БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 1 * №11 * 1975

УДК 577.15.04 : 547.781.5 : 542.951

РЕАКЦИЯ ДИЭТИЛПИРОКАРБОНАТА С ИМИДАЗОЛОМ И ПРОИЗВОДНЫМИ ГИСТИДИНА

Аваева С. М., Краснова В. И.

Межфакультетская лаборатория биоорганической химии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Изучено взаимодействие диэтилпирокарбоната с имидазолом, N-ацетилгистидином и метиловым эфиром N-ацетилгистидина в условиях модификации белков. Установлено, что обработка имидазола и производных гистидина 10—40-кратными молярными избытками диэтилпирокарбоната приводит к размыканию имидазольного кольца и образованию производных непредельного диамина. Из имидазола и метилового эфира N-ацетилгистидина соответственно получены 1,2-ди(карбэтоксиамино)этилен и метиловый эфир 2-ацетиламино-4,5-ди(карбэтоксиамино)пентен-4-овой кислоты. Соединения охарактеризованы элементным анализом, УФ-, ИК- и ЯМР-спектрами. В свете полученных данных обсуждаются некоторые аспекты использования диэтилпирокарбоната для модификации белков.

Модификация гистидиновых остатков в белках под действием диэтилпирокарбоната была предложена в 1967 г. [1, 2] и получила широкое распространение для выяснения функциональной роли этой аминокислоты в самых разных ферментах. По общепринятому мнению в реакции имидазола и производных гистидина с диэтилпирокарбонатом при pH 6 образуется N-карбэтоксипроизводное, имеющее характерный спектр в области 220—260 нм с молярным коэффициентом поглощения при 240 нм, равным 3000—3600 M^{-1} $см^{-1}$ [1, 3]. Существенно, что карбэтоксигруппа может быть удалена с имидазольного кольца при pH 7 в течение нескольких минут с помощью гидроксиламина [4] или аммиака [5].

Попытка использовать диэтилпирокарбонат для модификации остатков гистидина в неорганической пирофосфатазе дрожжей привела нас к выводу, что, вопреки литературным данным, реакция не протекает столь однозначно. В связи с этим в настоящей работе детально изучена реакция диэтилпирокарбоната с имидазолом и некоторыми производными гистидина.

При реакции диэтилпирокарбоната с избытком имидазола в соответствии со сказанным выше образуется N-карбэтоксиимидазол, дифференциальный спектр которого приведен на рис. 1 (кривая *1*). Однако при модификации белков используются обратные соотношения реагентов, т. е. применяется избыток диэтилпирокарбоната. Реакция имидазола с диэтилпирокарбонатом при 10—40-кратных молярных избытках последнего приводит к соединению, отличающемуся по спектру от N-карбэтоксиимидазола. Как видно из приведенного спектра (рис. 1, *2*), максимум поглощения этого соединения существенно смещается в более коротковолновую область и находится при 218 нм. Значительно возрастает поглощение в максимуме, но и поглощение при 240 нм также превышает величину,

ожидаемую для N-карбэтоксиимидазола. Реакцию проводили при pH 6 и при 25°, однако снижение температуры до 4° не оказало влияния на характер спектра. N-карбэтоксиимидазол и соединение, получающееся в реакции с избытком диэтилпирокарбоната, различаются между собой отношением к гидроксиламину. Как известно, при взаимодействии гидроксиламина с N-карбэтоксиимидазолом карбэтоксигруппа легко элиминируется и дифференциальное поглощение в области 210—270 нм исчезает. При воздействии гидроксиламина на соединение, характеризующееся спектром *2* (рис. 1), наблюдается быстрое смещение максимума к 233 нм,

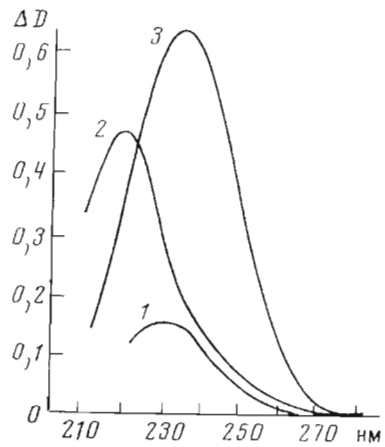


Рис. 1. Спектры соединений, образующихся в реакции диэтилпирокарбоната с имидазолом. Состав реакционной смеси: *1* — $3 \cdot 10^{-3}$ М имидазол и $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ М диэтилпирокарбонат; перед снятием спектра смесь разбавлена в 5 раз водой; *2* — $2{,}9 \cdot 10^{-3}$ М имидазол и $2{,}7 \cdot 10^{-2}$ М диэтилпирокарбонат; для снятия спектра смесь разбавлена в 200 раз; *3* — $1{,}45 \cdot 10^{-3}$ М имидазол, $1{,}4 \cdot 10^{-2}$ М диэтилпирокарбонат и 2 М NH_2OH или 0,05 н. NaOH; для снятия спектра смесь разбавлена в 100 раз

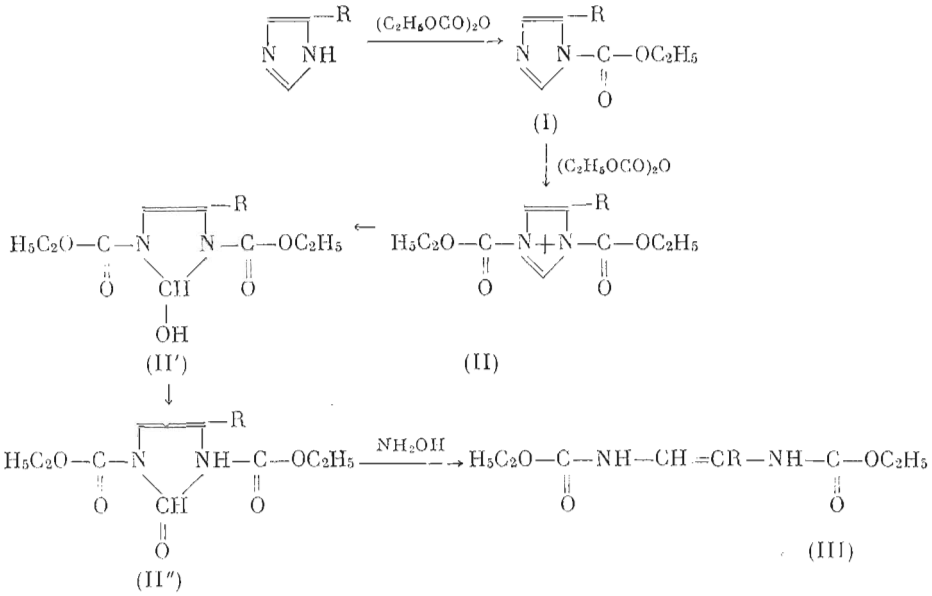
что свидетельствует об образовании нового соединения (рис. 1, *3*). Такое превращение возможно и без гидроксиламина: при выдерживании реакционной смеси при комнатной температуре в течение нескольких дней наблюдается аналогичное смещение максимума спектра. Такой переход очень быстро происходит в присутствии 0,1 н. NaOH.

Аналогично была проведена реакция диэтилпирокарбоната с N-ацетилгистидином. Соединение, образующееся в реакции с избытком N-ацетилгистидина, имеет спектр с максимумом поглощения при 235 нм (рис. 2, *1*), карбэтоксигруппа в нем элиминируется под действием гидроксиламина или щелочи. Реакция N-ацетилгистидина с избытком диэтилпирокарбоната дает в результате соединение, имеющее спектр с максимумом поглощения при 227 нм (рис. 2, *2*). Последующая обработка реакционной смеси гидроксиламином или щелочью приводит к соединению, которое характеризуется спектром с максимумом при 230 нм (рис. 2, *3*).

Метиловый эфир N-ацетилгистидина является соединением, близко моделирующим гистидин, включенный в полипептидную цепь. На рис. 3 представлены дифференциальные спектры соединений, образовавшихся при реакции метилового эфира N-ацетилгистидина с диэтилпирокарбонатом. Соединение, соответствующее монокарбэтоксипроизводному, имеет спектр с максимумом при 235 нм (кривая *1*). Соединению, полученное при реакции с избытком диэтилпирокарбоната, поглощает с максимумом при 224 нм (кривая *2*). Соединение, получившееся в результате добавления разбавленной щелочи к реакционной смеси, характеризуется спектром с максимумом при 227 нм (кривая *3*).

Изучение продуктов модификации привело к нас к выводу, что при реакции имидазола и производных гистидина с избытком диэтилпирокарбоната образуется дикарбэтоксипроизводное имидазола, местом нуклеофильной атаки в котором является углеродный атом $C_{(2)}$ имидазольного кольца. Реакция по этому центру приводит к размыканию цикла, выщеплению одного углеродного атома и образованию производного непредель-

ного диамина:



где R равно: а) H, б) $-CH_2-CH(COOH)-NHCOCH_3$, в) $-CH_2-CH(COOCH_3)-NHCOCH_3$.

Аналогичное раскрытие имидазольного кольца наблюдал Бамбергер при бензоилировании имидазола [6]. В соответствии со схемой спектры *1* на рис. 1—3 должны быть приписаны монокарбэтоксипроизводным (I), спектры *2* — одному из продуктов (II) — (II″), а спектры *3* — соединениям (III).

В опытах с имидазолом и метиловым эфиром N-ацетилгистидина выделены соответственно 1,2-ди(карбэтоксиамино)этилен (IIIа) и метиловый эфир 2-ацетиламино-4,5-ди(карбэтоксиамино)пентен-4-овой кислоты (IIIв). Они выпадают в виде кристаллов после обработки исходных соединений диэтилпирокарбонатом с последующим разбавлением реакционной смеси нейтральным раствором гидроксиламина. УФ-спектры индивидуальных соединений соответствовали спектрам *3*, приведенным на рис. 1 и 3. Полученные соединения охарактеризованы элементным анализом, ИК- и ЯМР-спектрами.

Известно, что реакционная способность остатков гистидина в белках бывает самой различной и зависит, по-видимому, как от пространственной доступности гистидина, так и от внутримолекулярных взаимодействий, отражающихся на величине p*K* азота имидазольного кольца. Если для остатков гистидина в белках, вероятно, протекание реакции с диэтилпирокарбонатом такое же, как в рассматриваемых моделях, то появляется возможность объяснить некоторые непонятные факты, наблюдавшиеся при модификации ряда белков. Это, в первую очередь, относится к явлению, отмеченному при модификации актина [7], церулоплазмина [8] и алкогольдегидрогеназы [9], когда создавалось впечатление, что в белок вводится больше карбэтоксигрупп, чем возможно при полной модификации остатков гистидина в молекуле. Из данных настоящей работы видно, что величина поглощения при 240 нм, используемая для расчета количества прореагировавших остатков гистидина, у образующегося дикарбэтоксипроизводного больше, чем у монокарбэтоксиимидазола, что и должно приводить к кажущемуся увеличению числа гистидинов.

Кроме того, становится понятным тот факт, что в ряде белков не удается полностью удалить карбэтоксигруппы с гистидина с помощью NH_2OH. Этот факт обнаружен при модификации дрожжевой гексокиназы [10],

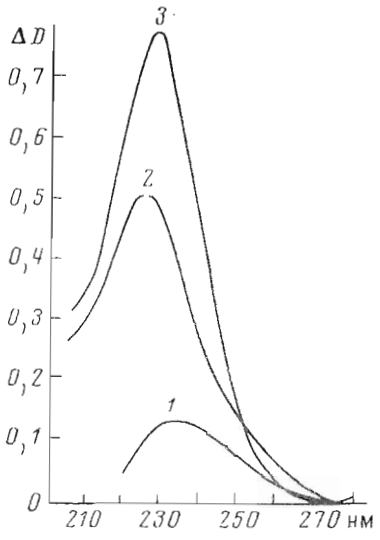


Рис. 2

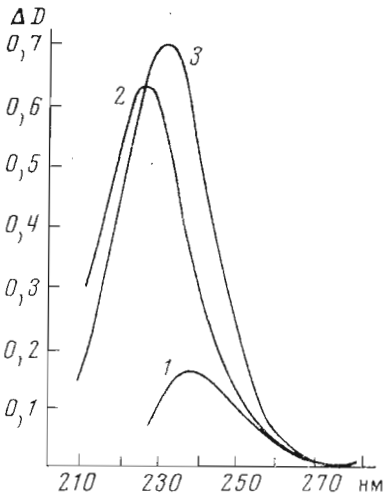


Рис. 3

Рис. 2. Спектры соединений, образующихся в реакции диэтилпирокарбоната с N-ацетилгистидином. Состав реакционной смеси: *1* — $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ М N-ацетилгистидин и $6{,}6 \cdot 10^{-3}$ М диэтилпирокарбонат, для измерения спектра смесь разбавлена в 300 раз; *2* — $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ М N-ацетилгистидин и $5{,}4 \cdot 10^{-1}$ М диэтилпирокарбонат, перед снятием спектра смесь разбавлена в 300 раз; *3* — $0{,}65 \cdot 10^{-2}$ М N-ацетилгистидин, $2{,}7 \cdot 10^{-1}$ М диэтилпирокарбонат и 2 М NH_2OH или 0,05 н. NaOH; для измерения спектра смесь разбавлена в 150 раз

Рис. 3. Спектры соединений, образующихся в реакции диэтилпирокарбоната с метиловым эфиром N-ацетилгистидина. Состав реакционной смеси: *1* — $4{,}0 \cdot 10^{-3}$ М метиловый эфир N-ацетилгистидина и $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ диэтилпирокарбонат; для измерения спектра смесь разбавлена в пять раз водой; *2* — $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ М метиловый эфир N-ацетилгистидина и $2{,}8 \cdot 10^{-2}$ М диэтилпирокарбонат, смесь перед снятием спектра разбавлена в 60 раз; *3* — $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ М метиловый эфир N-ацетилгистидина и $2{,}8 \cdot 10^{-2}$ М диэтилпирокарбонат, смесь разбавлена вдвое 0,1 н. NaOH и через 30 мин для измерения спектра разбавлена еще в 30 раз водой

триптофансинтетазы [11], термолизина [12] и фенилаланин-тРНК-синтетазы [13]. Поскольку гидроксиламин не регенерирует гистидин в случае образования дикарбэтоксипроизводных, сохранение поглощения при 240 нм после обработки гидроксиламином или отсутствие при этом реактивации модифицированного белка, по-видимому, не следует относить к модификации других функциональных групп. Образование дикарбэтоксипроизводных также делает неоднозначными опыты по включению в белок метки ^{14}C при использовании меченого диэтилпирокарбоната.

Модификация белков избытком диэтилпирокарбоната может быть использована как метод избирательного разрушения доступных остатков гистидина, за ходом которого удобно следить по уменьшению гистидина в полных кислотных гидролизатах белка. Так, инкубация $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ М раствора панкреатической рибонуклеазы с $7{,}5 \cdot 10^{-2}$ М раствором диэтилпирокарбоната и последующий кислотный гидролиз модифицированного белка приводит к исчезновению в гидролизате $\sim$ 50% остатков гистидина.

Экспериментальная часть

УФ-спектры и дифференциальные спектры снимали на регистрирующем спектрофотометре «Cary-15» (США), ИК-спектры — на приборе «Perkin-Elmer» (США) модель 257 (в таблетке с KBr), спектры ^1H-ЯМР — на приборе «Tesla» (Чехословакия) (80 МГц) в CD_3OD. В качестве внутреннего стандарта (δ 0,00 м.д.) использовали тетраметилсилан.

В работе использованы имидазол и N-ацетилгистидин фирмы «Reanal» (Венгрия), диэтилпирокарбонат фирм «Sigma» и «Calbiochem» (США). Метиловый эфир N-ацетилгистидина (т. пл. 122—124°) был синтезирован из N-ацетилгистидина обработкой хлористым тионилом в абсолютном метаноле [14].

Реакция с диэтилпирокарбонатом. Диэтилпирокарбонат использовали в виде свежеприготовленного раствора в холодном абсолютном этаноле. К 30 мл $3 \cdot 10^{-3}$ М раствора имидазола при pH 6 прибавляли 4,4 мкл диэтилпирокарбоната, разбавленного втрое этанолом. Реакционную смесь перемешивали при 25°. Через 60 мин снимали дифференциальный спектр образовавшегося карбэтоксиимидазола (Ia) в интервале 210—280 нм. В качестве контроля использовали реакционную смесь с прибавленным вместо диэтилпирокарбоната спиртом. Далее к 12 мл реакционной смеси прибавляли еще 150 мкл раствора диэтилпирокарбоната и поддерживали pH реакционной смеси равным 6 прибавлением 0,2 н. NaOH. Конечная концентрация имидазола $2{,}9 \cdot 10^{-3}$ М, концентрация добавленного диэтилпирокарбоната $2{,}7 \cdot 10^{-2}$ М. Дифференциальный спектр образовавшегося дикарбоэтоксипроизводного снимали через 60 мин после прибавления второй порции диэтилпирокарбоната. Соединение устойчиво в течение нескольких часов в 0,1 н. HCl. Для реакции с гидроксиламином или щелочью реакционную смесь разбавляли вдвое 1М NH_2OH (pH 7) или 0,1 н. NaOH и через 10 мин снимали дифференциальный спектр. Соединение (IIIa) устойчиво в течение нескольких часов при комнатной температуре в 0,1 н. HCl и 0,1 н. NaOH и выдерживает инкубацию в кипящей воде не менее 30 мин. Аналогично при взаимодействии с N-ацетилгистидином и метиловым эфиром N-ацетилгистидина получены соединения (IIIб) и (IIIв).

Выделение 1,2-ди(карбэтоксиамино)этилена (IIIа). Для препаративного выделения соединения (IIIa) реакцию проводили с неразбавленным диэтилпирокарбонатом. К 10 мл 0,1 М раствора имидазола pH 6 прибавляли 1 мл диэтилпирокарбоната и проводили реакцию при 25° в течение 2 ч, поддерживая pH равным 6. Затем добавляли равный объем 4М NH_2OH и через 30 мин выпавший осадок отфильтровывали, промывали холодной водой и высушивали в вакууме над P_2O_5. Выход 160 мг (73%); т. пл. 126—128°. УФ-спектр; $\lambda_{макс}$ 233 нм (ε 25000). ИК-спектр, $см^{-1}$; 1380, 1460 (CH_2, CH_3); 1670, 1700, 1730 (α,β-непредельный уретан), 2990 (=C—H); 3240, 3310, 3350 (NH), ЯМР (δ, м.д.); 1,16 (CH_3); 4,00 (CH_2); 5,60 (=CH—). Найдено, %: C 47,75; H 7,15; N 13,43. $C_8H_{14}N_2O_4$. Вычислено, %: C 47,51; H 6,99; N 13,85. Соединение (IIIa) может быть выделено без добавления гидроксиламина. При стоянии реакционной смеси, представляющей собой водно-органическую эмульсию, при комнатной температуре в течение нескольких суток начинается выпадение в осадок вещества, идентичного описанному выше.

Выделение метилового эфира 2-ацетиламино-4,5-ди(карбэтоксиамино)-пентен-4-овой кислоты (IIIв). К 25 мл $3{,}6 \cdot 10^{-2}$ М раствора метилового эфира N-ацетилгистидина прибавляли 3,5 мл диэтилпирокарбоната. Через 2 ч при 25° и pH 6 реакционую смесь упаривали на роторном испарителе до 10 мл и прибавляли равный объем 4М NH_2OH pH 7. Через 2—3 мин начиналось разрушение органического слоя и выпадение белого осадка. Через 30 мин осадок отфильтровывали, промывали холодной водой и высушивали в вакууме над P_2O_5. Выход соединения (IIIв) 200 мг (65%); т. пл. 157—159°. УФ-спектр: $\lambda_{макс}$ 227 нм (ε 22000). ИК-спектр, $см^{-1}$; 1380, 1440 (CH_2CH_3); 1660, 1670, 1700, 1740 (α, β-непредельный уретан, CO в сложном эфире и втор. амиде); 3000 (=C—H); 3330 (NH). ЯМР (δ, м. д.); 1,16 (CH_3); 1,85 ($-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_3$); 2,54 ($-CH_2-\overset{\overset{N}{|}}{CH}-$); 3,60 ($-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OCH_3$); 3,99 ($CH_2$, $CH-NH$); 5,96 (=CH—); 7,32, 7,77 (ушир. сигнал —NH—CH= и

—NH—C—). Найдено, %: C 48,93; H 6,90; N 12,74. $C_{14}H_{23}N_3O_7$. Вычис-
‖
O
лено, %: C 48,60; H 6,73; N 12,17.

Авторы благодарны Полякову В. А. за снятие ЯМР-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovádi J., Libor S., Elödi P. (1967) Acta biochim et biophys. Acad. scient. hung, **2**, 455—458.
2. Mühlrad A., Hegyi G., Toth G. (1967) Acta biochim. et biophys. Acad. scient. hung., **2**, 19—29.
3. Holbrook J. J., Ingram V. A. (1973) Biochem. J, **131**, 729—738.
4. Melchior W. D., Fahrney D. (1970) Biochemistry, **9**, 251—258.
5. Ovádi J., Keleti T. (1969) Acta biochim. et biophys. Acad. scient. hung., **4**, 365—378.
6. Bamberger E., Berlè B. (1893) J. Liebigs Ann. Chem., **273**, 342—363.
7. Mühlrad A., Hegyi G., Horányi M. (1969) Biochim. et biophys. acta, **181**, 184—190.
8. Nylen U., Pettersson G. (1972) Eur. J. Biochem., **27**, 578—584.
9. Morris D. L., McKinley-McKee J. S. (1972) Eur. J. Biochem., **29**, 515—520.
10. Grouselle M., Thiam A. A., Pudles J. (1973) Eur. J. Biochem., **39**, 335—341.
11. Miles E. W., Kumagai H. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 2843—2851.
12. Burstein Y., Walsh K. A., Neurath H. (1974) Biochemistry, **13**, 205—210.
13. Hennecke H., Böck A. (1974) Eur. J. Biochem., **50**, 157—166.
14. Mattews H. R., Rapoport H. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 2297—2303.

Поступила в редакцию
23.IV.1975

DIETHYLPYROCARBONATE REACTION WITH IMIDAZOLE AND THE HISTIDINE DERIVATIVES

AVAEVA S. M., KRASNOVA V. I.

Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Under the conditions used for modification of proteins by diethylpyrocarbonate the interaction of the reagent with imidazole, N-acetyl-L-histidine and N-acetyl-L-histidine methyl ester was studied. It was established that the treatment of imidazole and its derivatives by 10—40-fold molar excess of diethylpyrocarbonate leads to the fast formation of N,N′-dicarbethoxy derivatives accompanied by opening the imidazole ring and appearance of unsaturated diamine. The reaction of diethylpyrocarbonate with imidazole and N-acetyl-L-histidine methyl ester yields 1,2-di(carbethoxyamino)-ethylene and 2-acetylamino-4,5-di(carbethoxyamino)-4-pentenoic acid methyl ester, respectively. These compounds absorb in the same UV-region as monocarbethoxy derivatives but the molar absorption coefficient is significantly higher. In the light of the data obtained, some aspects are discussed concerning the use of diethylpyrocarbonate for protein modification.