

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

План лекции

- 1. Задачи химической модификации белков.**
- 2. Типы химических модификаций.**
- 3. Функциональные группы аминокислотных остатков, которые могут быть модифицированы.**
- 4. Особенности химической модификации белков.**
- 5. Примеры химической модификации.**

Примеры применение метода химической модификации белков

**Отслеживание *in vivo* конъюгатов белков
с флуорофорами**

- Пегилирование белков с целью снижения иммуногенности**
- Получение белков с новыми свойствами**
- Изучение механизма действия ферментов при патологиях**
- Биоконъюгация**

Методы обнаружения «существенных» и «избыточных» а.о.

- 1. Направленный (сайт-специфический) мутагенез.**
- 2. Химическая модификация боковых групп а.о.**

Задачи химической модификации белков

- 1. Поиск функционально значимых групп.**
- 2. Создание необратимых ингибиторов ферментов.**
- 3. Изучение топографии поверхности белковых молекул и их локализации в надмолекулярных структурах.**

Пример.

Модификация диизопропилфторфосфатом остатков Ser в активном центре сериновых протеиназ.

Типы химических модификаций

1. Модификация отдельных а.о. с помощью селективных химических реагентов.
2. Модификация двух функциональных групп с помощью бифункциональных химических реагентов.
3. Направленная или биоспецифическая модификация (аффинное мечение).

Особенности химической модификации белков

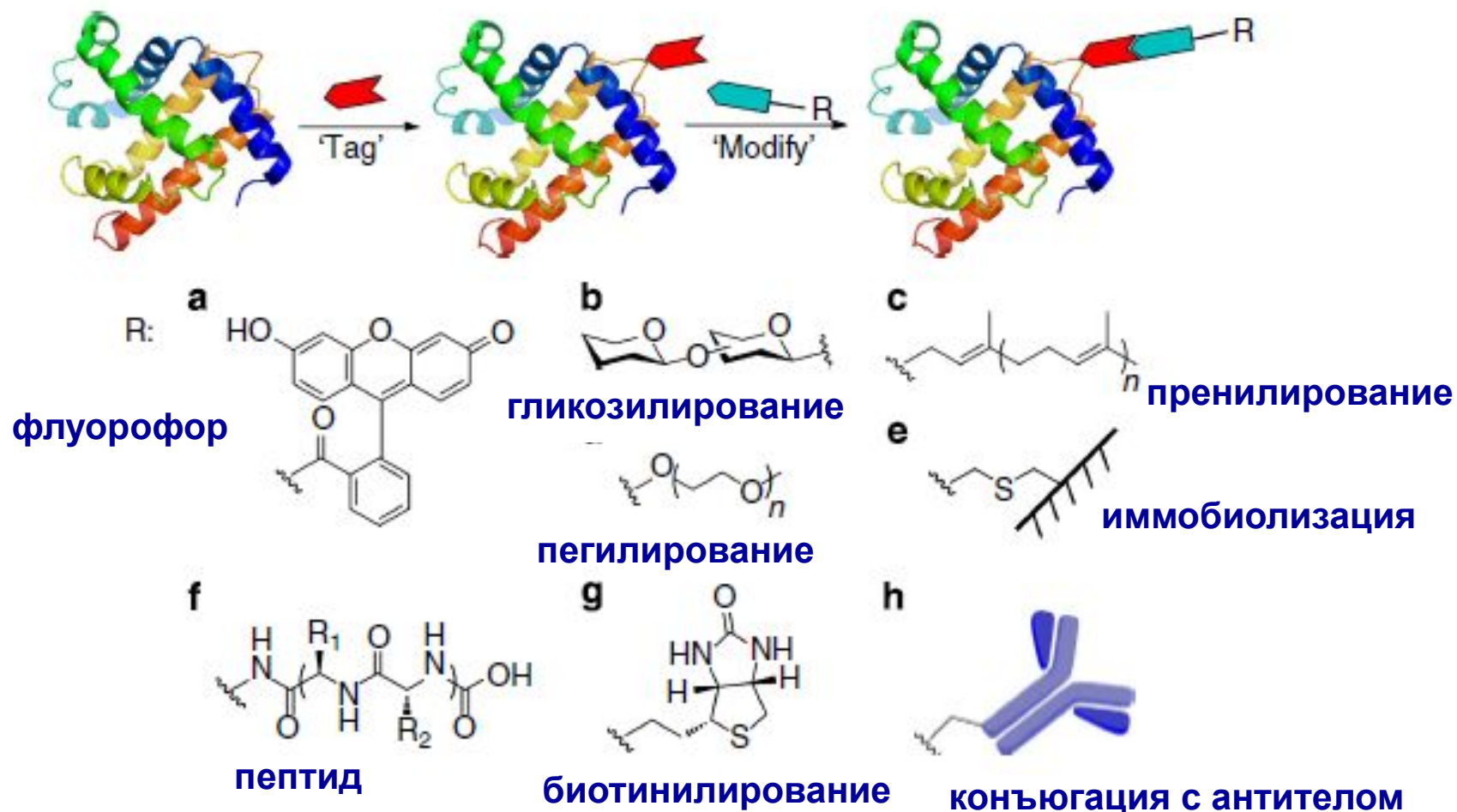
Химические свойства идентичных функциональных групп в аминокислотах и в белках различаются по следующим причинам:

- а) часть функциональных групп скрыта внутри белковой глобулы и недоступна для химических реагентов;**
- б) локальные изменения полярности (гидрофобности) микроокружения функциональной группы также могут изменять её реакционную способность;**
- в) различные участки поверхности белковой глобулы могут сорбировать химические реагенты, что приводит к локальному повышению концентрации реагента и возможности побочных реакций;**
- г) химические реакции могут влиять на конформацию молекулы белка;**
- д) многие функциональные группы в белках контактируют с соседними группировками, образуя своеобразные ансамбли.**

Условия среды для химических модификаций природных белков

- $< 37^{\circ}\text{C}$
- pH 6-8
- реакция в водном растворе

Подход, основанный на модификации метки («tag-and-modify» approach)



C.D.Spicer, B.G.Davis. Selective chemical protein modifications. Nature Communications, 2014, 5739-5740.

Функциональные группы белков, которые могут быть модифицированы

1. α -NH₂ –группа и ϵ -NH₂-группа остатков Lys.
2. Вторичная аминогруппа остатков His.
3. Сульфгидрильная группа (–SH) остатков Cys.
4. Дисульфидные мостики цистиновых остатков.
5. Тиоэфирная группа остатков Met.
6. Оксифенильная группа (-C₆H₄-OH) остатков Tyr.
7. Индольная группа боковой цепи остатков Trp.
8. Гуанидиновая группа остатков Arg.
9. Карбоксильные группы боковых цепей остатков Asp и Glu.
10. Гидроксильные группы боковых цепей остатков Tyr и Ser.

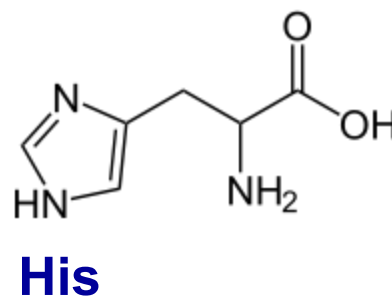
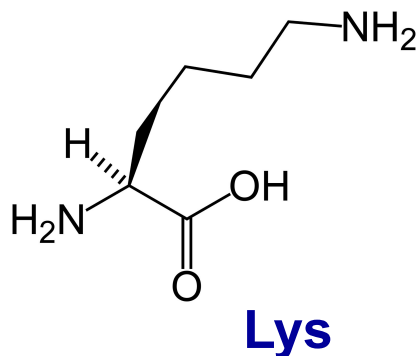
Остатки Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Asn, Gln, Sec, Pyl
модификации не подвергаются.

Химическая модификация аминокрупп

Типы аминокрупп в белках:

- 1) α -NH₂-группа N-концевого а.о., pK_a 6,8-7,6;
- 2) ϵ -NH₂-группа боковой цепи остатка Lys, pK_a 9,5-10,5;
- 3) вторичная аминокруппа имидазольного кольца остатка His, pK_a 7,2-7,6.

Понижая pH раствора до 7,0 можно избежать модификации ϵ -NH₂-групп боковой цепи остатка Lys.



Химическая модификация остатков Lys

ϵ -NH₂–группа боковой цепи остатка Lys может быть модифицирована следующими методами:

- 1) ацилирование;**
 - 2) арилирование;**
 - 3) реакция с имидоэфирами;**
 - 3) алкилирование или восстановительное алкилирование;**
 - 4) карбомоилирование;**
 - 4) амидирование;**
 - 5) гуанидинирование;**
 - 6) образованием Шиффовых оснований;**
 - 7) дансилирование**
- и др.**

Ацилирование ε -NH₂-группы Lys

Ацилирование можно вести с помощью:

- 1) симметричных ангидридов (уксусного, трифторуксусного, янтарного, малеинового, цитраконового);
- 2) смешанных ангидридов (карбоксиангидридов);
- 3) активированных сложных эфиров.

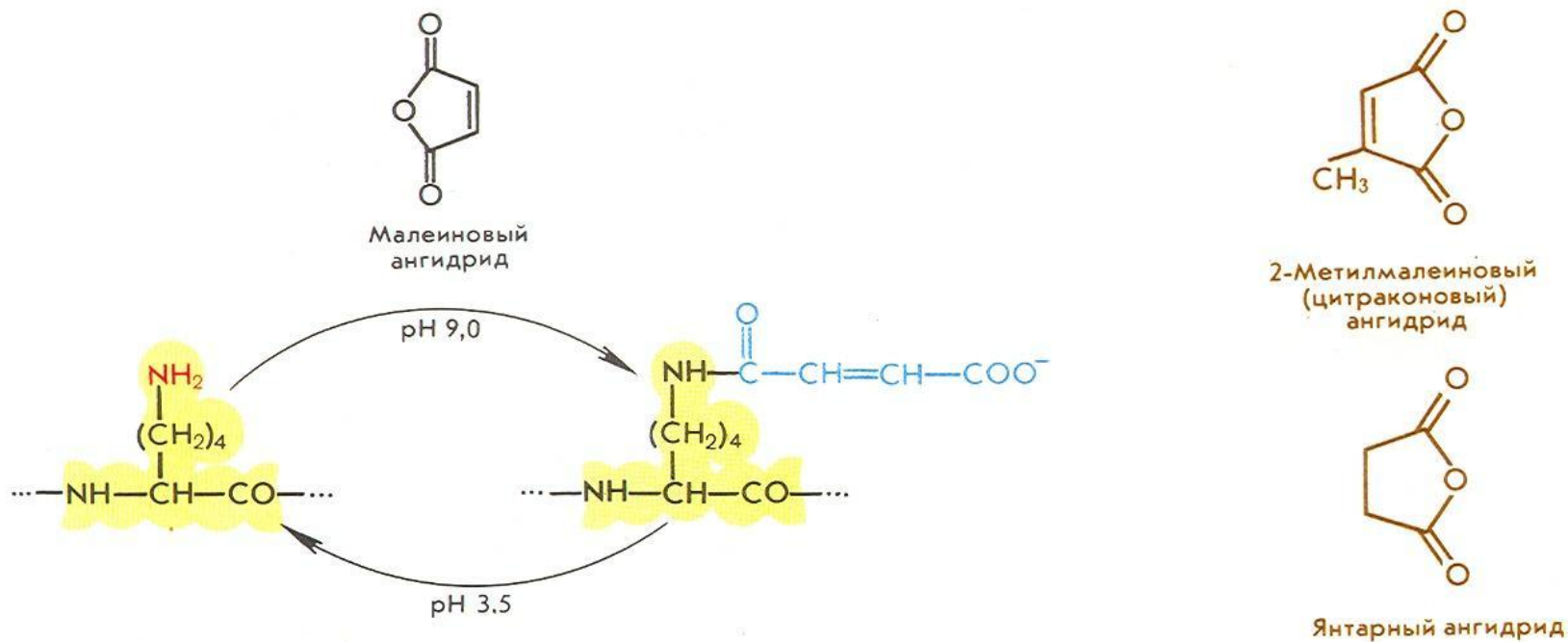
Всегда требуется большой избыток ацилирующего агента, т. к. основной побочной реакцией является его гидролиз.

Скорость гидролиза уменьшается в ряду:



ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ Lys

Ацилирование

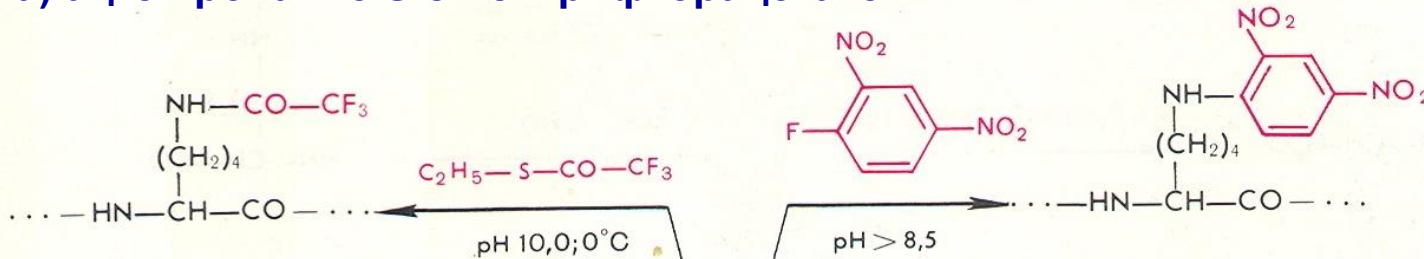


Замена заряда с +1 на -1 вызывает большие конформационные изменения.

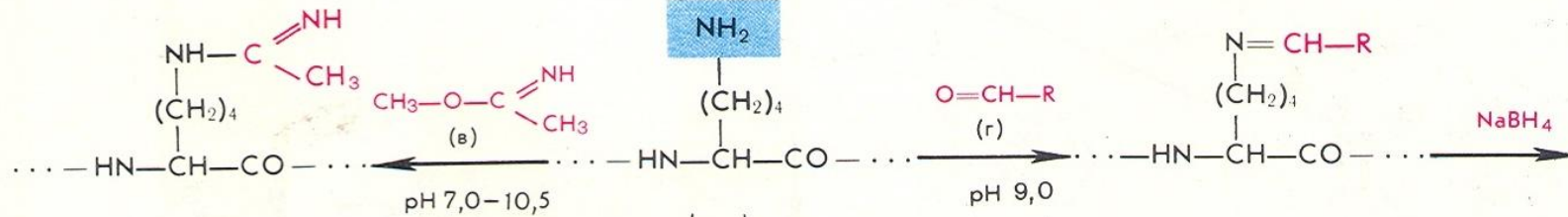
Основной побочной реакцией является необратимое алкилирование SH-групп остатков Cys.

Химическая модификация Lys

а) ацилирование S-этил-трифторацетатом

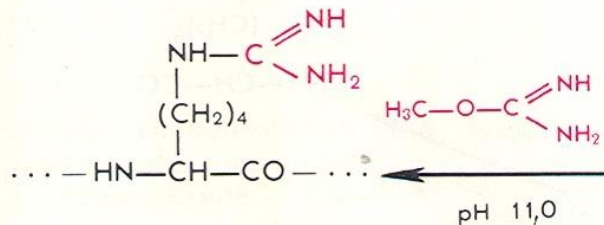


б) арилирование 2,4-динитрофторбензолом



в) реакция с имидоэфирами, образование амидинов

д) гуанидинирование O-метилизомочевинной

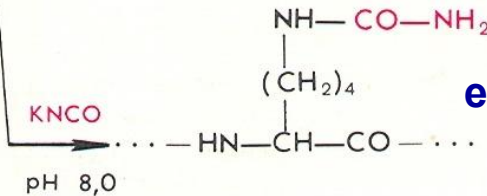


гомоаргинин

г) образование оснований Шиффа

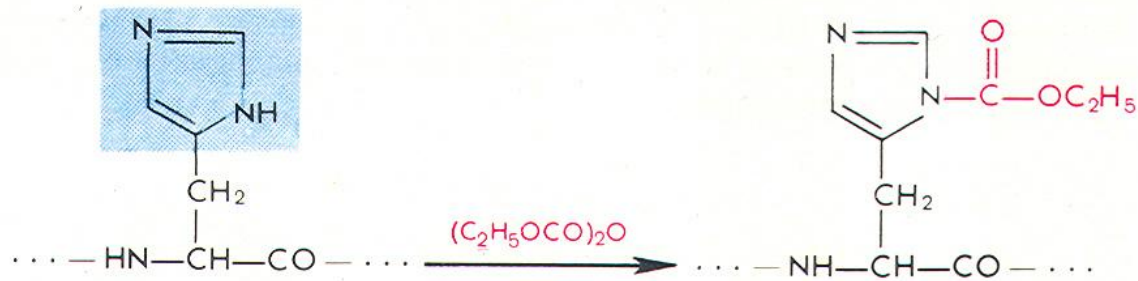
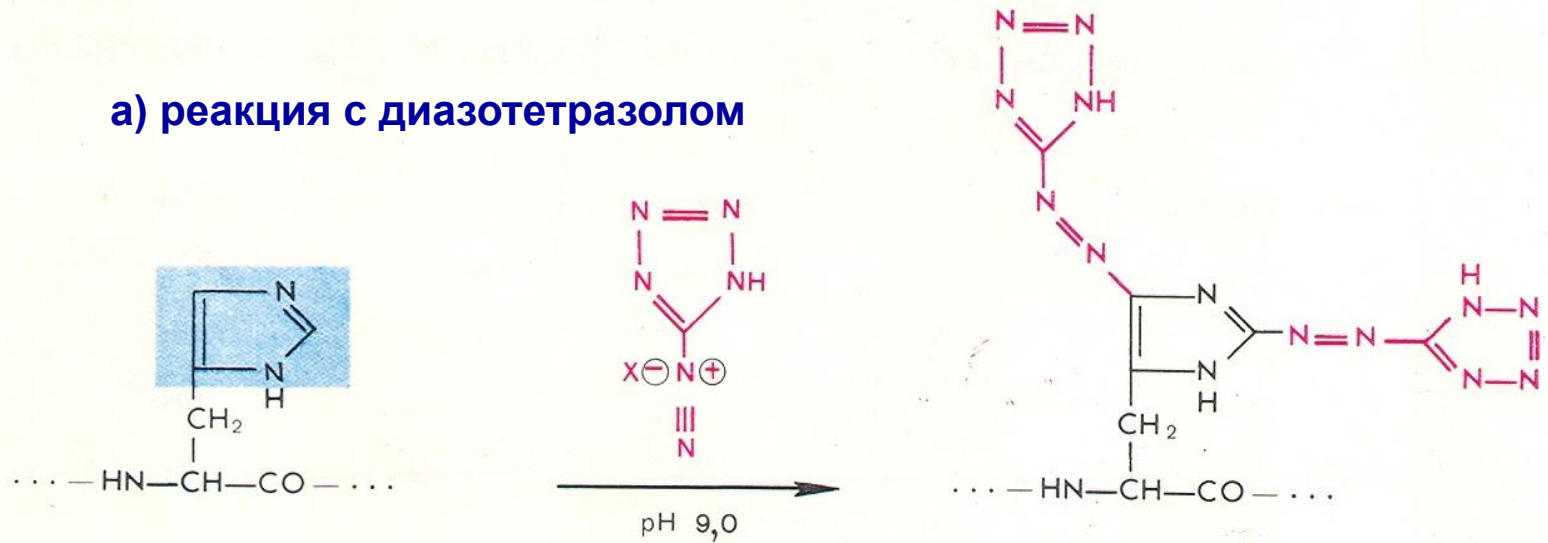
восстановительное алкилирование

е) карбамоилирование



Модификация остатка His

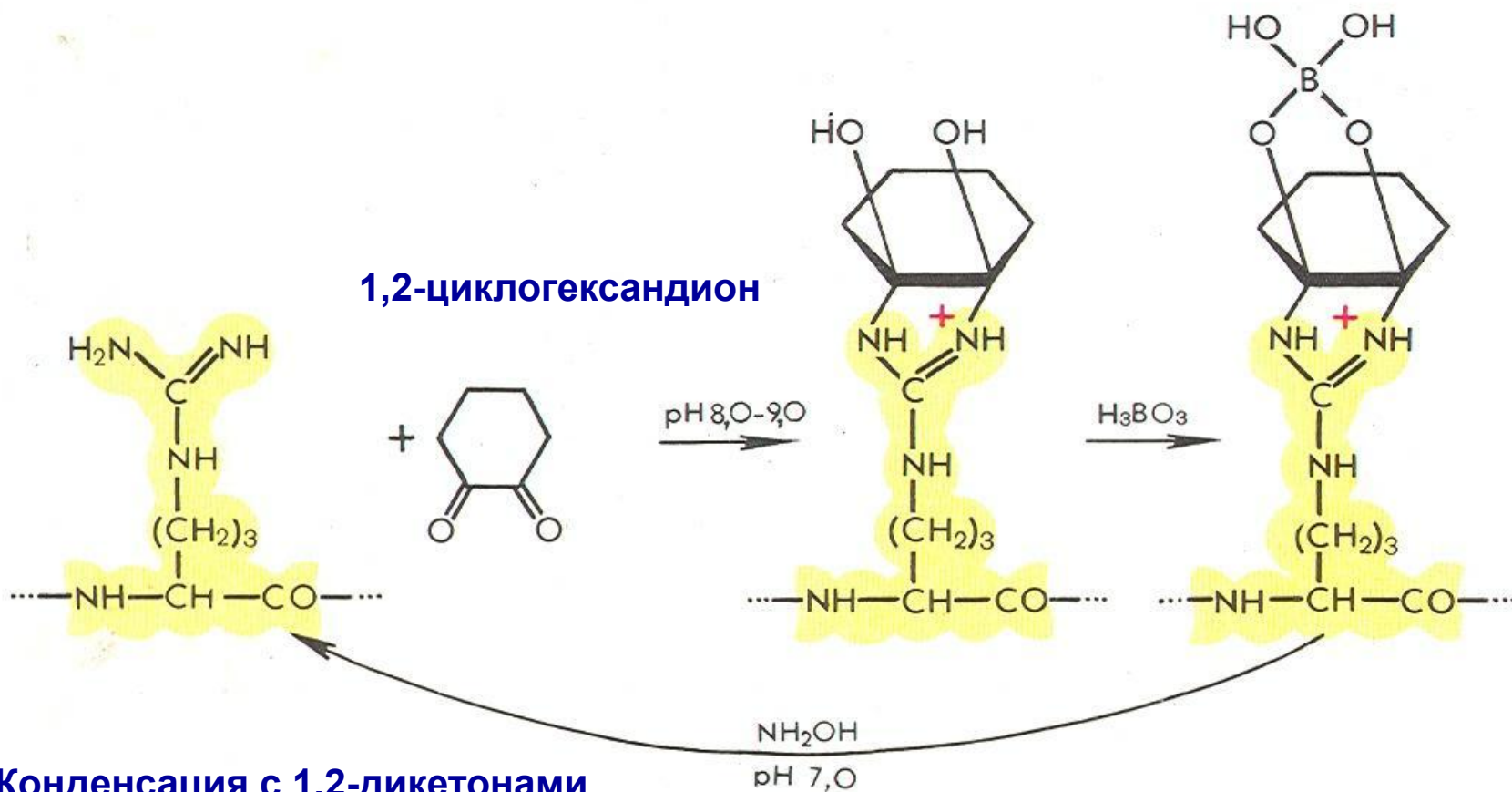
а) реакция с диазотетразолом



б) реакция с диэтилпирокарбонатом

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ Arg

1975 г. Л. Патти, Э. Смит



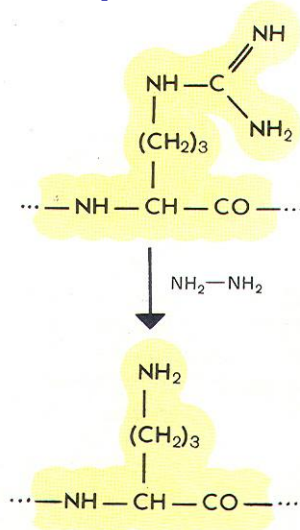
Конденсация с 1,2-дикетонами

Аргинин можно легко регенерировать при действии гидроксиламина при pH 7,0, 37°C в течение 7-8 часов

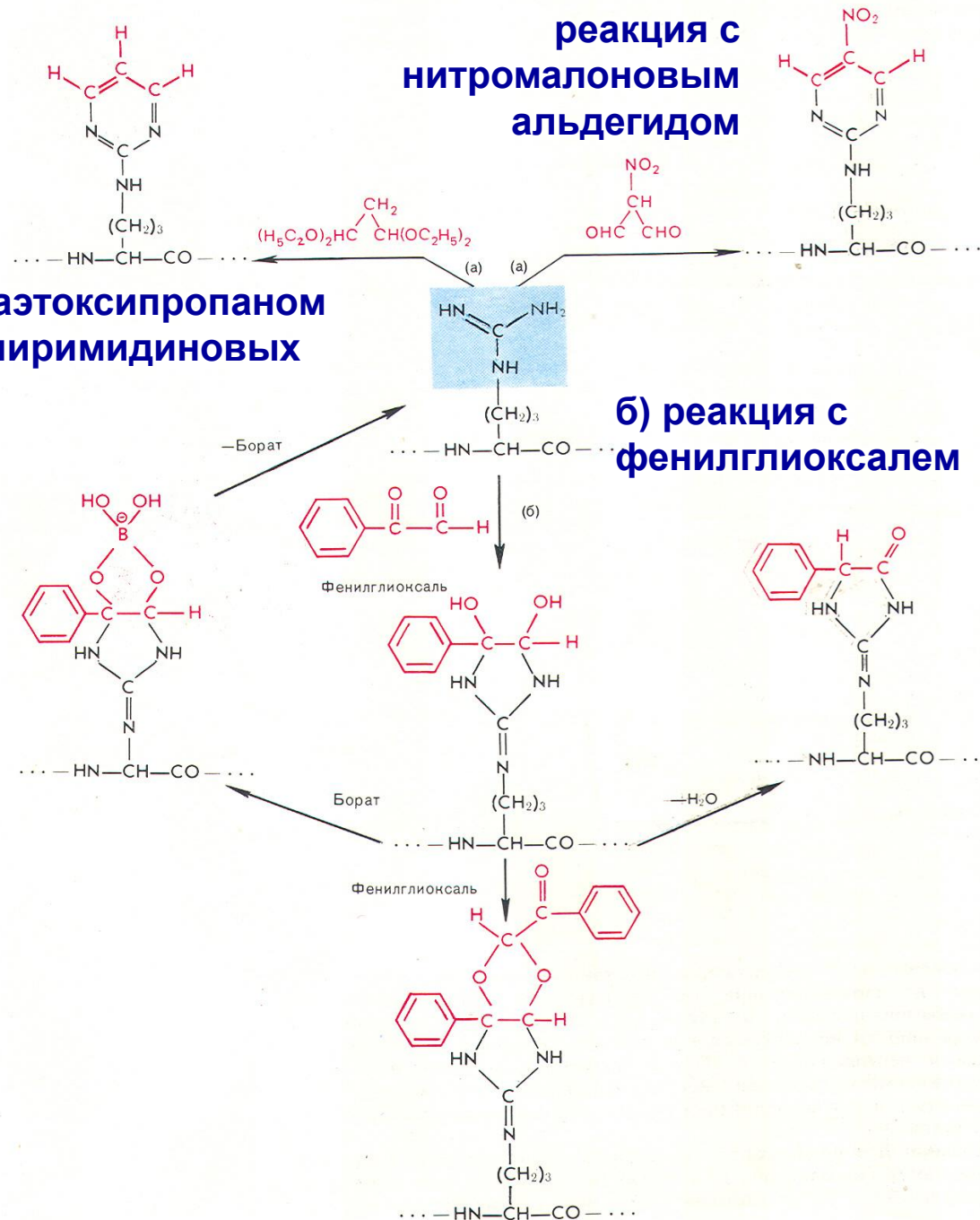
Химическая модификация Arg

а) реакция с тетраэтоксипропаном с образованием пиримидиновых производных

в) гидразинолиз с образованием орнитина

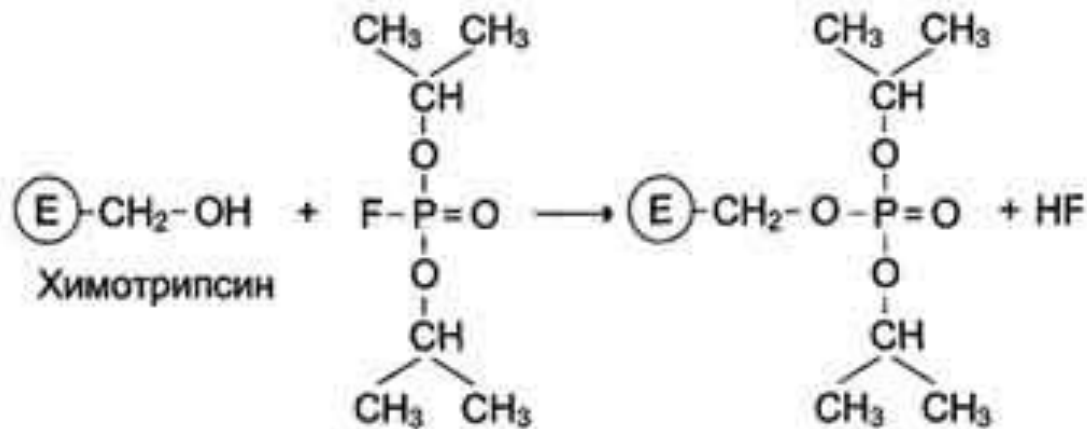


реакция с нитромалоновым альдегидом



Модификация остатков Ser и Thr

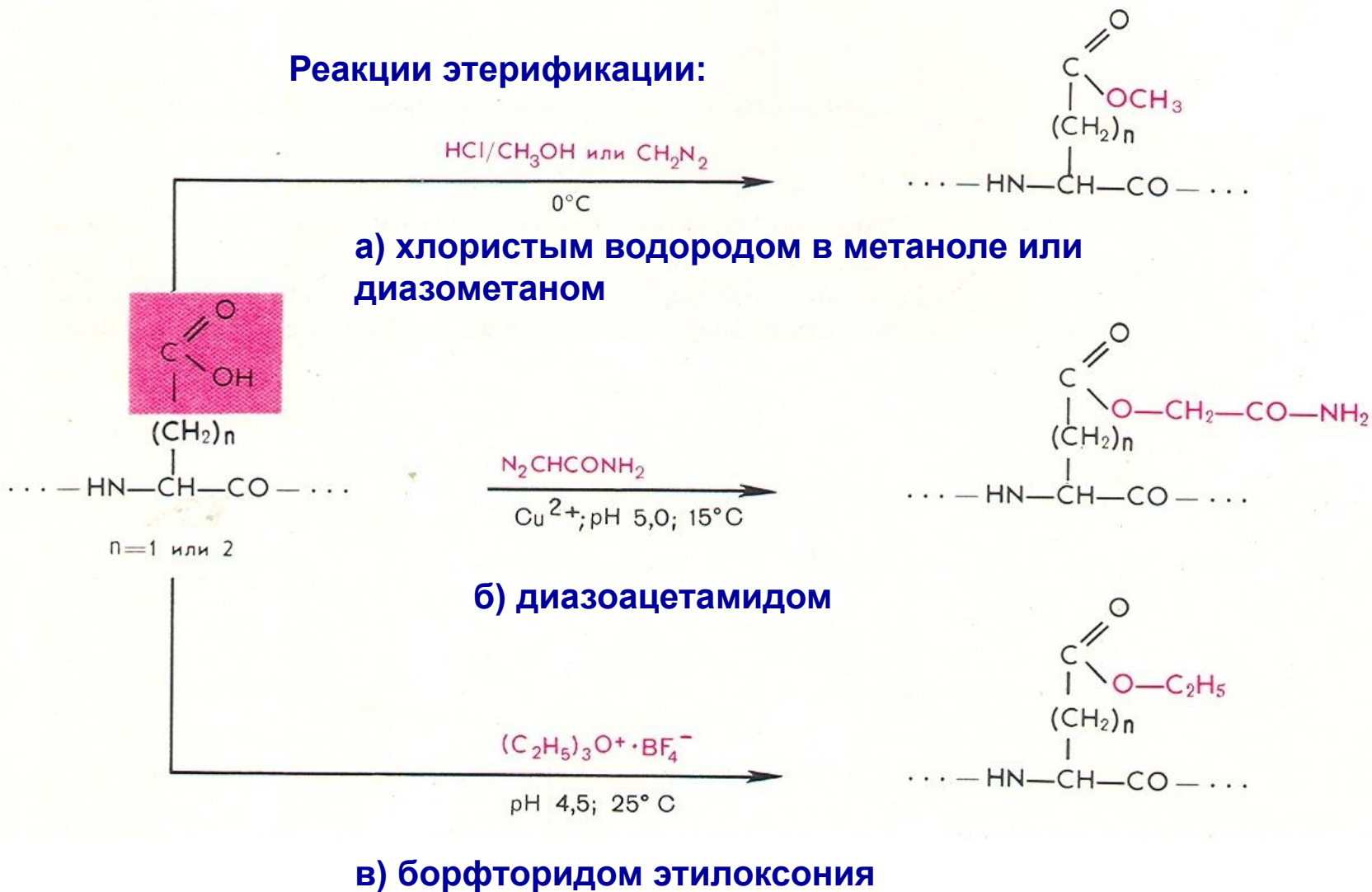
Из-за низкой реакционной способности первичных спиртовых групп Ser и Thr специфическая модификация этих остатков невозможна. Функционально важный остаток Ser в активном центре сериновых протеаз можно специфически промодифицировать **диизопропилфторфосфатом**:



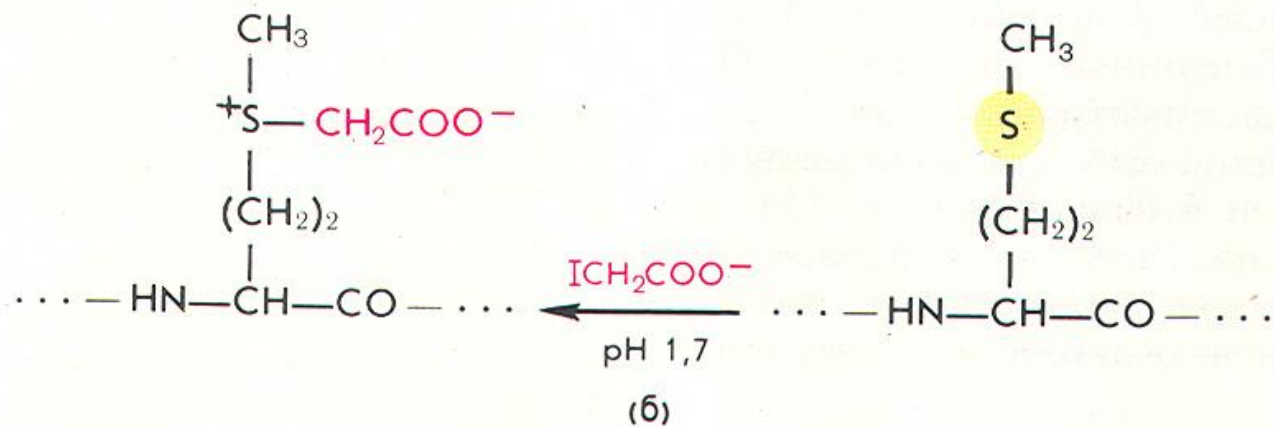
диизопропилфторфосфат

Модификация остатков Asp и Glu

Реакции этерификации:

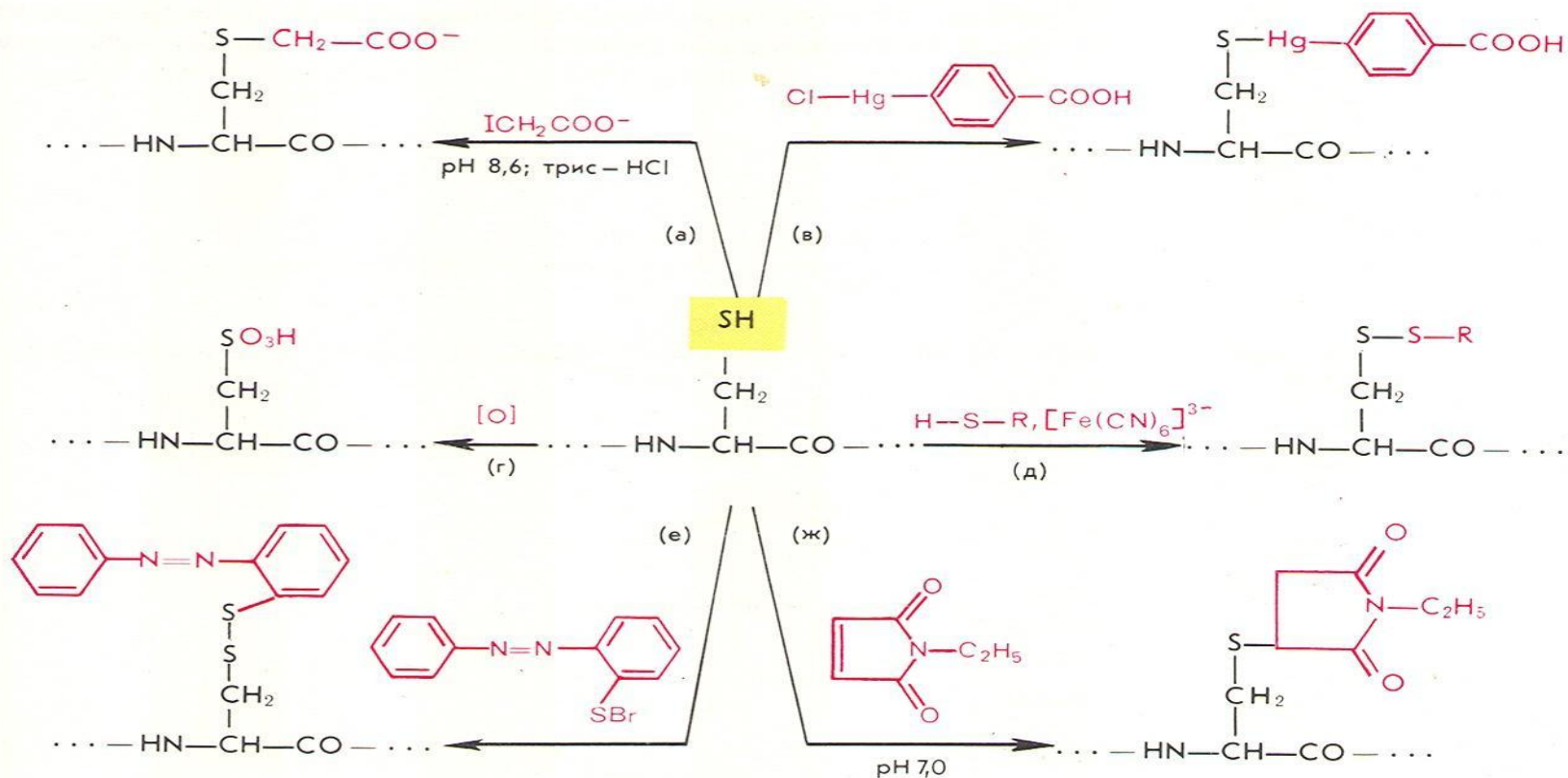


Модификация остатка Met



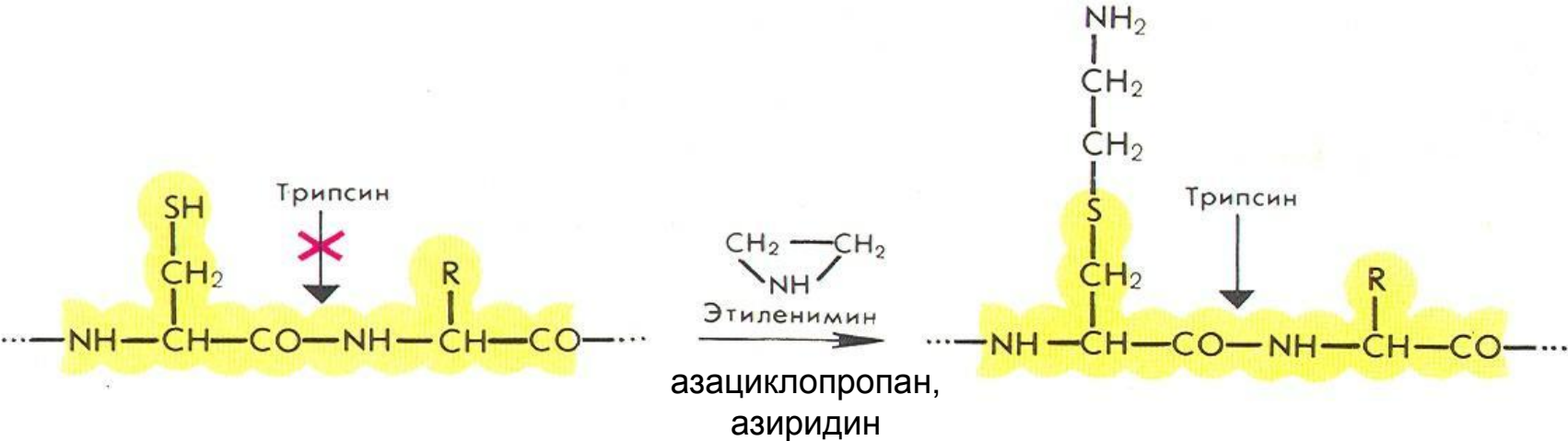
Алкилирование иодацетамидом с образованием карбоксиметилсульфониевой соли

Модификация сульфгидрильных групп цистеина

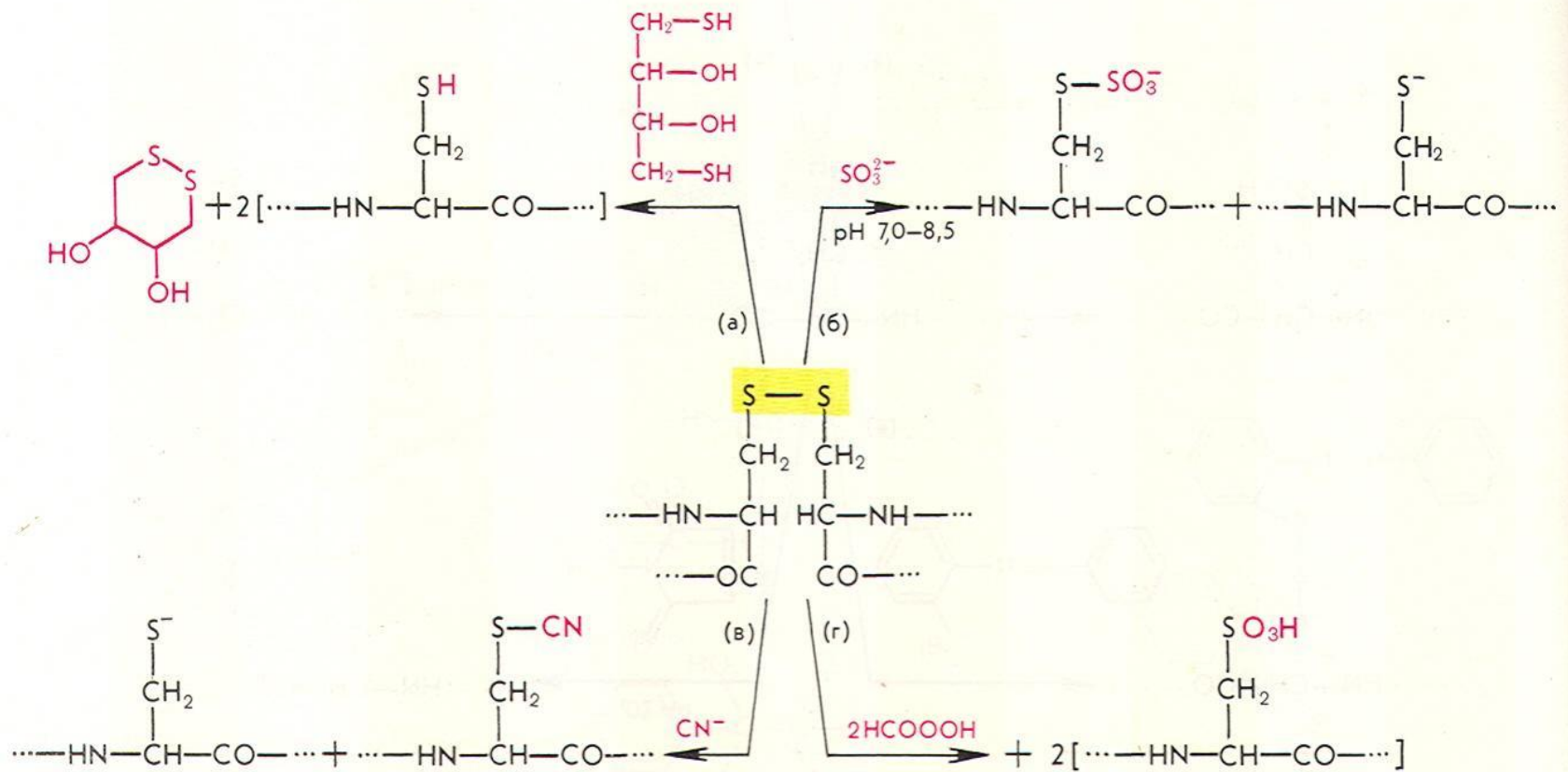


- а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацетамидом;
 - б) аминоэтилирование этиленимином (не показана);
 - в) реакция с п-хлормеркуриобензойной кислотой;
 - г) окисление с помощью O_2 до цистеиновой кислоты;
 - д) окисление с образованием дисульфидных связей в присутствии феррицианида;
 - е) реакция с азобензол-2-сульфенилбромидом;
 - ж) реакция с N-этилмалеимидом;
- 3) пиридилэтилирование 4-винилпиридином (не показана).

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ Cys



Модификация дисульфидных групп цистина

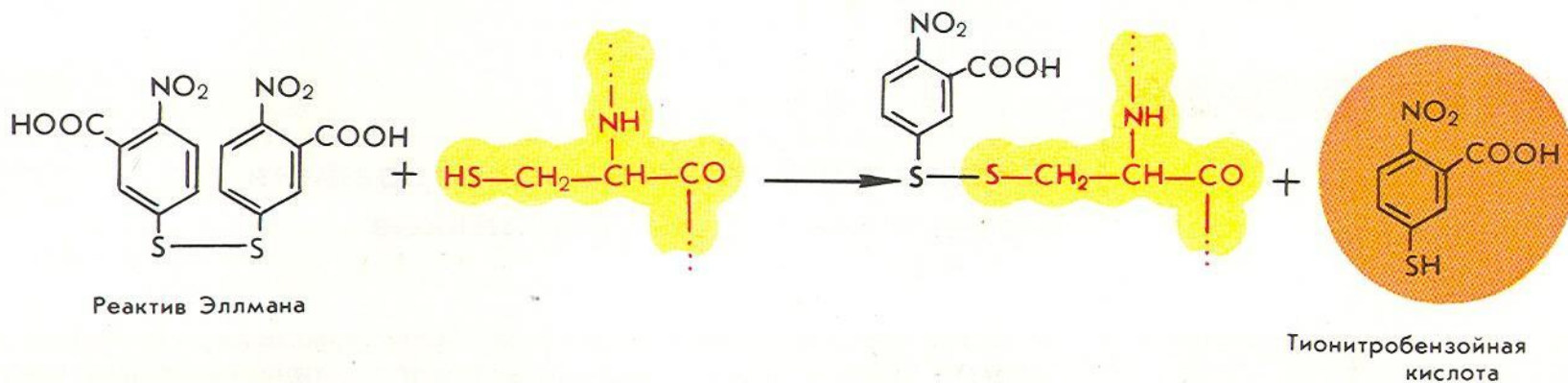


- а) восстановление дитиотреитолом, меркаптоэтанолам или другими тиолами;
 б) окислительный сульфитолиз;
 в) расщепление цианидами;
 г) окисление надмуравьиной кислотой.

Дисульфидный обмен при $\text{pH} > 7,0$



Титрование белка реактивом Эллмана - 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой)

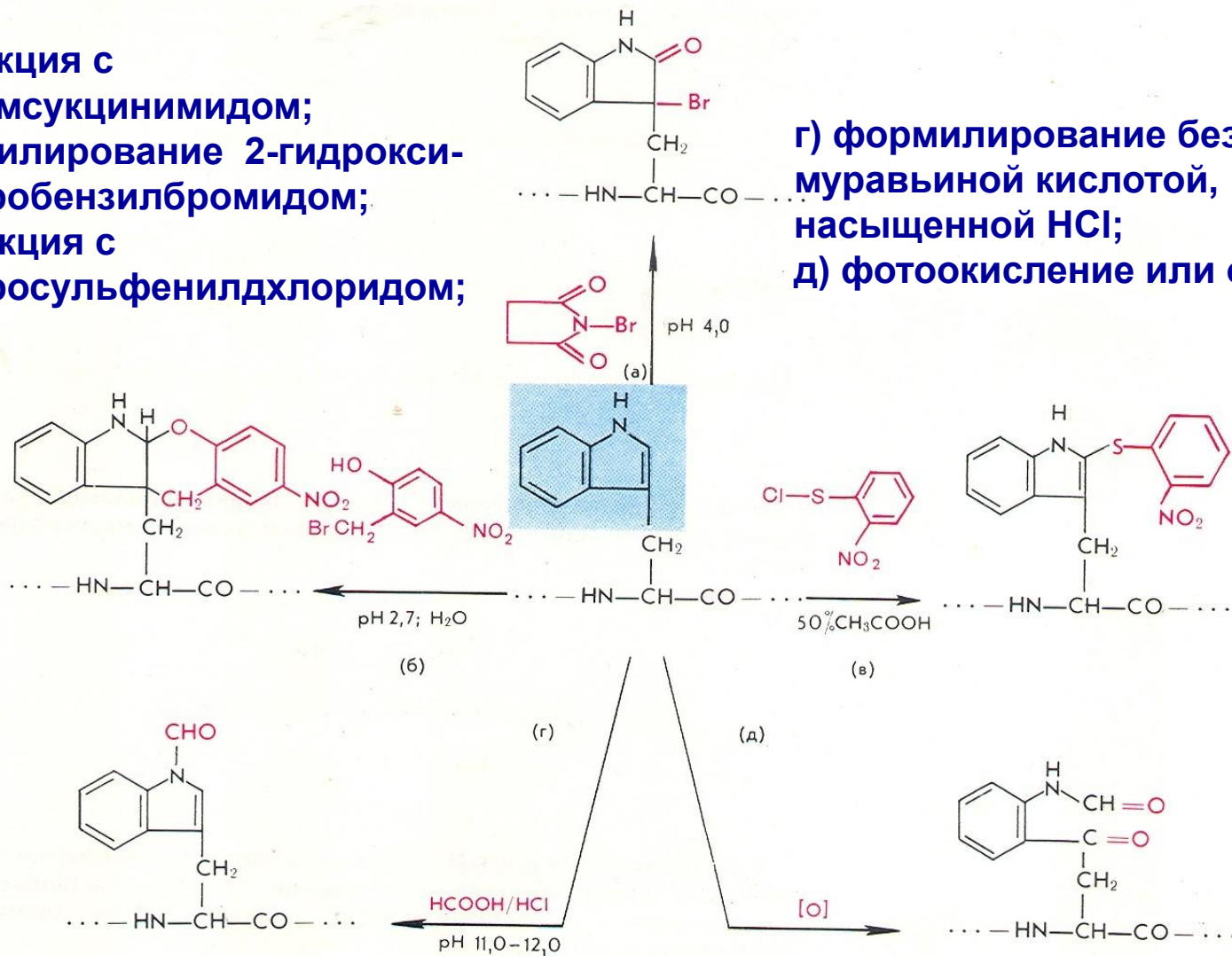


Тионитробензойная кислота обладает сильным поглощением при 412 нм и определяется количественно спектрофотометрически.

Модификация остатка Trp

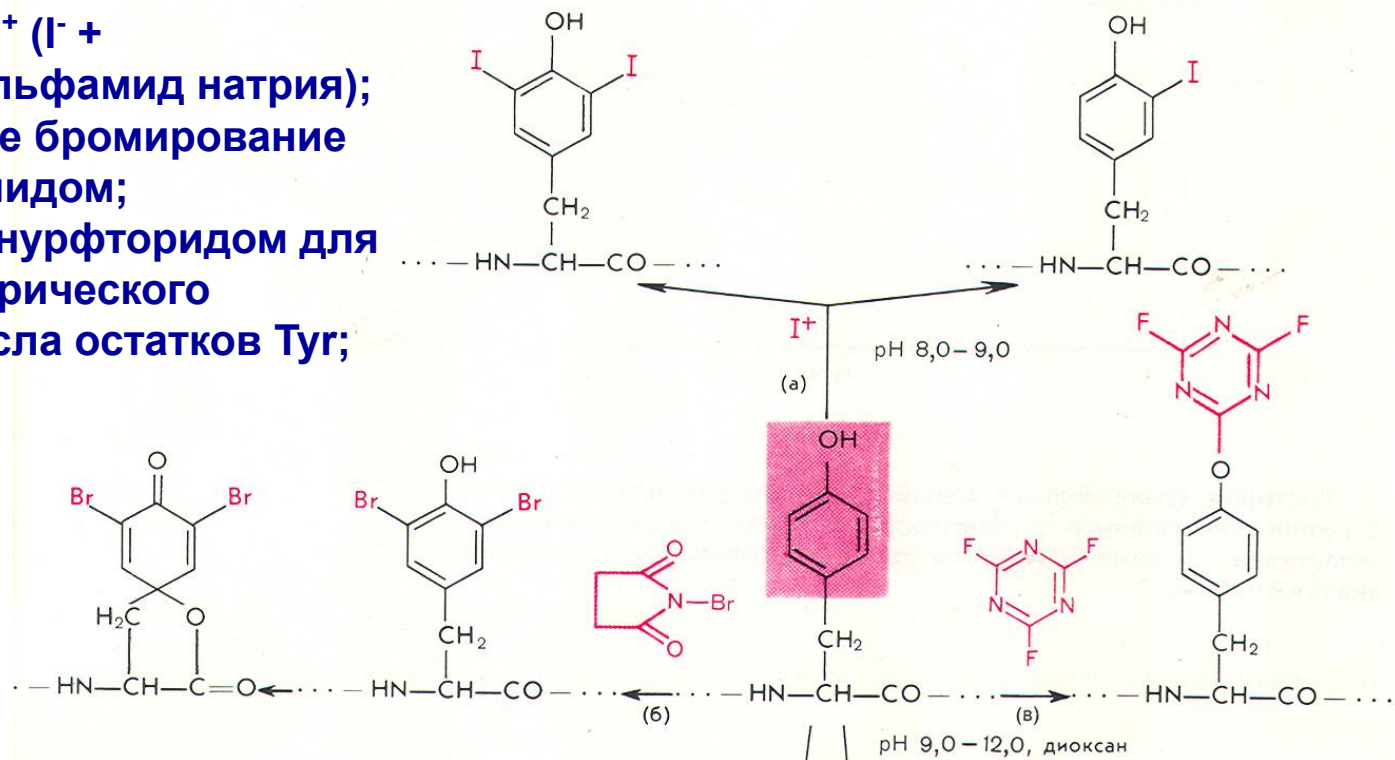
- а) реакция с N-бромсукцинимидом;
- б) алкилирование 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом;
- в) реакция с 2-нитросульфенилдхлоридом;

- г) формилирование безводной муравьиной кислотой, насыщенной HCl;
- д) фотоокисление или озонлиз.

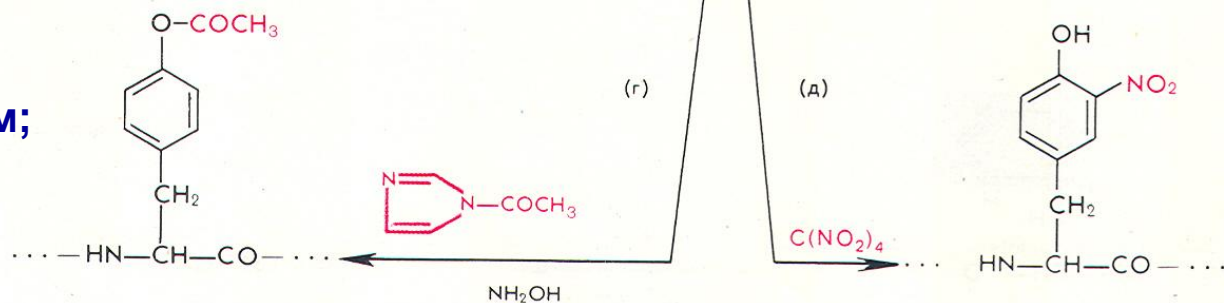


Модификация остатка Tyr

- а) иодирование I^+ ($I^- + N$ -хлортолуолсульфамид натрия);
- б) окислительное бромирование N -бромсукцинимидом;
- в) реакция с цианурфторидом для спектрофотометрического определения числа остатков Tyr;



- г) ацетилирование N -ацетилимидазолом;
- д) нитрование тетранитрометаном.



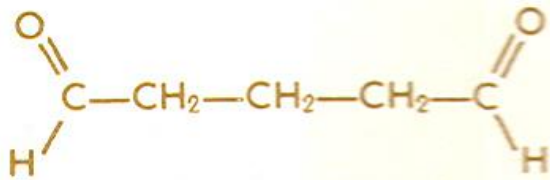
Кросс-сшивающие или бифункциональные реагенты

Кросс-сшивающими или бифункциональными реагентами называются соединения с двумя реакционноспособными группами.

Общая формула этих соединений $X-R-Y$, где X и Y – химически активные группы, а R – так называемая «ножка».

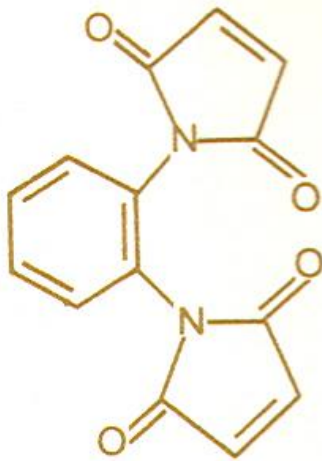
Бифункциональные реагенты используются для ковалентной сшивки пространственно сближенных участков как одной молекулы, так и двух разных белков, функционирующих в едином комплексе.

Специфичные бифункциональные реагенты



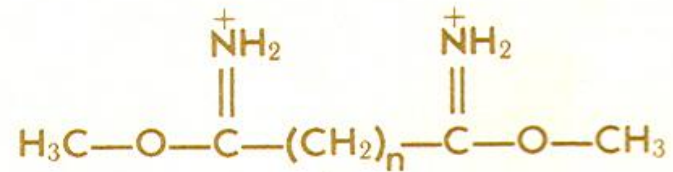
Глутаровый альдегид

Взаимодействуют с аминогруппами
(бис-карбоксиимидаты)



N,N'-(1,2-Фенилен)-
бис-малеимид

Взаимодействует с сульфгидрильными
группами

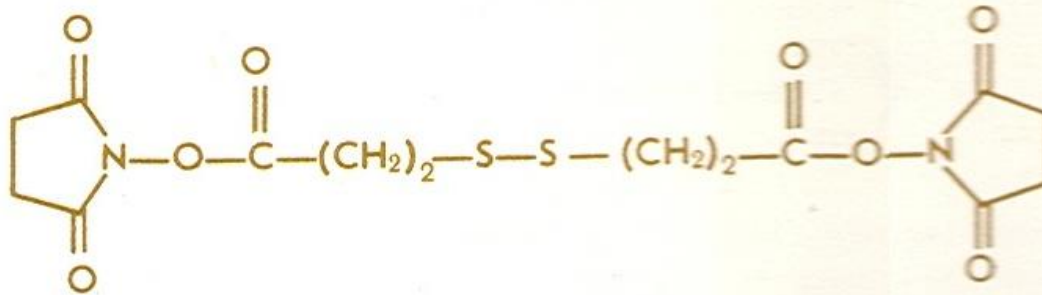


n=1, 2, 3, 4, 5, 6

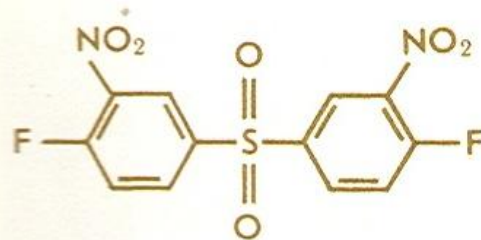
Диимидоэфиры

n=1 длина шивки 5А; n=2 6А; n=3 8А;
n=4 9А; n=5 10А; n=6 11А;

Расщепляемые бифункциональные реагенты



Бис-сукцинимидный эфир 3,3'-дитио - бис (пропионовой кислоты)



p,p'-Дифтор-м,м'-динитродифенилсульфон

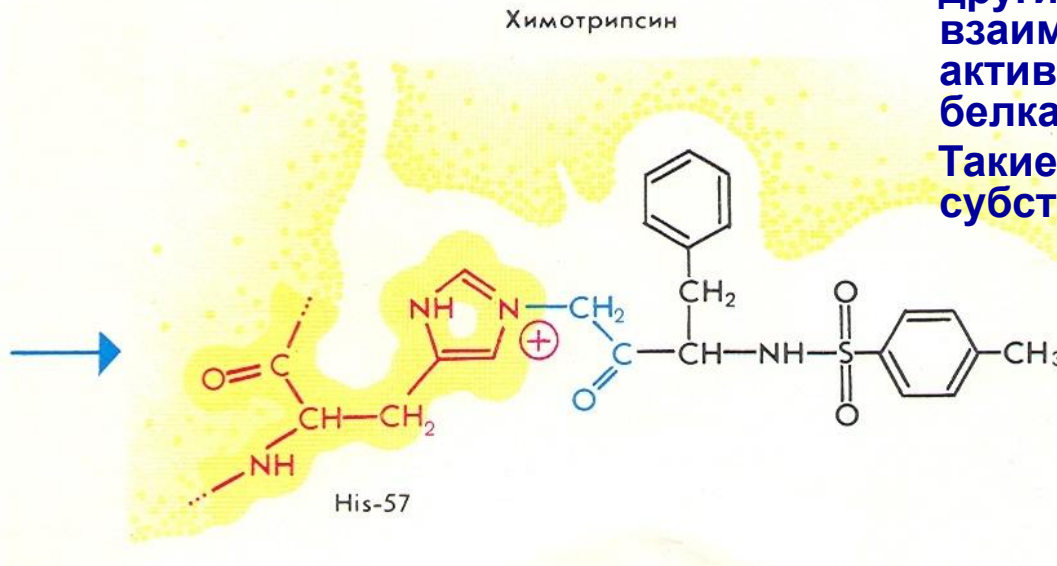
Использование расщепляемых реагентов облегчает процесс идентификации сшиваемых с их помощью участков одного белка или различных белков при исследовании многокомпонентных белковых систем.

Биоспецифическая модификация белков



Реакционноспособные аналоги субстратов или других лигандов могут взаимодействовать с а.о. в активном центре фермента или белка-рецептора.

Такие реагенты называются субстратоподобными.



Фотоаффинная модификация

Частным случаем биоспецифической модификации является фотоаффинная модификация, основанная на использовании производного природного лиганда, содержащего фотоаффинную группировку. При облучении УФ-светом происходит образование свободных радикалов, способных реагировать с различными группировками белка в местах тесных контактов с лигандом. Главное требование к фотоактивируемой группе: она должна быть абсолютно инертна до поглощения фотона.

В качестве предшественников фотоактивируемых соединений используют арилазиды и диазосоединения, генерирующие нитрены и карбены:

