина через

1,2-диаминоэтановый или 1,3-диаминопропановый линкер. Выбор в качестве объекта исследования стрептавидин-биотиновой системы обусловлен большим сродством компонентов данного комплекса друг к другу ($K_a = 10^{14} \text{ M}^{-1}$), что позволяет ограничить область модификации функциональных групп белков в пределах участка связывания лиганда и накопить достаточное количество продукта модификации аминокислотного остатка для физико-химического анализа.

Синтез *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-*N'*-(*d*-биотинил)-1,2-диаминоэтана (1) и *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-*N'*-(*d*-биотинил)-1,3-диаминопропана (2) и их аффинные свойства. Фотоаналоги биотина (1) и (2) были получены путём ацилирования первичной аминогруппы *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,2-диаминоэтана и *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана с помощью 2-нитро-4-сульфопенилового эфира биотина, очищены с помощью ОФХ и охарактеризованы с помощью физико-химических методов.

В силу большого сродства биотина к стрептавидину, оказалось невозможным провести сравнительный анализ по специфическому связыванию биотина и его фотоаналогов обычным путём. Выводы о количественном включении аналогов биотина в активный центр стрептавидина были сделаны на основании данных по взаимодействию стрептавидина с фотобиотином (1) и (2) при разных мольных отношениях компонентов (фотоаналог:стрептавидин = 10:1 и 4:1). Обнаружено, что фотоаналоги биотина полностью связываются со стрептавидином при мольном отношении 4:1. В качестве доказательства того, что фотоаналоги (1) и (2) связываются с тем же центром субъединицы стрептавидина, что и природный лиганд, была продемонстрирована неспособность соединений (1) и (2) связываться с природным комплексом стрептавидин-биотин (мольное отношение фотоаналога к комплексу было 4:1). Способность стрептавидина к специфическому связыванию с продуктами фотоллиза соединений (1) и (2) была доказана в аналогичной серии экспериментов с использованием предоблучённых фотоаналогов биотина.

Фотовзаимодействие и вторичные реакции фотоактивируемых аналогов биотина (1) и (2) с активным центром стрептавидина. Для исследования возможности участия в модификации долгоживущих интермедиатов, генерируемых при облучении реагентов, несущих 5-азидо-2-нитробензойную группу, были поставлены эксперименты по аффинной модификации стрептавидина с использованием фотоактивируемых аналогов биотина (1) и (2) (реакционные смеси I) и

продуктов их фотолитического разложения (реакционные смеси II). Используемое мольное отношение лиганд/белок составляло 4:1.

В таблице 1 приведены данные хроматографического разделения протеиназного гидролизата стрептавидина, модифицированного фотобиотином (I) при различных условиях проведения реакции.

Таблица 1.

Данные хроматографического разделения протеиназного гидролизата стрептавидина, модифицированного фотобиотином (I) при различных условиях проведения реакции (реакционные смеси I–III).

№ реакц. смеси.	Облучение фото-биотина, с.	Облучение реакц. смеси, с.	Хроматографические данные ** (время удерживания, мин)
I	—	40	6.97 (1), 11.729 (3)
II	40	—	6.737 (1), 9.417 (2), 11.692 (3)
III	40	40	6.73 (1), 9.317 (2), 11.618 (3), 14.5 (4)
контрольный эксперимент*			6.833 (1), 9.417 (2)

* — облучённый фотоаналог биотина, ** — детекция при $\lambda = 360$ нм

Видно, что, как в случае реакционной смеси с облучённым комплексом стрептавидин-фотобиотин (I) (реакционная смесь I), так и при модификации стрептавидина продуктами фотолитического разложения (I) (реакционная смесь II), образуются модифицированные пептиды, время удерживания которых на смоле с обращенной фазой одинаково (фракция 3). В случае модификации стрептавидина продуктами фотолитического разложения с повторным облучением реакционной смеси (реакционная смесь III) наблюдается появление модифицированных пептидов, отсутствующих в случае реакционных смесей I и II (фракция 4). Это может указывать либо на образование в ходе облучения фоточувствительных интермедиатов, модифицирующих белок после дополнительного фотолиза, либо на образование фоточувствительного ковалентного аддукта. В ходе аналогичных экспериментов, проведенных с использованием в качестве лиганда фотоаналога биотина (2), получается более сложный набор модифицированных пептидов (данные не приведены), но анализ соответствующих хроматографических данных так же указывает на протекание «темновой» стадии модификации.

Представленные выше результаты указывают на то, что частицей, модифицирующей белок, может быть не арилнитрен, как считали ранее, а продукт его дальнейшего превращения. В силу этого было целесообразно исследовать механизм фотолиза реагентов на основе 5-азидо-2-

нитробензойной кислоты в условиях проведения фотоаффинной модификации белков.

Механизм фотопревращения фотоаналога биотина (1). Изменения электронных спектров поглощения соединений (1) и (2) в ходе их облучения в водном растворе отличаются (данные не приведены). В то же время следует отметить, что характер изменения в спектре поглощения продуктов фотолиза (1) аналогичен изменению в спектре поглощения, наблюдаемому при облучении *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-*N'*-(d-биотинил)-1,4-диаминобутана. Это указывает на то, что судьба арилнитрена, образующегося в ходе облучения фотоактивируемых аналогов биотина, будет определяться размером спейсера, связывающего биотиновый остаток с арилазидной группой. Одним из путей дальнейшего превращения арилнитрена, образующегося при фотолизе соединения (1), может быть его внутримолекулярное взаимодействие с биотиновым остатком (схема 1).

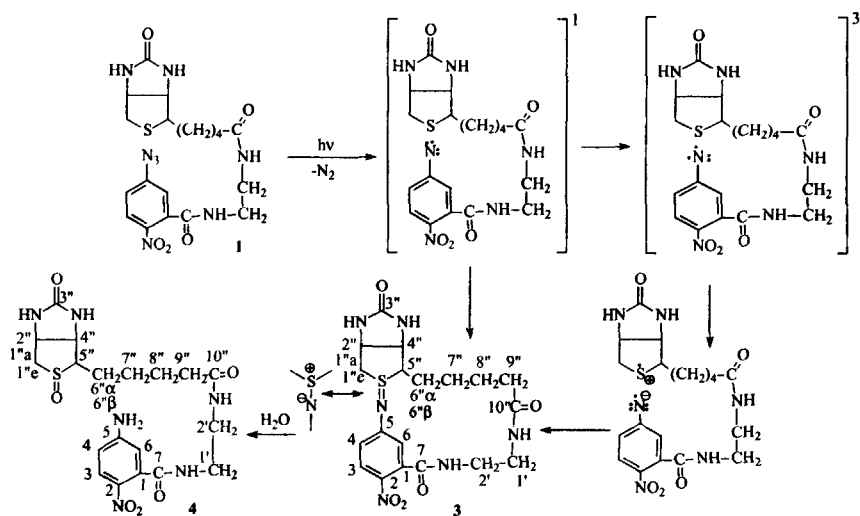


Схема 1.

На преимущественное протекание внутримолекулярной реакции арилнитрена с биотиновым фрагментом указывает возрастание процентного содержания основного продукта фотолиза (3) при понижении концентрации исходного арилазида (1) в облучаемом водном растворе. Согласно данным 1H -ЯМР (таблица 2) соединению (3), соответствует структура циклического иминосульфурана (схема 1).

Соединение (3) оказалось неустойчивым. Время полупревращения 2.5 мМ водного раствора соединения (3) в единственный продукт (4) при комнатной температуре было 8.5 суток. Скорость превращения увеличивалась при нагревании и по мере разбавления раствора водой. Процесс не происходил в таких растворителях, как MeOH и CH₃CN. Эти факты могут свидетельствовать о протекании протон-зависимой реакции. Кроме того, высокая диэлектрическая проницаемость воды может приводить к увеличению скорости протекания процесса за счёт разделения разноименных зарядов. Данные ¹H-ЯМР для продукта превращения (3) приведены в таблице 2 и соответствуют структуре *N*-(5-амино-2-нитробензоил)-*N'*-(*d*-(*S*-оксо)биотинил)-1,2-диаминоэтана (4) (схема 1).

Таблица 2.

Данные ¹H-ЯМР для соединений (3) и (4) (CD₃CN, δ, м.д. и J, Гц).

(Н) Соед.	3, д,	4, дд,	6, д	1e", дд	1a", дд	2", ддд	4", дд	5", ддд
(3)	8.07 J 9.0	7.19 J 9.0, 2.5	7.24 J 2.5	4.10 J 13.2, 6.0	3.96 J 13.2, 3.0	4.9 J 8.0, 6.0, 3.0	4.78 J 8.0, 5.5	4.22 J 10.5, 5.5, 4.0
(4)	7.97 J 9.0	6.70 J 9.0, 2.5	6.64 J 2.5	2.83 J 15.0, 6.5	3.24 J 15.0, 1.5	4.77 J 8.5, 6.5, 1.5	4.64 J 8.5, 6.0	2.69 J 10.0, 5.0, 6.0

Строение соединения (4) подтверждено спектральными данными (¹³C-ЯМР, ИК, МС). В ИК-спектре аминопроизводного (4) наблюдается сильная полоса поглощения при значении волнового числа 1097,9 см⁻¹, что может быть вызвано валентными колебаниями связи S=O. В масс-спектре этого соединения регистрируется сигнал с *m/z* 437.2, соответствующий массе иона [M – NO + H]⁺.

При фотолизе соединения (1) не было обнаружено продуктов, характерных для реакций триплетных нитренов. Диалкилсульфиды часто используются в качестве ловушек синглетных нитренов. Таким образом, можно предполагать, что синглетный арилнитрен, образующийся при фотолизе соединения (1), не претерпевает интеркомбинационный переход в триплетное состояние, а при создавшихся благоприятных условиях (близко расположенный нуклеофильный центр на биотиновом остатке) взаимодействует с нуклеофильным атомом серы. Однако возможность образования соединения (4) через взаимодействие триплетного нитрена с атомом серы биотинового остатка также нельзя упускать из рассмотрения. Такое взаимодействие может протекать легко за счёт того, что электроноакцепторная нитрогруппа будет способствовать

восстановлению нитрена с образованием соединения сульфиминовой природы.

Образование сульфиминов в условиях фотоаффинной модификации может привести к снижению эффективности образования ковалентных аддуктов между фотореагентом и белком по трем причинам: 1 – за счёт реакции нитрена с компонентами буфера (тиолсодержащими соединениями); 2 – за счёт гидролиза ковалентных аддуктов с сульфиминовой связью, образующихся в случае модификации серусодержащих аминокислотных остатков; 3 – в связи с возможным образованием ковалентно соединённых между собой участков внутри модифицированного белка за счёт реакции активного сульфинимина с нуклеофильным боковым радикалом аминокислотного остатка.

Механизм фотопревращения *n*-нитрозамещенных арилазидов в условиях проведения фотоаффинной модификации биополимеров.

Результаты исследований по фотопревращению соединения (1) нельзя обобщать для всех реагентов, несущих остаток 5-азидо-2-нитробензойной кислоты даже в пределах фотоаналогов биотина. Для того чтобы понять, какие долгоживущие интермедиаты могут принимать участие в модификации белков при использовании реагентов на основе *n*-нитрозамещенных фенилазидов, мы исследовали фотопревращение *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-1,3-диаминопропана (5) и *n*-нитрофенилазида (6) – функциональных групп аффинных реагентов – в условиях проведения фотоаффинной модификации белков, т.е. в водных растворах.

Фотопревращения *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (5) при облучении в водных растворах. При облучении амида 5-азидо-2-нитробензойной кислоты (5) в водных растворах с различным содержанием кислорода замечено, что в присутствии O₂ образуется соединение (7), которое элюируется с обращенной фазы при более высокой концентрации ацетонитрила по сравнению с соединениями, образующимися при облучении соединения (5) в атмосфере аргона. На основании данных ¹H-ЯМР (см. табл. 3) этому соединению, может быть приписана структура *N*-(3-амино-пропил)-5-{3-(3-амино-пропилкарбамоил)-4-[3-(3-амино-пропилкарбамоил)-4-нитро-фенил-*NNO*-азокси]фенил-*ONN*-азокси}-2-нитробензамида (7) (см. рис. 1). Строение соединения (7) подтверждено данными ¹³C-ЯМР и MS. В MALDI масс-спектре продукта фотолиза (7) наблюдается пик с *m/z* 959.25, соответствующий массе иона этого соединения с дополнительно присоединенными двумя молекулами трифторацетата и ионом натрия, т. е. $[M_{(7)} + 2 \text{ CF}_3\text{COO}^- + \text{Na}]^+$. Трифторацетат в составе соединения

выявляется также ^{19}F -ЯМР-спектроскопией. Появление его в качестве противоиона протонированного аминоспейсера обусловлено использованием раствора трифторуксусной кислоты в качестве элюента в процессе хроматографического разделения продуктов фотолиза арилазида (5).

Таблица 3.
Данные ^1H -ЯМР соединения (7) ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д., J/Гц).

J	д, 9.0	дд 9.0, 2.4	д, 2.4	м	м	м	т, 6.0	т, 6.0	т, 6.0
(H), δ	3 8.34	4 8.56	6 8.47	8, 8'	9, 9'	10, 10'	NH	NH'	NH''
	3' 8.33	4' 8.29	6' 8.13	и 8''	и 9''	и 10''	9.02	8.97	8.80
	3'' 8.26	4'' 8.22	6'' 8.11	3.37	1.83	2.92			

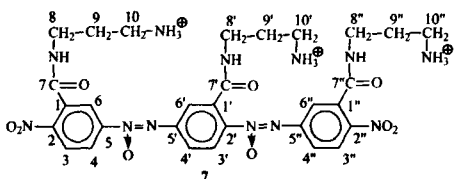


Рис. 1.

Структура продукта фотолиза (7)
N-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (5).

диаминопропан (9). До настоящего времени такие продукты фотолиза арилазидов рассматривались как результат превращения триплетного нитрена (схема 2, путь а).

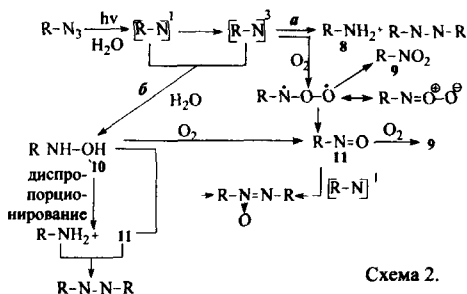


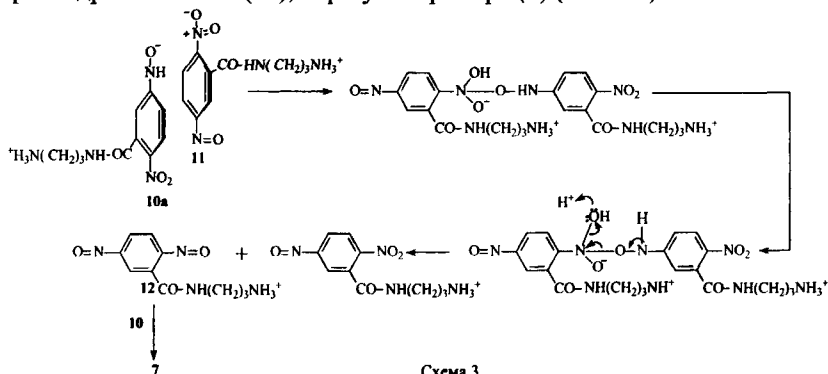
Схема 2.

соединение (11) может образоваться за счёт окисления *N*-арилгидроксиламина кислородом воздуха или его диспропорционирования. Наличие в молекуле производного гидроксиламина аминоспейсера, pK_a которого находится в области значения pK_a для гидроксигруппы *n*-нитрозамещенного гидроксиламина ($pK_a = 10.2$), может способствовать смещению равновесия в сторону образования цвиттер-иона гидроксиламина (10) – соединения (10а) (см. схему 3). Взаимодействие последнего с электронодефицитным

Наряду с соединением (7) из реакционной смеси с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ было выделено еще два мажорных продукта фотолиза: *N*-(5-амино-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропан (8) и *N*-(2,5-динитробензоил)-1,3-

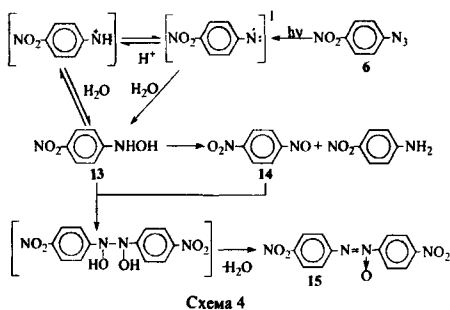
Впервые на роль предшественника всех выявленных продуктов фотолиза нами предлагается *n*-нитрозамещенный *N*-арилгидроксиламин (10) – продукт взаимодействия арилнитрена с молекулами воды (схема 2, путь б). Реакционноспособное нитрозо-

нитрозосоединением (11) приведет к формированию комплекса с переносом заряда. При внутрикомплексном восстановлении нитрогруппы в реакционной смеси будет накапливаться 2,5-динитропроизводное (12), которое, вступив в реакцию азоксисочетания с двумя молекулами *N*-арилгидроксиламина (10), образует «тример» (7) (схема 3).



Отсутствие среди мажорных продуктов фотолиза димера – продукта азоксисочетания нитрозосоединения (11) с гидроксиламином (10) – связано, вероятно, с тем, что динитропроизводное (12) обладает большей реакционной способностью в реакции азоксисочетания, чем мононитрозосоединение (11).

Фотопревращение *p*-нитрофенилазида (6) при облучении в водных растворах.



Выделение и идентификация *N*-арилгидроксиламинов затруднительны из-за их неустойчивости в водных растворах. Зарегистрировать образование *N*-(*p*-нитрофенил)-гидроксиламина удалось только при облучении водного раствора *p*-нитрофенилазида (6) в присутствии 30 %-ов метанола (рН 8). В

ходе фотолиза наблюдается образование соединения (13) (см. схему 4), электронный спектр поглощения которого ($\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ нм}$) аналогичен описанному в литературе для *N*-(*p*-нитрофенил)-гидроксиламина (лит. $\lambda_{\text{max}} = 356 \text{ нм}$).

Образование *N*-арилгидроксиламина в ходе облучения 4-нитрофенилазида в водных растворах было подтверждено через

реакцию азоксисочетания продукта фотолиза с 1-нитрозо-4-нитробензолом (14) (схема 4). Для того чтобы исключить влияние кислорода, фотолиз *п*-нитрофенилазида (6) в присутствии «ловушки» – 1-нитрозо-4-нитробензола – проводили в атмосфере аргона. Предварительно было показано, что в условиях облучения нитрозосоединение (14) устойчиво. Было обнаружено, что с увеличением дозы облучения, молярный коэффициент экстинкции в области максимального поглощения 1-нитрозо-4-нитробензола ($\lambda_{\text{max}} = 282 \text{ нм}$) падает. Это указывает на вовлечение нитрозосоединения в реакцию. Образующееся при этом соединение было выделено и идентифицировано нами как 4,4'-динитроазоксибензол (15).

Дополнительно мы исследовали взаимодействие 1-нитрозо-4-нитробензола (14) с предоблучённым азидом (6). Как видно из таблицы 4, с повышением концентрации нитрозосоединения (14) выход азоксипродукта (15) увеличивается симбатно. Это еще раз свидетельствует о том, что при облучении *п*-нитрозамещённых арилазидов в водных растворах в качестве промежуточного активного интермедиата образуется *N*-арилгидроксиламин.

Таблица 4.

Зависимость выхода азоксисоединения от соотношения арилазид/нитрозосоединение

Соотношение концентрации соединений (6) / (14)	В отсутствие (14)	3.6 / 1	0.7 / 1
*Выход соединения (15), %	15	31	73

* – Выход оценен как молярный эквивалент относительно исходного количества нитрозосоединения (14).

Совокупность полученных нами результатов указывает на то, что фотоаффинные реагенты на основе *п*-нитрозамещённых арилазидов при облучении могут генерировать долгоживущие химически активные соединения – нитрозосоединения. Последние, в силу своей реакционной способности, могут взаимодействовать с функциональными группами белков, что необходимо учитывать при анализе данных по фотоаффинной модификации биополимеров.

Изучение продуктов фотовзаимодействия 5-азидо-2-нитробензонильных реагентов с аминокислотными остатками в условиях сближения реакционных центров.

Решение проблемы по установлению структуры продуктов фотомодификации аминокислотных остатков мы проводили с

использованием двух модельных систем, предложенных и хорошо зарекомендовавших себя ранее:

- 1) комплекса стрептавидин-фотоаналог биотина;
- 2) соединения, в котором аминокислотный остаток сближен при помощи линкера с арилатидной группой на расстояние, сопоставимое с расстоянием между реагирующими группами при фотоаффинной модификации белка.

Анализ модифицированного пептида. В ходе изучения фотоиндуцированного взаимодействия стрептавидина с соединением (1) было обнаружено, что модифицированные пептиды неустойчивы в условиях анализа. Поэтому все работы по установлению структуры модифицированных пептидов проводились с использованием стрептавидина, модифицированного фотобиотином (2).

Для анализа использовали модифицированный пептид, образующийся как при облучении, так и на «темновой» стадии модификации стрептавидина. Электронный спектр поглощения модифицированного пептида характеризуется $\lambda_{\max} = 385$ нм, что указывает на присутствие в составе продукта остатка реагента. Первичная структура модифицированного пептида была проанализирована методом Эдмана и определена как G(74)W*TVAW*KN(81), где W* – модифицированный остаток триптофана. В MALDI-масс-спектре продукта регистрируется сигнал с $m/z = 1455.1$, соответствующий массе иона, образованного пептидным фрагментом с дополнительно присоединенным остатком арилнитрена и двух атомов кислорода.

Активный центр стрептавидина хорошо изучен различными методами. Его формируют аминокислотные остатки и пептиды: N(23)QLGS(27); Y(43)ESAVGN(49); S(88)ATTW(92); W(108)LL(110); а так же W(79)W(120); D(128); и T(129). Таким образом, видно, что модифицированный пептид попадает в район активного центра стрептавидина, причём, согласно компьютерному моделированию активного центра стрептавидина W(75) и W(79) могут взаимодействовать непосредственно с фотоаналогом биотина. В ходе экспериментов по исследованию аффинных свойств фотоактивируемого производного биотина и продуктов его фотолитического разложения нами было показано, что во всех случаях активный центр стрептавидина может включать только одну молекулу фотоаналога биотина или одну молекулу продукта его фотолитического разложения, и проникновение туда второй активной частицы практически невозможно. В то же время, очевидно, что одна нитреновая частица, синглетная или триплетная, не может служить причиной модификации двух остатков триптофана. К тому же модифицированный пептид образовывался как при фотовзаимодействии стрептавидина с

фотобиотином, так и при добавлении к белку предоблученного реагента. Фотомодификация активного центра одной субъединицы реагентом, связанным в активном центре другой субъединицы стрептавидина, также исключается. Для того чтобы арилазидогруппа провзаимодействовала с любым из остатков триптофана соседней субъединицы, нужно сместить её на расстояние, превышающее суммарную длину остатка валериановой кислоты, аминокислоты и самой арилазидной группы. Таким образом, факт модификации двух остатков триптофана одной молекулой фотореагента может быть объяснён тем, что при облучении образуется соединение, которое, модифицируя один аминокислотный остаток, превращается в другое активное соединение, взаимодействующее со вторым остатком триптофана.

Изучение структуры продуктов фотовзаимодействия функциональных групп белков с арилазидами может дать ключ к пониманию природы образующихся при фотолизе арилазида активных частиц, и механизма их взаимодействия с боковыми радикалами аминокислот. На основе этих данных можно было бы создать предсказательную модель, полезную для интерпретации результатов, полученных при исследовании многих биомакромолекул и биохимических процессов методами фотоаффинной модификации. Поэтому в задачу следующего этапа работы входило определение строения продуктов фотовзаимодействия 5-азидо-2-нитробензоильного остатка с некоторыми функциональными группами белка.

Фотоиндуцированное взаимодействие 5-азидо-2-нитробензоильной группы с функциональными группами триптофана и гистидина. Решение проблемы установления структуры продуктов фотомодификации аминокислотных остатков целесообразно проводить с использованием модельных соединений, в которых аминокислотный остаток сближен при помощи линкера с арилазидной группой на расстояние, сопоставимое с расстоянием между реагирующими группами при фотоаффинной модификации белка. Для исследования продуктов фотомодификации функциональных групп триптофана и гистидина реагентами на основе 5-азидо-2-нитробензойной кислот нами были синтезированы два модельных соединения: 5-азидо-*N*-[2-(3Н-имидазол-4-ил)-этил]-2-нитробензамид (16) и *N*-{3-[2-амино-3-(Н-индол-3-ил)-пропиониламино]-пропил}-5-азидо-2-нитробензамид (17). Соединение (16) было получено путем бензоилирования аминогруппы гистамина *N*-гидроксисукцинимидным эфиром 5-азидо-2-нитробензойной кислоты. Синтез соединения (17) проводился через ацилирование аминогруппы спейсера пентафторфениловым эфиром *Вос*-защищенного триптофана. Структуры модельных соединений были подтверждены методами ¹H-

ЯМР, ^{13}C -ЯМР, ИК- и электронной спектроскопии и MALDI-TOF-масс спектрометрии.

Фотолиз 5-азидо-N-[2-(3Н-имидазол-4-ил)-этил]-2-нитробензамида (16). Было обнаружено, что набор продуктов фотолиза соединения (16) зависит от содержания кислорода в облучаемом растворе. Выделенные после облучения продукты (18), (19) и (20) на основании данных ^1H -ЯМР и электронной спектроскопии были идентифицированы как азокси-амино- и нитросоединения, соответственно (схема 5).

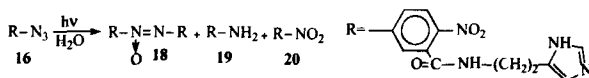


Схема 5.

Фотолиз N-{3-[2-амино-3-(Н-индол-3-ил)-пропиониламино]-пропил}-5-азидо-2-нитробензамида (17).

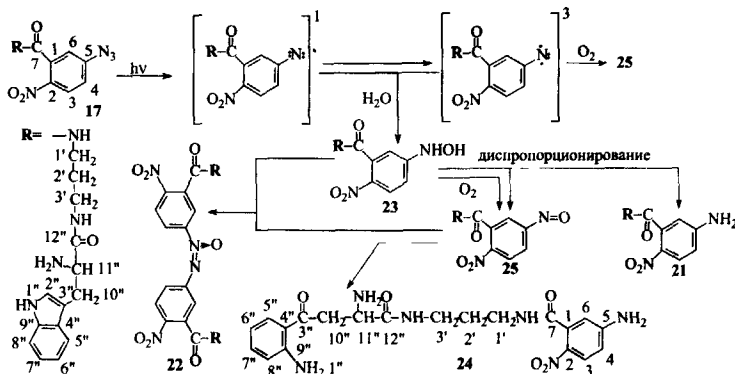


Схема 6.

Среди продуктов фотолиза соединения (17), наряду с устойчивыми соединениями (21) и (22) (см. схему 6), было выделено соединение, которое с течением времени распадалась с образованием трех основных продуктов: неустойчивого соединения (23) и двух устойчивых соединений (21) и (24). На основании сходства химического поведения и электронных спектров поглощения продукта (23) ($\lambda_{\text{max}} = 358 \text{ nm}$) и *p*-нитрофенилгидроксиламина ($\lambda_{\text{max}} = 356 \text{ nm}$), соединение (23) было отнесено к производному *N*-замещенного арилгидроксиламина (схема 6).

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии для соединений (21) и (22) свидетельствуют о том, что модификация по остатку триптофана отсутствует. Согласно данным ^1H -ЯМР и электронной спектроскопии и

MALDI-масс-спектрометрии, соединению (21) может быть приписана структура аминсоединения, а соединению (22) – структура азокисоединения (схема 6).

При сравнении электронных спектров поглощения триптофана и соединения (24) выявляется отсутствие полосы поглощения, соответствующей индольному кольцу, кроме того, в спектре соединения (24) наблюдается полоса поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 382$ нм), свидетельствующая о наличии 5-амино-2-нитробензоильного остатка ($\lambda_{\text{max}} = 383$ нм). Согласно данным ^1H -ЯМР соединению (24) может соответствовать структура

N-{3-[2-амино-4-(2-аминофенил)-4-оксобутириламино]-пропил}-5-амино-2-нитробензамина (см. табл. 5, нумерация атомов в соединении (24) аналогична нумерации, приведенной на схеме 6 для соединения (17)).

Таблица 5.

Данные ^1H -ЯМР для соединения (24) (D_2O , δ , м.д. и J , Гц).

(H)	3	4	6	2"	5"	6"	7"	8"	10"	11"
σ	8.04	6.77	6.65	—	7.84	7.45	6.82	6.91	3.78	4.50
J	д, 9.0	дд 9.0, 2.4	д, 2.5	—	д, 8.0	т, 8.0	т, 8.0	д, 8.0	д, 6.0	т, 6.0

Данные MALDI-TOF-масс спектрометрии подтверждают образование производного кинуренина. В масс-спектре соединения (24) регистрируются сигналы с m/z 427 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 397 $[\text{M} - \text{NO}]$, m/z 381 $[\text{M} - \text{NO} - \text{O}]$.

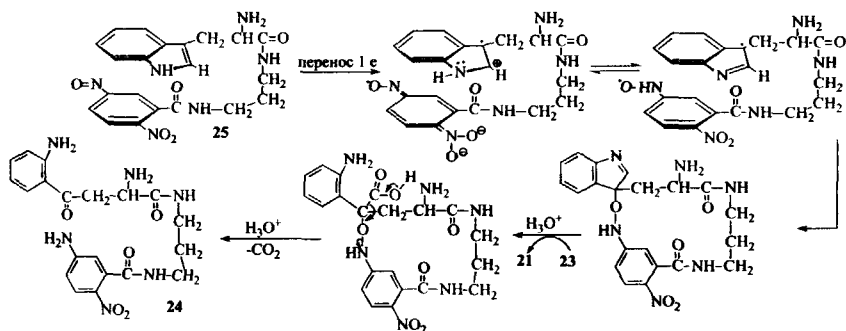


Схема 7.

Образование предшественника соединения (24) является кислород-зависимым процессом. Среди стадий процесса фотопревращения арилазида (17), кислород-зависимой стадией является окисление *N*-арилгидроксиламина (23), приводящее к образованию

нитрозосоединения (25), которое, кроме того, может образоваться за счёт диспропорционирования соединения (23). Взаимодействие арилнитрозогруппы с индольным кольцом триптофана, вероятно, приводит к образованию продукта (24) (схема 7). В реакции диспропорционирования *N*-арилгидроксиламина (23), наряду с нитрозосоединением будет накапливаться аминосоединение (21). Продуктом конденсации исходного *N*-арилгидроксиламина с нитрозосоединением будет азоксисоединение (22) (схема 6).

Работа выполнена при поддержке грантов SCOPES 2000-2003, CRDF Res 008, РФФИ и №НШ-1419-2003-4.

ВЫВОДЫ

I. В условиях проведения фотоаффинной модификации белков исследован механизм фотохимического превращения *n*-нитрозамещенных арилазидных реагентов. Впервые показано:

- 1) облучение *n*-нитрофенилазида, *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана – функциональных фрагментов фотоаффинных реагентов – в водных растворах приводит к образованию *n*-нитрозамещенных *N*-арилгидроксиламинов;
- 2) предшественником ароматических нитрозо-, амино-, азоксисоединений в водных растворах является *N*-замещенный арилгидроксиламин, а не триплетный нитрен, как считали ранее; нитрозо- и аминосоединения образуются при диспропорционировании *N*-арилгидроксиламина; азоксисоединение является продуктом конденсации исходного *N*-арилгидроксиламина с образующимся в процессе его окисления нитрозосоединением;
- 3) «темновые» процессы в фотоаффинной модификации белков при использовании *n*-нитрозамещенных арилазидных реагентов обусловлены образованием в ходе облучения арилазидогруппы реакционноспособного ароматического нитрозосоединения.

II. Для изучения фотоиндуцированного взаимодействия *n*-нитрозамещенных арилазидных реагентов с функциональными группами аминокислот синтезированы две модельные системы, обеспечивающие сближение реакционных центров:

- а) комплекс стрептавидин•фотоаналог биотина;
- б) соединения, в которых аминокислотный остаток сближен при помощи линкера с арилазидной группой на расстояние, сопоставимое с расстоянием между реагирующими группами при фотоаффинной модификации белка.

С помощью их обнаружено:

- 1) образование нестабильного ковалентного аддукта сульфиминовой природы, в случае модификации соединений, имитирующих остаток метионина; в водных растворах этот продукт модификации гидролизуетсся с образованием производного сульфоксида;
- 2) превращение арилазидного реагента в amino-, нитро-, и азоксисоединения в присутствии функциональных групп лизина и гистидина;
- 3) образование производного кинуренина, в случае модификации остатка триптофана; предложен механизм его образования на стадии «темновых» реакций.

Основные результаты диссертации изложены в работах:

1. Т.В. Попова, А.Ю. Денисов, Н.И. Комарова, Т.С. Годовикова. Изучение модификации белков продуктами фотолиза амидов 2-нитро-5-азидобензойной кислоты на примере стрептавидин-фотобиотининового комплекса. // *Труды XXXVII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс"*. Из-во НГУ. 1999. С. 73–82.
2. T.V. Popova, A.Yu. Denisov, M.M. Shakirov, N.I. Komarova, P.V. Alekseyev, M.V. Serebriakova, T.S. Godovikova. Long-lived reactive intermediate photogenerated from *N*-(5-azido-2-nitrobenzoyl)-*N'*-(d-biotinyl)-1,2-diaminoethane as an affinity reagent to streptavidin // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2001. V. 61. N. 1-2. P. 68–77.
3. T.V. Popova, V.S. Mal'shakova, P.V. Alekseyev, N.V. Kudryashova, M.M. Shakirov, L.L. Savinkova, I.A. Drachkova, T.S. Godovikova. Photoanalogues of the initiation substrates of the RNA polymerase II, 5-azido-2-nitrobenzoyl derivatives of the ATP γ -amidophosphate: the possible photoinduced degradation of the functional group to an *N*-arylhydroxylamine // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids*. 2004. V. 23. N. 6-7. P. 921–925.
4. Д. Г. Кнорре, Н. В. Кудряшова, Т. В. Попова, М. М. Шакиров, В. С. Мальшакова, О. Е. Шпенев, Л. К. Савинкова, М. В. Серебрякова, Т. С. Годовикова. Фотоактивируемые аналоги иницирующего субстрата РНК-полимеразы II на основе арилазидных производных γ -амидофосфатов НТР: синтез, химические и фотохимические реакции функциональных групп. // *Биоорган. хим.* 2005. Т. 34. № 4. С. 332–343.
5. Т.В. Попова, Т.С. Годовикова. Фотохимическое взаимодействие 5-азидо-2-нитробензоильной группы с боковым радикалом триптофана. // *Труды 1-го Международного форума "Актуальные проблемы современной науки"*. Ч. 45: Биология. Из-во СГТУ. 2005. С. 98–101.

Изд. лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001.

Подписано к печати и в свет 19.10.05

Формат бумаги 60x84/16. Бумага № 1. Гарнитура "Times New Roman".

Печать офсетная. Печ. л. 1,1. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 120 Заказ № 155

Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН.

Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

№ 212 56

РНБ Русский фонд

2006-4

22883