

FOTOAFINITNÍ ZNAČENÍ – METODA STUDIA PROTEINŮ

BOŽENA KUBÍČKOVÁ a PETR HODEK

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: kubickov@natur.cuni.cz, hodek@natur.cuni.cz

Došlo dne 31.VIII.2000

Klíčová slova: fotoafinitní značení, fotolýza, fotolabilní sondy, karben, nitren, radikál, kovalentní modifikace, cytochrom P450

Obsah

1. Úvod
2. Princip fotoafinitního značení a kritéria pro výběr fotoafinitní sondy
3. Fotolyticky vzniklé intermediáty a jejich prekursory
 - 3.1. Nitreny a jejich prekursory
 - 3.2. Karbeny a jejich prekursory
 - 3.3. Další prekursory aktivních intermediátů
4. Použití fotoafinitních sond
5. Závěr

1. Úvod

Naše poznání v oblasti biologických procesů, které probíhají v organismech, je do značné míry vázáno na odhalení struktury biomakromolekul a podstaty interakcí jednotlivých komponent biologických systémů – makromolekul s nízkomolekulárními sloučeninami a makromolekul vzájemně. Vedle celé škály spektroskopických metod, které reprezentují přístupy využívající interakci hmoty a záření, byly pro studium biologických makromolekul navrženy i metody založené na podstatně odlišných, často speciálních principech. Významné místo mezi těmito metodami zauímají chemické modifikační metody, které využívají vzniku kovalentní vazby mezi zkoumanou biomakromolekulou a chemicky reaktivním činidlem. Nejčastěji jsou do této skupiny řazeny klasické modifikační postupy (využívající reaktivních nízkomolekulárních sloučenin), afinitní značení (viz dále) a použití tzv. sebevražedných substrátů (u nichž je chemicky reaktivní forma substrátu tvořena během enzymové reakce). Před necelými čtyřiceti lety přibyla velmi slibná metoda fotoafinitního značení^{1–6}.

Vzhledem k tomu, že se metoda fotoafinitního značení vyvinula jako reakce na nedostatky metody afinitního značení, bude nejprve pojednáno o základních principech afinitního značení. Tato metoda vychází z přirozené afinity mezi ligandem (např. hormonem, protilátkou, substrátem, inhibitorem) a receptorem (např. enzymem, transportním proteinem). Molekula jednoho z těchto vazebných partnerů (nejčastěji ligan-

du) je substituována chemicky reaktivní skupinou – vzniká tak afinitní sonda (značka), která by měla po přidání do reakční směsi vytvořit kovalentní vazbu s druhým vazebným partnerem; v ideálním případě tímto způsobem vzniká kovalentní komplex ligand–receptor. Aplikací této metody lze např. nalézt receptor ve složité směsi proteinů, nebo identifikovat vazebné místo popř. aktivní centrum na molekule receptoru^{7,8}.

Metoda afinitního značení má však nejméně dva podstatné nedostatky: prvním je poměrně nízká chemická reaktivita afinitní sondy, která je vynucena tím, že téměř všechny experimenty jsou prováděny ve vodném prostředí, což by v případě sondy s příliš reaktivní skupinou vedlo k vysokému stupni hydrolytické deaktivace ještě dříve, než dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi sondou a receptorem.

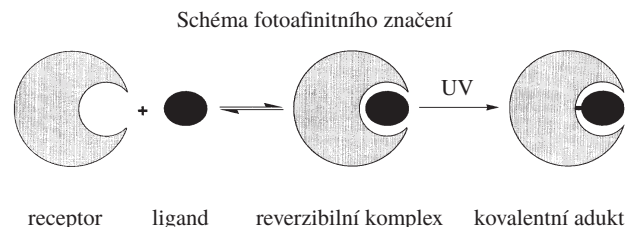
Druhá nevýhoda spočívá v tom, že téměř nelze zamaskovat reaktivní skupiny afinitních sond tak, aby bylo možno za požadovaných podmínek sondu reaktivovat. S tím souvisí i možnost tzv. nespecifického značení, tedy interakce sondy v místech jiných, než je specifické vazebné místo pro přirozený ligand (popř. receptor).

2. Princip fotoafinitního značení a kritéria pro výběr fotoafinitní sondy

Oba zmíněné nedostatky afinitního značení překonává metoda fotoafinitního značení tím, že je chemicky reaktivní skupina sondy fotolyticky generována v požadovaném čase z původně chemicky inertní skupiny. Tento experimentální přístup vychází z principů afinitního značení s využitím fotolabilního derivátu sondy. Podstatnou výhodou fotolyticky generovaných intermediátů je jednak extrémně krátký poločas života, jednak značná reaktivita s poměrně nízkou selektivitou aktivované sondy, která umožňuje kovalentně modifikovat všechny aminokyselinové zbytky v těsné blízkosti příslušného reaktivního intermediátu. Tím je podstatně snížena úroveň nespecifického značení a umožněno široké použití této sondy. Schéma prezentující princip metody fotoafinitního značení je znázorněno na obrázku 1.

Analoga ligandu (popř. receptoru) používaná při fotoafinitním značení by měla splňovat co možná nejvíce kritérií definovaných pro ideální fotoafinitní sondu:

- 1) Fotolabilní skupina sondy by měla vykazovat vhodné fotochemické vlastnosti, tj. měla by být aktivovatelná svět-



Obr. 1. Schéma fotoafinitního značení receptorové molekuly (proteinu) fotolabilním ligandem

lem vlnové délky, které závažně nepoškozuje biomakromolekuly. Celkem bezpečné je světlo vlnových délek vyšších než 300 nm. Fotolabilní skupiny by v této oblasti měly mít výrazná absorpční maxima garantující dostatečnou účinnost fotolýzy při relativně nízkých výkonech světelných zdrojů. Dále by fotolýza neměla vést k poškození biologického systému fotooxidací nebo jiným způsobem, než je kovalentní modifikace sondou.

- 2) Sonda by se měla co možná nejvíce podobat původní sloučenině (např. ligandu). Zavedení fotolabilní skupiny do skeletu ligandu by tedy nemělo podstatně ovlivnit strukturální a funkční charakteristiky nezbytné pro zachování afinity pro daný receptor, což má klíčový význam pro specifické interakce v biologických systémech. Disociační konstanta charakterizující míru afinity ligandu pro receptor by neměla být vyšší než je 10^{-5} mol.dm⁻³.
- 3) Intermediáty vznikající fotolýzou sondy by měly být vysoce reaktivní (tedy s krátkou dobou života) s minimální selektivitou, tj. reaktivitou vůči různým funkčním skupinám. Důležitým požadavkem je i to, aby tyto intermediáty nepodléhaly přesmykům na méně reaktivní deriváty, které by mohly snižovat výtěžek, popř. vést k reakcím mimo vazebné centrum.
- 4) Důležitou vlastností sondy je i její stabilita a chemická inertnost za experimentálních podmínek a při skladování. Zvláště důležitá je stabilita za různých pH (okolo fyziologických hodnot), teplot a v redukčním či oxidačním prostředí.
- 5) Sonda by měla být jednoduše synteticky dostupná spolu s možností přípravy radioaktivně značeného derivátu vysoké specifické radioaktivity.
- 6) Kovalentní vazby komplexů ligand–receptor vznikající po fotolyticky aktivované inkorporaci by měly být stabilní vůči běžným separačním a charakterizačním metodám včetně např. štěpení proteinů chemickými činidly.

Téměř žádná z používaných fotoafinitních sond tato přísná kritéria nesplňuje zcela. Vždy se jedná o určité kompromisní řešení, které v dostatečné míře vyhovuje zamýšlenému použití.

3. Fotolyticky vzniklé intermediáty a jejich prekursory

Fotolabilní sloučeniny (skupiny) lze v zásadě rozdělit podle způsobu vzniku reaktivních intermediátů do dvou skupin^{2,3}: A) Homolytickým štěpením dvojných vazeb nebo dvou sousedních vazeb jednoduchých vznikají nitreny a karbeny. B) Homolytickým rozštěpením jednoduchých vazeb vznikají volné radikály (příkladem takového prekursoru jsou α , β -nenasycené ketony).

3.1. Nitreny a jejich prekursory

První použití je spojeno s rokem 1969, kdy Fleet a spol.⁹ připravil sondu s azido-skupinou pro studium protilátek. V následujících letech byla připravena celá řada azidoderivátů, které po fotolytickém odštěpení molekuly dusíku poskytují nitreny. Nejběžnějšími prekursory nitrenů jsou acylazidy, alkylazidy, arylazidy. Ovšem použití acylazidů a alkylazidů je podstatně omezeno jejich nestabilitou a náchylností nitrenů

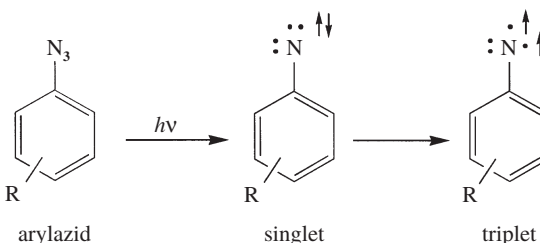
k přesmykům za tvorby isokyanátů, jak je tomu v případě acylnitrenů (Curtiusův nebo Schmidtův přesmyk), a iminů z alkylnitrenů (vznikajících interakcí nitrenu s atomem vodíku sousedního uhlíku)⁶. Nevýhodou je také poloha absorpčních maxim azido-skupiny těchto sloučenin, díky níž je nutno fotoaktivaci provádět světlem vlnových délek podstatně nižších než je 300 nm. Takové ozařování působí silně destruktivně na biologický materiál^{3,8}. Nevýhodnou vlastností azidů je také jejich nestabilita v redukujícím prostředí. Dithioly okamžitě redukují azidy na odpovídající aminy. Pokud jsou v reakční směsi přítomny monothioly, např. 2-merkaptioethanol nebo glutathion, je reakce pomalejší, ale přesto je třeba brát v úvahu tento proces, který snižuje obsah fotoaktivovatelné sondy².

Z praktického hlediska jsou použitelné pouze arylazidy, které jsou méně náchylné k přesmykům. Jejich poločas života, jehož hodnota závisí na způsobu substituce aromatického jádra, je přibližně o řád vyšší než u karbenů. Po derivatizaci arylazidu vhodným substituentem (např. $-\text{NO}_2$) vykazuje vzniklý arylazid posun absorpčního maxima k vlnovým délkám vyšším než 300 nm.

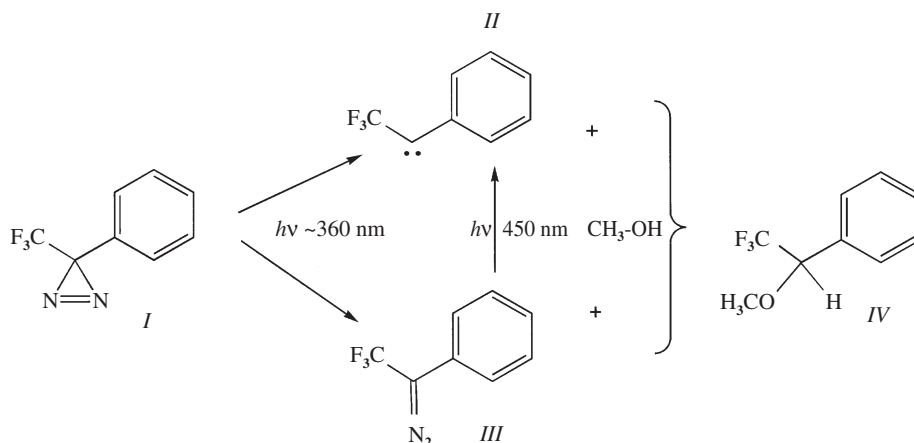
Fotochemie arylazidů zahrnuje dvě hlavní formy reaktivního intermediátu. Fotolýzou arylazidu většinou prvotně vzniká nitren v singletovém stavu, který se konverzí mění na tripletový nitren (viz obr. 2). Nitreny v singletovém stavu mají dusíkový atom obklopen sextetem elektronů, přičemž nepárové elektrony mají antiparalelní spin. Typickou reakcí pro singletové nitreny je elektrofilní atak elektronového páru.

Naproti tomu arylnitreny v tripletovém stavu se chovají jako biradikál (jejich nepárové elektrony mají paralelní spin). Tripletový stav je méně náchylný k přesmykům a vykazuje nižší selektivitu při výběru místa ataku, což je vhodné v případě, kdy ve vazném místě receptoru převažují skupiny s C–H vazbami. Charakteristickou reakcí této formy nitrenů je vytržení atomu H z atakované sloučeniny. Tripletový stav nitrenu je však méně reaktivní než singletový stav. Tomu odpovídá i poločas života tripletového stavu (okolo 100 ns), který je přibližně o řád vyšší než u singletového stavu.

Široké použití sond na bázi azidů dokumentují následující příklady. Struktura lidské 40S ribosomální podjednotky byla studována pomocí azidoderivátu fragmentu DNA, který byl komplementární k sekvenci rRNA 40S podjednotky. Tato fotolabilní sonda označila proteiny S3 a S5 (cit.¹⁰). Vazné centrum cytochromu P450 1A1 pro kumenhydroperoxid bylo identifikováno radioaktivně značeným derivátem *p*-azido-isopropylbenzenem, [³H]-azidokumenem¹¹. Dalším příkladem využití tohoto typu sond je arylazid 2'-deoxyuridin-5'-trifosfátu, který byl použit pro označení vazného místa pro substrát HIV reverzní transkriptasy¹².



Obr. 2. Fotolýza arylazidu. Šipky naznačují spin elektronů singletového a tripletového nitrenu po rozpadu azido-skupiny



Obr. 3. **Příklad reakce sondy karbenového typu s methanolem.** Trifluoromethylfenyldiazirin (*I*) po ozáření poskytuje karbenový intermediát (*II*) jak přímo, tak cestou fotoizomerizace na fotolabilní diazoderivát (*III*) a jeho následné fotolýzy. Oba intermediáty jsou schopny reakce s methanolem (MeOH) za vzniku odpovídajícího methoxyderivátu sondy (*IV*)

3.2. Karbeny a jejich prekursory

Prekursor tohoto typu intermediátu byl poprvé použit roku 1962 Singhem a spol.¹ pro studium proteolýzy – jednalo se o diazoacetylchymotrypsin. Existují dvě skupiny karbenových precursorů: diazosloučeniny a diaziriny. Oba typy sloučenin poskytují po fotolytickém odštěpení molekuly dusíku vysoce reaktivní karben. Nejběžnějšími zástupci první skupiny sloučenin jsou estery diazokarboxylových kyselin, u nichž karboxylová skupina přispívá ke stabilizaci a snížení náchylnosti k přesmykům karbenů, které jsou velmi běžné v případě diazokarboxylových sloučenin. Určitou nevýhodou jsou poměrně nízké hodnoty molárních absorpčních koeficientů v oblasti okolo 340 nm, neumožňující efektivní fotolýzu, a dále i příliš elektrofilní charakter 2-oxo-karbenů, které preferují interakce např. s kyslíkem –OH skupiny v přítomnosti C–H vazby. Nadějná skupina diazosloučenin je reprezentována např. 9-diazo-fluorenem¹⁵ nebo diazocyklopentadienem¹⁴, který poskytuje jeden z nejreaktivnějších karbenů. Oba tyto prekursory lze efektivně aktivovat světlem vlnových délek vyšších než 300 nm díky silným absorpčním maximům v této oblasti. Výhodou je i poměrně vysoká účinnost inkorporace karbenů těchto sloučenin při ataku neaktivované C–H vazby.

Zcela jedinečnou skupinu karbenových precursorů představují diaziriny, spirocyklické izomery lineárních diazosloučenin¹⁵. Jsou překvapivě stabilní jak vůči působení tepla a světla viditelné oblasti, tak chemicky např. vůči silným kyselinám, zásadám nebo redučním i oxidačním činidlům¹⁶. Většina diazirinů silně absorbuje v oblasti okolo 360 nm, čehož se využívá k jejich fotoaktivaci bez vážnějšího poškození biomakromolekul. Jednou z nepříliš vhodných vlastností diazirinů je však možná fotoizomerizace na lineární diazosloučeniny, které jsou sice též fotolabilní, ale zároveň často vykazují elektrofilní charakter. Pro účely fotoafinitního značení byla připravena celá řada sloučenin obsahujících diazirinový kruh, ovšem požadovaná kritéria splňují jen některé: jedná se např. o alkyl-diaziriny, u nichž není v blízkosti karbenu dostupný atom vodíku, který by způsobil intramolekulární deaktivaci karbenu za vzniku dvojné vazby⁴, nebo aryldiaziriny obsahující jako substituent diazirinového cyklu trifluoromethylovou skupinu, která potlačuje elektrofilní charakter fotoizomerizačního pro-

duktu¹⁷. Příklad typické reakce karbenu vznikajícího fotolýzou trifluoromethylfenyldiazirinu v methanolu je znázorněn na obr. 3 (cit.¹⁸).

Karbeny jsou vysoce reaktivní divalentní intermadiáty, které se podobně jako nitreny snaží doplnit oktet valenčních elektronů (z původního sextetu). Vyskytují se též ve dvou stavech, singletovém stavu jako elektrofil a tripletovém jako biradikál. Mezi oběma stavy je předpokládán určitý typ rychlé tepelné rovnováhy¹⁹. Karbeny vykazují stejné typy reakcí jako odpovídající formy nitrenů. Podstatný rozdíl je však v reaktivitě obou typů intermediátů. Karbeny jsou o několik řádů reaktivnější než odpovídající nitreny a vykazují i nižší selektivitu při výběru místa ataku^{4,17,20,21}. S tím souvisí i podstatně kratší poločasy života singletového či tripletového stavu karbenu. Přesné hodnoty jsou pochopitelně závislé na typu karbenového precursoru a reakčních podmínkách, ale přibližně odpovídají μs pro tripletový stav a ns pro singletový stav, což jsou ve srovnání s nitreny hodnoty o 3–4 řády nižší⁴.

V současné době několik prací popisuje využití a efektivitu značení různě substituovanými diaziriny. Například sonda vzniklá derivatizací thiminového dimeru 4-(1-azi-2,2,2-trifluorethyl)-benzoátem byla použita k určení aminokyselinových zbytků účastnících se interakce T4 endonukleasy V s DNA (cit.²²). Dalším příkladem tohoto typu sond je 3-trifluoro-3-(*m*-[¹²⁵I]iodofenyl)diazirin, pomocí něhož byla označena membránová doména prostaglandin endoperoxid H synthasy a dále její aktivní místo pro cyklooxygenasu²³.

3.3. Další prekursory aktivních intermediátů

Tato skupina tzv. přímých fotoafinitních sond obsahuje heterogenní směs organických sloučenin, jejichž fotolýzou vznikají volné radikály. Tyto sloučeniny reagují většinou cestou tripletu, který je téměř inertní vůči molekulám vody a zároveň vykazuje vysokou schopnost inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb. Díky převažujícímu podílu tripletového reakčního mechanismu nejsou většinou tyto prekursory náchylné k inaktivaci přesmyky. Z pohledu fotoafinitního značení se tedy jedná o sloučeniny vhodných vlastností.

Poměrně široké použití zaznamenaly α, β-nenasycené ke-

tony např. benzofenony a acetofenony²⁴. Především sondy benzofenonového typu nabízejí řadu výhodných vlastností, jsou chemicky stabilnější než např. diazoestery, arylazidy nebo diaziriny, lze s nimi manipulovat při běžném osvětlení a jsou aktivovány světlem vlnových délek okolo 350–360 nm. Fotoaktivací benzofenonu vzniká tripletový excitovaný stav schopný vytrhnout atom vodíku z donoru za vzniku dvou radikálů, které následně rekombinují. Reakční schéma je znázorněno na obrázku 4. Substituenty benzofenonu mohou významně ovlivnit fotochemické vlastnosti připravené sondy. Zatímco skupiny poskytující elektrony a systémy s delokalizací elektronů na aromatických a konjugovaných strukturách snižují reaktivitu tripletového stavu, skupiny s nedostatkem elektronů usnadňují odtržení atomu vodíku²⁵.

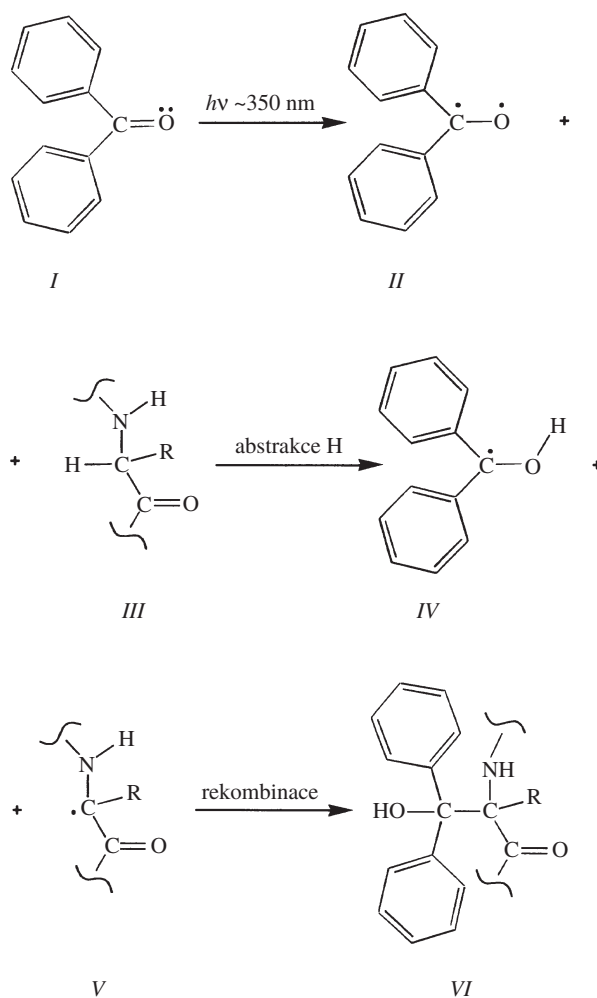
Jako fotoafinitní sondy jsou často využívány fotolabilní polypeptidy obsahující benzofenonem modifikovaný fenylalanin, popřípadě příbuzné aminokyseliny. Příslušné modifikované polypeptidy byly použity k mapování např. lidského insulinového receptoru²⁶ nebo k identifikaci kontaktních míst podjednotek α a β lidského luteinizačního hormonu²⁷.

Do této skupiny sond patří dále α , β -nenasycené steroidy, které se chovají podobně jako benzofenony, náleží sem též nitroareny např. chloramfenikol²⁸ a flunitrazepam²⁹, dále puriny, pyrimidiny, psoraleny a další sloučeniny jako např. α -amanitin nebo bilirubin⁴. Tyto sondy jsou však poměrně řídké používané, pravděpodobně pro nízkou univerzálnost jejich aplikací.

4. Použití fotoafinitních sond

Aplikace fotoafinitního značení je značně široká, od topologických studií proteinů přes sledování kinetiky molekulárních interakcí až k provádění funkčních enzymologických měření. Tato problematika je podrobně zpracována v přehledných člancích a monografiích^{2–4,6,18,25,30–32}, proto následující partie bude spíše utříděním a zobecněním možností, které fotoafinitní značení poskytuje.

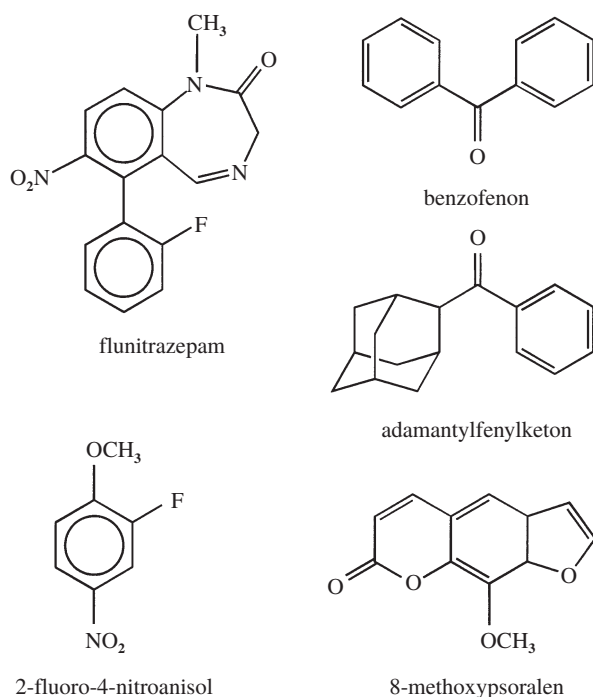
- 1) Pomocí specificky reagující fotolabilní sondy je možno označit určitý receptor nebo méně často ligand v částečně purifikovaném preparátu nebo přímo ve vzorku tkáně. Navázaná sonda (vhodně značená) pak umožňuje např. monitorování dané makromolekuly během separačních postupů a při její charakterizaci, což je zejména výhodné pro receptorové molekuly, které nelze snadno stanovit, a dále pro identifikaci neznámých receptorů³³. Speciálním případem aplikace je vyhledávání funkční podjednotky u podjednotkových enzymů.
- 2) Topologii membránových proteinů lze studovat v podstatě dvěma způsoby. Prvý je založen na použití fotolabilních derivátů lipidů nebo jiných silně hydrofobních fotolabilních sloučenin, které jsou dobře rozpustné v membránách. Fotolýzou vzniklé intermediáty zmíněných sloučenin jsou schopny označit části proteinů, které jsou ve styku s membránou^{34,35}. Tento experimentální přístup umožňuje určit i hloubku zanoření proteinové makromolekuly do membrány. Tyto sondy musí být schopné efektivní inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb postranních alifatických řetězců hydrofobních aminokyselin, které lze předpokládat právě v těchto částech proteinů. Druhý způsob použití fotoafinitního značení pro topologické účely je zaměřen



Obr. 4. Fotolýzou benzofenonu (I) vzniká biradikál (II), který vytrhuje atom vodíku z C–H vazby aminokyseliny peptidu (III) za vzniku ketyl (IV) a alkyl (V) radikálů, které nakonec rekombinují na sloučeninu benzpinakolového typu (VI)

na identifikaci částí proteinu, které jsou ve styku s vodným prostředím. Pro tyto záměry se hodí téměř jakákoli silně hydrofilní fotolabilní sloučenina nevstupující do membrány.

- 3) Pomocí fotoafinitního značení lze v biologických systémech určovat vzdálenosti ve dvou úrovních, buď intra- nebo intermolekulárně, s čímž souvisí i možnost detekce komponent multienzymových či subjednotkových systémů nebo určení jejich nejbližšího okolí³⁶. Sondy používané pro tyto účely musí být bifunkční, tzn. musí obsahovat na protilehlých koncích co možná rigidního řetězce fotolabilní skupiny – pak se jedná o homobifunkční síťovací činidla, nebo jednu fotolabilní a druhou chemicky reaktivní skupinu u heterobifunkčních síťovacích činidel. Vhodné je do spojovacího řetězce vložit snadno degradabilní vazbu, např. S–S-můstek, kterou lze v redukčním prostředí rozštěpit, a pak izolovat obě označené složky systému. Heterobifunkční činidla jsou zpravidla nejprve navázaná prostřednictvím chemicky reaktivní skupiny na danou molekulu, a pak je teprve aktivována fotolabilní skupina, značící např. postranní řetězce aminokyselin ve své blízkosti.



Obr. 5. Příklady přirozeně fotolabilních sloučenin, prekursorů volných radikálů, které se používají jako fotoafinitní sondy

U homobifunkčních činidel je třeba, aby alespoň jeden konec činidla obsahoval strukturu umožňující specifickou interakci činidla se studovanou makromolekulou; druhý konec pak může být zakončen pouze fotolabilní skupinou.

- 4) Speciálním způsobem aplikace metody fotoafinitního značení je ireverzibilní zablokování aktivního centra enzymů nebo u alosterických enzymů fixování jejich aktivní nebo naopak inaktivní konformace, které lze pak použít pro studium vztahu struktury a funkce těchto enzymů³⁷. Zajímavé možnosti nabízí i fotolyticky připravené komplexy receptorů s nízkomolekulárními sloučeninami.
- 5) Současné světelné zdroje o vysokém výkonu (lasery, intenzivní záblesková zařízení) umožňují provádět fotoaktivaci sond během velmi krátkého časového úseku (μs – ms). Ve spojení s přístroji pro rychlé mísení reakčních komponent slouží tato metodika ke sledování časového sledu dějů, např. průběhu enzymových reakcí, vazby hormonu na receptor nebo interakci složek multienzymového systému³⁸ v definovaných časových okamžicích. Používané sondy nesmí podléhat přesmykům a izomerizacím na reaktivní intermediáty s dlouhou dobou života, které by interferovaly při zaznamenání časově rozlišených interakcí.
- 6) Další aplikací fotoafinitního značení je mapování vazebných míst receptorů, přenašečů nebo aktivních center enzymů^{39,40}. V těchto případech metoda fotoafinitního značení, jako jeden z mála experimentálních přístupů, umožňuje pohled např. i do hydrofobního vazebného místa proteinů, jejichž trojrozměrnou strukturu nelze zatím určit. Většina ostatních chemicko-modifikačních metod by v případě vazebných míst se značným obsahem hydrofobních aminokyselin byla neúčinná. Proto je tato metoda výhodná pro výzkum struktury aktivního centra cytochromu P450,

enzymu hrajícího klíčovou úlohu při metabolismu hydrofobních léčiv a kancerogenů.

Tato oblast aplikace metody fotoafinitního značení ke studiu aktivního centra savčích cytochromů P450 je v centru našeho zájmu. Pro značení aktivního centra byly postupně použity diamantandiazirin⁴¹, sonda karbenového typu a dále *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminofenethylamin, zástupce nitrenových sloučenin, kterým se podařilo identifikovat Arg197 aktivního centra cytochromu P450 2B4 (cit.⁴²). Tento typ heterobifunkční azidové sondy vykazuje značnou selektivitu vůči místu ataku – modifikuje převážně polární aminokyseliny. Proto byly v dalších studiích jako výhodnější fotoafinitní sondy testovány prekursory volných radikálů, jejichž intermediáty mají vysokou schopnost inkorporace do neaktivovaných C–H vazeb, a nejsou náchylné k interakcím s molekulami vody, což je pro fotoafinitní značení cytochromů P450 velmi důležité, neboť v aktivním centru savčích cytochromů P450 se předpokládá přítomnost vody. Jedná se o přirozeně fotolabilní sloučeniny: flunitrazepam, 8-methoxypsoralen, 2-fluoro-4-nitroanisole včetně polohového izomeru 2-nitro-4-fluoroanisolu, benzofenon a jeho analog adamantylfenylketon (viz obr. 5). Všechny sloučeniny prokázaly značnou fotolabilitu při expozici krátkovlnným UV zářením a jeví se jako velmi perspektivní sondy pro mapování aktivního centra cytochromu P450.

Právě detailní poznání struktury a aminokyselinového složení aktivních center cytochromů P450 umožní vedle pochopení mechanismu aktivace kancerogenů též cílenou konstrukci léčiv rezistentních vůči inaktivaci cytochromy P450 a přípravu inhibitorů s preventivně ochranným efektem proti chemickým kancerogenům.

5. Závěr

Technika fotoafinitního značení je progresivní metodou s širokou možností aplikace pro studium biomakromolekul. Fotoafinitní značení vychází z principu afinitního značení s tím zásadním rozdílem, že analog substrátu není chemicky reaktivní až do okamžiku fotoaktivace. Fotolýzou dojde k rozpadu fotolabilní skupiny sondy za vzniku reaktivních intermediátů, které umožní tvorbu kovalentní vazby mezi sondou a studovaným receptorem. Výhoda použití fotoafinitních sond spočívá především ve značné reaktivitě intermediátů, umožňující značit na proteinech místa s nízkou chemickou reaktivitou, a dále ve velmi krátké době života těchto intermediátů, což vede k minimalizaci vazby sondy mimo studované místo.

Při konstrukci fotoafinitních sond velmi široké použití zaznamenaly arylazidy substituované na aromatickém kruhu nitroskupinou. Zavedení této skupiny jednak způsobuje posun absorpčních maxim derivátů do oblasti vlnových délek vyšších než 300 nm, jednak zvyšuje reaktivitu arylnitrenů⁴³, která se pak blíží nejreaktivnějším nitrenům vznikajícím z acylazidů.

V řadě ohledů jsou však prekursory karbenů, zejména diaziriny, lepšími kandidáty pro přípravu fotoafinitních sond než azidosloučeniny. Karbeny jsou podstatně reaktivnější při nižší selektivitě pro místo ataku. Na snížení nespecifické vazby má značný vliv i o několik řádů nižší poločas života karbenů, který nedovoluje reaktivním intermediátům, aby atakovaly místa vzdálená od místa jejich vzniku. Výhodně jsou položena i absorpční maxima všech diazirinů (350–380 nm).

Navíc diazirinová skupina je poměrně menší než některé prekursorů nitrenů, např. objemná nitroarylazidová skupina, takže jen minimálně ovlivňuje vazebné vlastnosti sondy. Zároveň karben vzniklý z diazirinu je přímo součástí skeletu ligandu, což zajišťuje označení právě vazného místa receptoru. Nicméně, i přes řadu předností, nejsou diaziriny zcela ideálními prekursorů reaktivních intermediátů pro svou náchylnost k fotoizomerizacím na lineární diazosloučeniny, které snižují výtěžek značení díky kompetici obou izomerů o vazbu na receptor.

Slibnými kandidáty pro fotoafinitní značení jsou již zmíněné přímé fotoafinitní sondy. U těchto sond, díky jejich přímé fotolabilitě, nedochází k poklesu afinity ligandu pro receptor způsobené zavedením fotoaktivovatelné skupiny do jeho molekuly. Tyto fotoafinitní sondy tím, že většinou reagují tripletovým mechanismem, v sobě spojují přednosti tripletových karbenů a nitrenů.

Autoři děkují za finanční podporu grantům GAUK 246/1999 a MŠMT ČR VS96141.

LITERATURA

- Singh A., Thornton E. R., Westheimer F. H.: *J. Biol. Chem.* 237, 3006 (1962).
- Guillory R. J.: *Pharmacol. Ther.* 41, 1 (1989).
- Schäfer H.-J., v knize: *Chemical Modification of Enzymes: Active Site Studies* (Eyzaguirre J., ed.), str. 45. Wiley, New York 1987.
- Bayley H.: *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam 1983.
- Chowdhry V., Westheimer F. H.: *Ann. Rev. Biochem.* 48, 293 (1979).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Methods Enzymol.* 46, 69 (1977).
- Singer S. J.: *Adv. Prot. Chem.* 22, 1 (1967).
- Glazer A. N., DeLange R. J., Sigman D.S., v knize: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Work T. S., Work E., ed.), sv. 4, část I. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1976.
- Fleet G. W. J., Porter R. R., Knowles J. R.: *Nature* 224, 511 (1969).
- Malygin A. A., Vaseneva O. G., Ven'yaminova A. G., Repkova M. N., Karpova G. G.: *Mol. Biol.* 32, 367 (1998).
- Cvrk T., Strobel H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 95 (1998).
- Shcherbik N. V., Khodyreva S. A., Vlasov V. A., Dobrikov M. I., Dymshits G. M., Lavrik O. I.: *Mol. Biol.* 31, 290 (1997).
- Anjaneyulu P. S. R., Lala A. K.: *FEBS Lett.* 146, 165 (1982).
- Moss R. A.: *J. Org. Chem.* 31, 3296 (1966).
- Smith R. A. G., Knowles J. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5072 (1973).
- Bradley G. F., Evans W. B. L., Stevens I. D. R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1214 (1977).
- Brunner J., Richards F. M.: *J. Biol. Chem.* 255, 3319 (1980).
- Fleming S. A.: *Tetrahedron* 51, 12479 (1995).
- Griller D., Montgomery C. R., Scaiano J. C., Platz M. S., Hadel L.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6813 (1982).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Biochemistry* 17, 2414 (1978).
- Bayley H., Knowles J. R.: *Biochemistry* 17, 2420 (1978).
- Hori N., Iwai S., Inoue H., Ohtsuka E.: *J. Biol. Chem.* 267, 15591 (1992).
- James C. O., Smith W. L.: *J. Biol. Chem.* 271, 9906 (1996).
- Galaray R. E., Craig L. C., Printz M. P.: *Nature* 242, 127 (1973).
- Dormán G., Prestwich G. D.: *Biochemistry* 33, 5661 (1994).
- Shoelson S. E., Lee J., Lynch C. S., Backer J. M., Pilch P. F.: *J. Biol. Chem.* 268, 4085 (1993).
- Keutman H. T., Rubin D. A.: *Endocrinology* 132, 1305 (1993).
- Sonenberg N., Zamir A., Wilchek M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 693 (1974).
- Mohler H., Battersby M. K., Richards J. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1666 (1980).
- Schuster D. I., Probst W. C., Ehrlich G. K., Singh G.: *Photochem. Photobiol.* 49, 785 (1989).
- Brunner J.: *Methods Enzymol.* 172, 628 (1989).
- Moore G. J.: *Pharmacol. Ther.* 33, 349 (1987).
- Usui H., Takahashi Y., Maeda N., Mitui H., Isobe T., Okuyama T., Nishizawa Y., Hayashi S.: *J. Chromatogr.* 515, 375 (1990).
- Lala A. K., Bhat S.: *Biotechnol. App. Biochem.* 12, 586 (1990).
- Schiavo G., Demel R., Montecucco C.: *Eur. J. Biochem.* 199, 705 (1991).
- Mogre R. M., Batliwala H. F., Anjaneyulu P. S. R., Lala A. K.: *FEBS Lett.* 221, 408 (1987).
- Eberle A. N., DeGraan P. N. E., Scimonelli T., Solca F.: *Pharmacol. Ther.* 44, 63 (1989).
- McCray J. A., Trentham D. R.: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 239 (1989).
- Wadzinski B. E., Shanahan M. F., Seamon K. B., Ruoho A. E.: *Biochem. J.* 272, 151 (1990).
- Donnelly-Roberts D. L., Lentz T. L.: *Biochemistry* 30, 7484 (1991).
- Hodek P., Smrček S.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 181 (1999).
- Antonovič L., Hodek P., Smrček S., Novák P., Šulc M., Strobel H. W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 208 (1999).
- Schuster G. B.: *NATO ASI Ser., Ser. C; Photochem. Probes Biochem.* 272, 31 (1989).

B. Kubičková and P. Hodek (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Photoaffinity Labelling – A Method of Protein Study**

Photoaffinity labelling is one of the most powerful chemical modification techniques employed in the study of protein architecture and interactions. This approach utilises photolabile derivatives of ligands (substrates), termed photoaffinity probes, for a covalent labelling of target proteins (enzymes). Upon UV-light photolysis, photoaffinity probes are converted to highly reactive intermediates which are able to modify amino acid residues of a target protein. The goal of this technique is the identification of the probe binding site(s) in a probe-protein covalent complex. In this review, major concepts of photoaffinity labelling are described with respect to selection criteria of appropriate photoaffinity probes and assessment of advantages and disadvantages of currently used photolabile probes. In addition, several examples of photoaffinity probe application in protein research focused on the cytochrome P450 active centre are presented.