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 и возможности побочных реакций;

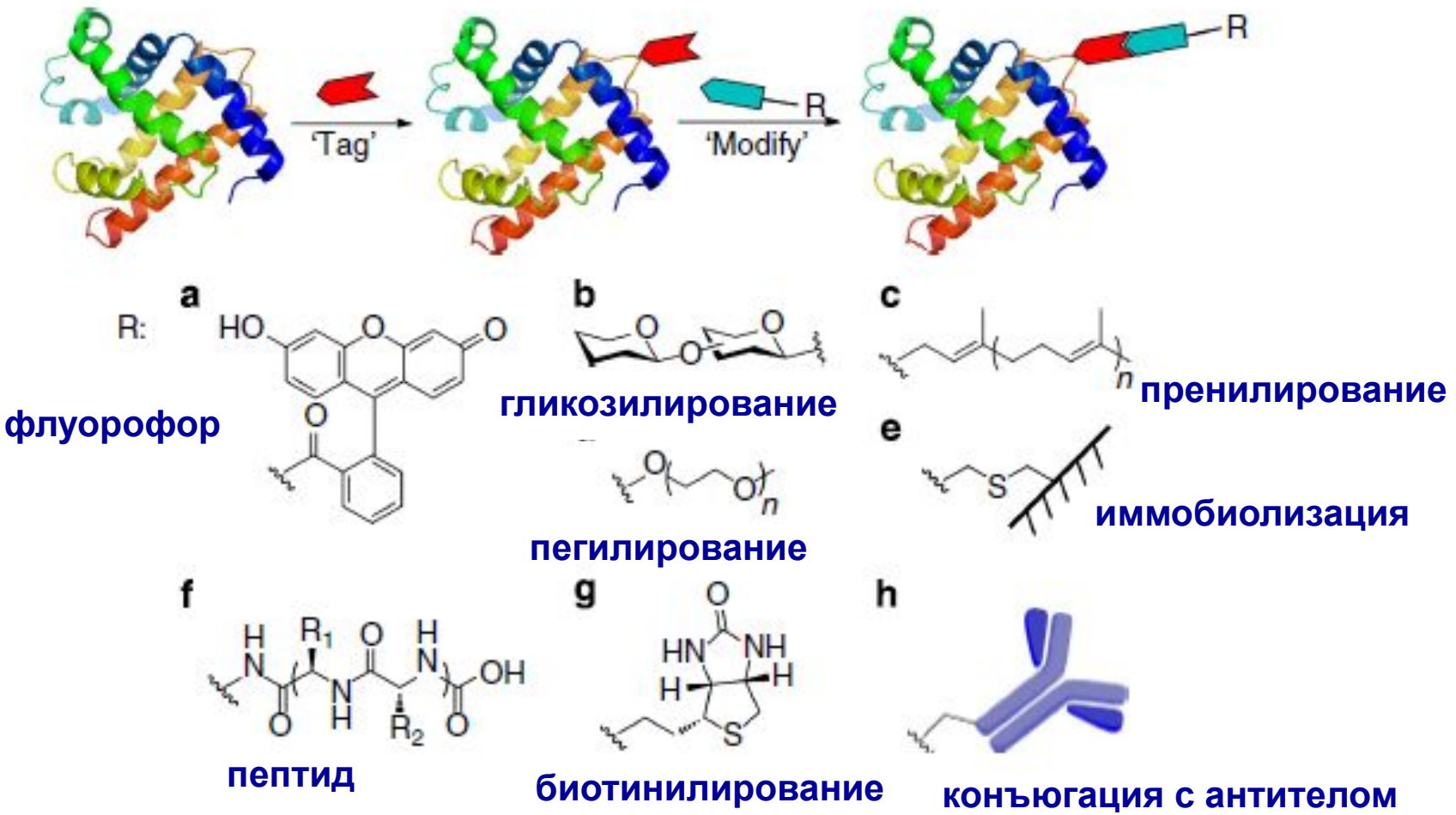
г) химические реакции могут влиять на конформацию молекулы белка;

д) многие функциональные группы в белках контактируют с соседними группировками, образуя своеобразные ансамбли.

Условия среды для химических модификаций природных белков

- < 37^0C
- 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-NH_2 –группа и ε-NH_2-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 (-C_6H_4-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.

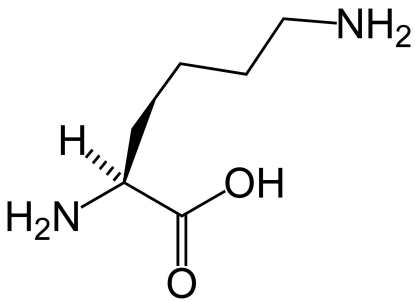
Остатки Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Asn, Gln, Sec, Pyl модификации не подвергаются.

Химическая модификация аминогрупп

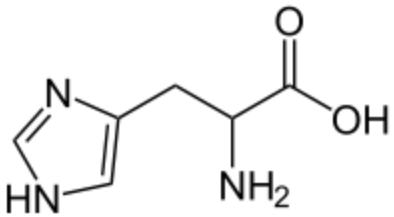
Типы аминогрупп в белках:

1) α-NH_2–группа N-концевого а.о., *pKa* 6,8-7,6;
2) ε-NH_2–группа боковой цепи остатка Lys, *pKa* 9,5-10,5;
3) вторичная аминогруппа имидазольного кольца остатка His, *pKa* 7,2-7,6.

Понижая pH раствора до 7,0 можно избежать модификации ε-NH_2–групп боковой цепи остатка Lys.



Lys



His

Химическая модификация остатков Lys

ε-NH_2–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-NH_2–группы Lys

Ацилирование можно вести с помощью:

1) симметричных ангидридов (уксусного, трифторуксусного, янтарного, малеинового, цитраконового);

2) смешанных ангидридов (карбоксиангидридов);

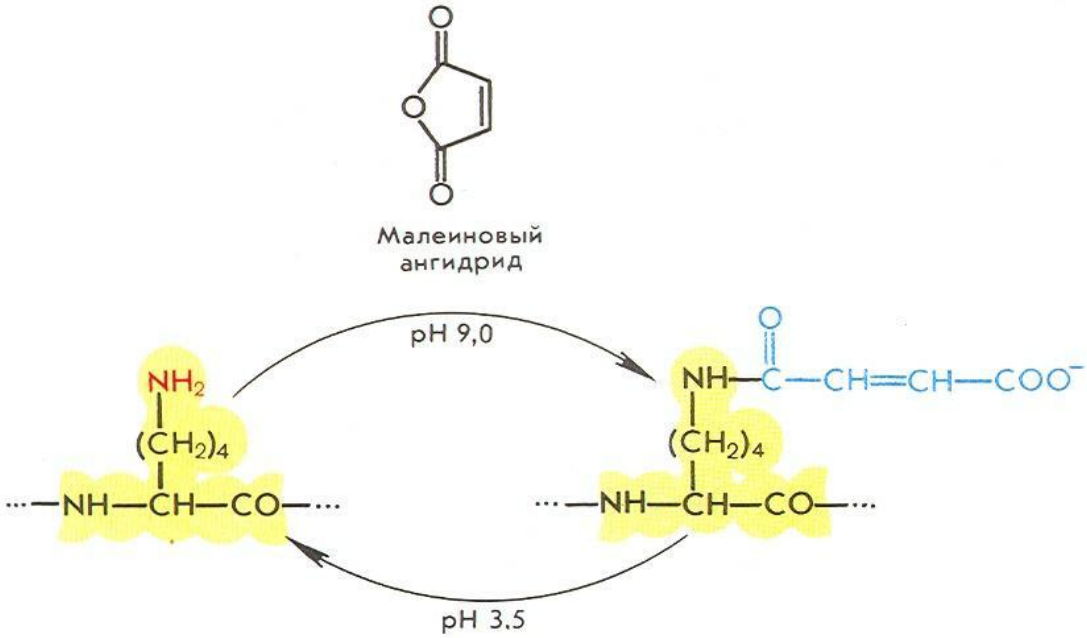
3) активированных сложных эфиров.

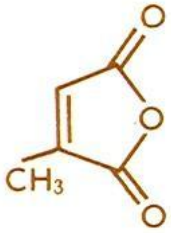
Всегда требуется большой избыток ацилирующего агента, т. к. основной побочной реакцией является его гидролиз.

Скорость гидролиза уменьшается в ряду:

$$R\text{-}COCl > R_1\text{-}CO\text{-}O\text{-}CO\text{-}R_2 > R_1\text{-}CO\text{-}O\text{-}R_2$$

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ Lys
Ацилирование



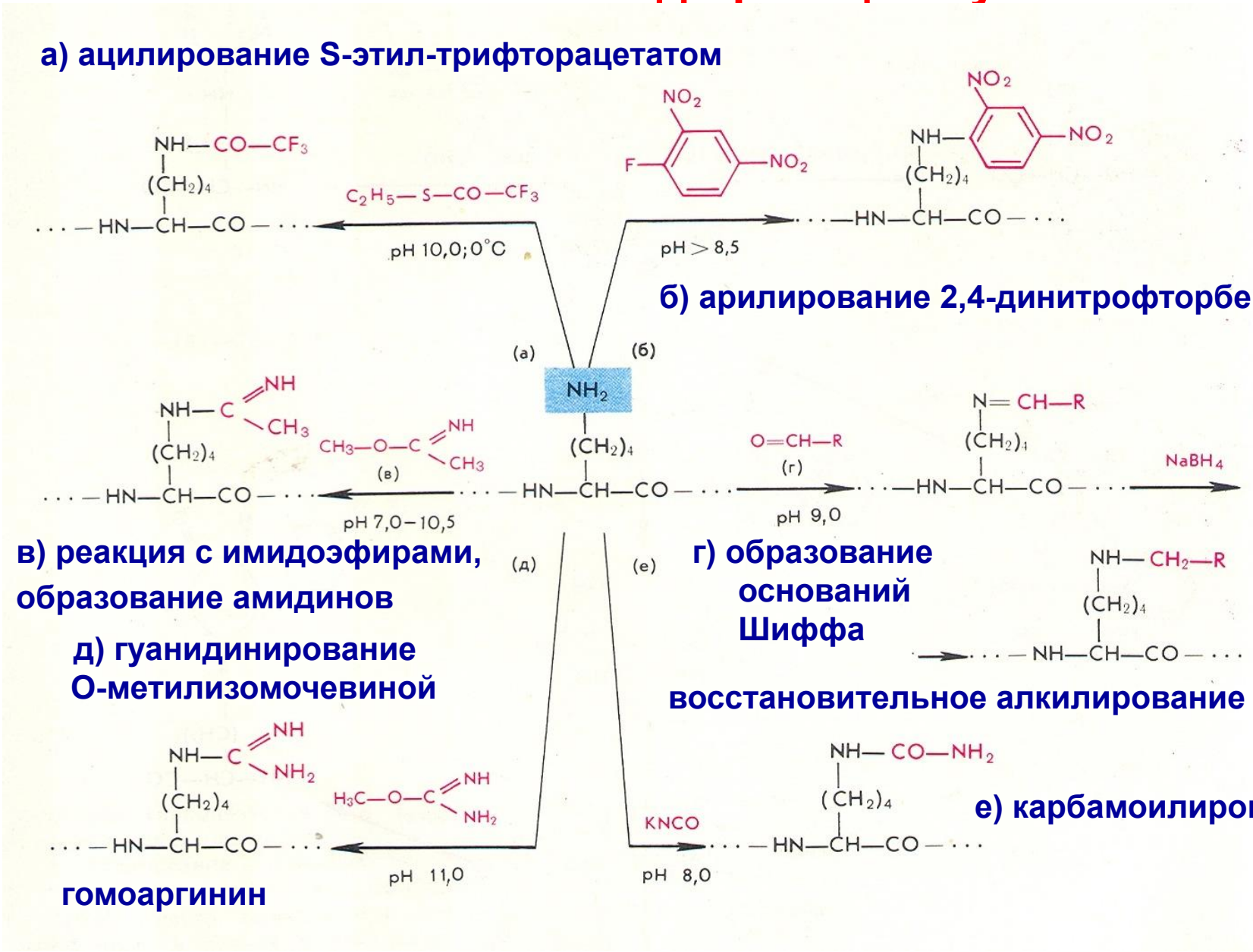


2-Метилмалеиновый (цитраконовый) ангидрид

Янтарный ангидрид

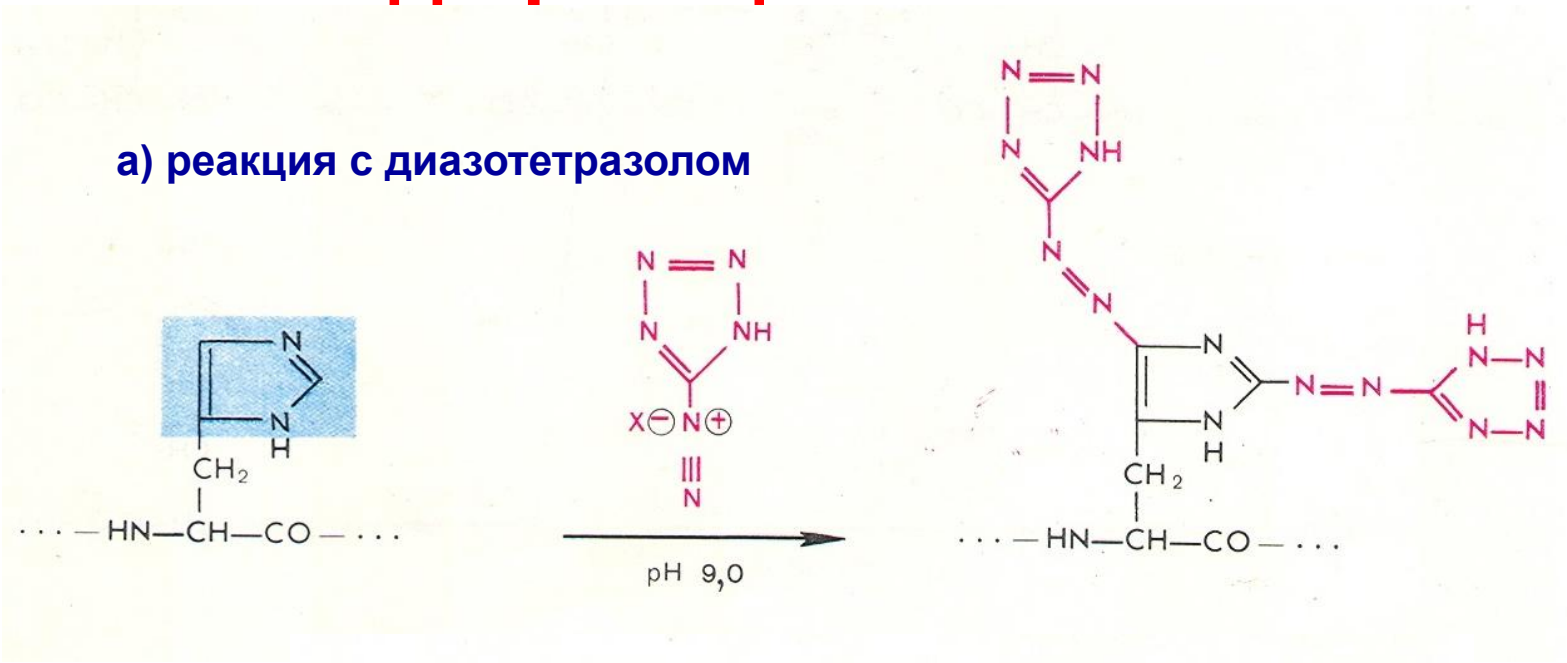
Замена заряда с +1 на -1 вызывает большие конформационные изменения.
Основной побочной реакцией является необратимое алкилирование SH-групп остатков Cys.

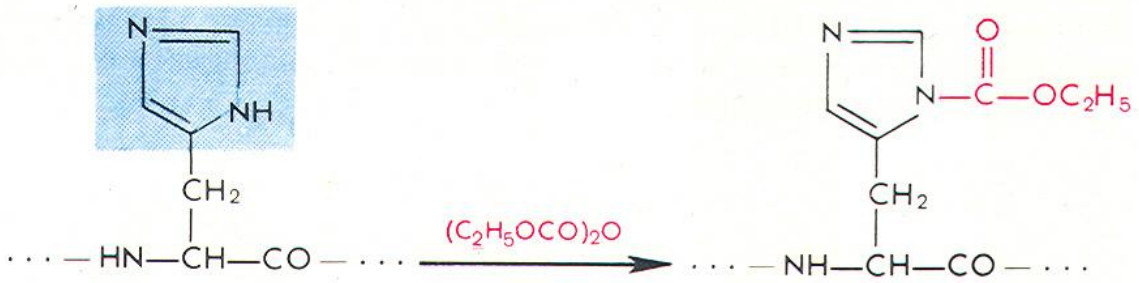
Химическая модификация Lys



Модификация остатка His

а) реакция с диазотетразолом

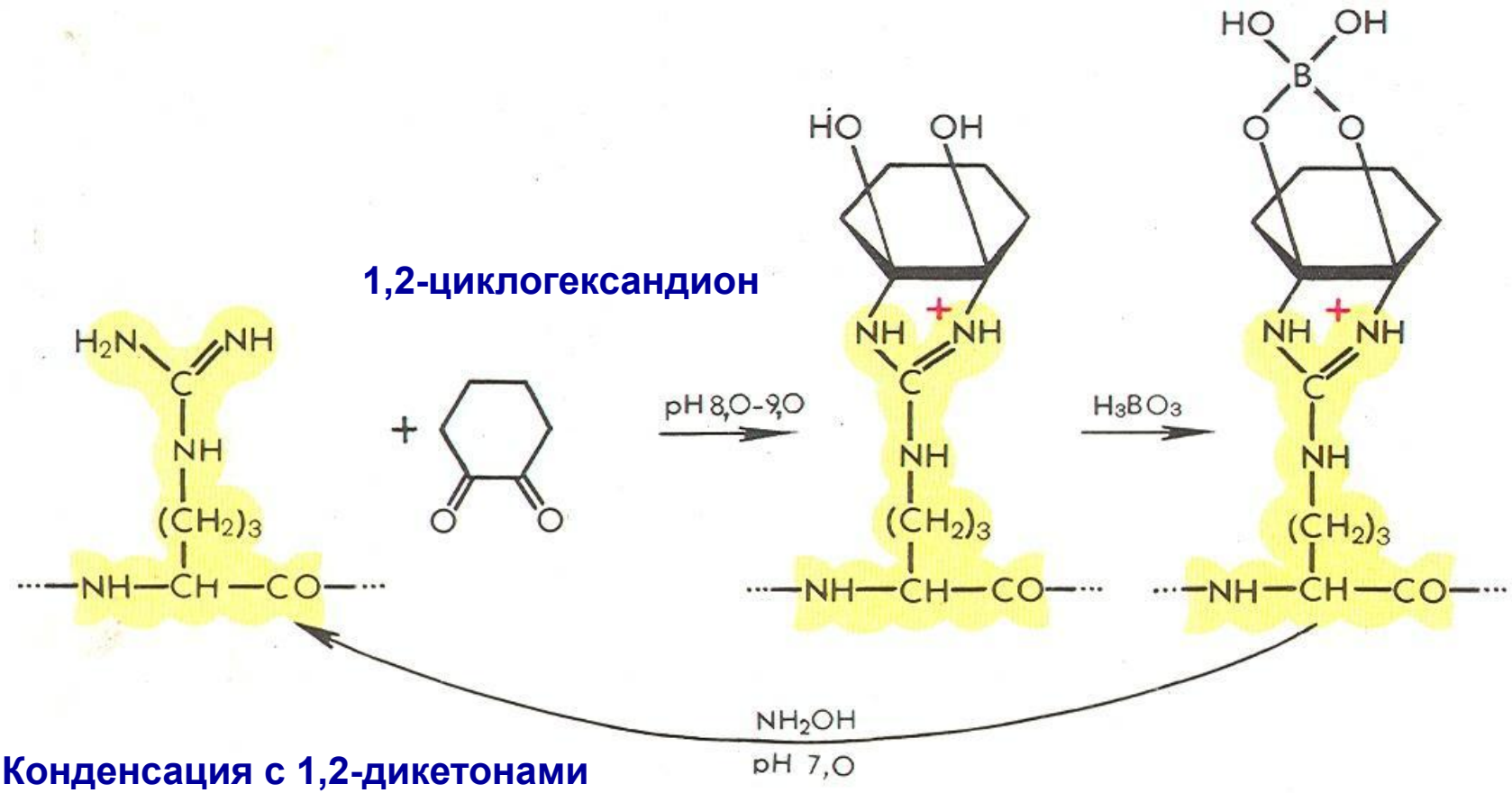




б) реакция с диэтилпирокарбонатом

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^{0}C в течение 7-8 часов

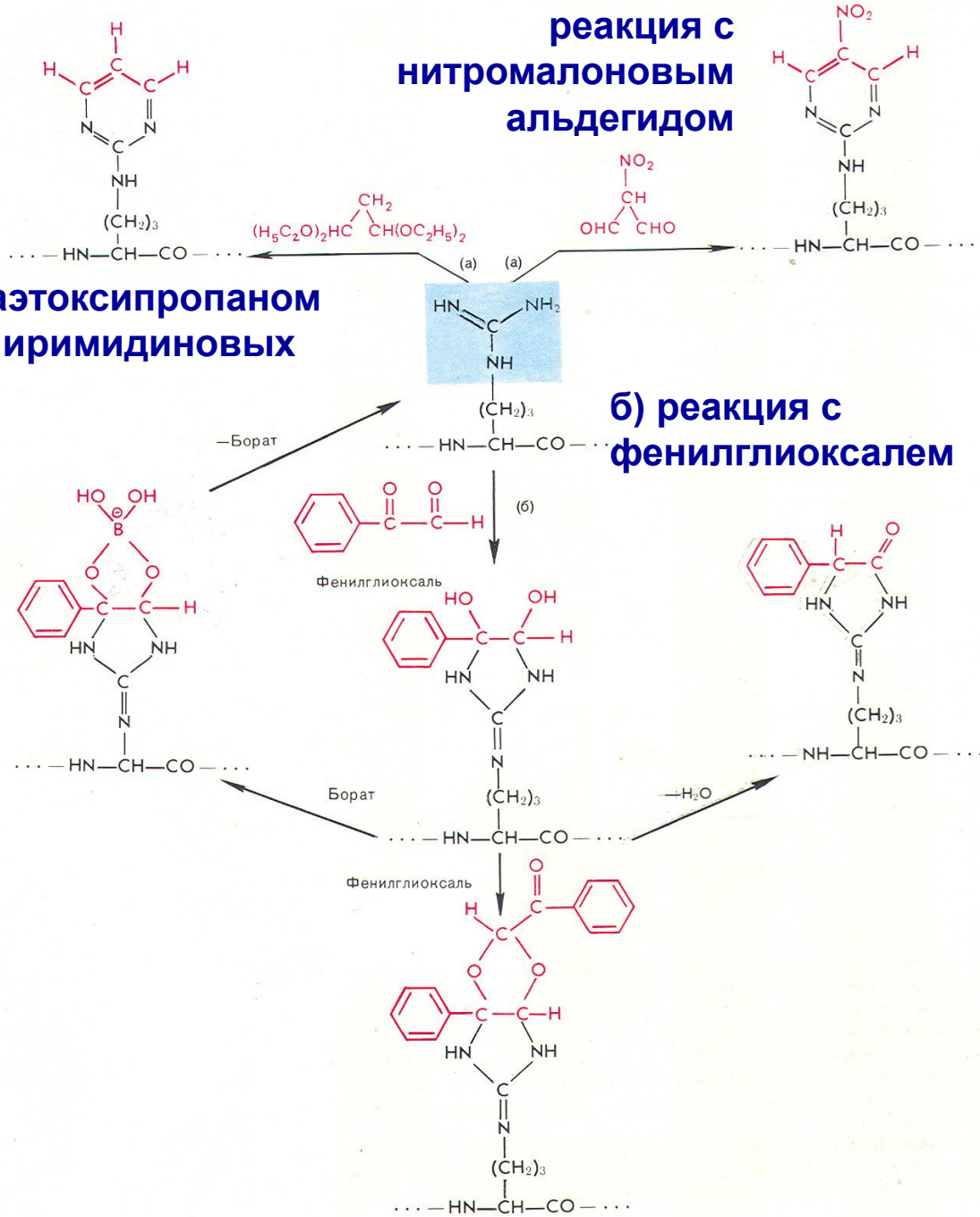
Химическая модификация Arg

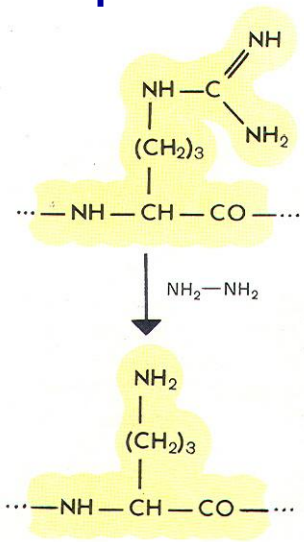
реакция с нитромалоновым альдегидом

а) реакция с тетраэтоксипропаном с образованием пиримидиновых производных

б) реакция с фенилглиоксалем

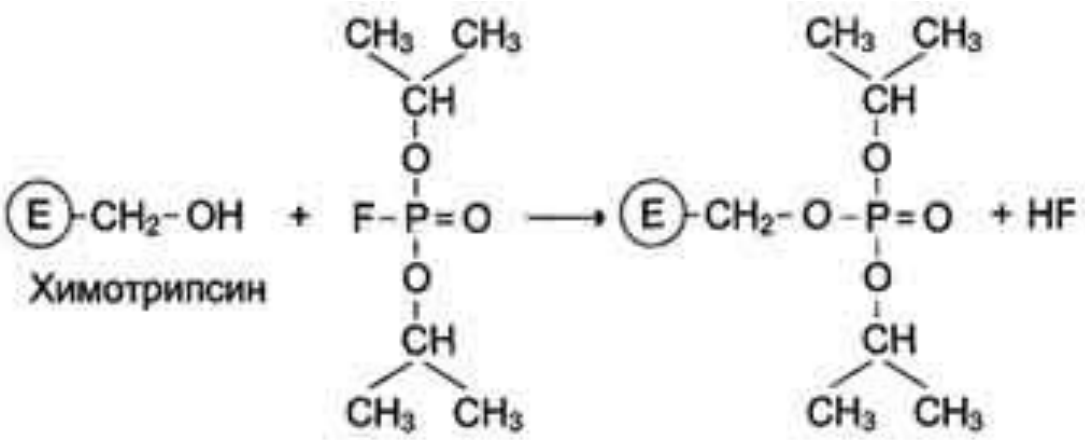
в) гидразинолиз с образованием орнитина





Модификация остатков Ser и Thr

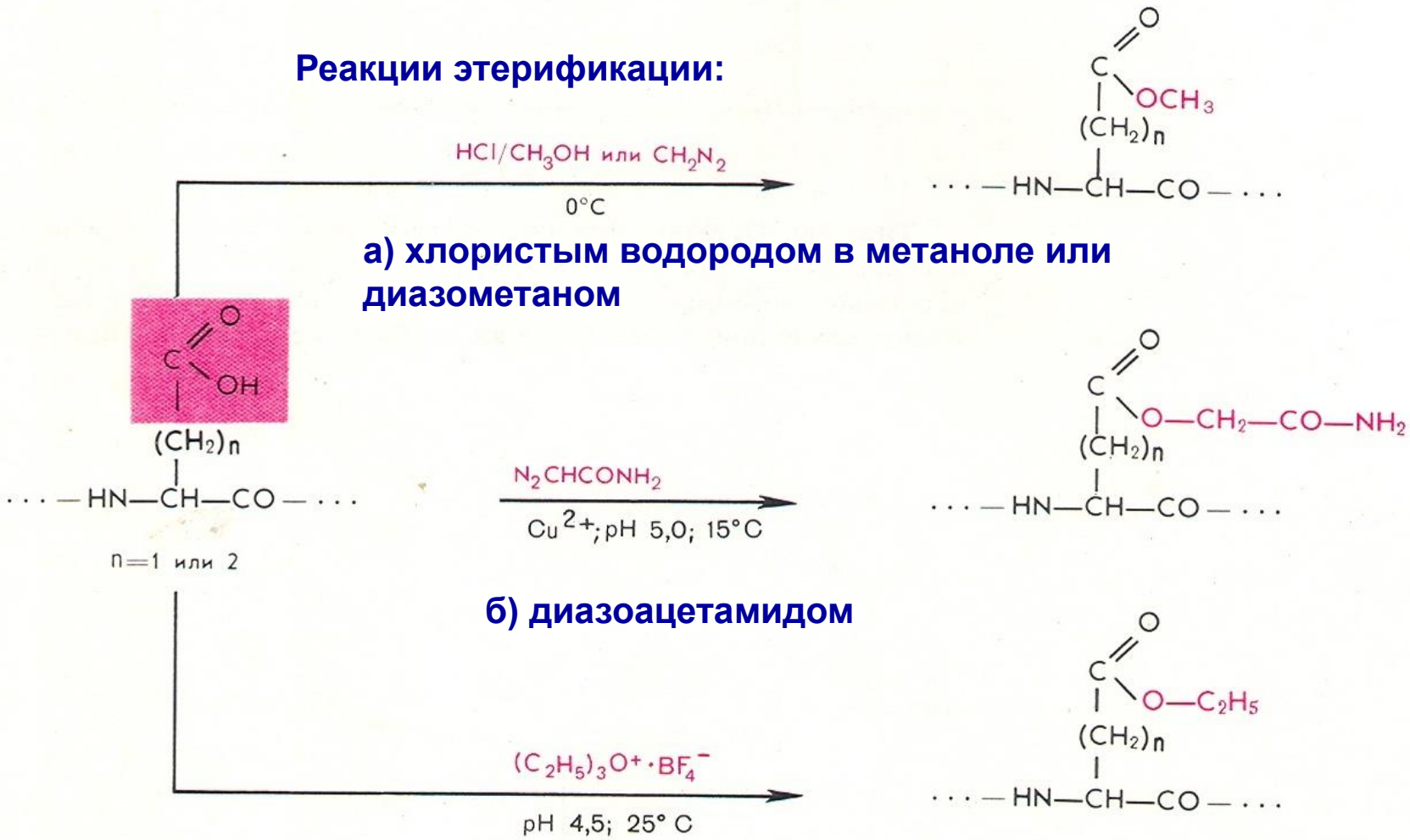
Из-за низкой реакционной способности первичных спиртовых групп Ser и Thr специфическая модификация этих остатков невозможна. Функционально важный остаток Ser в активном центре сериновых протеаз можно специфически промодифицировать диизопропилфторфосфатом:



диизопропилфторфосфат

Модификация остатков Asp и Glu

Реакции этерификации:

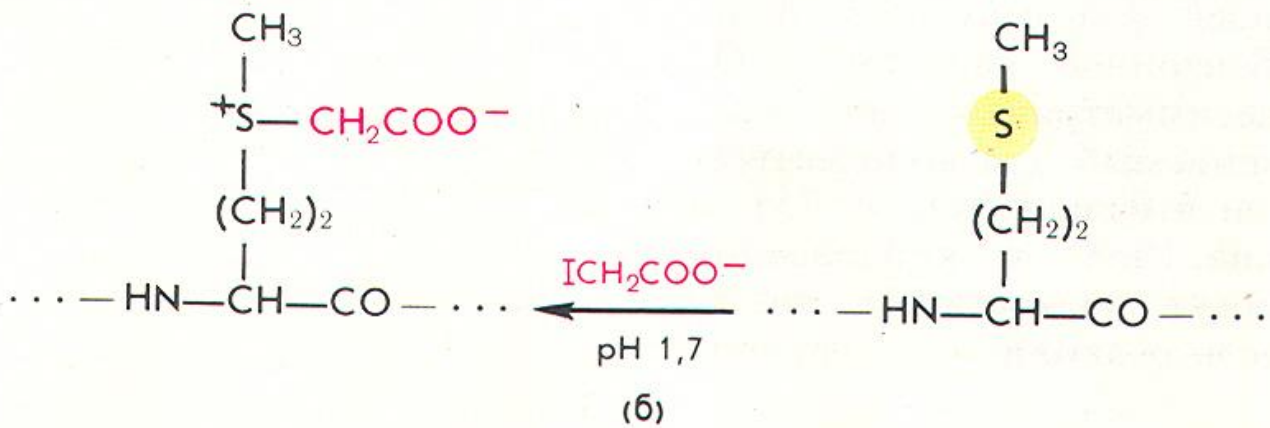


а) хлористым водородом в метаноле или диазометаном

б) диазоацетамидом

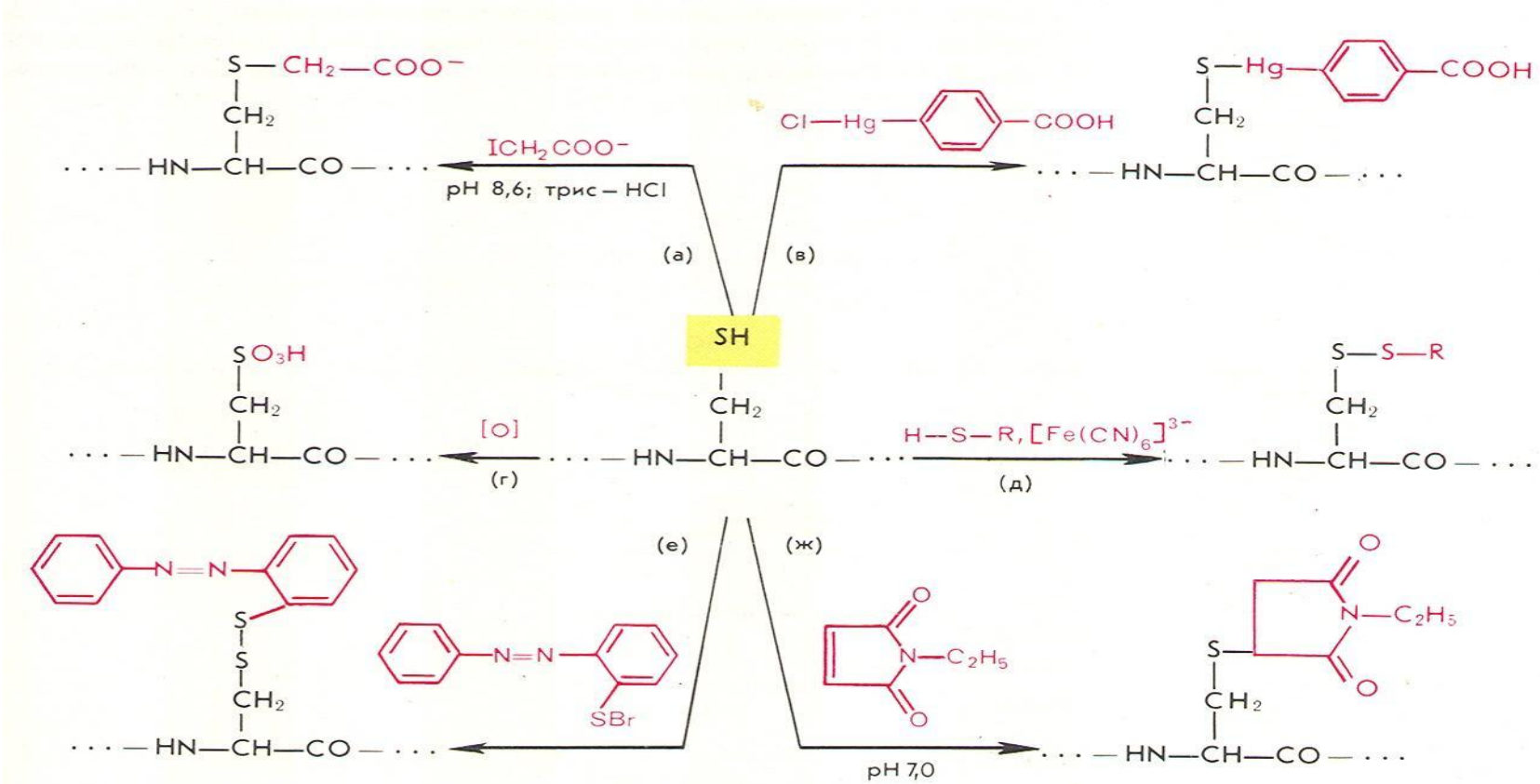
в) борфторидом этилоксония

Модификация остатка Met



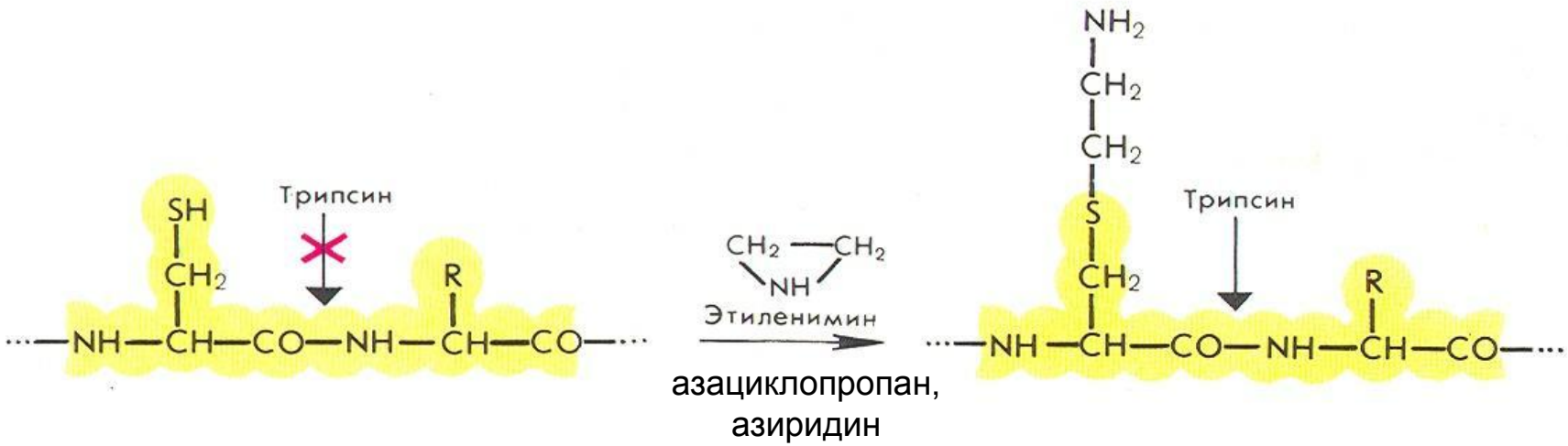
Алкилирование иодацетамидом с образованием карбоксиметилсульфониевой соли

Модификация сульфгидрильных групп цистеина

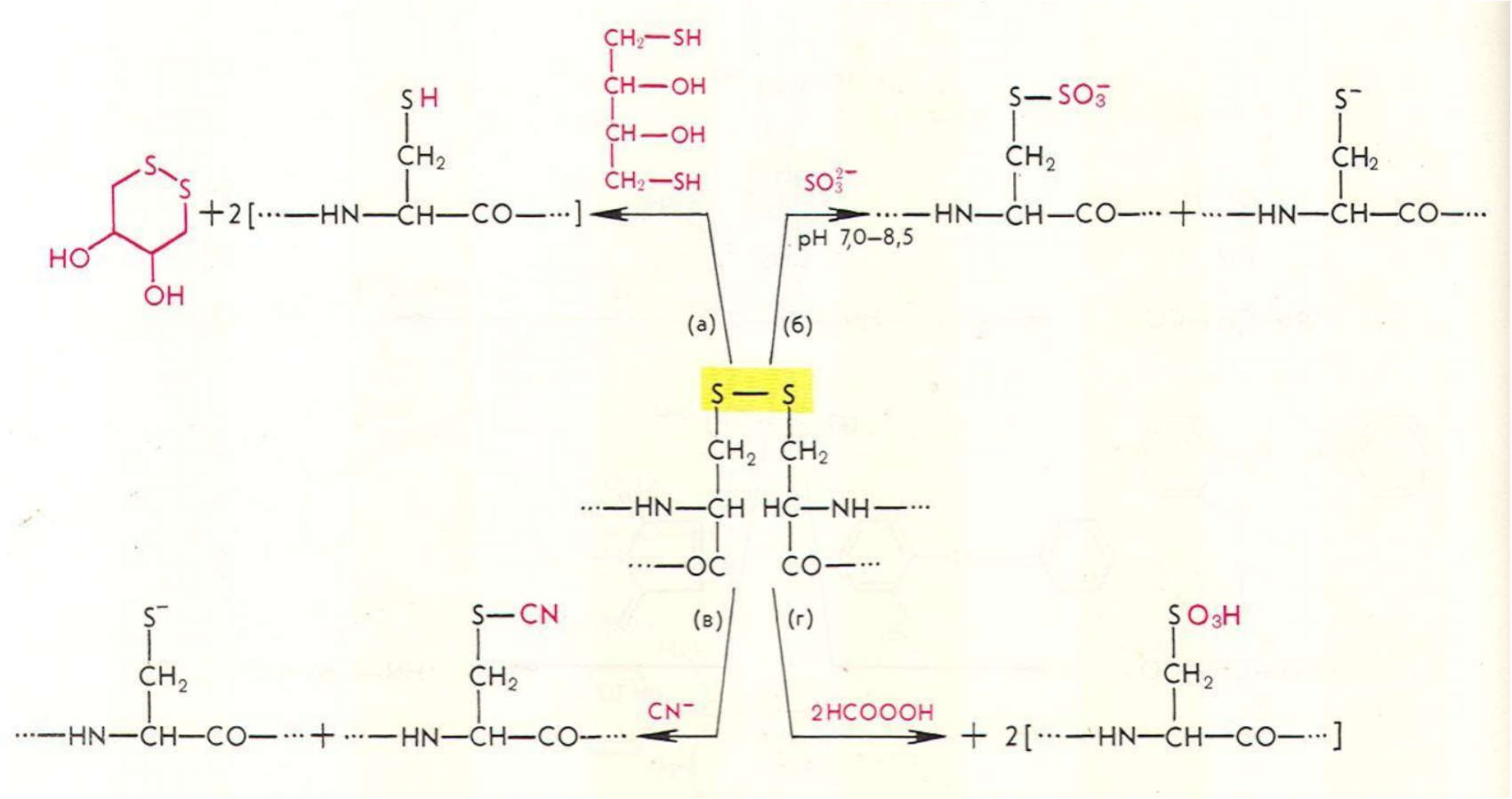


а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацетамидом;
б) аминоэтилирование этиленимином (не показана);
в) реакция с п-хлормеркуриобензойной кислотой;
г) окисление с помощью O_2 до цистеиновой кислоты;
д) окисление с образованием дисульфидных связей в присутствии феррицианида;
е) реакция с азобензол-2-сульфенилбромидом;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

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ Cys



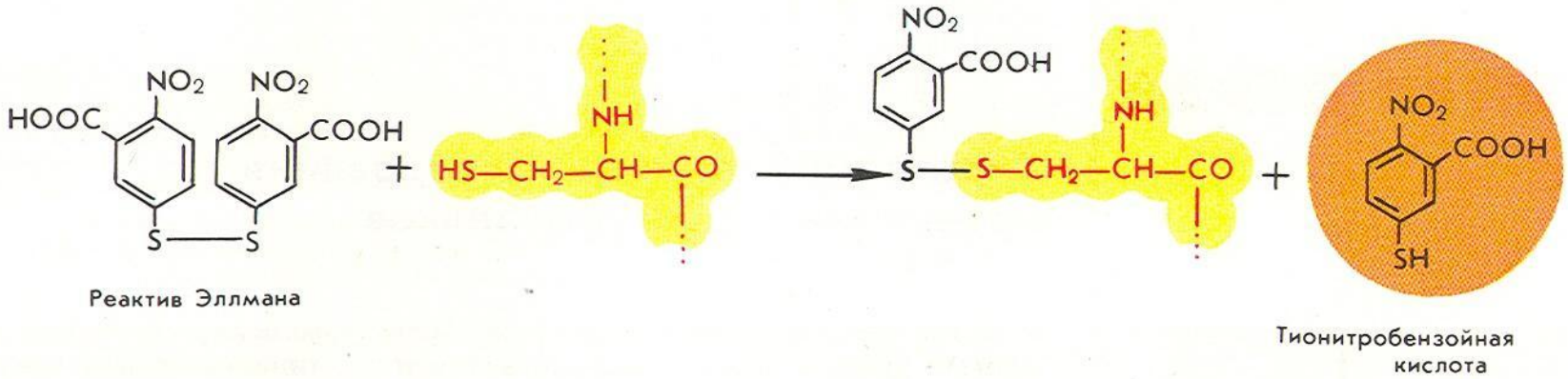
Модификация дисульфидных групп цистина



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

Дисульфидный обмен при pH>7,0

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

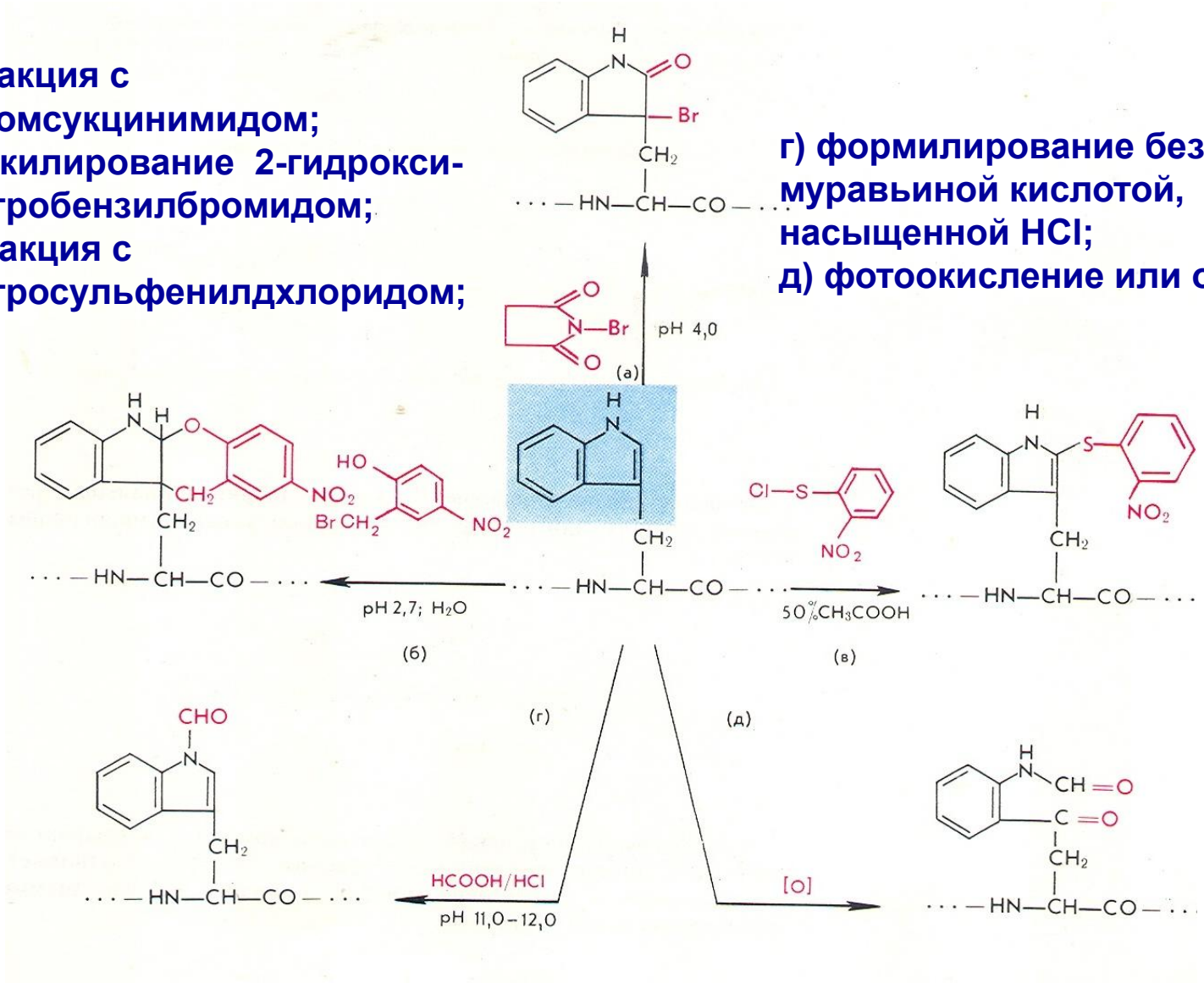


Тионитробензойная кислота обладает сильным поглощением при 412 нм и определяется количественно спектрофотометрически.

Модификация остатка Trp

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

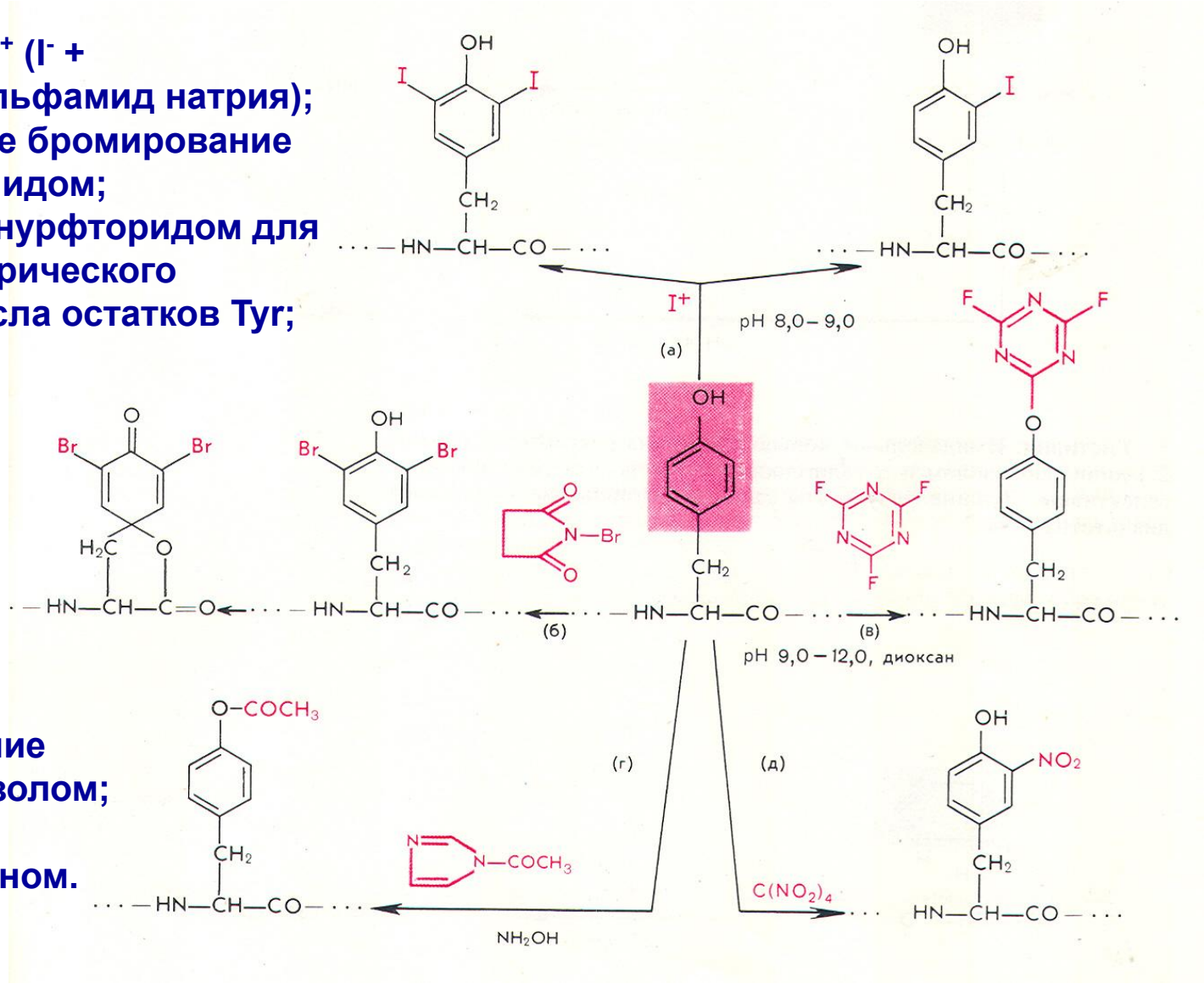
г) формилирование безводной муравьиной кислотой, насыщенной HCl;
д) фотоокисление или озонолиз.



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.



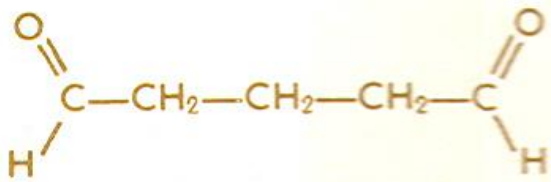
Кросс-сшивающие или бифункциональные реагенты

Кросс-сшивающими или бифункциональынми 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».

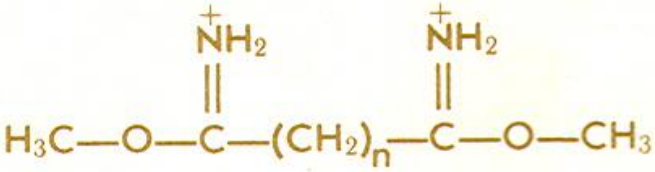
Бифункциональные реагенты используются для ковалентной сшивки пространственно сближенных участков как одной молекулы, так и двух разных белков, функционирующих в едином комплексе.

Специфичные бифункциональные реагенты



Глутаровый альдегид

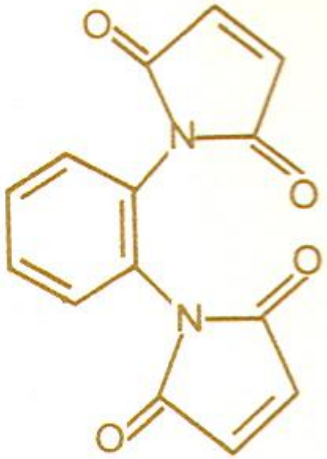
Взаимодействуют с аминогруппами



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

Диимидоэфиры (бис-карбоксиимидаты)

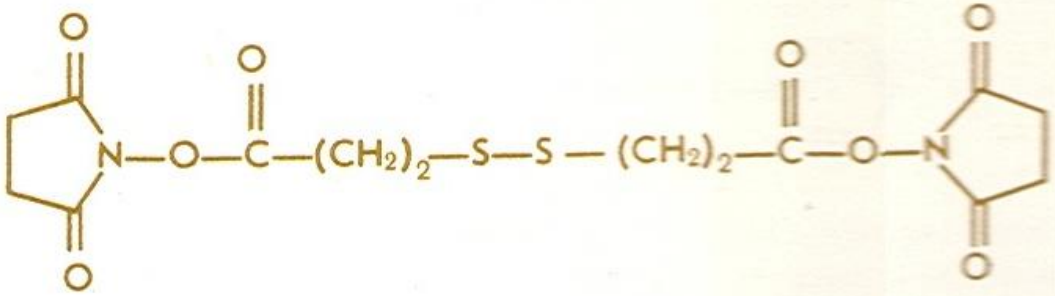
n=1 длина сшивки 5А; n=2 6А; n=3 8А; n=4 9А; n=5 10А; n=6 11А;



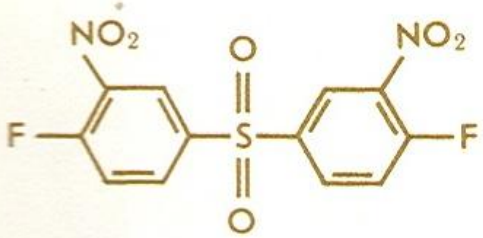
N,N′-(1,2-фенилен)-бис-малеимид

Взаимодействует с сульфгидрильными группами

Расщепляемые бифункциональные реагенты



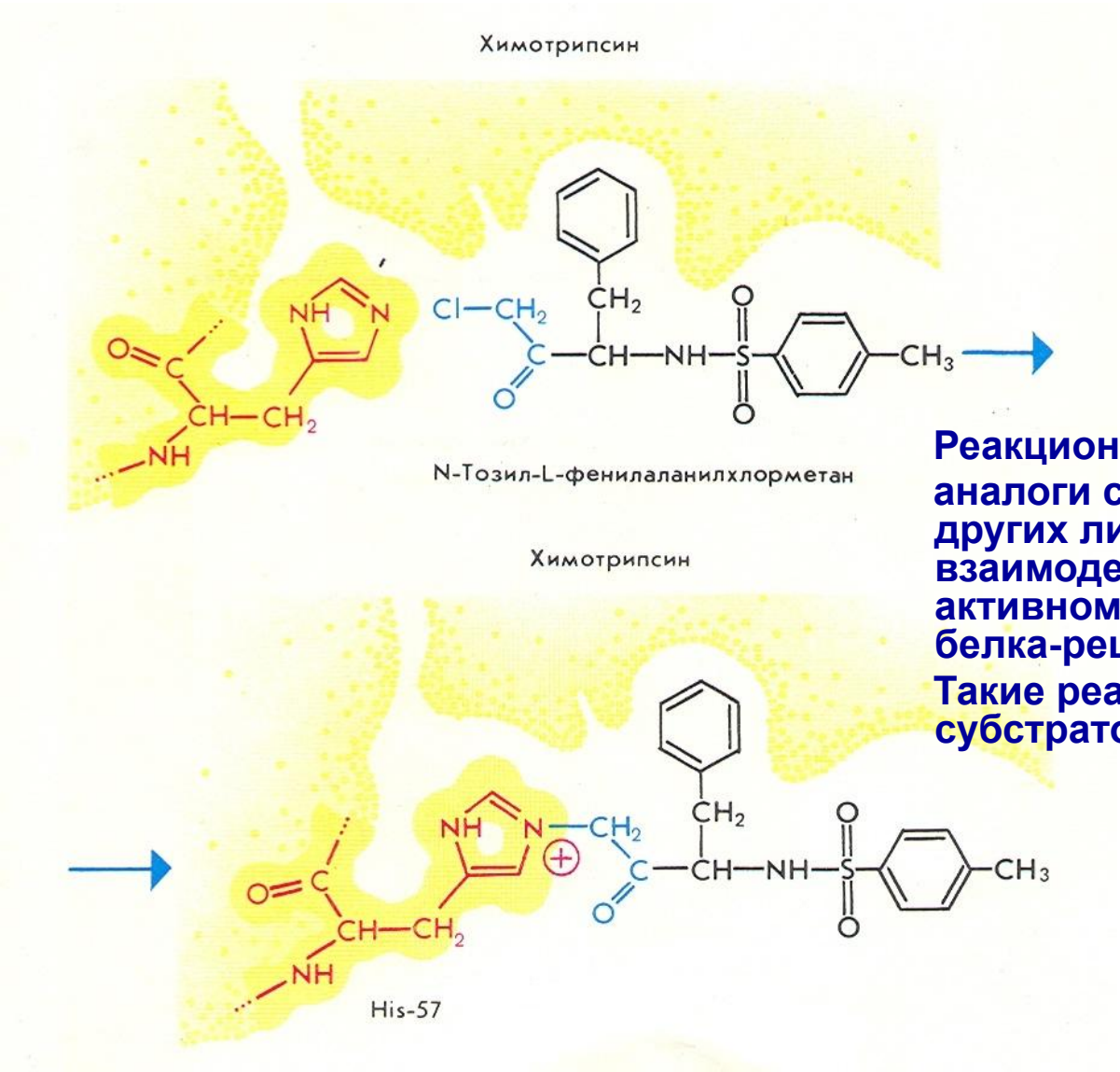
Бис–сукцинимидный эфир 3,3′–дитио –бис (пропионовой кислоты



п,п′–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



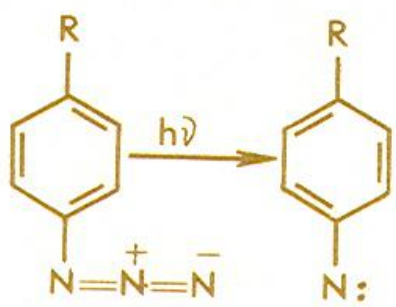
Реакционноспособные аналоги субстратов или других лигандов могут взаимодействовать с а.о. в активном центре фермента или белка-рецептора.

Такие реагенты называются субстратоподобными.

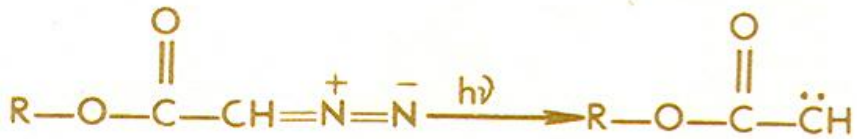
Фотоаффинная модификация

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:



Арилазиды **Нитрены**



Диазосоединения **Карбены**