

Создание фоторегулируемых биологических молекул на основе производных азобензола[†]

Т.С.Зацепин, Л.А.Абросимова, М.В.Монахова, Ле Тхи Хиен, А.Пингуд,
Е.А.Кубарева, Т.С.Орецкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет,
Факультет биоинженерии и биоинформатики и Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1
Университет инженерии и технологии Национального университета Вьетнама,
Факультет инженерной физики и нанотехнологий
Вьетнам, Ханой, Кау Гяу, Ксуан Туи, 144
Университет им. Ю.Либиха, Институт биохимии
Германия, D-35392 Гиссен, Хайнрих-Буфф-Ринг, 58

Обзор посвящен способам конструирования фоторегулируемых белков и нуклеиновых кислот. Обобщены данные по синтезу и модифицированию белков и нуклеиновых кислот производными азобензола. Рассмотрены примеры использования фотопереключаемых белков, их субстратов, ингибиторов и лигандов, содержащих азобензол, а также азобензольных производных нуклеиновых кислот для создания наномашин.

Библиография — 122 ссылки.

Оглавление

I. Введение	942
II. Синтез и применение нуклеиновых кислот и их аналогов, содержащих фрагменты азобензола	944
III. Введение фрагмента азобензола в состав пептидов и белков	947
IV. Фоторегулирование активности белков	951
V. Применение фоторегулируемых субстратов, ингибиторов и лигандов для регулирования активности белков	956
VI. Заключение	962

I. Введение

Свет играет ключевую роль во многих процессах, происходящих в живой и неживой природе. В ходе эволюции все организмы — от бактерий до млекопитающих — приобрели разнообразные механизмы, для того чтобы чувствовать свет и реагировать на него. Как правило, это специализированные

органы и ткани, однако известны примеры и внутриклеточных структур. Белки являются одними из основных биополимеров в клетке, при этом они сильно различаются по

[†] Обзор посвящен памяти профессора Гобинда Кораны, лауреата Нобелевской премии, выдающегося ученого, определившего развитие химии нуклеиновых кислот.

Т.С.Зацепин (T.S.Zatsepin). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник химического факультета МГУ. Телефон: (495)939–3148, e-mail: tsz@yandex.ru

Л.А.Абросимова (L.A.Abrosimova). Аспирантка факультета биоинженерии и биоинформатики того же университета. Телефон: (495)939–3148, e-mail: abrludmila@rambler.ru

М.В.Монахова (M.V.Monakhova). Аспирантка химического факультета того же университета. Телефон: (495)939–3148, e-mail: monakhovamv@gmail.com

Ле Тхи Хиен (Le Thi Hien). Кандидат химических наук, научный сотрудник Университета инженерии и технологии Национального университета Вьетнама. Телефон: +84(43754)94–29, e-mail: lehien1411@gmail.com

А.Пингуд (A.Pingoud). Доктор наук, профессор, директор Института биохимии Университета им. Ю.Либиха.

Телефон: +49(641)993–5400, e-mail: Alfred.M.Pingoud@chemie.bio.uni-giessen.de

Е.А.Кубарева (E.A.Kubareva). Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ. Телефон: (495)939–5411, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Т.С.Орецкая (T.S.Oretskaya). Доктор химических наук, профессор химического факультета того же университета.

Телефон: (495)939–5411, e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru
Область научных интересов авторов: синтез модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов, ДНК-белковые взаимодействия.

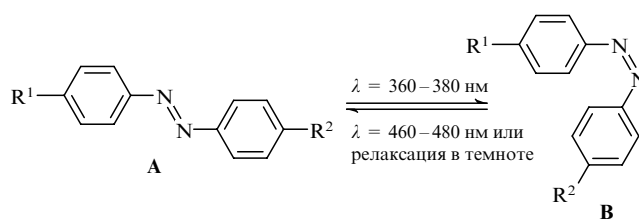
Дата поступления 12 октября 2012 г.

структуре и функциям. Регулирование активности белка может быть осуществлено как на стадии синтеза (т.е. на стадии транскрипции и трансляции), так и путем регулирования его деградации, а также использованием ингибиторов или активаторов. При наличии определенных структурных элементов в белке возможно регулирование его активности под действием света. В природе такие белки встречаются редко (например, бактериородопсин), однако возможно введение в состав белков так называемых «фотопереклюателей» — фрагментов, изменяющих структуру под действием света. Это можно осуществить путем химических превращений: либо включением неприродных аминокислот в состав белка, либо модифицированием субстрата, ингибитора или кофактора. Основное свойство нуклеиновых кислот (НК) заключается в образовании двух- и трехспиральных комплексов. Возможность изменять стабильность таких комплексов с помощью «фотопереклюателей», введенных в состав нуклеиновых кислот, позволит влиять на процессы с их участием и расширить область применения НК-производных.

В настоящее время в качестве «фотопереклюателей» применяют замещенные азобензолы, спиропираны, стерически затрудненные стильбены, производные тиоиндиги и ряд других соединений. Обратимые переходы таких соединений сопровождаются одним из следующих процессов: *цис-транс*- или *син-анти*-изомеризацией, фотоциклизацией и установлением равновесия кето-енольной таутомерии.^{1–5} Наиболее часто в качестве «фотопереклюателей» выступают производные азобензола. Хотя азобензолы давно применяются как красители в промышленности, их использование в качестве молекулярных «фотопереклюателей» началось относительно недавно. Опубликовано большое количество работ, посвященных применению производных азобензола в различных областях химии — полимерной, органической и биоорганической,^{6,7} а также в материаловедении.^{8,9} Значительный интерес к использованию подобных реагентов в биоорганической химии вызван тем, что изомеризация азобензола происходит под действием света с длиной волны более 300 нм и, следовательно, позволяет активировать/деактивировать белки *in vivo*, по крайней мере на культуре клеток. С помощью производных азобензола можно наиболее эффективно регулировать активность белка по сравнению с другими реагентами.

Азобензол с двойной связью в *анти*-конфигурации[‡] (A) превращается в *син*-форму (B) при его облучении ближним

Схема 1



УФ-светом (~ 380 нм), а обратное превращение осуществляется при облучении голубым светом (470 нм) или при инкубации в темноте (схема 1).^{10–12}

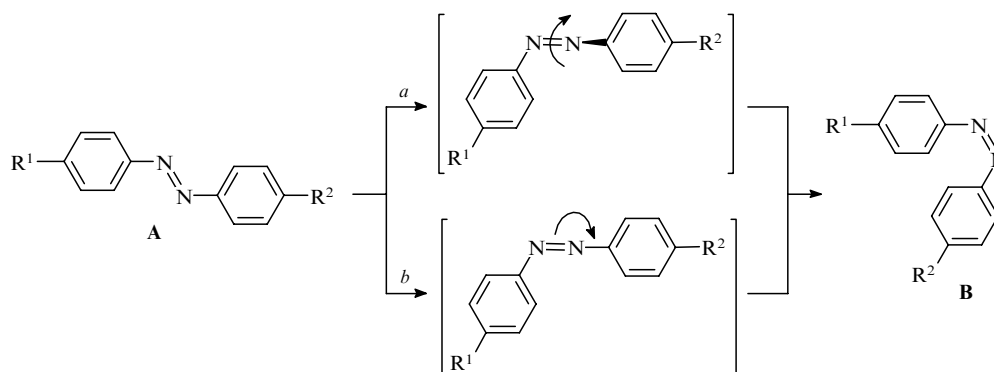
Производные азобензола широко используются для фоторегулирования активности белков благодаря их следующим уникальным свойствам:

- минимальное влияние дипольного момента среды на спектр поглощения и на процесс изомеризации,
- низкая скорость «выгорания» флуорофора,
- высокий выход *син-анти*-перехода,
- существенное различие геометрии *син*- и *анти*-изомеров (большая разница расстояний и углов между двумя концами молекулы азобензола в *син*- и *анти*-конфигурации),
- короткое время изомеризации (1–10 пс),
- химическая устойчивость азобензола в отсутствие сильных восстановителей.

В результате изомеризации центральной двойной связи происходит изменение геометрии молекулы и ее дипольного момента.^{13–15} Соотношение *син*- и *анти*-изомеров для производных азобензола обычно определяется методами ВЭЖХ¹⁶ или спектроскопии ЯМР ¹H.¹⁷ Синглет протона в *орто*-положении азобензола в *анти*-изомере превращается в дублет в *син*-изомере. Механизм обратимой *син-анти*-изомеризации азобензола остается неясным, несмотря на большое количество экспериментальных и теоретических работ, посвященных этому вопросу.^{18–21} Предложен следующий механизм *син-анти*-изомеризации азобензола: сочетание вращения одного из бензольных колец вне плоскости молекулы (схема 2, путь a) и его инверсии в плоскости молекулы (см. схему 2, путь b).

Данный обзор посвящен включению производных азобензола в состав нуклеиновых кислот и их аналогов, а также пептидов, белков, их субстратов и лигандов для изменения структуры и регулирования активности этих биологически активных молекул.^{22–26}

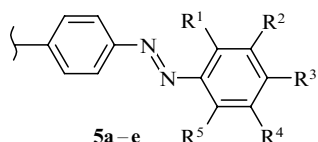
Схема 2



[‡] Здесь и далее для обозначения *Z*- и *E*-конфигураций изомеров использованы префиксы «*син*» и «*анти*» как наиболее общепринятые в этой области химии.

II. Синтез и применение нуклеиновых кислот и их аналогов, содержащих фрагменты азобензола

Для регулирования активности НК-связывающих белков можно использовать олигонуклеотидные аналоги субстратов, которые изменяют свои свойства при облучении. Чаще всего для этих целей применяется производное азобензола на основе D-треонинола (соединение **1**).²⁷ Показано, что фрагмент азобензола, присоединенный к D-треонинолу, направлен в малую бороздку ДНК-дуплекса, в то время как в случае L-изомера (**2**) — в большую бороздку. Структурные изменения азобензольного фрагмента, происходящие в узкой малой бороздке, значительно влияют на структуру и стабильность НК-дуплекса, в то время как в бороздке большего размера такие изменения незначительны. Включение одного-двух фрагментов азобензола в состав олигонуклеотида позволяет добиться разницы в термической стабильности ДНК-дуплекса для *син*- и *анти*-формы в 15–20°. Для синтеза таких олигонуклеотидов (X_D и X_L) были использованы амидофосфитные производные, содержащие остатки N-(4-фенилазобензоил)-D-треонинола (**3**) и N-(4-фенилазобензоил)-L-треонинола (**4**) (схема 3).²⁷



$R^1 = \text{Me}, R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$ (a); $R^2 = \text{Me}, R^1 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$ (b); $R^3 = \text{Me}, R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = \text{H}$ (c); $R^1 = R^5 = \text{Me}, R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$ (d); $R^1 = R^4 = \text{Me}, R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ (e)

В качестве «фотопереклюателей» для изменения стабильности дуплексов применялись также различные замещенные азобензолы **5a–e**, встроенные в олигонуклеотид через остаток D-треонинола.²⁸

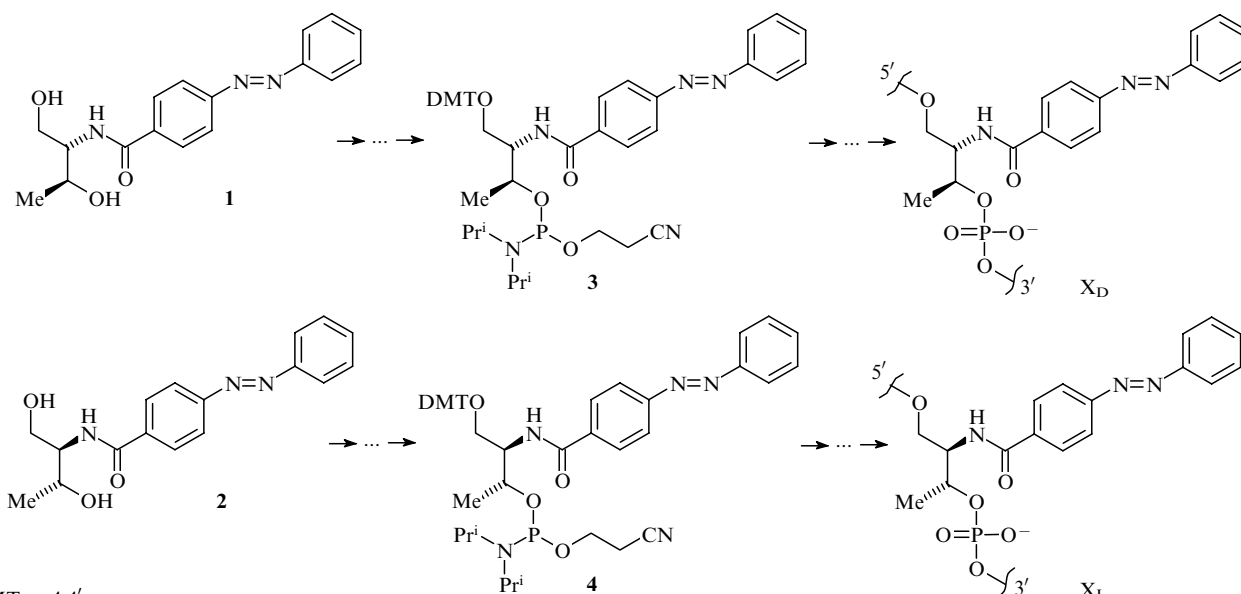
Фрагмент азобензола в *анти*-конфигурации способен увеличивать стабильность ДНК-дуплекса, при облучении УФ-светом конфигурация двойной связи изменяется и обра-

зуется *син*-форма, которая дестабилизирует ДНК-дуплекс. Показано, что при введении одной метильной группы в азобензольный фрагмент разница между температурой плавления ДНК-дуплекса после облучения УФ-светом (~ 380 нм) и в отсутствие облучения увеличивается по сравнению с дуплексами, содержащими незамещенный азобензол. Использование дизамещенных азобензолов приводит к еще большей разнице в температуре плавления соответствующих ДНК-дуплексов. Однако следует учитывать, что термическая *син*–*анти*-релаксация замещенных азобензолов в составе олигонуклеотида проходит в 10 раз медленнее по сравнению с незамещенным соединением.

При гибридизации ДНК, содержащей фрагмент азобензола, с комплементарной РНК также наблюдалось значительное различие в стабильности дуплекса для *син*- и *анти*-конфигураций.²⁹ В отличие от ДНК/ДНК-дуплекса, в случае некоторых последовательностей наблюдалась дестабилизация ДНК/РНК-дуплексов, содержащих азобензол в *анти*-конфигурации. Это объясняется разницей в структурах дуплексов ДНК/ДНК (В-форма) и ДНК/РНК (А-форма).

Модифицированные азобензолом ДНК/РНК-дуплексы были исследованы методом кругового дихроизма (КД).²⁹ Слабый отрицательный эффект Коттона в области ~ 360 нм (π – π^* -переход азобензола) указывает на встраивание азобензола в *анти*-конфигурации между плоскостями оснований. Кроме того, наблюдался батохромный сдвиг полосы поглощения азобензола в *анти*-конфигурации при формировании дуплекса. В случае *син*-конфигурации азобензола индуцированный КД оказался гораздо слабее. Наблюдаемые спектральные изменения были аналогичными и в случае ДНК/ДНК-дуплекса.²⁹ РНК/РНК-Дуплекс, содержащий фрагмент азобензола,³⁰ также характеризовался значительной разницей в термической стабильности двух форм, что позволяет проводить его фоторегулирование. Кроме того, олигонуклеотид, содержащий фрагмент азобензола, использовался для образования триплекса, что может найти применение при блокировании связывания факторов (активаторов) транскрипции и РНК-полимеразы.³¹ Например, в случае 13-звенного триплекса, в одной из цепей которого на 5'-конце присутствует *м*-амидазобензол, разница между термической стабильностью триплексов, содержащих этот

Схема 3

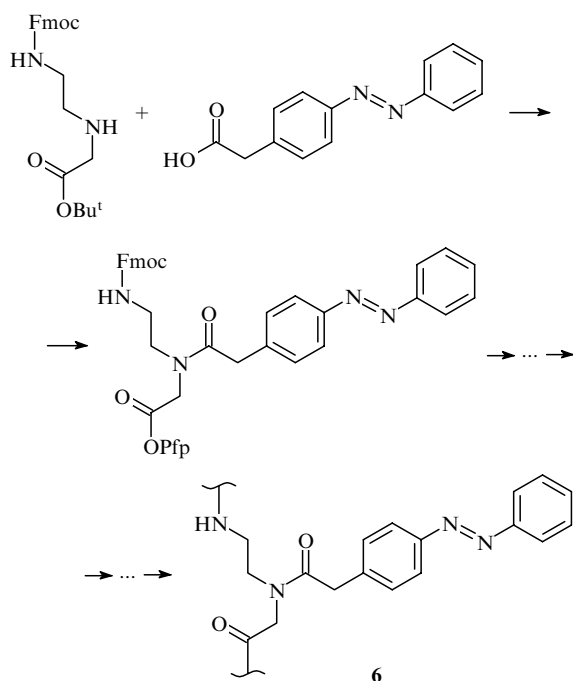


DMT — 4,4'-диметокситритил

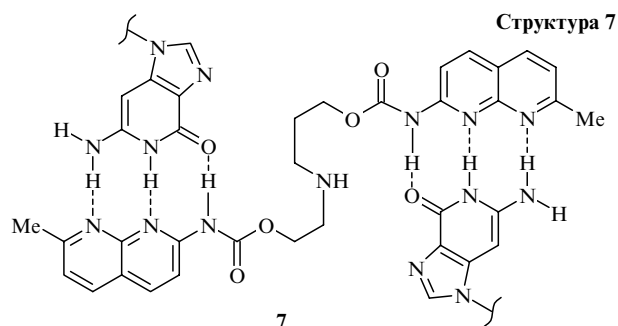
фрагмент в *анти*- и *син*-конфигурациях, составила 19.2°. Следует отметить, что введение *м*-амидоазобензола в *анти*-конфигурации в качестве внутрицепочечного фрагмента в одну из цепей триплекса увеличивало температуру плавления ($T_{пл}$) на 6.3° по сравнению с немодифицированным триплексом. При введении *п*-амидоазобензола в аналогичный триплекс разница между $T_{пл}$ триплексов, содержащих *анти*- и *син*-форму, составила 14.3°. Однако эта разница сильно зависела от положения фрагмента и в некоторых случаях превышала 30° при введении *п*-амидоазобензола внутрь олигонуклеотидной цепи.

Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) являются синтетическими аналогами нуклеиновых кислот и представляют собой азотистые основания, присоединенные к *N*-(2-аминоэтил)глицинполиамиду.³² Они хотя и не являются природными соединениями, но способны образовывать с ДНК и между собой стандартные уотсон-криковские и хугстиновские пары. Благодаря высокому сродству ПНК к ДНК, а также их физиологической устойчивости ПНК по эффективности гибридизации часто превосходят другие аналоги ДНК при воздействии на различные биохимические процессы, такие как транскрипция и трансляция (схема 4). Для фоторегулирования этих процессов в состав ПНК вводят азобензольную группу. Фотохромные свойства образующегося соединения **6** очень схожи с таковыми для аналогичных производных нуклеиновых кислот.^{33, 34}

Схема 4



Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил; Pfp — пентафторфенил



Интересным подходом к стабилизации некоплементарных пар в составе ДНК-дуплекса является использование низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с гетероциклическими основаниями. Димерный *N*-(7-метил-1,8-нафтиридин-2-ил)карбамат (НКА) селективно связывается с двуцепочечной последовательностью 5'-YGG-3'/3'-GGY-5', которая содержит некоплементарную пару G·G, путем образования водородной связи с гуаниновыми основаниями (структура 7). Если Y = T, то стабилизирующий эффект НКА максимален (рис. 1).³⁵

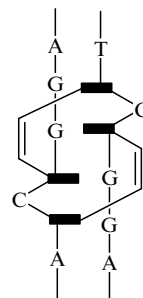
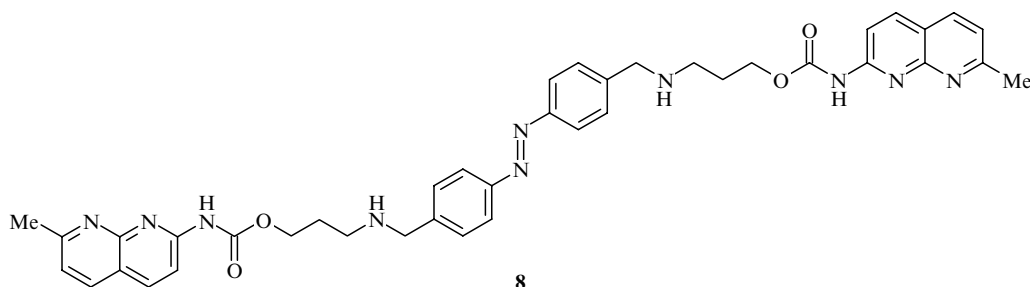


Рис. 1. Схематическое изображение соединения двух цепей ДНК с помощью димера НКА₂Аз (**8**).³⁵

Так, 11-звенная ДНК 5'-CCTTTGGTCAG-3' при комнатной температуре представляет собой одноцепочечную структуру, а в присутствии 100 мкмоль · л⁻¹ димера **7** образуется дуплекс с температурой плавления 58.8°C. Введение азобензола в линкер между фрагментами нафтиридина (НКА₂Аз, **8**) позволяет контролировать образование дуплекса.

При *анти*-конфигурации азобензола $T_{пл}$ дуплекса 5'-СТААСГГААТГ-3'/3'-ГАТТГГСТТАС-5' составила 32.7°C. При облучении светом с длиной волны 360 нм $T_{пл}$ дуплекса увеличилась на 15.2° ($T_{пл} \approx 48.0^\circ\text{C}$). Наблюдаемый эффект объясняется тем, что *син*-конфигурация НКА₂Аз имеет более высокое сродство к последовательности 5'-CGG-3'/3'-GGC-5', содержащей некоплементарную G·G-пару, чем к канонической последовательности. Неплоский линкер с азобензолом в *син*-форме позволяет двум

Структура 8



нафтиридиновым циклам занять нужные позиции для взаимодействия с остатками гуанина в некомплементарной паре. При этом стабилизация дуплекса является полностью обратимой.

Нуклеиновые кислоты способны к самостоятельной сборке, основанной на гибридизации между комплементарными цепями, что позволяет получать фотонные провода, ферментативные ансамбли и ДНК-зонды.^{36–43} На основе ДНК разрабатываются «наномашин» с возможностью изменения их эффективности при внешнем воздействии. За последнее десятилетие было получено множество «наномашин» различной конструкции.^{36, 44} В большинстве случаев такие «молекулярные двигатели» в качестве «топлива» используют энергию, выделяющуюся в процессе гибридизации ДНК. В каждом рабочем цикле гибридизованные ДНК должны удаляться и заменяться на одноцепочечные комплементарные ДНК. Естественно, из-за подобных операций эффективность «наномашин» сильно снижается. При использовании ДНК, «фотопереключаемой» с помощью производных азобензола, удалось избежать этих недостатков. Был разработан «нанопинцет», в течение 10 циклов открытия и закрытия которого эффективность работы не изменилась.⁴⁵ Такой «пинцет» состоит из трех ДНК-цепей (участки А, Б, В) и имеет структуру, показанную на рис. 2.

Участки В1 и В1 образуют 22-звенные ДНК-дуплексы с олигонуклеотидом А, формируя две стороны «пинцета». Цепь Б имеет в своем составе также участок В2, в который вводился остаток D-треонинола, модифицированный азобензолом (3) или *n*-изопропилазобензолом. Одноцепочечный участок В2 на 3'-конце цепи Б способен гибридизоваться с комплементарным ему одноцепочечным участком в цепи В (В4). При образовании такого 10-звенного дуплекса «пинцет» становится закрытым (*анти*-конфигурация азобензола способствует формированию дуплекса). При облучении УФ-светом дуплекс между участком В2 и В4 диссоциирует вследствие *анти*–*син*-превращения азобензольного фрагмента, и «пинцет» становится открытым. За действием «пинцета» наблюдали с помощью измерения флуоресценции. Для

этого к двум концам олигонуклеотида А были присоединены флуорофор и «тушитель», и по изменению интенсивности флуоресценции следили за ходом работы «пинцета». Интересно, что при использовании *n*-изопропилазобензольного фрагмента в качестве «фотопереключателя» был получен противоположный эффект: при облучении видимым светом «пинцет» был открыт, при УФ-воздействии — закрыт.

Были получены наноструктуры на основе ДНК, совмещенные с азобензольной частью и способные к фотоуправлению.⁴⁶ Недавно была продемонстрирована модель молекулярного двигателя, управляемого содержащей азобензол ДНК. Его действие основано на обмене между множеством нитей ДНК. Дальнейшее совершенствование оптических свойств «фотопереключателя» привело к созданию одномолекулярного ДНК-«наномотора».⁴⁷ Принцип действия одномолекулярного ДНК-«мотора» состоит в возможности регулирования дегибридации (в открытом состоянии) и гибридизации (закрытое состояние) шпильчатой структуры ДНК благодаря встроенным в нее азобензольным фрагментам. Из-за двустороннего движения (расширения или сжатия) такая молекула является мотором, и его движение можно охарактеризовать изменением флуоресценции при изменении расстояния между флуорофором и «тушителем» на концах ДНК (рис. 3).

По сравнению с предыдущими ДНК-«моторами», в которых циклы двигателя включают бимолекулярные или мультимолекулярные взаимодействия между несколькими независимыми цепями ДНК, одномолекулярный ДНК-двигатель со структурой шпильки имеет существенно более простой механизм действия в силу своей собственной уникальной структуры. Из-за своей простоты и внутримолекулярных взаимодействий под воздействием УФ- и видимого света «мотор» демонстрирует 40–50%-ную эффективность перехода из закрытой в открытую форму и обратно. Такой вид «наномотора» проявляет хорошую регуляторную активность в мягких условиях без потери вещества. В отличие от многокомпонентных ДНК-машин, предложенная система обладает уникальной функциональностью, не зависящей от

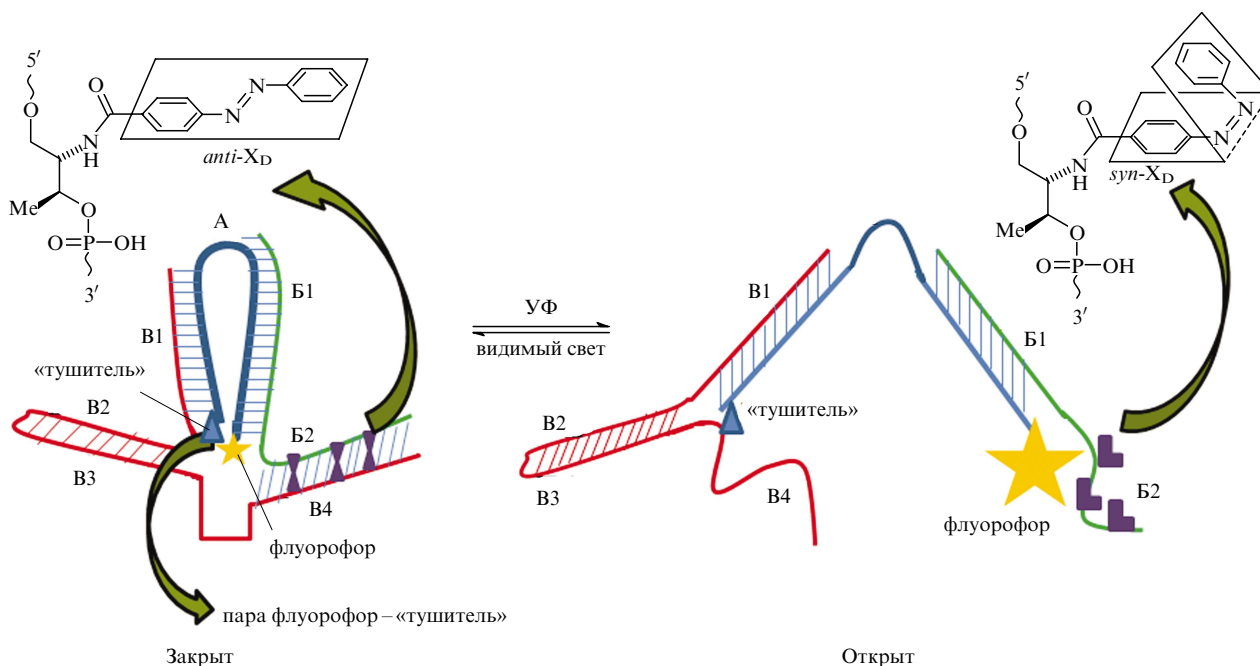


Рис. 2. Структура и схема действия «нанопинцета», сконструированного из фрагментов ДНК, которые содержат фрагменты азобензола.⁴⁵

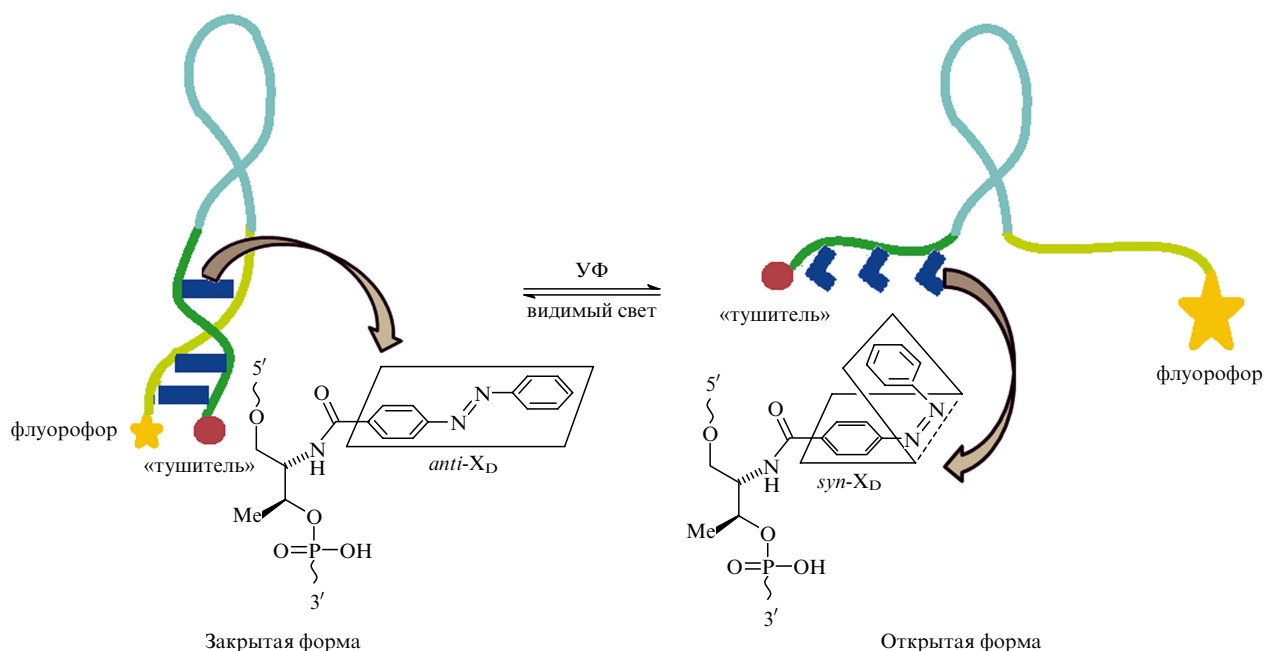


Рис. 3. Принцип действия ДНК-«наномотора», содержащего три азобензольных фрагмента X_D в составе шпильчатой структуры.⁴⁷

концентрации соединения. Кроме того, шпильчатая структура остова «мотора» существенно увеличивает эффективность конверсии световой энергии в энергию движения.⁴⁷

Для регулирования активности белков широко используются НК-аптамеры, которые способны эффективно и селективно связываться с активным центром определенного белка или аллостерически регулировать его активность. Был синтезирован фотопереключаемый аптамер на тромбин,⁴⁸ который имеет три функциональные области: ингибиторную, регуляторную и связывающую. Он позволяет обратимо регулировать активность тромбина в зависимости от длины волны облучения.

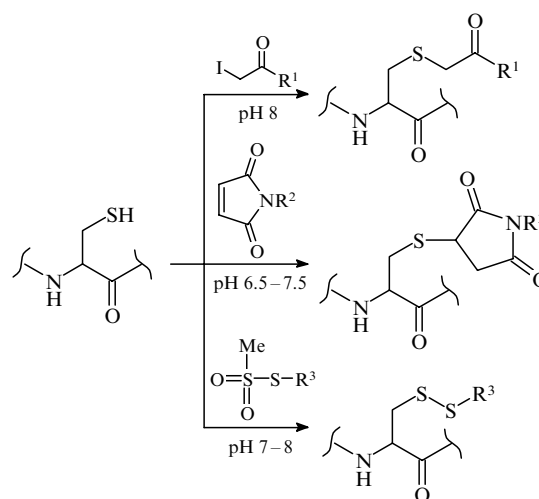
III. Введение фрагмента азобензола в состав пептидов и белков

Существуют следующие подходы для встраивания азобензола в пептиды и белки: химическое модифицирование пептидов и белков,^{49–51} получение производных в процессе пептидного синтеза^{16, 23, 52, 53} либо в процессе трансляции *in vitro*^{54–56} и *in vivo*.⁵⁷ В зависимости от выбранного метода для введения азобензольного фрагмента в состав пептида или белка применяются различные соединения.

Для модифицирования пептидов и белков в большинстве случаев используют специфические реакции, в которых участвуют сульфанильные группы остатков цистеина или ε-аминогруппы остатков лизина. Сульфанильная группа остатков цистеина весьма реакционноспособна в слабощелочных условиях, что позволяет вводить ее в реакцию с галогенацетамидами, малеинимидами и тиоэфирами (схема 5).⁵⁸ В последнем случае связь S–S может быть разорвана в присутствии восстановителей с регенерированием исходного белка. Надо также учитывать, что малеинимид специфично реагирует с сульфанильной группой остатка цистеина только при pH 6.5–7.5, а при увеличении pH среды возможна побочная реакция с аминогруппами белка.⁵⁹

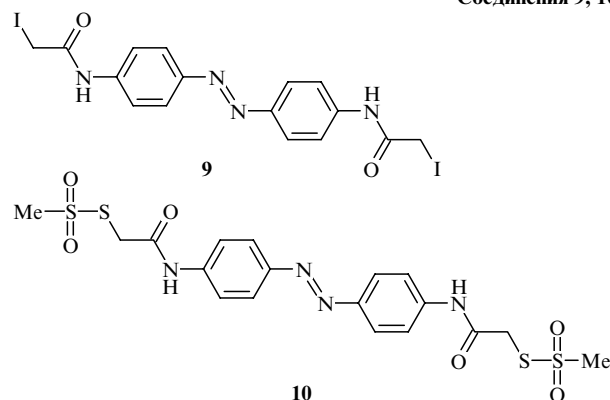
Для модифицирования цистеина было предложено два симметричных реагента на основе диаминоазобензола —

Схема 5

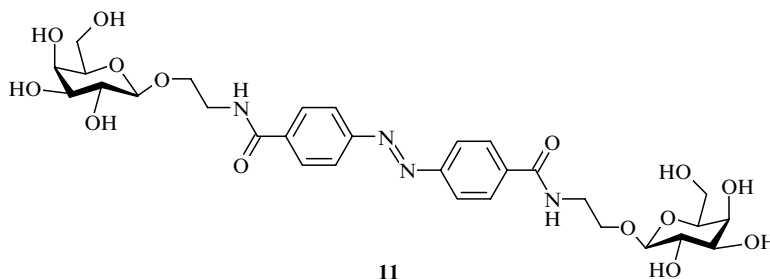


соединения **9** (см.^{50, 60–62}) и **10**.^{51, 63} В случае второго реагента азобензольный фрагмент можно удалить действием восстановителя.

Соединения **9**, **10**



Структура 11



11

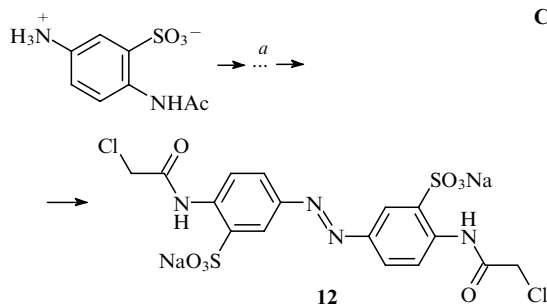


Схема 6

a — 1) NaClO , Na_2CO_3 , H_2O ; 2) HCl , H_2O ; 3) NaOH , H_2O ;
4) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$

Альтернативным вариантом введения фотопереключаемых фрагментов является использование нековалентных взаимодействий. Среди биологических процессов узнавания углеводов-белковое специфическое взаимодействие является относительно слабым, но использование гликокластеров приводит к мультипликативному повышению связывания.⁶⁴ В работе¹⁷ описан синтез нового класса производных азобензола, которые содержат несколько углеводных остатков, полученных в результате ацилирования 2-аминоэтилгликопиранозидов хлорангидридом азобензол-4,4'-дикарбоновой кислоты (соединение 11).

Показано, что в случае взаимодействия лактозного производного азобензола с соответствующим лектином

наблюдается кооперативное связывание. При УФ-облучении (азобензол в *син*-конфигурации) сродство гликозида к лектину увеличивается. Необходимо заметить, что термическая *син* — *анти*-релаксация таких производных азобензола в водном растворе происходит довольно медленно (< 5% за 3 ч).¹⁷

При синтезе азобензолов, содержащих несколько заместителей в бензольных кольцах, необходимо сначала получить подходящие производные анилина с соответствующими заместителями. В результате последующего окислительного сочетания производных анилина под действием гипохлорита натрия,⁶⁵ оксида серебра⁶⁶ или тетрафторобората натрия⁶⁷ образуются симметричные азобензолы. Производные азобензола можно также синтезировать путем восстановления

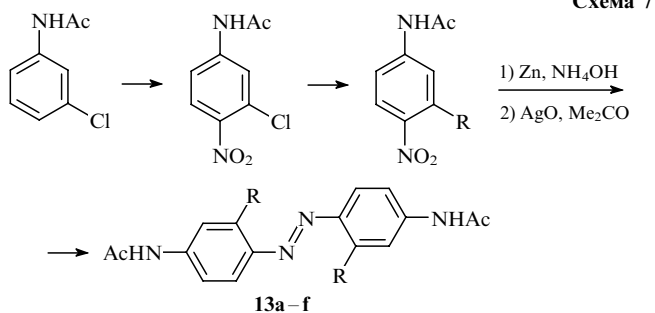


Схема 7

$\text{R} = \text{Me}_2\text{N}$ (a), Et_2N (b), $(\text{CH}_2)_4\text{N}$ (c), $(\text{CH}_2)_5\text{N}$ (d),
 $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ (e), $\text{MeN}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ (f)

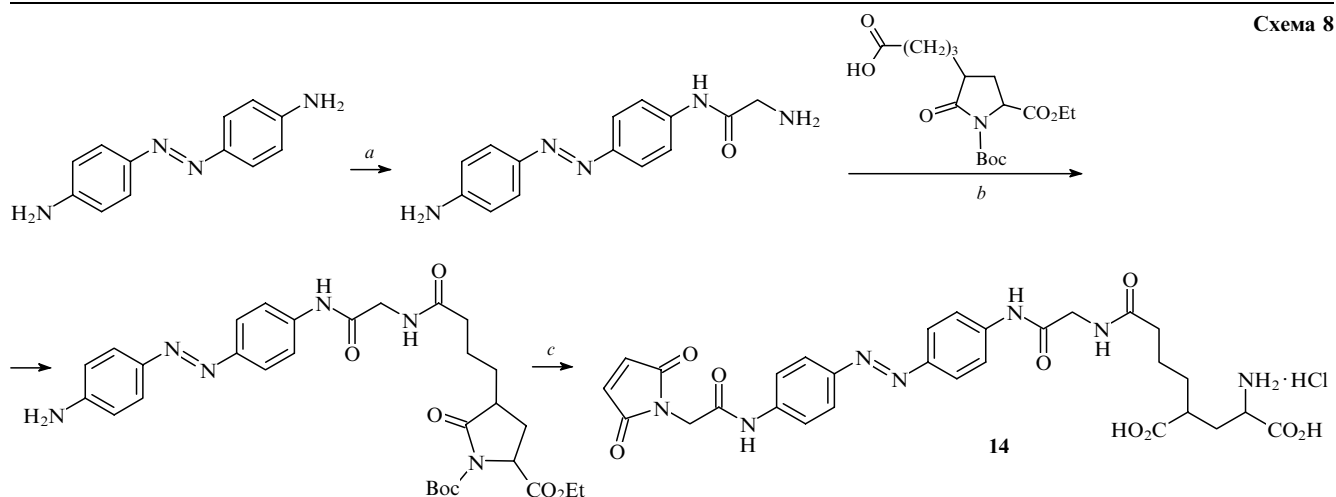
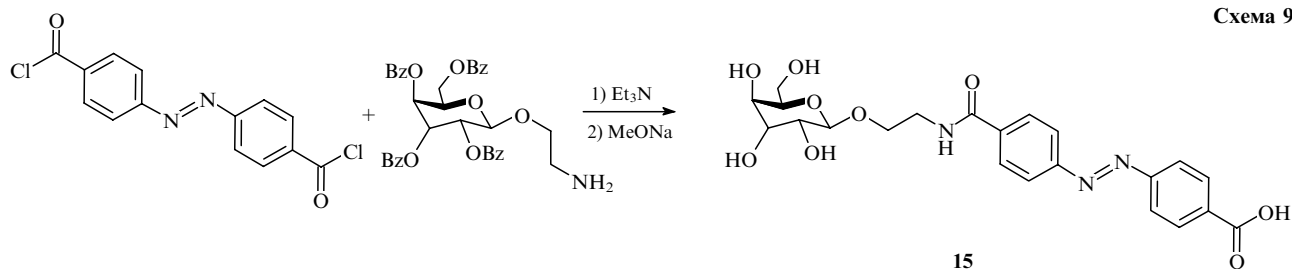


Схема 8

a — 1) Boc-Gly-OH , EDC, HOBT , DIPEA (выход 66%); 2) TFA , CH_2Cl_2 (выход 98%); b — 1) EDC, HOBT , DIPEA (выход 97%);
2) Fmoc-Gly-OH , $(\text{COCl})_2$, DMF ; 3) пиперидин, DMF (выход 43% в расчете на 2 стадии); c — 1) 1 M LiOH в H_2O , THF , 0°C (выход 80%);
2) N -метоксикарбонилмалеинимид, NaHCO_3 , THF , H_2O (выход 71%); 3) EtOAc , нас. HCl (выход 87%);

Boc — *трет*-бутоксикарбонил, EDC — 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид, HOBT — гидроксибензотриазол, DIPEA — диизопропилэтиламин, TFA — трифторуксусная кислота



нитробензолов хлоридом олова(II).⁶⁸ Плохая растворимость производных азобензола в воде затрудняет их использование для модифицирования белков. Для преодоления этого недостатка синтезированы соединения, содержащие сульфо- или аминогруппы в ароматическом ядре. Например, водорастворимое сульфопроизводное азобензола **12** получено окислением 5-амино-2-ацетиламинобензолсульфоновой кислоты гипохлоритом натрия с последующим ацилированием ароматической аминогруппы (схема 6).^{60, 65, 69}

4,4'-Диацетидазобензолы **13a–f** с различными аминогруппами в положениях 2 и 2' синтезированы в несколько стадий из *N*-(3-хлорфенил)ацетамида. На заключительном этапе проводят окисление соответствующего замещенного ацетидаанилина оксидом серебра (схема 7).⁶⁶ Показано, что гидрофобные взаимодействия между заместителями в положениях 2 и 2' азобензола стабилизирует *син*-конфигурацию азобензола.

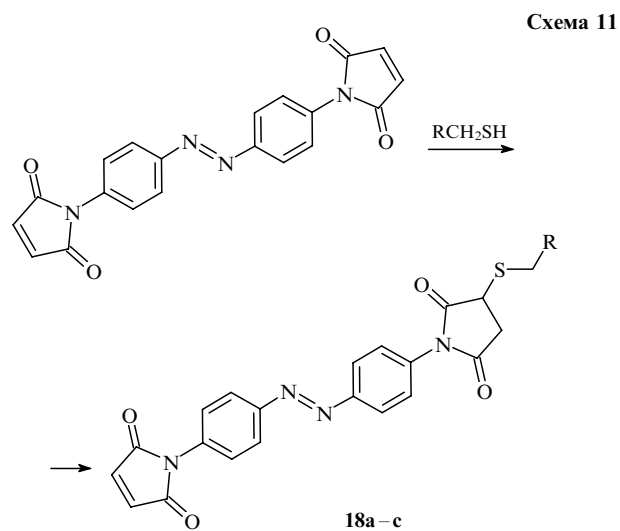
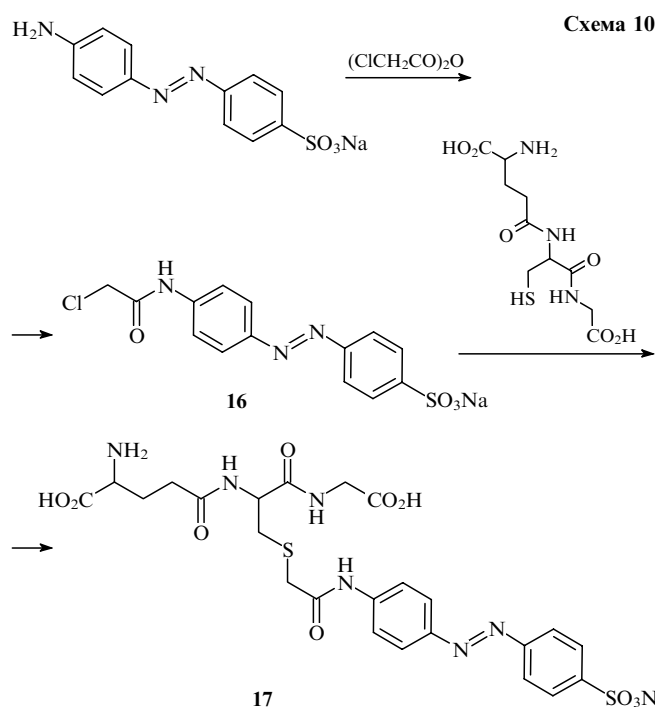
Симметричные производные азобензола часто применяются в качестве «сшивающих» реагентов для соединения двух сближенных остатков цистеина пептида или белка. При необходимости модифицировать один аминокислотный остаток используют несимметричные производные азобензола, содержащие в одном из бензольных колец реакционноспособную группу, а в другом — различные заместители. Как правило, для получения таких соединений диаминоазобензол на начальной стадии ацилируют одним эквивалентом карбоновой кислоты (схема 8). Например, соединение **14**, содержащее остаток глутаминовой кислоты, использовалось для аллостерического регулирования активности глутаматного рецептора посредством света.⁴⁹

Аналогичным способом было получено монопроизводное азобензолдикарбоновой кислоты **15** (схема 9).¹⁷

В качестве исходных соединений могут также выступать коммерчески доступные несимметричные производные азобензола (схема 10).⁷⁰ Соединение **16** применяли для модифицирования белка α -гемоллизина. Показано, что скорость термической *анти*–*син*-релаксации производного азобензола **16** в 4 раза выше, чем скорость термической релаксации соединения **17**, содержащего трипептид глутатион.

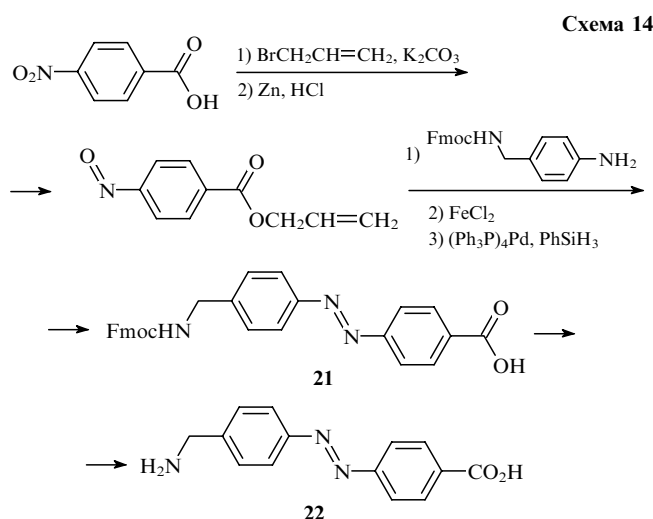
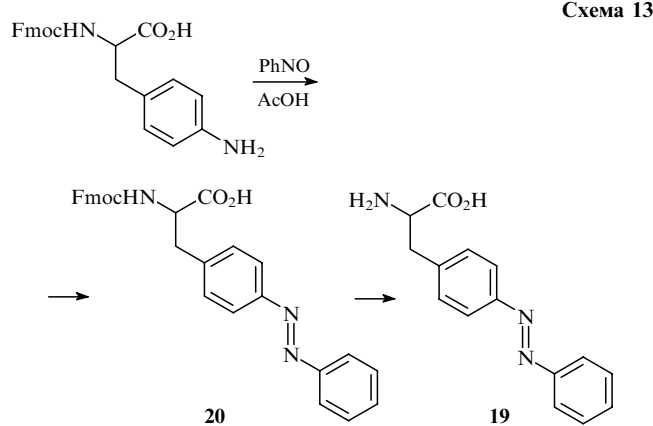
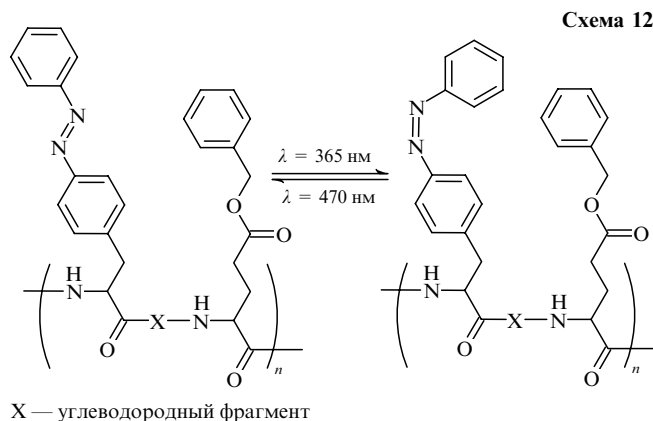
Для регулирования активного центра белка использовали несимметричные производные азобензола с малеинимидным фрагментом.⁷¹ Например, с этой целью были получены соединения **18a–c**, содержащие в одном бензольном кольце незамещенный малеинимид для связывания с остатком цистеина белка, а в другом — малеинимид с периферийной гидроксильной, карбоксильной или аминокислотной группой (схема 11).

Авторы работы⁷² в 60-х годах прошлого века впервые предложили использовать азобензолсодержащую аминокислоту (4'-фенилазофенилаланин, PAF, **19**) для модифицирования пептидов. Фоторегулирование конформации поли- α -аминокислоты в сополимере 4'-фенилазофенилаланина с γ -бензилглутаминовой кислотой осуществлялось под действием видимого света (схема 12).



R = CH₂OH (a), CH₂CO₂H (b), CH(CO₂H)NH₂ (c)

Реагенты для твердофазного пептидного синтеза — Fmoc-защищенные 4'-фенилазофенилаланин **20** (схема 13)²⁸ и 4-(аминометил)фенилазобензойная кислота **21** (схема 14) (см.⁷³) — синтезировали реакцией сочетания соответствующих производных анилина и нитрозобензола.

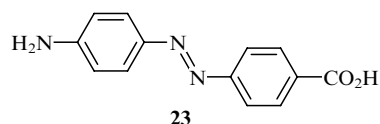


Такие Fmoc-защищенные неприродные аминокислоты, содержащие «фотопереклюатель» либо в боковой цепи (соединение **20**), либо в основной (соединение **21**), были использованы для введения фрагмента азобензола в пептид. Например, Fmoc-защищенную аминокислоту **20** включали в состав S-пептида в процессе стандартного твердофазного пептидного синтеза.

Чмиелевский и Улисс⁷⁴ первыми разработали методику включения 4-(аминометил)фенилазобензойной кислоты (**22**) в полипептидный остов с помощью твердофазного пептидного синтеза. Затем указанную аминокислоту вводили в

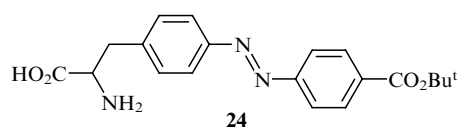
пептид γ-ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив) для регулирования белок-белкового взаимодействия. Реннер и соавт.^{22, 23} синтезировали другой хромофор — 4-аминофенилазобензойную кислоту (**23**), который, по мнению авторов, должен был увеличить влияние азобензольного фрагмента на структуру пептида.

Структура 23



Неприродные аминокислоты часто вводят в состав белка в процессе трансляции *in vitro* с использованием четырех-нуклеотидных кодонов.^{56, 75} Так, соединение **24** включали в состав белка аминоксил-тРНК_{CCCG}.

Структура 24



Модифицированная тРНК была получена лигированием конъюгата pdCpA-**24** с тРНК_{CCCG}(-CA) (т.е. тРНК с антикодоном CCCG без динуклеотида CA на 3'-конце) с помощью T4 РНК-лигазы. Трансляцию осуществляли с мутантной мРНК, содержащей четырехнуклеотидный кодон, во внеклеточной трансляционной системе, которая включала синтетическую аминоксил-**24**-тРНК_{CCCG} и 30S-субъединицу рибосомы в экстракте клеток *Escherichia coli*. Эффективность введения неприродной аминокислоты **24** составляла приблизительно 40%. Согласно этому методу, соединение **24**, содержащее фрагмент азобензола, включалось в определенное положение эндонуклеазы рестрикции BamHI.⁵⁴

Возможность введения неприродной светочувствительной аминокислоты в определенное положение белка, находящегося непосредственно в живом организме, значительно расширяет область фоторегулирования биологических процессов. В работе⁵⁷ описано получение пары тРНК и аминоксил-тРНК-синтазы, которая позволяет селективно вводить светочувствительную аминокислоту 4'-фенилазо-фенилаланин (**19**) в белки в клетках *E. coli*. Поскольку РАР близок по структуре к тирозину, авторы использовали мутантную форму тирозин-тРНК-синтазы для получения РАР-тРНК. Образующаяся РАР-тРНК представляет собой тирозин-тРНК с антикодоном CUA, соответствующим стоп-кодону UAG. Из данных работы⁵⁷ следует, что пара РАР-тРНК и РАР-тРНК-синтаза может эффективно работать, не влияя на другие тРНК или тРНК-синтазы в клетках *E. coli*.

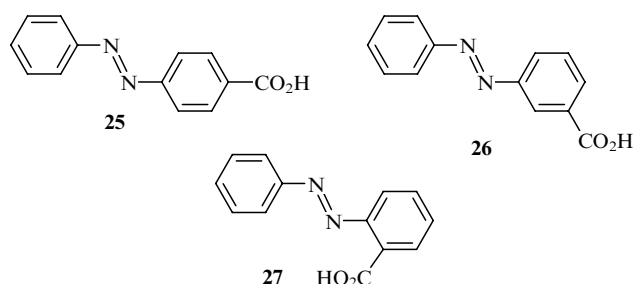
Таким образом, для введения фрагмента азобензола в пептиды или белки используют четыре подхода: в процессе пептидного синтеза, трансляциями *in vitro* и *in vivo*, а также химическим модифицированием биомолекул. Из их сравнения следует, что химическое модифицирование является наиболее простым, эффективным и широко используемым методом. Реакционноспособные производные азобензола, применяемые для этих целей, получают двумя способами — превращениями простых и доступных азобензолов или сочетанием анилинов с нитрозобензолами различного строения.

IV. Фоторегулирование активности белков

Регулирование активности ферментов под действием света можно осуществлять двумя путями: прямым методом, когда «фотопереключатель» присоединен к белку, и косвенным, при котором фрагмент азобензола включен в субстрат, лиганд или ингибитор белка. Чтобы достичь эффекта переключения, необходимо сконструировать такую систему, в которой минимальное изменение геометрии фотохромного соединения существенно влияет на структуру или активность белка. Известно, что в темноте азобензол существует в более стабильной *анти*-конфигурации, которая изомеризуется в *син*-форму только при УФ-облучении. Однако чистый *син*-изомер азобензола при облучении УФ-светом не образуется. С другой стороны, при инкубации азобензола в темноте или при облучении голубым светом можно получить смесь, обогащенную *анти*-формой и содержащую *син*-изомер в виде небольшой примеси.⁷⁶ Следовательно, чтобы белок обладал фоторегулируемой активностью в отсутствие постоянного УФ-облучения, нужно создать такую молекулу, которая была бы неактивна при *анти*-конфигурации азобензола и становилась активной после облучения УФ-светом, когда азобензол имеет *син*-конфигурацию. Было показано, что пептид или белок, модифицированный симметричными производными азобензола, может обратимо изменять свою конфигурацию и(или) активность при изменении длины волны возбуждающего света.^{61, 71, 77, 78} Известно также, что в этих же условиях функциональная активность белков, модифицированных несимметричными производными азобензола, может изменяться *in vivo*^{70, 79, 80} и *in vitro*.^{19, 81–84} Для ферментов имеется ограниченное число примеров, когда модифицирование производными азобензола позволяет регулировать их активность при облучении.^{54, 55, 85–88}

Описаны примеры нерегиоселективного модифицирования белков, например ацилирование остатков лизина. В случае папаина⁸⁶ были использованы карбоксильные производные **25–27**. Продemonстрировано, что активность *anti*-**25**-рапаин и *anti*-**26**-рапаин составляет 80 и 36% от активности папаина дикого типа. При этом *anti*-**27**-рапаин полностью теряет активность после введения азобензольного фрагмента. Показано также, что *anti*-**25**-рапаин в 2.75 раз более активен, чем *syn*-**25**-рапаин.

Структуры **25–27**



Следовательно, неспецифическое модифицирование белка производными азобензола может оказаться несложной процедурой, так как для ее осуществления не нужно знать структуру белка, а химическая реакция осуществляется непосредственно с диким типом фермента. Однако невозможно предсказать поведение фермента после присоединения к нему нескольких фрагментов азобензола (обычно в белке содержится много остатков лизина), не зная мест локализации модифицированных звеньев. Конструирование фоторегулируемого фермента представляется более рацио-

нальным, если остатки азобензола будут присоединяться к ферменту определенным образом.

1. Регулирование структуры α -спирали

α -Спираль является распространенным структурным элементом в пептидах и белках и играет важную роль в белок-белковом и ДНК-белковом узнавании, а также в связывании белков с лигандами. В результате «фотопереключения» происходит либо разрушение α -спирали, либо изменение ее параметров. Сначала идея фоторегулирования α -спирали была реализована на примере пептида.⁵⁰ Для этого в состав пептида вводили два остатка цистеина и соединяли их бифункциональным линкером на основе азобензола (рис. 4). Такой вариант регулирования структуры белка был назван методом «молекулярной пружины».

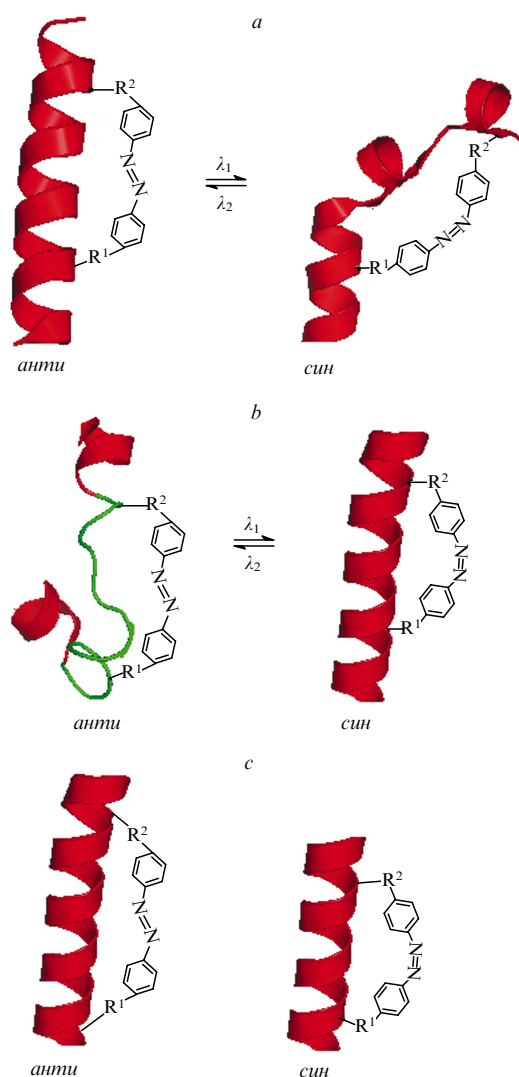
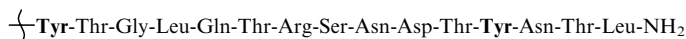
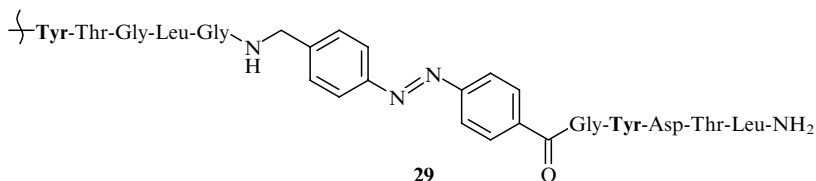


Рис. 4. Образование α -спирали при *анти*-конфигурации азобензола и ее разрушение при переходе азобензола в *син*-конфигурацию (а), образование α -спирали при *син*-конфигурации азобензола и ее разрушение при переходе азобензола в *анти*-конфигурацию (б) и образование α -спиралей различной структуры при *анти*- или *син*-конфигурации одного и того же «сшивающего» реагента на основе азобензола (с).⁵⁰ Здесь и далее λ_1 и λ_2 — длины волн, используемые для обратимого «фотопереключения».



28



29

В качестве «сшивающих» реагентов обычно используют симметричные производные азобензола. Было реализовано два варианта, в зависимости от того, в какой конфигурации азобензол стабилизирует α -спираль — в *анти*- (см. рис. 4,а)^{65, 69} или в *син*-конфигурации^{24, 50, 51, 87} (см. рис. 4,б). Для оптимизации эффекта фоторегулирования варьировали положение остатков цистеина в α -спирали и длину «сшивающих» реагентов (см. рис. 4,с). На примере «лейциновой молнии», образующейся в результате димеризации двух параллельных лейцинбогатых α -спиралей, было продемонстрировано, что «фотопереключение» структуры α -спиралей сильно влияет на их димеризацию и эффективность связывания ДНК.⁸⁸ Далее этот подход был распространен на ДНК-связывающий домен транскрипционного активатора bZIP GCN4 из дрожжей.⁷⁸ В темноте содержание α -спиралей в модифицированном белке снижается по сравнению с диким типом, а при облучении УФ-светом наблюдается повышение содержания α -спиралей и увеличение (в ~ 20 раз) сродства ДНК к белку. Авторы отмечают, что изменение ДНК-связывающей активности указанного модифицированного белка является полностью обратимым.

Впоследствии подход «молекулярной пружины» использовали для фактора транскрипции MyoD, который принадлежит к семейству белков, содержащих структурный элемент «спираль–петля–спираль» для связывания ДНК.⁸⁹ При облучении УФ-светом (азобензол находится в основном в *син*-конфигурации) происходит стабилизация α -спирали, что приводит к формированию ДНК-белкового комплекса. Интересно отметить, что сродство photoMyoD к контрольной ДНК, не содержащей специфической последовательности, одинаково в темноте и при облучении. Эффективность связывания photoMyoD со специфическим ДНК-лигандом повышается на два порядка после активации УФ-светом, что является самым большим из известных к настоящему времени эффектов «фотопереключения» для белка. Возможно, это вызвано минимальным изменением в структуре мотива «спираль–петля–спираль» фактора транскрипции MyoD, приводящим к существенному изменению сродства белка к ДНК-лиганду.

Методом «молекулярной пружины» осуществлено и регулирование белок-белковых взаимодействий на примере тирозинкиназы Syk.⁷⁴ Белок Syk включает в себя киназный домен и тандем из двух SH2-доменов (tSH2), которые играют ключевую роль в связывании со специфическим рецептором, содержащим внутриклеточную последовательность аминокислот, называемую ITAM. После того как два остатка тирозина в последовательности ITAM фосфорилируются, тандем из двух SH2-доменов белка Syk связывается с ITAM, что приводит к активации киназного домена Syk-белка. Поскольку расстояние между двумя остатками тирозинфосфатов в нативном γ -ITAM-пептиде (структура 28) играет важную роль в связывании тандема SH2-доменов белка Syk с ITAM-последовательностью рецептора, был синтезирован

фоторегулируемый ITAM-пептид (photoITAM, 29), содержащий азобензольный фрагмент. Показано, что эффективность связывания photoITAM с белком Syk в 10 раз меньше при *син*-конфигурации азобензола, чем при *анти*-конфигурации, что позволяет регулировать передачу сигналов посредством изменения рецептора под действием света.

Подход «молекулярной пружины» был развит на примере специально сконструированного аналога фермента PvuII. В растворе wt.PvuII существует в форме димера, состоящего из двух идентичных субъединиц. Авторы работы⁹⁰ использовали мутантную форму фермента scPvuII (single chain PvuII), в которой С-конец одной субъединицы (N-субъединица) соединен с N-концом другой субъединицы (С-субъединица) четырехзвенным пептидным линкером Gly-Ser-Gly-Gly. Для регулирования активности такой мутантной формы PvuII использовали 4,4'-бис(малеинимида)азобензол, соединяющий два сближенных остатка цистеина белка. Наилучшего результата — 16-кратного различия в скоростях гидролиза ДНК при облучении УФ- и голубым светом — удалось добиться, когда два фрагмента бис(малеинимида)азобензола находятся рядом с каталитическим центром, а каталитически важный остаток Tyr94 в непосредственной близости от него заменен на Phe для уменьшения исходной активности фермента.⁹⁰

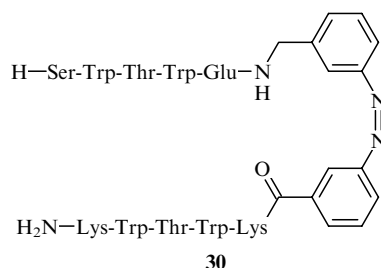
2. Изменение структуры β -шпильки в пептиде

Самым малым структурным мотивом, содержащим β -лист, является β -шпилька, где два антипараллельных β -тяжа связаны одним поворотом или небольшой петлей (рис. 5).



Рис. 5. Схематичное изображение β -шпильки.²³

β -Шпильки часто участвуют в белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействиях, однако структура β -шпильки нестабильна и ее трудно охарактеризовать спектральными методами. Авторы работы⁹¹ обнаружили структурный мотив «триптофановой молнии» (trpzip), который стабилизирует конфигурацию β -шпильки в коротких пептидах. Был синтезирован фотопереключаемый аналог «триптофановой молнии» на основе азобензола (структура 30).²³



При *син-анти*-переходе наблюдалось разрушение структуры β -шпильки.

3. Фоторегулирование связывания ДНК с пептидом, содержащим структурный мотив «цинковый палец»

Мотив «цинковый палец» присутствует в структуре многих эукариотических факторов транскрипции. С их помощью белки могут сайт-специфически связываться с ДНК-дуплексами. Многочисленные мутантные белки с мотивом «цинковый палец» были сконструированы для контроля экспрессии генов на уровне транскрипции, для подавления репликации вирусов,^{92–95} ингибирования теломеразы,⁹⁶ расщепления ДНК и сайт-направленного модифицирования ДНК.^{97–100}

Номура и Окамото¹⁰¹ синтезировали конъюгат пептида **31**, содержащего мотив «цинковый палец» и фрагмент азобензола на N-конце пептида (рис. 6). Соединение **31** узнает специфическую последовательность ДНК 5'-GGGGCG-3' после формирования структуры «цинковый палец». Этот пептид связывается с ДНК, реализуя различные типы взаи-

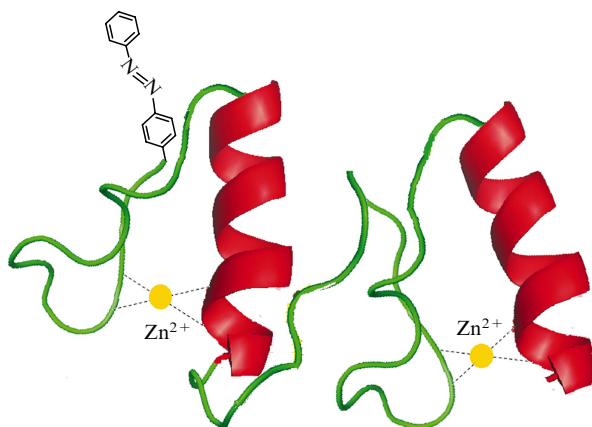


Рис. 6. Пространственное изображение конъюгата пептида **31**, содержащего мотив «цинковый палец» и модифицированного азобензолом.¹⁰¹

Структура 30

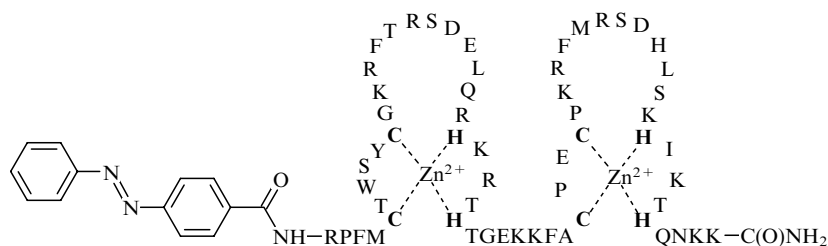
модействий, такие как водородные связи между гетероциклическими основаниями ДНК и аминокислотами в α -спирали «цинкового пальца», электростатические контакты между фосфатными группами ДНК и основными аминокислотами. Модификация на N-конце пептида не меняет структуру и функцию мотива «цинковый палец», однако азобензол расположен рядом с областью связывания ДНК с пептидом, и его изомеризация может существенно влиять на эффективность образования пептидо-нуклеинового комплекса. После фотоизомеризации двойной связи азобензола ДНК-связывающая способность пептида значительно снижается, что позволяет контролировать ДНК-белковое взаимодействие с помощью УФ-излучения.¹⁰¹

4. Связывание активатора транскрипции CAP с 3',5'-аденозинциклофосфатом

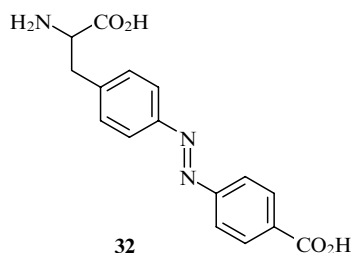
Возможность регулирования эффективности связывания факторов транскрипции клеток *E. coli* с промоторами при введении в белок *in vivo* фоточувствительной аминокислоты 4'-фенилазофенилаланина (**19**) была продемонстрирована на примере белка катаболита (CAP), который представляет собой гомодимерный бактериальный активатор транскрипции.⁵⁷ Связывание CAP с 3',5'-аденозинциклофосфатом (сАМР) приводит к изменению конформации белка, что повышает его сродство к своему промотору, и в результате увеличивается уровень транскрипции. Согласно данным о кристаллической структуре тройного комплекса CAP–сАМР–ДНК, вблизи остатков аминокислот, которые образуют сложную сеть при взаимодействии CAP с сАМР, находится Ile71. Фрагмент РАР был введен в катаболит вместо этой аминокислоты с образованием структуры CAP71РАР. Показано, что до облучения УФ-светом константа связывания CAP71РАР с промотором лактозы была в 4 раза выше, чем после облучения светом с длиной волны 334 нм.

5. Регулирование процесса димеризации белковых субъединиц

Эндонуклеаза рестрикции (ЭР) BamHI (R.BamHI) может специфически гидролизовать ДНК-дуплекс только после формирования правильной димерной формы фермента.¹⁰² Накаяма и соавт.⁵⁴ предложили способ регулирования активности этого фермента, влияя на процесс димеризации. Аминокислоты в интерфейсе димера, которые играют ключевую роль в образовании сети солевых мостиков, необходимых для поддержания конформации димера BamHI в активной форме, были заменены на фенилазофенилаланин **19** или его 4-карбоксисодержащий аналог **32** с образованием фотоактивируемых ЭР **19-BamHI** и **32-BamHI**.



Структура 31



В темноте ДНК-гидролизующая активность фермента (*anti*-19-VamHI) подавлена для одной из его мутантных форм (степень расщепления ДНК-субстрата составляет только 3%). После облучения УФ-светом активность фермента (*syn*-PAP1-VamHI) восстанавливается (степень расщепления ДНК-субстрата составляет 98%). После облучения модифицированного фермента светом с длиной волны 436 нм (для превращения *син*-азобензола в *анти*-изомер) ожидалось снижение активности фермента. Однако никакого изменения в активности фермента не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что после образования правильной конформации димера R.VamHI (*син*-азобензол, активный фермент) обратное превращение затруднено.

Авторы предложили два возможных механизма регулирования ферментативной активности R.VamHI посредством *анти*–*син*-изомеризации азобензола. Первый механизм заключается в том, что азобензольный остаток в *анти*-конфигурации препятствует взаимодействию двух мономеров R.VamHI для правильного формирования димера фермента. Более компактная структура *син*-конфигурации азобензола не препятствует формированию активного фермента. Согласно второму механизму, азобензольный фрагмент меняет локальную структуру мономера R.VamHI вокруг хромофора за счет взаимодействия ароматических колец с поверхностью белка. Так как *син*-азобензол более компактен по сравнению с *анти*-изомером, площадь контакта между белком и *син*-изомером меньше, чем между белком и *анти*-изомером. В результате *анти*-изомер азобензола меняет локальную структуру в интерфейсе димера в большей степени, чем *син*-изомер. Для ЭР 32-VamHI с карбоксильной группой в азобензольном фрагменте продемон-

стрировано, что его активность восстанавливается после УФ-облучения быстрее, чем активность аналога 19-VamHI. Это означает, что отрицательный заряд карбоксильной группы в соединении 32 влияет на димеризацию ЭР 32-VamHI в процессе *анти*–*син*-изомеризации.

6. Метод «молекулярных ворот»

Для контролирования активности гомодимерных ДНК-связывающих белков разработана также стратегия «молекулярных ворот», эффективность которой была продемонстрирована на примере ЭР SsoII.¹⁰³ Эндонуклеаза рестрикции при взаимодействии с субстратом подвергается конформационным изменениям, что позволяет ДНК подойти к ДНК-связывающему центру фермента, который находится в интерфейсе между двумя субъединицами гомодимера.^{104, 105} В ходе исследования были получены различные мутантные формы ЭР SsoII, в которых выбранные для модифицирования остатки были заменены на цистеин. Модифицируя белок несимметричными производными азобензола вблизи ДНК-связывающего или каталитического центра, можно сделать его недоступным для подхода ДНК из-за стерических препятствий в случае более «вытянутой» *анти*-конфигурации производных азобензола.⁷¹ Поскольку *анти*-конфигурация азобензола более стабильна, чем *син*-форма, модифицированный фермент не может связываться с ДНК-субстратом и поэтому неактивен. При облучении УФ-светом происходит превращение *анти*-конфигурации азобензола в более компактную *син*-конфигурацию, расстояние (*R*) между концами двух фрагментов азобензола увеличивается, и субстрат может попасть в ДНК-связывающий центр белка (рис. 7).

Начальная скорость гидролиза ДНК под действием света с $\lambda = 365$ и 470 нм различалась в 2 раза, когда в каждой субъединице R.SsoII к остатку Cys, находящемуся внутри ДНК-связывающего «кармана» (C224), и к остатку Cys, локализованному на его внешней поверхности (C174), были присоединены производные азобензола, содержащие гидроксильную группу (рис. 8,а). Такой же эффект достигался при сближении хелатообразующих групп азобензола, присоединенных к остатку Cys171, за счет формирования комплексного соединения в присутствии ионов никеля (см. рис. 8,б).¹⁰³

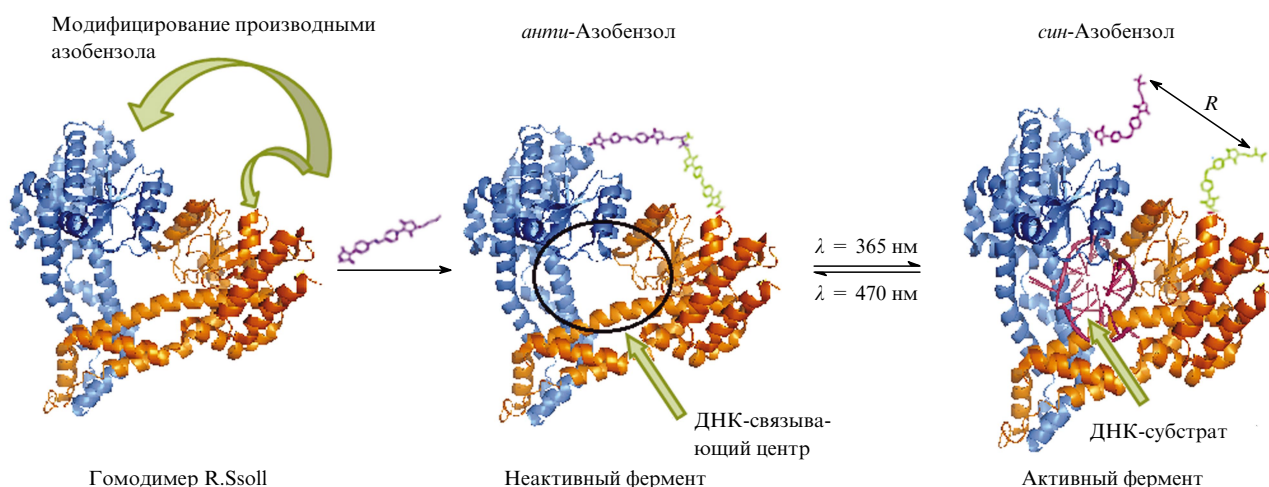


Рис. 7. Принцип стратегии «молекулярных ворот» на примере ЭР SsoII.¹⁰³

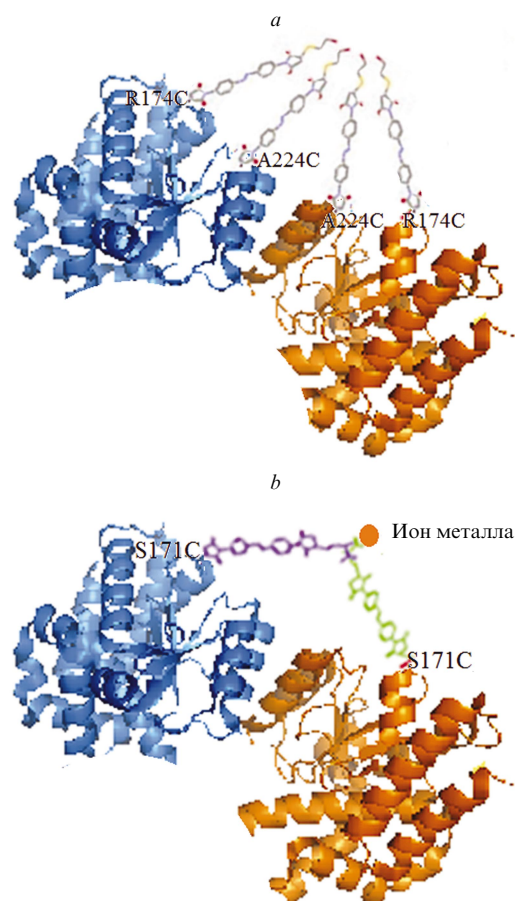


Рис. 8. Схематическое изображение метода «молекулярных ворот», показывающее обратимое блокирование активного центра белка с помощью производных азобензола: *a* — образование водородных связей с участием гидроксильных групп, *b* — комплексообразование в присутствии иона металла.¹⁰³

V. Применение фоторегулируемых субстратов, ингибиторов и лигандов для регулирования активности белков

1. Фоторегулируемые субстраты

Для регулирования активности НК-связывающих белков можно использовать олигонуклеотидные аналоги субстратов, которые изменяют свои свойства при облучении светом. Конфигурация азобензольного остатка влияет на стабильность ДНК-дуплекса,¹⁰⁶ что позволяет косвенно регулировать активность ферментов. РНК-Полимеразы (РНКП) фагов SP6 и T7 относятся к классу ДНК-зависимых РНК-полимераз и имеют специфические индивидуальные промоторные последовательности. Оба промотора состоят из 17 пар нуклеотидов и включают РНКП-узнающую последовательность

(позиции от –17 до –5) и ТАТА-область (позиции от –4 до –1). В каждую из этих областей промотора SP6 были введены азобензольные фрагменты и исследована фоторегулирующая способность такого промотора влиять на транскрипцию (рис. 9).¹⁰⁷

При введении модификации только в одну область (РНКП-узнающую или ТАТА) промотора SP6 РНКП эффективность транскрипции под действием облучения не изменялась, в то время как при одновременном введении в обе области наблюдалась заметная разница между количеством продукта транскрипции в темноте и под действием УФ-света. В последнем случае РНК синтезировалась в 3.5 раза быстрее.¹⁰⁷ При облучении УФ-светом (изомеризация азобензола в *син*-конфигурацию) дуплекс в области модифицированного азобензолом промотора диссоциировал. Такая локальная диссоциация дуплекса способствовала образованию открытого комплекса РНКП с промотором, в результате чего начиналась транскрипция. В случае же азобензола в *анти*-конфигурации дуплекс оставался стабильным, и РНКП образовывала в основном закрытый промоторный комплекс.

Фоторегулирование Т7 РНК-полимеразы было достигнуто путем введения производного азобензола, содержащего D-треонинол (см. структуру X_D на схеме 3), в нематричную цепь промотора Т7.¹⁰⁸ Как и в случае SP6 РНКП, транскрипция была сильно замедлена в темноте или при облучении видимым светом, в то время как она эффективно протекала после облучения УФ-светом (рис. 10). Таким образом, с помощью фоточувствительного промотора можно достигнуть переключения транскрипции при облучении светом.

Изучено влияние положения модификации в промоторе Т7 РНКП на транскрипцию. Показано, что если один остаток азобензола введен в промотор в область связывания РНК-полимеразы (позиции от –7 до –11) или в область расплетания ДНК (позиции от –1 до –4), то транскрипция подавляется при существовании азобензола в *анти*-конфигурации и восстанавливается при его изомеризации. Количество транскрипта после облучения УФ-светом в 1.5–2 раза больше, чем в темноте. Как и в случае SP6 РНКП, эффект сильно возрастает, если два фрагмента азобензола введены в обе указанные области: после облучения УФ-светом транскрипция идет в 7.6 раз быстрее, чем в темноте, но в два раза медленнее по сравнению с немодифицированным Т7-промотором.

В работе¹⁰⁹ исследовали влияние фоторегулирования транскрипции с участием Т7 РНК-полимеразы на трансляцию зеленого флуоресцентного белка (GFP). При измерении интенсивности флуоресценции в результате транскрипции *in vitro* и последующей трансляции было показано, что экспрессию гена GFP можно регулировать с помощью света. Максимальное различие в эффективности экспрессии гена достигало двух раз.

Рибонуклеаза Н (РНКазы Н) гидролизует РНК в составе гибридного РНК/ДНК-дуплекса. Метод регулирования ее активности основан на существенном различии в термической стабильности ДНК/ДНК-дуплекса, содержащего

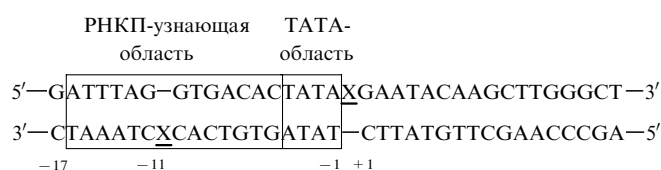


Рис. 9. Последовательность модифицированного SP6-промотора.¹⁰⁷ X — остаток фосфата *N*-(4-карбоксиазобензоил)-D-треонина (X_D).

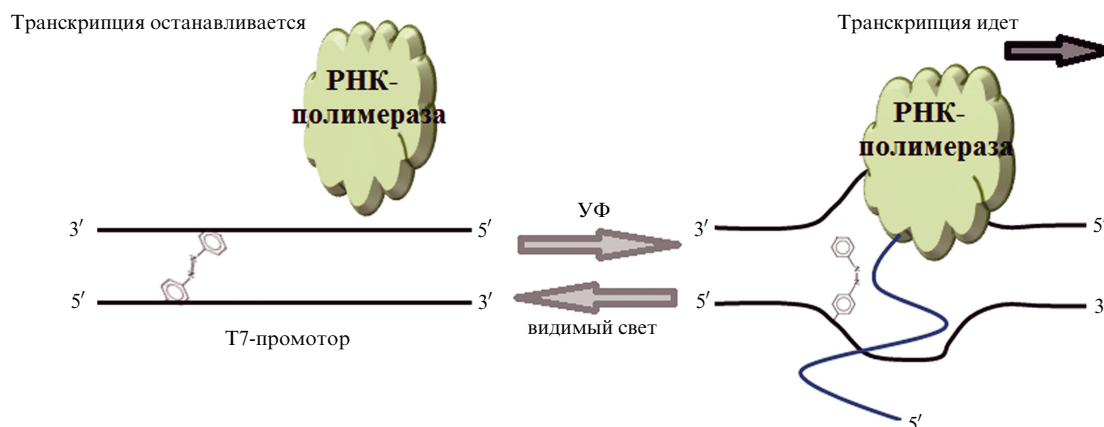


Рис. 10. Фоторегулирование транскрипционной активности T7 РНК-полимеразы.¹⁰⁸

производные азобензола в *син*–*анти*-конфигурациях.¹¹⁰ «Фотопереклюатель» на основе азобензола, присоединенного к D-треонину (X_D), был введен в смысловую цепь ДНК в качестве дополнительного звена. В темноте азобензол находится в *анти*-конфигурации, что позволяет формировать прочный ДНК-дуплекс, РНК при этом существует в одноцепочечной форме. При облучении УФ-светом азобензол принимает *син*-конфигурацию, термическая стабильность ДНК-дуплекса понижается, и дуплекс диссоциирует. В результате образуется более прочный ДНК/РНК-дуплекс и РНК-цепь расщепляется РНКазой Н. Показано, что эффективность «фотопереключения» повышается с увеличением количества введенных фрагментов азобензола: разница достигает двух раз в случае трех фрагментов азобензола и четырех раз в случае пяти фрагментов азобензола.¹¹⁰

Для оценки действия ПНК как «фотопереклюателя» транскрипции производное азобензола вводили либо на N-, либо на C-конец двух ПНК. При формировании триплекса ПНК-последовательность образует стабильную правую спираль состава ПНК₂/ДНК. Наличие *анти*-азобензольного фрагмента значительно стабилизирует триплекс, в то время как *син*-изомер может стабилизировать или дестабилизировать триплекс в зависимости от положения модификации. Так, введение азобензола на C-конец последовательности ПНК стабилизировало триплекс, в то время как N-концевая азобензольная группа обладала дестабилизирующим эффектом по сравнению с немодифицированным триплексом. *анти*-Конфигурация азобензола в составе ПНК в большей степени увеличивает стабильность триплекса ПНК₂/ДНК по сравнению с *анти*-азобензолом в составе аналогичного ДНК-триплекса.³⁴ Это свойство ПНК позволяет использовать значительно меньшие концентрации олигонуклеотидов и снизить концентрацию Mg^{2+} для узна-

вания целевой последовательности ДНК. Для изучения возможного фоторегулирования транскрипции в качестве модели была рассмотрена транскрипция гена *egfr* (зеленого флуоресцентного белка) в присутствии короткой комплементарной ПНК, содержащей или не содержащей азобензольный фрагмент (рис. 11).³⁴

Пептидо-нуклеиновая кислота, содержащая фрагмент *анти*-азобензола, образует наиболее устойчивую триплексную структуру с целевым одноцепочечным участком гена ($T_{пл} = 58^\circ C$) и является ингибитором транскрипции. Концентрация ПНК, при которой эффективность транскрипции уменьшается в 2 раза (IC_{50}), составляет $35 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Аналогичная ПНК с *син*-азобензолом ($T_{пл} = 45^\circ C$) менее эффективно участвует в образовании триплекса и в два раза менее эффективно ингибирует транскрипцию ($IC_{50} = 90 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$). В отсутствие азобензола ПНК образует самую нестабильную триплексную структуру ($T_{пл} = 40^\circ C$), и ее способность к ингибированию транскрипции еще меньше ($IC_{50} > 125 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$). Замены нуклеотидов, приводящие к образованию некомплементарных пар в участке связывания ПНК с ДНК ($5'-GAAAAAG-3' \rightarrow 5'-GAACGCG-3'$), значительно снижают ингибирующее действие ПНК. В случае такой замены ингибирование транскрипции наблюдается только при высоких концентрациях ПНК ($> 100 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) за счет неспецифического связывания ПНК с ДНК. Таким образом, эти результаты показывают, что производные ПНК взаимодействуют сайт-специфично с целевой одноцепочечной ДНК и при введении производных азобензола могут быть использованы для регулирования транскрипции генов.

2. Фоторегулируемые ингибиторы и лиганды

Много работ посвящено синтезу «фотопереключаемых» ингибиторов и исследованию их способности обратимо ингибировать ферментативную реакцию. Общая структура фоторегулируемых ингибиторов состоит из двух частей: функциональной группы для связывания в активном центре фермента и «фотопереклюателя», имеющего структуру, которая меняется при изменении длины волны возбуждающего света. В случае одной из двух конфигураций «фотопереклюателя» геометрия ингибитора соответствует структуре активного центра фермента и может предотвращать функционирование последнего. При облучении светом определенной длины волны структура «фотопереклюателя» и, следовательно, молекулы ингибитора меняется, и активность фермента восстанавливается.

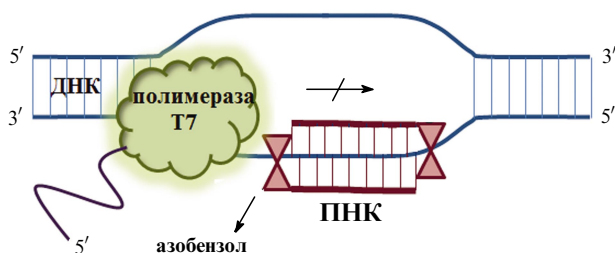
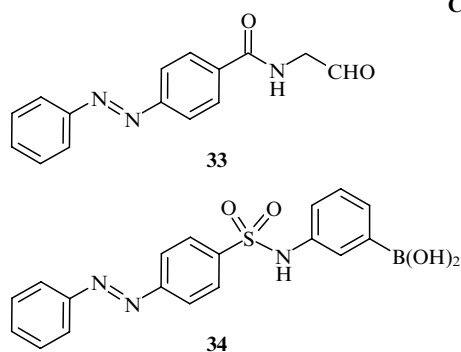


Рис. 11. Механизм ингибирования транскрипции с помощью ПНК с азобензолом.³⁴

Известно, что рибонуклеаза А специфически расщепляется ферментом субтилизином на две части, названные S-пептидом и S-белком. При раздельном существовании они неактивны. При образовании комплекса S-пептида и S-белка активность фермента восстанавливается. Химический синтез аналога S-пептида позволяет ввести неприродные аминокислоты в заранее выбранные положения пептидной цепи. Авторы определили методом ВЭЖХ, что в условиях экспериментов раствор «син»-S-пептида содержит 90% *син*- и 10% *анти*-изомеров фрагмента PAP, а раствор «анти»-S-пептида — 96% *анти*- и 4% *син*-форм.¹⁶ Показано, что *син*–*анти*-изомеризация замещенного азобензола **19** в основном не приводит к значительному изменению активности фермента. Вероятно, такой фрагмент, находясь в боковой цепи полипептида, обладает значительной конформационной подвижностью, и эффект от его изомеризации нивелируется.

Был синтезирован ряд фотохромных ингибиторов цистеиновых протеаз^{111, 112} и сериновых протеаз^{113, 114} и изучена их способность обратимо ингибировать указанные ферменты при облучении. Для цистеиновых протеаз (папаина и кальпаина) функциональной группой ингибитора является альдегид **33**, который обратимо связывается с сульфанильной группой остатка цистеина фермента, образуя полуацеталь в активном центре. Для сериновых протеаз (α -химотрипсина и субтилизина) функциональной группой ингибитора является остаток арилбороновой кислоты **34**, которая может обратимо реагировать с остатком серина в активном центре фермента.¹¹² В обоих случаях «фотопереключателем» молекул ингибиторов являются производные азобензола. Показано, что эффективность ингибирования папаина соединением **33** в *анти*-конфигурации в шесть раз больше, чем в *син*-конфигурации, причем такое переключение обратимо. В случае азобензольного производного **34** ингибирование α -химотрипсина отличается только в 1.3 раза при *анти*–*син*-изомеризации «фотопереключателя».¹¹²

Структуры 33, 34

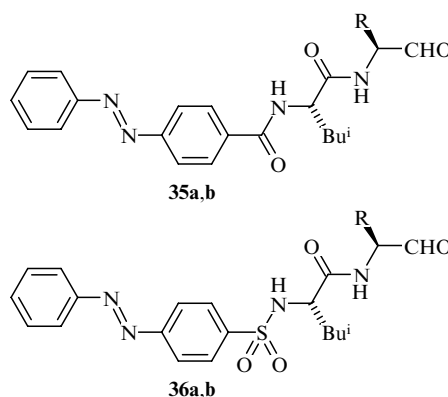


Кальпаин является кальций-зависимой цистеиновой протеазой. Для ингибирования этого фермента были созданы фоторегулируемые дипептиды **35a,b**, **36a,b**.¹¹¹ Они содержат фоточувствительный азобензольный фрагмент на N-конце, который располагается в субстрат-связывающем кармане фермента, и альдегидную группу для обратимого связывания с остатком цистеина активного центра. Кроме того, в фоторегулируемых дипептидах **36a,b** присутствует сульфамидная связь вместо обычной амидной, что повышает устойчивость ингибитора к гидролизу. После облучения УФ-светом эти соединения в 4 раза хуже ингибируют кальпаин, чем до облучения.¹¹¹

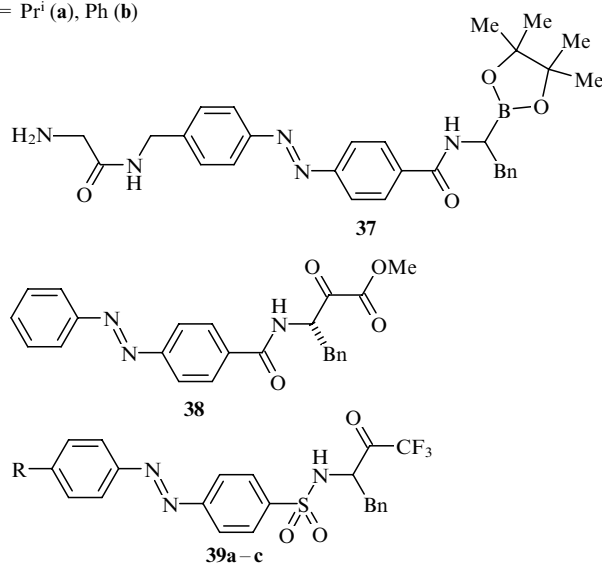
В более поздних работах для ингибирования α -химотрипсина был синтезирован ряд пептидомиметиков, содержащих

различные функциональные группы: эфир бороновой кислоты **37**,¹¹³ α -кетозфир **38** и трифторметилкетоны **39a–c**.¹¹⁴

Структуры 35–39



R = Prⁱ (a), Ph (b)



R = H (a), Br (b), I (c)

Соединение **37** при облучении УФ- и голубым светом разлагается, и его применение оказалось невозможным. α -Кетозфир **38** в *син*-форме ингибирует α -химотрипсин в два раза эффективнее, чем в *анти*-форме. В случае трифторметилкетонпроизводных **39b,c** в *пара*-положении азобензола присутствует атом галогена. Предполагалось, что введение атома галогена за счет его большего размера по сравнению с атомом водорода приведет к увеличению различия в геометрии между *син*- и *анти*-изомерами «фотопереключателя». Показано, что *син*-изомеры производных азобензола, содержащие трифторметилкарбонильный фрагмент, ингибируют α -химотрипсин в 5 раз эффективнее, чем *анти*-изомеры. Регулирование активности белка полностью обратимо, но неполное переключение не позволяет добиться максимального эффекта. Интересное применение таких ингибиторов продемонстрировано в работе¹¹⁴. Авторы иммобилизовали ингибитор на поверхности, что позволило фоторегулировать адсорбцию α -химотрипсина.

Для практического использования необходимо создать эффективный подход к фоторегулируемому связыванию семейства биомолекул на поверхности, результаты которого можно было бы предсказывать и контролировать. В работе¹¹⁵ было изучено обратимое фоторегулирование адсорбции на поверхности золота, покрытой ингибитором. Чередование



Рис. 12. Фоторегулирование экзогенного калиевого канала (SPARK).⁸¹

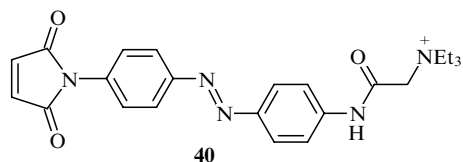
вание облучения УФ- и голубым светом обратимо меняет геометрию азобензола, что приводит к изменению аффинности ингибитора к ферменту и, таким образом, позволяет контролировать связывание протеазы на поверхности. Однако если эксперименты в растворе показали, что ингибитор в *син*-конфигурации снижает активность α -химотрипсина в 3.6 раза по сравнению с *анти*-формой, то в гетерофазной системе активность различалась лишь в 1.7 раза.

Похожий подход для фоторегулирования сорбции клеток, содержащих интегрин на поверхности, которые селективно взаимодействуют с RGD-пептидом (Arg-Gly-Asp), был реализован в работе¹¹⁶. RGD-Пептид иммобилизовали на твердом носителе с помощью линкера, содержащего остаток азобензола. При *анти*-конфигурации азобензола степень адгезии клеток была примерно в 1.5 раза выше, чем в случае *син*-изомера. Данный эффект авторы объясняют уменьшением расстояния между носителем и RGD-пептидом, что снижает конформационную подвижность последнего и степень связывания с интегрином клеток.¹¹⁶

В работах, посвященных фоторегулированию ионных каналов, для химического модифицирования белков использовали лиганды, содержащие фрагмент азобензола. При этом лиганды либо обратимо блокируют пору канала без индуцирования значительного конформационного изменения структуры белка, либо могут взаимодействовать с аллостерическим сайтом связывания, что приводит к такому изменению.

Бангхарт с соавт.⁸¹ создал фоторегулируемый калиевый канал (рис. 12). Известно, что калиевый канал может быть блокирован четвертичным аммониевым ионом (QA), например тетраэтиламмонием.¹¹⁷ Авторы ввели на поверхность канала дополнительный остаток цистеина и с использованием ряда линкеров¹¹⁸ присоединили к нему маленимидо-азобензол **40**, содержащий катион тетраэтиламмония.

Структура 40



В случае мутантной формы E442C калиевого канала, к остатку Cys которой присоединено соединение **40**, электропроводность для *анти*-конфигурации азобензола оказалась в 20 раз меньше, чем для *син*-формы. Это обусловлено тем, что при *анти*-форме азобензола тетраэтиламмониевый лиганд достигает канала и связывается с ним, а при компактной *син*-форме лиганд оттягивается от канала, что восстанавливает

его функционирование. Подобное регулирование является обратимым, что может найти применение в терапии нейронных повреждений.

Кроме химического модифицирования мутантных форм белка, возможно и модифицирование нативного белка. В работах^{119,120} была представлена концепция «фотопереключаемой аффинной модификации», схематически показанная на рис. 13. Для аффинной модификации белков синтезировали производные азобензола, содержащие в одном бензольном кольце электрофильную группу, а в другом — лиганд, выбор структуры которого зависел от природы белка. Далее проводили аффинную модификацию белка производным азобензола (см. рис. 13).

Первоначально лиганд взаимодействует с центром связывания белка, что фиксирует «фотопереключатель» и дает возможность электрофильной группе образовать ковалентную связь преимущественно с аминокислотными остатками, находящимися вблизи от связывающего центра при *анти*-форме «фотопереключателя». При облучении УФ-светом «фотопереключатель» переходит в *син*-форму, что приводит к выходу лиганда из связывающего центра белка и позволяет активировать либо инактивировать белок за счет сближения/удаления лиганда относительно центра связывания. Достоинство этой концепции состоит в том, что она позволяет сделать фоточувствительными нативные белки, находящиеся в клетках. Данный подход особенно полезен для клеточных систем, в которые сложно ввести гены мутантных форм белка.

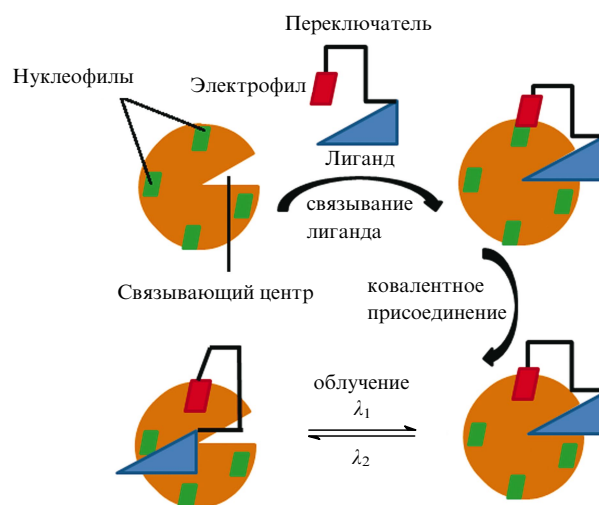
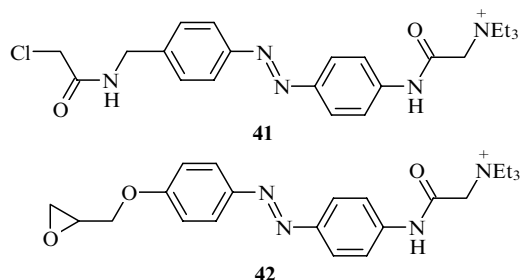


Рис. 13. «Фотопереключаемая» аффинная модификация белка.¹¹⁹

В работе¹¹⁹ рассмотренный выше подход использовали для создания фотоактивируемого калиевого канала. Реагенты для «фотопереключаемого» аффинного присоединения к катионным каналам представляли собой производные азобензола **41**, **42**, содержащие в одном бензольном ядре четвертичный аммониевый ион в качестве лиганда калиевых каналов, а в другом — различные электрофильные группы для модифицирования аминокислотных остатков белка, преимущественно лизина и цистеина.

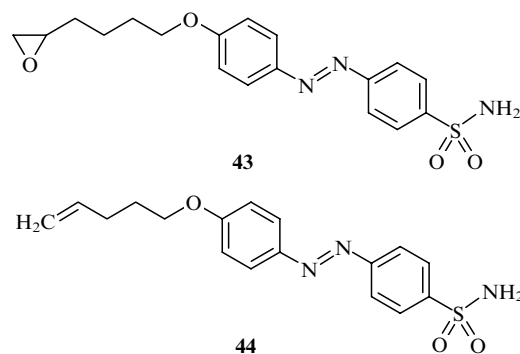
Структуры **41**, **42**



Связывание лиганда в калиевом канале увеличивает локальную концентрацию электрофильных групп, что способствует более селективному ковалентному присоединению реагентов и позволяет получать «фотопереключаемые» калиевые каналы, которые называют PAL-каналами (рис. 14). Показано, что электропроводность PAL-канала при облучении светом с длиной волны 500 нм в 10 раз меньше, чем при облучении УФ-светом. Данный процесс обратим, но при одновременном облучении происходит уменьшение активности PAL-канала.¹¹⁹ Так как четвертичный аммониевый ион не является лигандом для натриевых или кальциевых каналов, то предлагаемый подход не является универсальным.

Подход «фотопереключаемой аффинной модификации» также был применен для контроля активности карбоангидразы путем ковалентного присоединения «фотопереключаемых» ингибиторов.¹¹⁹ Карбоангидраза катализирует обратимую реакцию гидратации углекислого газа для поддержания функционального значения pH. На основе сульфаниламида, известного ингибитора карбоангидразы, синтезировано производное азобензола **43**, содержащее оксирановый цикл. Инкубирование фермента с ингибитором в темноте приводит к значительному уменьшению ферментативной активности. При облучении УФ-светом с длиной волны 380 нм скорость гидролиза указанного субстрата повышается в 2 раза. Переключение является обратимым. При использовании нереакционноспособного аналога **44** активность фермента не зависит от длины волны облучения.

Структуры **43**, **44**



Аллостерический контроль активного центра с помощью дистанционного управления доступностью участка связывания является механизмом регулирования для различных классов белков, от ферментов до моторных и сигнальных белков.

Первая версия фотоконтролируемой системы была описана для никотин-ацетилхолинового рецептора, который фотоактивируется с помощью прикрепленного аналога холина.¹²¹ Результаты этой работы оставались невостребованными долгое время, так как трудно было применить предложенный подход для других белков, не зная их кристаллических структур и не имея в арсенале современных методов инженерии белков. Рассмотренный выше калиевый канал является хорошей мишенью для присоединения «фотопереключаемого» лиганда, потому что пора канала симметрична и расположена в центре широкой поверхности. Однако эти характеристики присущи только калиевому каналу. Большинство белков имеет активный или аллостерический центр, который связывает лиганды внутри белковой глобулы в результате образования сложного специфического комплекса, организованного по принципу «ключ–замок».

Волграф с соавт.⁴⁹ описал подход аллостерического фотоконтроля активности рецепторов на примере ионотропного глутаматного рецептора (iGluR), который представляет собой мембранный рецептор нервных клеток. Взаимодействие лиганд-связывающего домена iGluR с нейромедиатором глутаматом (лигандом) приводит к конформационному изменению трансмембранного домена, в результате чего открывается канал для прохода катионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} (рис. 15,а). На основе iGluR авторы создали его фоторегулируемый вариант — LiGluR (рис. 15,б). Для этого была проведена аффинная модификация остатков Cys мутантных форм белка LiGluR производным азобензола **45** ($n = 0$), содержащим в одном бензольном кольце малеин-

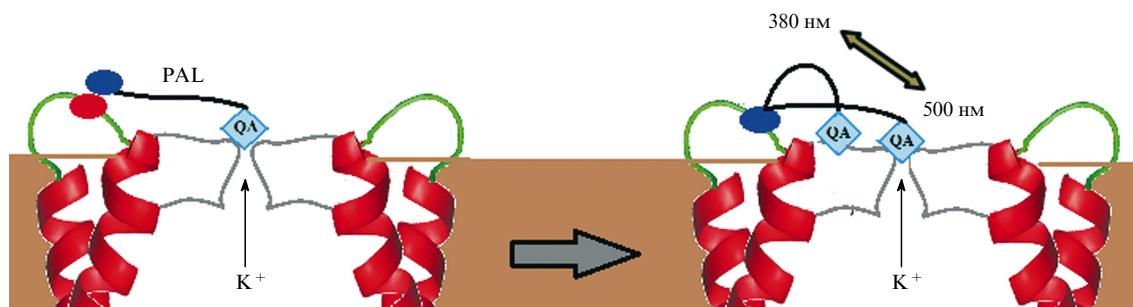


Рис. 14. Образование «фотопереключаемого» калиевого канала.¹¹⁹

PAL — реагент для аффинной модификации; четвертичный аммониевый ион связывается с порой канала.

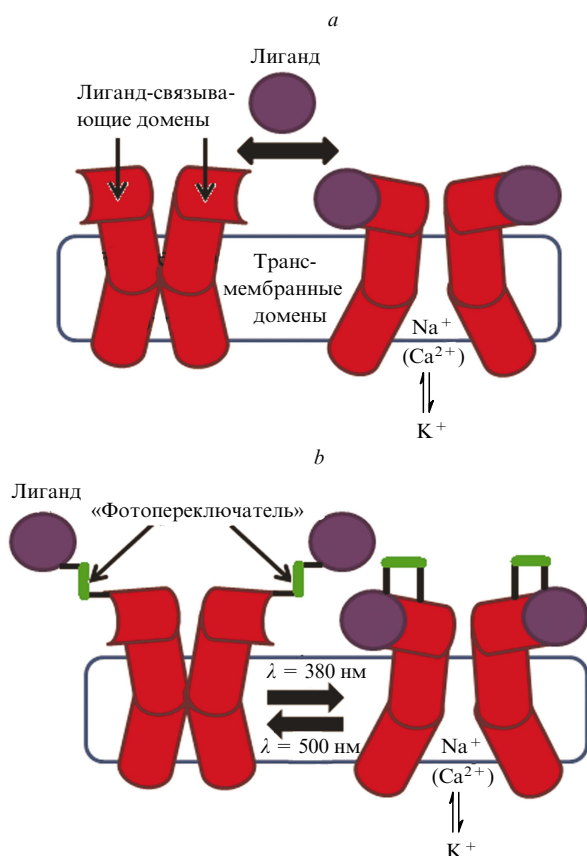


Рис. 15. Дизайн аллостерического «переключателя»: рабочий режим iGluR (a) и LiGluR (b).⁴⁹

имидную группу, а в другом — остаток глутаминовой кислоты (схема 15).

Остатки Cys были введены в лиганд-связывающий домен на определенном расстоянии от лиганд-связывающего сайта LiGluR. Фоторегулирование связывания присоединенного к белку лиганда в лиганд-связывающем домене LiGluR приводит к открытию/закрытию канала для потока катионов.

Авторы работы⁸² варьировали размеры соединения **45** ($n = 1, 2$), т.е. положение остатка Cys в лиганд-связывающем домене ионотропного глутаматного рецептора, и определили длины волн света, при использовании которых для облучения LiGluR наблюдается наибольшая разница в активности указанного белка. Показано, что максимальный эффект переключения для функционирования LiGluR дости-

гается при облучении УФ-светом (380 нм) и светом с длиной волны 500 нм.⁸² Самая большая разница в функционировании белка (120 раз) при альтернативном облучении (380 и 500 нм) была достигнута для LiGluR(L439C).⁸⁴ Кроме того, было продемонстрировано, что при облучении светом с длинами волн, находящимися между 380 и 500 нм, наблюдается меньший эффект регулирования активности белка.⁸² «Фотопереключение» LiGluR посредством альтернативного облучения можно повторять в течение 30 мин с одинаковой амплитудой детектируемого сигнала после каждого цикла облучения. Кроме того, при облучении УФ-светом LiGluR (*syn*-**45**) сигнал меньше, чем при активации LiGluR свободным ионом глутамата в его насыщенном растворе. Возможно, что модифицирование рецептора «фотопереклюателем» **45** прошло не полностью. Вероятно также, что только ограниченное количество глутамата в составе «переключателя» может связываться с аллостерическим лиганд-связывающим участком LiGluR.

Поскольку структуры типа лиганд-связывающего домена iGluR распространены в природе, описанный подход можно применять и к другим трансмембранным белкам, например к метаботропику глутаматных рецепторов (mGluRs). Поскольку структуры лигандов для других типов лиганд-связывающих доменов белков известны, данную стратегию можно применять и для других белков. Для каждого случая привлекательность этого подхода состоит не только в возможности переключения активности белка, но и в регулировании его степени активации в зависимости от выбранной длины волны при облучении.

Авторы работ^{75, 76, 122} описали стратегию регулирования биологических реакций с использованием азобензольных производных и антител, узнающих азобензол в *анти*-конфигурации. Для этого были получены моноклональные антитела на *анти*-L-4'-фенилазофенилаланин, которые могут связываться только с азобензолом в *анти*-конфигурации и диссоциировать, когда он переходит в *син*-конфигурацию. Принцип подхода был продемонстрирован на примере регулирования алкогольдегидрогеназы. Ион никотинамидениндинуклеотида (NAD⁺) является кофактором ферментативной реакции. Было синтезировано азобензольное производное никотинамидениндинуклеотида (Ab-NAD⁺, **46**).

Показано, что восстановление Ab-NAD⁺ практически останавливается при добавлении антитела, связывающегося с *анти*-азобензолом в темноте. При облучении УФ-светом скорость реакции восстанавливается до 72% от первоначального значения. Неполное восстановление скорости реакции, вероятно, связано с частичным переходом *анти*-изомера производного азобензола в *син*-изомер. Скорость реакции возрастает также при высоких концентрациях

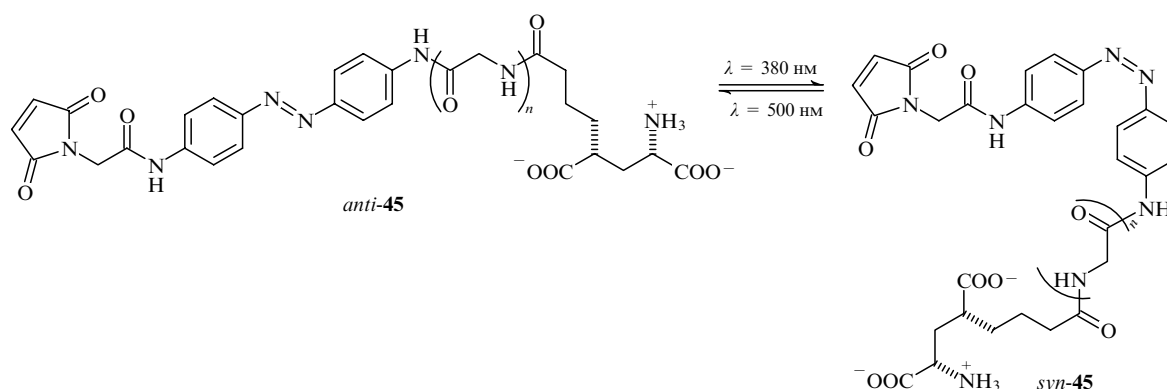
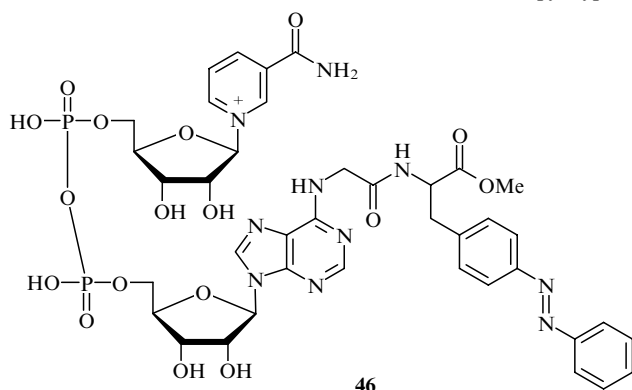


Схема 15

Структура 46



46

анти-конфигурации Ab-NAD⁺. Переключение активности является обратимым, а широкое распространение NAD⁺ в качестве кофактора для различных оксидоредуктаз позволяет использовать данный подход для разных систем.

VI. Заключение

Существует три стратегии регулирования активности белков с помощью «фотопереклюкателей» на основе азобензола: 1) прямое модифицирование белков производными азобензола; 2) создание фоторегулируемых ингибиторов или субстратов ферментов и 3) направленное модифицирование белков производными азобензола, содержащими одновременно лиганд для связывания с данным белком и реакционноспособную группу. Определяющим фактором при выборе метода является цель регулирования активности белка, структура самого белка и его субстрата, кофактора и(или) ингибитора. При выборе того или иного подхода нужно учитывать не только конечный результат (разницу в активности белка при специфическом облучении), но и совокупность факторов, приводящих к получаемому эффекту. Для применения стратегии направленного модифицирования белков производными азобензола необходимо, чтобы структура фермента была известна. Для введения производных азобензола обычно выбираются положения в таких структурных элементах пептидов или белков, которые играют важную роль в белок-белковом и(или) ДНК-белковом узнавании и связывании белка с лигандом. Создание фоторегулируемых ингибиторов либо субстратов ферментов находит практическое применение, например в области очистки ферментов для упрощения техники аффинной хроматографии белков.

При аффинном связывании ингибиторы фермента могут использоваться как лиганды, которые при облучении будут переходить из конфигурации с сильным сродством к целевому ферменту в конфигурацию со слабым сродством к нему. Эту процедуру можно рассматривать как новый подход к очистке фермента в мягких условиях. Кроме того, возможность регулировать взаимодействия биомолекул с поверхностью с помощью света позволяет конструировать новые обратимые биосенсоры, улучшенные медицинские имплантанты и др.

Направленное модифицирование белков производными азобензола, содержащими лиганд для связывания с данным белком, применяется в большинстве случаев для белков, образующих ионные каналы, и рецепторов с известными лигандами. Включение подходящей группы в качестве лиганда в состав «фотопереклюкателей» позволяет модифицировать разные типы ионных каналов и рецепторов, что

дает возможность контролировать различные физиологические функции белков посредством света. Варьируя природу фотопереключаемых реагентов для присоединения к белку, можно модифицировать различные аминокислоты, что позволяет иметь набор инструментов для фоторегулирования эндогенных белков. Например, реакционноспособную группу можно выбрать так, чтобы она селективно реагировала с индивидуальными аминокислотами белка, а светочувствительный остаток модифицировать, чтобы можно было изменять его спектральные характеристики и, как следствие, кинетику процесса фотопереключения. Введение подходящей группы в качестве лиганда в состав указанных реагентов позволяет модифицировать разные типы нативных ионных каналов и рецепторов, что дает возможность контролировать различные физиологические функции белков посредством света.

Приведенные выше примеры регулирования активности белков демонстрируют эффективность азобензольных производных, вводимых в состав как ферментов, так и их субстратов. Существуют также перспективы использования азобензолсодержащих нуклеиновых кислот в области био- и нанотехнологий. Однако следует учесть неполное превращение *син*- и *анти*-изомеров при облучении, что в ряде случаев ограничивает использование структур на основе азобензола. Поэтому поиск фотохромных соединений для регулирования активности биологически активных молекул является актуальной задачей.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке программы РФФИ-ННМО Международные исследовательские группы с участием молодых ученых (проект № 11-04-91338).

Литература

1. B.L.Feringa, R.A.Delden, N.Koumura, E.M.Geertsema. *Chem. Rev.*, **100**, 1789 (2000)
2. M.Erdélyi, A.Karl, A.Gogol. *Chem. – Eur. J.*, **12**, 403 (2006)
3. T.Cordes, D.Weinrich, S.Kempa, K.Riesselmann, S.Herre, C.Hoppmann, K.Rück-Braun, W.Zinth. *Chem. Phys. Lett.*, **42**, 167 (2006)
4. T.Cordes, C.Elsner, T.Herzog, C.Hoppmann, T.Schadendorf, W.Summerer, K.Rück-Braun, W.Zinth. *Chem. Phys.*, **358**, 103 (2009)
5. T.Schadendorf, C.Hoppmann, K.Rück-Braun. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 9044 (2007)
6. A.Natansohn, P.Rochon. *Chem. Rev.*, **102**, 4139 (2002)
7. V.Shibaev, A.Bobrovsky, N.Boiko. *Prog. Polym. Sci.*, **28**, 729 (2003)
8. I.Willner, S.Rubin. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 367 (1996)
9. I.Willner. *Acc. Chem. Res.*, **30**, 347 (1997)
10. G.S.Kumar, D.C.Neckers. *Chem. Rev.*, **89**, 1915 (1989)
11. H.Rau. In *Molecules and Systems*. (Eds H.Dürr, H.Bonas-Laurent). Elsevier, Amsterdam, 1990. P. 165
12. H.Rau. In *Photoreactive Organic Thin Films*. (Eds Z.Sekkat, W.Knoll). Academic Press, New York, 2002. P. 3
13. I.K.Lednev, T.Q.Ye, P.Matousek, M.Towrie, P.Foggi, F.V.R.Neuwahl, S.Umapathy, R.E.Hester, J.N.Moore. *Chem. Phys. Lett.*, **290**, 68 (1998)
14. T.Fujino, Y.S.Arzhantsev, T.Tahara. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 8123 (2001)
15. R.Nägele, R.Hoche, W.Zinth, J.Wachtveitl. *Chem. Phys. Lett.*, **272**, 489 (1997)
16. D.A.James, D.C.Burns, G.A.Woolley. *Protein Engin.*, **14**, 983 (2001)
17. O.Srinivas, N.Mitra, A.Surolia, N.Jayaraman. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2124 (2002)
18. C.R.Crecca, A.E.Roitberg. *J. Phys. Chem. A*, **110**, 8188 (2006)

19. W.Fuss, C.Kosmidis, W.E.Schmid, S.A.Trushin. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 4178 (2004)
20. M.L.Tiago, S.Ismail-Beigi, S.G.Louie. *J. Chem. Phys.*, **122**, 094311 (2005)
21. A.Cembran, F.Bernardi, M.Garavelli, L.Gagliardi, G.Orlandi. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3234 (2004)
22. C.Renner, L.Moroder. *ChemBioChem*, **7**, 868 (2006)
23. S.Dong, M.Lewenack, T.E.Schrader, W.J.Schreier, W.Zinth, L.Moroder, C.A.Renner. *Chem. – Eur. J.*, **12**, 1114 (2006)
24. D.C.Burns, D.G.Flint, J.R.Kumita, H.J.Feldman, L.Serrano, Z.Zhang, O.S.Smart, G.A.Woolley. *Biochemistry*, **43**, 15329 (2004)
25. Beharry, G.A.Woolley. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 4422 (2011)
26. C.Brieke, F.Rohrbach, A.Gottschalk, G.Mayer, A.Heckel. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 8446 (2012)
27. H.Asanuma, T.Takarada, T.Yoshida, D.Tamaru, X.Liang, M.Komiyama. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2671 (2001)
28. H.Nishioka, H.Kashida, M.Komiyama, X.Liang, H.Asanuma. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 85 (2006)
29. X.Liang, T.Yoshida, H.Asanuma, M.Komiyama. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **44**, 277 (2000)
30. H.Hayashi, H.Nishioka, X.Liang, H.Asanuma. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 171 (2007)
31. X.Liang, H.Asanuma, M.Komiyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1877 (2002)
32. P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt. *Science*, **254**, 1497 (1991)
33. P.E.Nielsen. *Mol. Biotechnol.*, **26**, 233 (2004)
34. T.Stafforst, D.Hilvert. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **49**, 9998 (2010)
35. C.Dohno, S.Uno, K.Nakatani. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **50**, 87 (2006)
36. C.Seeman. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **8**, 573 (1990)
37. C.M.Niemeyer, J.Koehler, C.Wuerdermann. *ChemBioChem*, **3**, 242 (2002)
38. X.Yang, A.V.Vologodskii, B.Liu, B.Kemper, N.C.Seeman. *Biopolymers*, **45**, 69 (1998)
39. J.S.Shin, N.A.Pierce. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10834 (2004)
40. J.H.Chen, N.C.Seeman. *Nature (London)*, **350**, 631 (1991)
41. W.M.Shih, J.D.Quispe, G.F.Joyce. *Nature (London)*, **427**, 618 (2004)
42. R.P.Goodman, I.A.Schaap, C.F.Tardin, C.M.Erben, R.M.Berry, C.F.Schmidt, A.J.Turberfield. *Science*, **310**, 1661 (2005)
43. S.Higashi-Fujime, R.Ishikawa, H.Iwasawa, O.Kagami, E.Kurimoto, K.Kohama, T.Hozumi. *FEBS Lett.*, **375**, 151 (1995)
44. Y.W.Zhang, N.C.Seeman. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1661 (1994)
45. X.Liang, N.Takemaka, H.Nishioka, H.Asanuma. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 697 (2008)
46. X.Liang, H.Nishioka, N.Takenaka, H.Asanuma. *ChemBioChem*, **9**, 702 (2008)
47. H.Kang, H.Liu, J.A.Phillips, Z.Cao, Y.Kim, Y.Chen, Z.Yang, J.Li, W.Tan. *Nano Lett.*, **9**, 2690 (2009)
48. Y.Kim, J.A.Phillips, H.Liu, H.Kang, W.Tan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6489 (2009)
49. M.Volgraf, P.Gorostiza, R.Numano, R.Kramer, E.Isacoff, D.Trauner. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 47 (2006)
50. J.R.Kumita, O.S.Smart, G.A.Woolley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3803 (2000)
51. N.Pozhidaeva, M.Cormier, A.Chaudhari, G.A.Woolley. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 1297 (2004)
52. D.Liu, J.Karanicolas, C.Yu, Z.Zhang, G.A.Woolley. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2677 (1997)
53. T.Ueda, K.Murayama, T.Yamamoto, S.Kimura, Y.Imanishi. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 225 (1994)
54. K.Nakayama, M.Endo, T.Majima. *Chem. Commun.*, 2386 (2004)
55. N.Muranaka, T.Hohsaka, M.Sisido. *FEBS Lett.*, **510**, 10 (2002)
56. T.Hohsaka, D.Kajihara, Y.Ashizuka, H.Murakami, M.Sisido. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 34 (1999)
57. M.Bose, D.Groff, J.Xie, E.Brustad, P.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 388 (2006)
58. D.G.Smyth, A.Nagamatsu, J.S.Fruton. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4600 (1960)
59. C.F.Brewer, J.P.Riehm. *Anal. Biochem.*, **18**, 248 (1967)
60. D.C.Burns, F.Zhang, G.A.Woolley. *Nat. Protoc.*, **2**, 251 (2007)
61. D.G.Flint, J.R.Kumita, O.S.Smart, G.A.Woolley. *Chem. Biol.*, **9**, 391 (2002)
62. G.A.Woolley. *Acc. Chem. Res.*, **38**, 486 (2005)
63. L.Chi, O.Sadovskii, G.A.Woolley. *Bioconjug. Chem.*, **17**, 670 (2006)
64. Y.C.Lee, R.T.Lee. *Acc. Chem. Res.*, **28**, 321 (1995)
65. Z.Zhang, D.C.Burns, J.R.Kumita, O.S.Smart, G.A.Woolley. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 824 (2003)
66. O.Sadovskii, A.A.Beharry, F.Zhang, G.A.Woolley. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 1484 (2009)
67. S.M.Menta, M.V.Vakilwala. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 563 (1952)
68. A.H.Cook. *J. Chem. Soc.*, 876 (1938)
69. F.Zhang, O.Sadovskii, G.A.Woolley. *ChemBioChem*, **9**, 2147 (2008)
70. S.Loudwig, H.Bayley. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12404 (2006)
71. Ле Тхи Хиен, Б.Ширлинг, А.Ю.Рязанова, Т.С.Зацепин, Е.М.Волков, Е.А.Кубарева, Т.И.Величко, А.Пингуд, Т.О.Орещкая. *Биорг. химия*, **35**, 610 (2009)
72. M.Goodman, A.Kossov. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5010 (1966)
73. J.Kuil, L.T.M.Wandelen, N.J.Mol, R.M.J.Liskamp. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 1393 (2008)
74. L.Ulysse, J.Chmielewski. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 2145 (1994)
75. T.Hohsaka, Y.Ashizuka, H.Murakami, M.Sisido. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9778 (1996)
76. T.Hohsaka, K.Kawashima, M.Sisido. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 413 (1994)
77. U.Kusebauch, S.A.Cadamuro, H.J.Musioli, M.O.Lenz, J.Wachtveitl, L.Moroder, C.Renner. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 7015 (2006)
78. G.A.Woolley, A.S.I.Jaikaran, M.Berezovskii, J.P.Calarco, S.N.Krylov, O.S.Smart, J.R.Kumita. *Biochemistry*, **45**, 6075 (2006)
79. P.V.Jog, M.S.Gin. *Org. Lett.*, **10**, 3693 (2008)
80. S.Muramatsu, K.Kinbara, H.Taguchi, N.Ishii, T.Aida. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3764 (2006)
81. M.Banghart, K.Borges, E.Isacoff, D.Trauner, R.Kramer. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1381 (2004)
82. P.Gorostiza, M.Volgraf, R.Numano, S.Szobota, D.Trauner, E.Y.Isacoff. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10865 (2007)
83. S.Szobota. *Neuron*, **54**, 535 (2007)
84. R.Numano. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6814 (2009)
85. M.D.Yamada, Y.Nakajima, H.Maeda, S.Maruta. *J. Biochem.*, **142**, 691 (2007)
86. I.Willner, S.Rubin, A.Riklin. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3321 (1991)
87. I.Hamachi, Y.Yamada, R.Eboshi, T.Hiraoka, S.Shinkai. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1215 (1999)
88. J.R.Kumita, D.G.Flint, G.A.Woolley, O.S.Smart. *Faraday Discuss.*, **122**, 89 (2002)
89. L.Guerrero, O.S.Smart, C.J.Weston, D.C.Burns, G.A.Woolley, R.K.Allemand. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 7778 (2005)
90. B.Schierling, A.J.Noël, W.Wende, L.T.Hien, E.Volkov, E.Kubareva, T.Oretskaya, M.Kokkinidis, A.Römpf, B.Spengler, A.Pingoud. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1361 (2010)
91. A.G.Cochran, N.J.Skelton, M.A.Starovasnik. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5578 (2001)
92. K.Tachikawa, O.Schröder, G.Frey, S.P.Briggs, T.Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15225 (2004)
93. L.Reynolds, C.Ullman, M.Moore, M.Isalan, M.J.West, P.Clapham, A.Klug, Y.Choo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1615 (2003)

94. D.J.Segal, J.Goncalves, S.Eberhardy, C.H.Swan, B.E.Torbett, X.Li, C.F.Barbas III. *J. Biol. Chem.*, **279**, 14509 (2004)
95. T.Sera. *J. Virol.*, **79**, 2614 (2005)
96. S.D.Patel, M.Isalan, G.Gavory, S.Ladame, Y.Choo, S.Balasubramanian. *Biochemistry*, **43**, 13452 (2004)
97. Y.G.Kim, J.Cha, S.Chandrasegaran. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1156 (1996)
98. F.D.Urnov, J.C.Miller, Y.L.Lee, C.M.Beausejour, J.M.Rock, S.Augustus, A.C.Jamieson, M.H.Porteus, P.D.Gregory, M.C.Holmes. *Nature (London)*, **435**, 646 (2005)
99. E.A.Moehle, J.M.Rock, Y.L.Lee, Y.Jouvenot, R.C.Kelver, P.D.Gregory, F.D.Urnov, M.C.Holmes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3055 (2007)
100. W.Nomura, C.F.Barbas III. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8676 (2007)
101. A.Nomura, A.Okamoto. *Chem. Commun.*, 1906 (2009)
102. M.Newman, T.Strzelecka, L.F.Dorner, I.Schildkraut, A.K.Agarwal. *Nature (London)*, **368**, 660 (1994)
103. L.T.Hien, T.S.Zatsepin, B.Schierling, E.M.Volkov, W.Wende, A.Pingoud, E.A.Kubareva, T.S.Oretskaya. *Bioconj. Chem.*, **22**, 1366 (2011)
104. D.Golovenko, E.Manakova, G.Tamulaitiene, S.Grazulis, V.Siksnys. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6613 (2009)
105. C.Schulze, A.Jeltsch, I.Franke, C.Urbanke, A.Pingoud. *EMBO J.*, **17**, 6757 (1998)
106. H.Asanuma, X.Liang, T.Yoshida, M.Komiyama. *ChemBioChem*, **2**, 39 (2001)
107. M.Liul, H.Asanuma, M.Komiyama. *Nucleic Acids Res.*, (Suppl. 3), 265 (2003)
108. H.Asanuma, D.Tamaru, A.Yamazawa, M.Liu, M.Komiyama. *ChemBioChem*, **3**, 786 (2002)
109. J.Zhao, J.Zhou, M.Liu, H.Asanuma, M.Komiyama. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 199 (2008)
110. D.Matsunaga, H.Asanuma, M.Komiyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11452 (2004)
111. A.D.Abell, M.A.Jones, A.T.Neffe, S.G.Aitken, T.P.Cain, R.J.Payne, S.B.McNabb, J.M.Coxon, B.G.Stuart, D.Pearson, H.Y.Lee, J.D.Morton. *J. Med. Chem.*, **50**, 2916 (2007)
112. P.R.Westmark, J.P.Kelly, B.D.Smith. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3416 (1993)
113. D.Pearson, A.D.Abell. *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 3618 (2006)
114. D.Pearson, N.Alexander, A.D.Abell. *Chem. – Eur. J.*, **14**, 7358 (2008)
115. D.Pearson, A.J.Downard, A.Muscroft-Taylor, A.D.Abell. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14862 (2007)
116. J.Auernheimer, C.Dahmen, U.Hersel, A.Bausch, H.Kessler. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16107 (2005)
117. R.MacKinnon, G.Yellen. *Science*, **150**, 276 (1990)
118. R.O.Blaustein, P.A.Cole, C.Williams, C.Miller. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 309 (2000)
119. D.L.Fortin, M.R.Banghart, T.W.Dunn, K.Borges, D.A.Wagenaar, Q.Gaudry, M.H.Karakossian, T.S.Otis, W.B.Kristan, D.Trauner, R.H.Kramer. *Nat. Methods*, **5**, 331 (2008)
120. J.H.Harvey, D.Trauner. *ChemBioChem*, **9**, 191 (2008)
121. E.Bartels, N.H.Wassermann, B.F.Erlanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1820 (1971)
122. J.Parisot, K.Kurz, F.Hilbrig, R.Freitag. *J. Sep. Sci.*, **32**, 1613 (2009)