


На правах рукописи



ПАНОВ Михаил Сергеевич

Косвенное детектирование короткоживущих интермедиатов реакций с
участием биологически важных молекул методом
импульсного ЯМР ^1H и ^{13}C

01.04.17 — Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук.

| | |
|------------------------------|---|
| Научный руководитель | Юрковская Александра Вадимовна, доктор физико-математических наук, г.н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук |
| Официальные оппоненты | Лешина Татьяна Викторовна доктор химических наук, г.н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук Клочков Владимир Васильевич доктор химических наук, в.н.с. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук |


Защита диссертации состоится “22” января 2020 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.014.02 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ученому секретарю диссертационного совета Д 003.014.02; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ _____ ” 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



Поздняков
Павлович Иван

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Короткоживущие свободные радикалы играют важную роль во многих быстропротекающих химических и биохимических реакциях, поэтому исследование строения и реакционной способности свободных радикалов является актуальной задачей. Особый интерес вызывают свободные радикалы в биологических системах, однако их изучение сильно затруднено в тех случаях, когда радикалы либо не имеют сильной характерной полосы поглощения для исследования оптическими методами, либо являются слишком короткоживущими для их детектирования методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В таких ситуациях косвенный метод детектирования радикалов, основанный на явлении химической поляризации ядер (ХПЯ), может быть особенно полезным.

Метод ХПЯ позволяет косвенным образом зарегистрировать радикалы с временем жизни даже на наносекундной шкале. Регистрация осуществляется по сигналам диамагнитных продуктов реакции в спектрах ядерного магнитного резонанса (ЯМР), интенсивности которых для продуктов геминальной рекомбинации пропорциональны константам сверхтонкого взаимодействия (СТВ) электрона с магнитными ядрами в радикале. По анализу амплитуды и знака сигналов в спектре ЯМР высокого разрешения с помощью ХПЯ можно установить структуру участвующих в реакции свободных радикалов. Дополнительным преимуществом этого метода является то, что он может быть применен при физиологических условиях (комнатная температура, водные растворы). В основе явления ХПЯ лежит спин-селективная рекомбинация радикальных пар, которая, в свою очередь, является результатом сохранения спина в ходе химических реакций. Это проявляется в том, что, хотя в спин-коррелированном триплетном состоянии радикалы

формируются парами, только одно состояние радикальной пары (обычно синглетное) является реакционноспособным. Поскольку скорость синглет-триплетной эволюции радикальной пары зависит от ядерного спинового состояния радикалов, то продукты радикальной реакции образуются с разной скоростью для различных ядерных спиновых состояний. Как следствие, диамагнитные продукты рекомбинации имеют неравновесные населенности ядерных спиновых состояний, что проявляется в виде аномальной фазы и интенсивности сигналов ЯМР продуктов реакции. Изучая зависимость интенсивности сигналов ХПЯ от времени и от напряженности магнитного поля, можно получить информацию о таких магнитных взаимодействиях в радикальных парах (РП), как сверхтонкие взаимодействия (СТВ) электрона с магнитными ядрами в радикале, а также об электронных g-факторах. Поэтому, обладая таким набором данных, можно сделать определенные выводы об электронной структуре короткоживущих промежуточных частиц и установить механизм реакций, протекающих с их участием. Представленная диссертация содержит описание оригинальных методик ХПЯ разработанных автором, которые позволяют существенно расширить возможности использования этого метода, в частности, в исследовании биологически важных объектов. Кроме описания методик работа включает демонстрацию их применения на нескольких примерах актуальных для современной биохимии процессов в живых организмах.

Процессы, лежащие в основе окислительного разрушения белков, являются в настоящей работе предметом исследования и демонстрации возможностей разработанных автором модификаций методик ХПЯ.

Реакции окисления лежат в основе ряда патологических воздействий: радиации, фотооблучения, неблагоприятных условий окружающей среды, различного рода заболеваний и биологического

старения. При окислении белков те аминокислоты, в составе которых есть атом серы (метионин и цистеин), чаще всего подвергаются этому воздействию с образованием различных радикальных частиц. При этом установлено, что вышеупомянутые радикалы могут приводить также и к позитивным изменениям в биологических процессах. Серосодержащие радикалы участвуют в реакции нейтрализации активных форм кислорода при окислительном стрессе, репарации ДНК, деградации центральной нервной системы, приводящей к болезням Паркинсона и Альцгеймера.

Наиболее общим механизмом окисления этих остатков (метионина и цистеина) является формирование катион-радикалов с радикальным центром на атоме серы. При этом известно, что механизм реакции и структура радикалов сильно зависят от протонированного состояния ближайшего атома азота, а именно, от того есть ли у него на концевой аминогруппе неподеленная пара или положительный заряд. Для изучения этих частиц методиками магнитного резонанса ЭПР, ХПЯ, ХПЭ важны следующие аспекты. Так, сильное спин-орбитальное взаимодействие, характерное для атома серы, приводит к тому, что для синглет-триплетной эволюции роль таких магнитных взаимодействий, как зеемановское и сверхтонкое, становится несущественной. Поскольку они отвечают за спин-зависимый канал синглет-триплетных переходов в радикальных парах, формирование спиновой электронной и ядерной поляризации происходит неэффективно, что приводит к тому, что сигналы химической поляризации электронов и ядер (ХПЭ и ХПЯ) в таких радикалах очень малы или не регистрируются совсем. Несмотря на относительно малую интенсивность, методом ХПЯ было установлено, что механизм реакции и структура радикалов в большой степени зависят от того, что находится на ближайшем атоме азота: неподеленная пара или положительный заряд на концевой аминогруппе. Для S-центрированных радикалов свободной

аминокислоты и дипептидов при расположении метионина на N-конце методом ХПЯ определено, что при взаимодействии с парой электронов на атоме азота образуется пятичленные циклические радикалы, содержащие трехэлектронные двухцентровые связи между атомами серы и азота. Для цистеина и цистеин-содержащих олигопептидов подобные исследования не проводились, они впервые были осуществлены в настоящей работе. Установление строения сероцентрированных, а также других короткоживущих радикалов проводилось с использованием модельных фотоиндуцированных реакций между аминокислотами и дипептидами и универсальным для целей данной работы акцептором – тетракарбоксизамещенным бензофеноном. (ТСВР).

Помимо возникновения и гибели короткоживущих реакционноспособных радикалов, в контексте защиты организмов от химической деградаци, интерес представляют также процессы репарации биополимеров, особенно ДНК. Косвенные методы ЯМР для детектирования короткоживущих состояний, в которых основания нуклеотидов оказываются вывернутыми из двойной спирали, применялись к исследованию динамики ДНК дуплексов, содержащих модифицированные основания, с целью понять их роль в репарации ДНК. В работе систем ферментативной репарации ДНК, которые участвуют в устранении повреждений, открытым оставался вопрос о том, по какому признаку происходит распознавание поврежденного участка молекулярными системами репарации. Одна из гипотез состояла в том, что химически модифицированные азотистые основания образуют менее прочные водородные связи и менее эффективно связаны стэкин-взаимодействиями с соседними основаниями по сравнению с их нативными аналогами, что сдвигает равновесие между открытым и закрытым состоянием двойной спирали ДНК для таких сайтов в сторону

открытой формы. В свою очередь, увеличение времени, проводимого в открытом состоянии, и может быть сигналом для запуска ферментативной системы репарации на данном участке ДНК. Для проверки этой гипотезы в данной работе было проведено сравнение констант равновесия выворачивания азотистых оснований в дуплексе с результатами исследования кинетики реакции этих же ДНК дуплексов с ферментом системы репарации.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы было определение кинетических и магниторезонансных параметров короткоживущих радикалов биологических молекул различными методами ЯМР. Задачи:

- создание установки по измерению ХПЯ на ядрах ^{13}C
- определение по спектрам ХПЯ ^{13}C констант СТВ ^{13}C радикала 3,3',4,4'-тетракарбокситетрагидрофенона (ТСВР) в реакции с гистидином
- установление механизма реакции и магниторезонансных параметров короткоживущих радикалов серосодержащей аминокислоты S-метилцистеина и пептида S-метилглутатиона методами ХПЯ с временным разрешением и зависимости ХПЯ от магнитного поля
- исследование механизма реакций ТСВР с ароматическими аминокислотами гистидином, тирозином и триптофаном
- выявление переноса спиновой поляризации в диамагнитных продуктах реакций за счет скалярного взаимодействия в сильно-связанных спиновых системах
- первое наблюдение ^1H ХПЯ в твердом теле при вращении образца под магическим углом.

Кроме того, была отработана методика и проведены измерения динамики раскрытия ДНК тридекамерных дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания с целью выявить,

является ли реакции выворачивания оснований лимитирующей стадией процесса распознавания при энзиматической репарации.

Научная новизна. Методом ХПЯ было исследовано фотоокисление гистидина, S-метилцистеина и S-метилглутатиона в реакции с ТСВР, получены магниторезонансные параметры короткоживущих частиц, возникающих при их одноэлектронном окислении. Впервые был получен спектр ХПЯ ^{13}C гистидина на природном содержании магнитного изотопа, из анализа полученного спектра были извлечены относительные константы СТВ с ядрами ^{13}C , что позволило установить структуру промежуточного радикала фотосенсибилизатора (3,3',4,4'-тетракарбокисбензофенона, ТСВР).

Впервые были получены сайт-специфичные данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами азотистых оснований в тридекамерных ДНК дуплексах, канонического и содержащих химически модифицированные нуклеотиды в положении 7.

Впервые был получен спектр ^1H ХПЯ в твердой матрице при вращении под магическим углом.

Практическая значимость работы. На основе полученных данных о константах СТВ ядер ^{13}C была определена структура радикалов ТСВР, возникающих в ходе реакции фотоокисления ароматических аминокислот гистидина, тирозина и триптофана.

Используя сайт-специфичные данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами ДНК дуплексов с химически модифицированными азотистыми основаниями, был сделан вывод, что на скорость репарации влияет не стабильность двойной спирали дуплекса, а скорость химических процессов гидролиза гликозидной связи.

Впервые полученный спектр ^1H ХПЯ в растворе циклогексанона указывает на сходство механизмов создания эффектов ХПЯ в твердом теле и в жидкости.

Методы исследования. В работе было использовано комплементарное сочетание времяразрешенной ХПЯ и зависимости ХПЯ от магнитного поля, что позволяет определить такие магниторезонансные параметры, как константы СТВ, g -факторы и времена ядерной парамагнитной релаксации короткоживущих радикалов. Также в работе были использованы методики ЯМР высокого разрешения, такие как спектроскопия в присутствии химического обмена и двумерные варианты ЯМР. Также одними из важных методов исследования в работе являются расчеты структуры и магниторезонансных параметров методом функционала плотности (DFT)

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся:

1. Установлен механизм и структура радикалов на геминальной стадии фотореакции ТСВР с ароматическими аминокислотами из сравнительного анализа интенсивностей сигналов в спектрах ХПЯ ^{13}C и ^1H и данных о константах СТВ, рассчитанных методом DFT.
2. Установление структуры короткоживущих радикалов S-метилцистеина и S-метилглутатиона и механизм реакции при различных значениях рН водных растворов.
3. Первое наблюдение ^1H ХПЯ в твердой матрице.
4. Данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами для ряда тридекамерных ДНК дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания, полученные из зависимости скорости обмена протонов этих оснований от концентрации акцепторов протона в водном растворе.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность выводов и результатов обеспечена использованием достаточно хорошо известных и апробированных методов. Вновь полученные результаты согласуются с известными ранее данными, а в некоторых случаях позволяют дискриминировать различные гипотезы относительно механизмов протекающих процессов.

Апробация работы. Результаты работы были лично представлены и обсуждались на следующих конференциях: *“Spin Physics, Spin Chemistry, Spin Technology (SPCT-2018)”* (2018, Новосибирск, Россия), *Modern Development of Magnetic Resonance*. (2015, Казань, Россия) *Российский симпозиум «Белки и пептиды»*, (2015, Новосибирск, Россия) *SCM 2015 - 14th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena*, (2015, Калькутта, Индия), *Modern Development of Magnetic Resonance* (2014, Казань, Россия), *School for young scientists “Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics”* (2014, Новосибирск, Россия), *International Scientific Student Conference “Student and scientific and technological progress.”* (2014, Новосибирск, Россия), *International Scientific Student Conference “Student and scientific and technological progress.”* (2013, Новосибирск, Россия).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в шести научных статьях [A1-A6], опубликованных в рецензируемых международных журналах, рекомендованных ВАК, и в восьми тезисах докладов международных конференций [A7-A15].

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка используемых сокращений, списка литературы и приложения. Полный объем диссертации составляет 142 страниц с 71

рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 217 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении отражена актуальность темы диссертации, сформулированы основные цели работы, описаны новизна и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, апробация работы, структура и объем диссертации.

Первая глава диссертации представляет собой обзор литературы по теме исследования и состоит из пяти разделов. Первый раздел посвящен механизму возникновения и экспериментальному проявлению химической поляризации ядер (ХПЯ). Во втором разделе описан механизм когерентного перераспределения поляризации среди ядерных спинов при прохождении области антипересечения уровней. В третьем разделе приведены физико-химические свойства используемых в работе соединений. Четвертый раздел представляет собой краткий обзор литературных данных по эксцизионной репарации ДНК. Пятый раздел посвящен обзору результатов исследования динамики раскрытия двойной спирали ДНК методом ЯМР.

Вторая глава – экспериментальные методы – посвящена подробному описанию используемых в работе экспериментальных установок и специально разработанных экспериментальных методик, которые позволяют создавать гиперполяризацию ХПЯ в сильном магнитном поле, а также в произвольных магнитных полях с последующим детектированием спектров высокого разрешения в однородном поле ЯМР- спектрометра. Переключение внешнего магнитного поля осуществляется за счет механического перемещения датчика ЯМР вместе с образцом в остаточном поле крио-магнита ЯМР спектрометра с рабочим

полем 7 Тл (300 МГц частота ^1H). Использование дополнительной системы электромагнитов позволяет проводить исследования в диапазоне полей от 0.1 мТл до 7 Тл. Достижимое минимальное время переключения поля ~ 0.3 с. Описана установка для времяразрешенных экспериментов ХПЯ, описаны методы математической обработки полученных результатов.

Третья глава – результаты и обсуждение – содержит описание основных результатов, полученных в работе. Глава разбита на шесть частей.

В первой части обсуждения показано, что химическая поляризация ядер (ХПЯ) в слабых магнитных полях, которая формируется в процессе спиновой эволюции в промежуточных радикальных парах, затем перераспределению поляризации в диамагнитных продуктах реакции. Такие явления имеют важное значение, когда ядерные спины продуктов реакции сильно связаны, что означает, что спин-спиновые взаимодействия сопоставимы с различиями в их зеемановском взаимодействии с внешним магнитным полем. В этом случае перенос поляризации является когерентным процессом; как следствие, спины могут получить значительную поляризацию, даже если они не имеют СТВ с электронным спином в радикальной паре, то есть не могут быть поляризованы непосредственно по механизмам ХПЯ. Это показано на ХПЯ н-бутиламина в качестве примера: в этом случае только $\alpha\text{-CH}_2$ протоны поляризованы напрямую, что подтверждается ХПЯ в сильном поле, в то время как $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$ и $\delta\text{-CH}_3$ протоны поляризуются только косвенно в связи с передачей поляризации от альфа- CH_2 протонов. Эти результаты показывают, что данные ХПЯ в низком магнитном поле следует интерпретировать с осторожностью, чтобы различать эффекты спиновой

эволюции в промежуточных радикальных парах и в диамагнитных продуктах реакции.

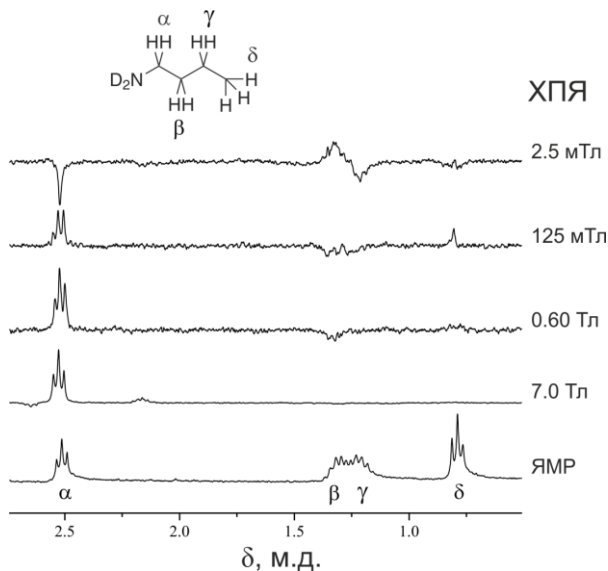


Рисунок 1. ^1H ХПЯ спектры н-бутиламина в реакции н-бутиламина и 4-карбокисбензофенона, полученные при облучении в разных полях $B_{\text{пр}}$. Протонный ЯМР-спектр в поле 7.0 Тл с отнесением сигналов показан ниже; также приведена структура н-бутиламина. Для получения спектров использовались 90° РЧ-импульсы

Вторая часть посвящена изучению фотоокислительно-восстановительной реакции между 3,3',4,4'-тетракарбокисбензофеноном (ТСВР) и L-гистидином (His). Эта реакция была исследована в нейтральном водном растворе с использованием метода ХПЯ с временным разрешением. Относительные величины изотропных констант сверхтонкого взаимодействия с ядрами ^{13}C в радикалах ТСВР и гистидина были получены из времязрешенных спектров ^{13}C -ХПЯ, записанных во время фотореакции ТСВР с гистидином при естественном содержании магнитного изотопа ^{13}C . Было установлено, что константы СТВ для

кетильного радикала ТСВР, рассчитанные с использованием теории функционала плотности, и полученные из времяразрешенных спектров ^{13}C -ХПЯ хорошо согласуются друг с другом. Был установлен механизм реакции тушения триплетного возбужденного ТСВР гистидином в нейтральном водном растворе. Из анализа полевой зависимости ^1H -ХПЯ, возникающей при этой же фотореакции, был получен g -фактор для радикала гистидина.

В третьей части константы сверхтонкого взаимодействия (КСТВ) короткоживущих радикалов 4-карбоксы, 4,4-дикарбоксы и 3,3', 4,4'-тетракарбоксыбензофенонов (4-СВР, ДСВР и ТСВР, соответственно), образованные в их фотореакция с тирозином, которые были получены при анализе спектров геминальной ХПЯ, сравнивали с КСТВ, рассчитанными с использованием теории функционала плотности. Из этого сравнения было установлено, что эффекты ХПЯ в ТСВР являются результатом суперпозиции вкладов трех типов радикальных структур ТСВР: не протонированного анионного радикала и двух анион-радикальных структур с одной протонированной карбоксильной группой в любом положении. Это позволило сделать вывод о том, что в реакции тушения возбужденного состояния хромофора перенос электрона сопровождается еще переносом протона (РСЕТ) на одну из четырех карбоксильных групп со сходными вероятностями. То же соотношение интенсивностей сигналов ХПЯ ТСВР и, следовательно, тот же механизм реакции был установлен для гистидина. Для 4-СВР и ДСВР триплетное тушение протекает также через РСЕТ, снова с образованием анионного радикала с протонированной карбоксильной группой.

В четвертой части метод времяразрешенной ХПЯ (ВР-ХПЯ) был применен к исследованию реакции фотоокисления S-метилцистеина, Cys(Me), и S-метилглутатиона, GS(Me). Было установлено, что реакция

Cys(Me) с фотосенсибилизатором, триплетно возбужденным 4-карбоксивензофеноном или 3,3',4,4'-тетракарбоксивензофеноном, происходит за счет переноса электрона от атома серы с образованием сероцентрированного катион-радикала. Из рН-зависимости ядерной поляризации установлено, что значение pK_a концевой аминогруппы этого радикала составляет 4.3, что значительно ниже, чем у исходного соединения, $pK_a = 9.0$. При рН ниже 4.3 сероцентрированный катион-радикал Cys(Me), сформированный в результате тушения триплет, участвует в реакции вырожденного обмена электрона с исходной молекулой, что приводит к быстрому затуханию ХПЯ во времени. При рН выше значения pK_a , ХПЯ постоянна во времени, что является результатом быстрого декарбокислирования циклического радикала с трехэлектронной связью между атомами серы и кислорода, который образуется из линейного радикала с незаряженной аминогруппой.

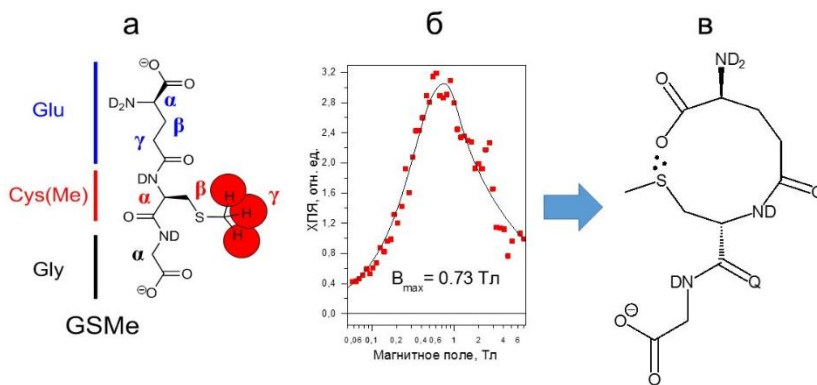


Рисунок 2. (а) Структура S-метилглутатиона, (б) полевая зависимость сигналов ^1H ХПЯ для протонов метильной группы остатка S-метилцистеина, (в) структура радикала GS(Me) с десятичленным циклом и трехэлектронной двухцентровой связью между атомами серы и кислорода.

Участие этого радикала было подтверждено зависимостью ХПЯ от магнитного поля в диапазоне от 0.1 до 7 Тл. Для GS(Me), образование циклического радикала, на который указывает независящая от времени интенсивность ХПЯ, коррелирует с депротонированием концевой аминокислотной группы остатка глутамата в составе молекулы GS(Me). Образование циклического радикала с трехэлектронной связью между атомами серы и азота исключается из-за отсутствия поляризации СН-протона в α -положении по отношению к аминокислотной группе, а также на основании анализа полевой зависимости ХПЯ, которая является типичной для (S \cdot :O) радикала. Таким образом, циклический радикал, возникающий при одноэлектронном окислении серы GS(Me), является 10-членным с трехэлектронной связью между атомом серы и атомом кислорода карбоксильной группы остатка глутамата.

Пятая часть посвящена исследованию динамики обратимого раскрытия двойной спирали тридекамерных ДНК дуплексов, содержащих химически модифицированные азотистые основания, моделирующие повреждения, репарируемые алкиладенин ДНК гликозилазой человека (AAG). Несмотря на интенсивные исследования, пока неясны молекулярное происхождение широкой субстратной специфичности и механизм дискриминации модифицированных от немодифицированных оснований ДНК. Разница между этими основаниями может быть связана с различными искажениями локальной структуры ДНК вокруг модифицированного основания, влияющими на эффективность достижения каталитически активной конформации. Другим основанием для узнавания субстрата могут быть различия в скорости открытия пар оснований. Этот фактор должен зависеть от стабильностей пар оснований в молекуле ДНК, что может быть изучено методом спектроскопии ЯМР.

В данном разделе устойчивость двойной спирали ДНК дуплексов с поврежденными азотистыми основаниями была изучена сайт-специфично по данным скорости обмена иминопотонов с протонами воды при различной концентрации катализатора обмена – свободного аммиака в водном растворе. Из зависимостей скоростей обмена от концентрации катализатора были извлечены сайт-специфичные константы равновесия выворачивания азотистых оснований, которые приведены на рисунке 3.

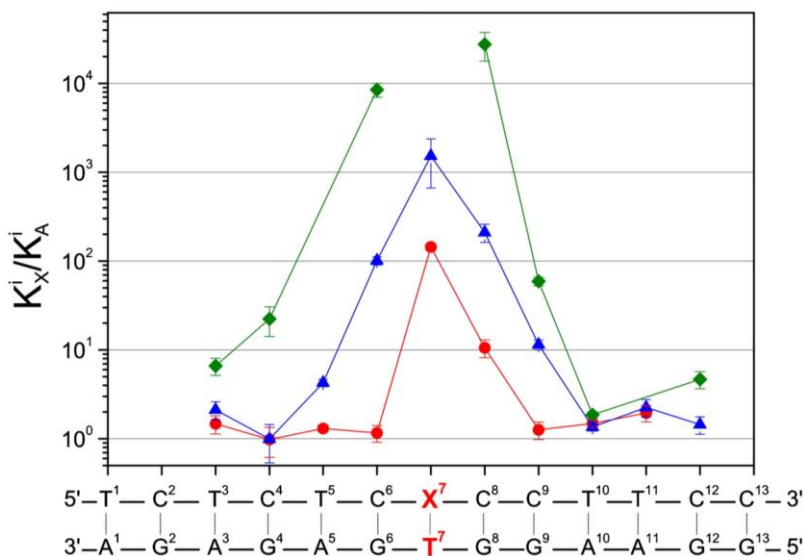


Рисунок 3. Отношение K_X^i / K_A^i , где K_X^i – сайт-специфичные константы равновесия спонтанного процесса выворачивания пары оснований с номером i в поврежденных дуплексах, а K_A^i – аналогичная величина для канонического $X=A$ дуплекса, ($X = F$, зеленые ромбы; $X = \epsilon A$, синие треугольники; $X = Hx$, красные круги).

Сопоставление этих результатов с кинетическими данными для реакции гидролиза гликозидной связи модифицированных оснований ферментом системы репарации позволило сделать вывод о том, что формирование каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса не является лимитирующей стадией в процессе удаления

повреждений алкиладенин ДНК гликозилазой человека. Иными словами, на скорость этого процесса сильнее влияют не процессы достижения нужной конформации, а непосредственно химические процессы гидролиза гликозидной связи.

В шестой части сообщается о первом наблюдении твердотельного ^1H фото-ХПЯ эффекта. ХПЯ наблюдается в замороженном растворе циклогексанона в 1, 4-диоксане d_8 при вращении под магическим углом и непрерывным облучением полным спектром ксеноновой дуговой лампы. Спектральные особенности показывают близкое сходство с наблюдаемыми в спектрах ^1H -жидкостного фото-ХПЯ-ЯМР.

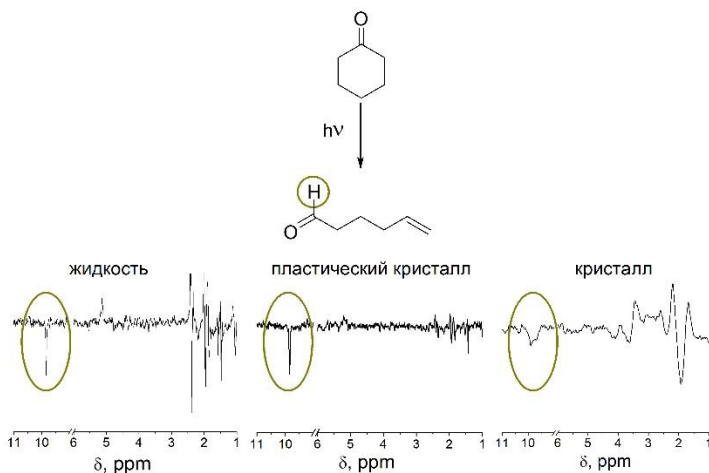


Рисунок 4. Сравнение спектров ^1H ХПЯ, полученных при вращении под магическим углом образцов, находящихся в разном фазовом состоянии.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Был обобщен подход к анализу геминальной ХПЯ, основанный на учете вклада в ^1H ХПЯ от трех радикальных пар на геминальной стадии, с его помощью в реакции ТСВР с гистидином и тирозином был

уточнен механизм реакции на геминальной стадии – это перенос электрона, и перенос электрона, связанный с переносом протона на одну из карбоксильных групп. Формирование кетильного радикала в результате таутомерных переходов происходит на более длинной (микросекундной) временной шкале, что подтверждается данными ^{13}C ХПЯ.

2. Изучены полевые зависимости ХПЯ в фотореакции ТСВР с S-метил-L-цистеином (Cys(Me)) в нейтральном растворе (pH 7.1) и в фотореакции 4-СВР с трипептидом S- метилглутатионом в щелочном растворе (pH 11.2). Установлено формирование короткоживущих циклических радикалов с трехэлектронной двухцентровой связью между атомами серы и кислорода для которых определены g-факторы, $g(\text{Cys}(\text{Me})^{\bullet})=2.0078\pm 0.0001$ и $g(\text{GS}(\text{Me})^{\bullet})=2.0080\pm 0.0001$.
3. Показано влияние когерентного переноса поляризации в диамагнитных молекулах в экспериментах по измерению полевой зависимости ХПЯ для фотореакции 4-СВР и n-бутиламина и дисперсии релаксации протонов n-бутиламина.
4. Получены сайт-специфичные данные о константах равновесия между открытой и закрытой формами тридекамерных ДНК дуплексов указывающие, что на скорость репарации влияет не стабильность двойной спирали дуплекса, а скорость химических процессов гидролиза гликозидной связи.
5. Впервые была зарегистрирована ХПЯ ^1H в твердой матрице при облучении замороженного раствора циклогексанона в 1,4-диоксане- d_8 при вращении под магическим углом в поле 9.4 Тл.

Список публикаций автора по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных журналах

- A1. **Panov** M.S., Bielytskyi P., Gräsing D., Yurkovskaya A.V., Matysik J., Same spectral signature in liquid-state and solid-state ^1H photoCIDNP NMR spectra of cyclohexanone // *Molecular Physics* – 2019. – V. 117, №19. – P.2756-2761
- A2. Morozova O. B., **Panov** M. S., Fishman N. N., Yurkovskaya A. V. Electron transfer vs proton-coupled electron transfer as the mechanism of reaction between amino acids and triplet-excited benzophenones revealed by time-resolved CIDNP // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2018. – V. 20, № 32. – P. 21127-21135
- A3. Morozova O. B., **Panov** M. S., Vieth H.-M., Yurkovskaya A. V. CIDNP study of sensitized photooxidation of S-methylcysteine and S-methylglutathione in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016. 321: 90-98.
- A4. Kuznetsov N. A., Kiryutin A. S., Kuznetsova A. A., **Panov** M. S., Barsukova M. O., Yurkovskaya A. V., Fedorova O. S. The formation of catalytically competent enzyme–substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017. 35: 950-967.
- A5. **Panov**, M. S., Pravdivtsev, A. N., Ivanov, K. L., Yurkovskaya, A. V., Vieth, H.-M. Coherent Polarization Transfer Effects Are Crucial for Interpreting Low-Field CIDNP Data. *Appl. Magn. Reson.* 2014. 45, 9, 893-
- A6. **Panov**, M. S., Saprygina N.N., Morozova O.B., Kiryutin A.S., Grishin Y.A., Yurkovskaya A. V. Photooxidation of Histidine by 3,3',4,4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: Time-Resolved and Field-Dependent CIDNP Study. *Appl. Magn. Reson.* 2014. 45, 10,

Тезисы докладов и труды научных конференций

- A7. **Panov** M.S., Bielytskyi P., Gräsing D., Yurkovskaya A.V., Matysik J., Same spectral signature in liquid-state and solid-state ^1H photo-CIDNP NMR spectra of cyclohexanone III International Conference "Spin Physics, Spin Chemistry, Spin Technology (SPCT-2018)", Novosibirsk, Russia Book of Abstracts: P. 114

- A8. Kuznetsov N. A., Kiryutin A. S., **Panov M. S.**, Yurkovskaya A. V., Fedorova O. S. Lesion impact on flipping-unflipping equilibrium of DNA duplexes: an NMR study. *Modern Development of Magnetic Resonance*. 2015 Kazan, Russia. Book of Abstracts: P. 22
- A9. **Панов М.С.**, Морозова О. Б., Юрковская А.В. Изучение структуры и реакций короткоживущих радикалов S-метилглутатиона в водном растворе методом химической поляризации ядер *Российский симпозиум «Белки и пептиды»*, 2015, Новосибирск, Россия, Сборник тезисов: С. 280
- A10. **Panov, M. S.**, Kiryutin, A. S., Fishman, N. N., Morozova, O. B., Yurkovskaya, A. V. Photooxidation of histidine by 3,3',4,4'-benzophenone tetracarboxylic acid in aqueous solution studied by time-resolved and field-dependent CIDNP. *SCM 2015 - 14th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena*, 2015 Kolkata, India. Book of Abstracts: P. 94
- A11. **Panov, M. S.**, Morozova, O. B., Yurkovskaya, A. V. Mechanism of photoreaction in aqueous solutions involving radicals of S-methylcysteine and S-methylglutathione studied by time resolved and magnetic field dependence CIDNP. *Modern Development of Magnetic Resonance*. 2014 Kazan, Russia. Book of Abstracts: P. 51
- A12. **Panov, M. S.**, Morozova, O. B., Yurkovskaya, A. V. Time resolved and magnetic field dependence CIDNP study of mechanism of photoreaction involving radicals of S-methylcysteine and S-methylglutathione. *School for young scientists "Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics"*. 2014 Novosibirsk, Russia. Book of Abstracts: P.78
- A13. **Panov, M. S.** Investigation of the magnetic field dependence of the CIDNP intensities in photoreaction 3,3', 4,4' tetracarboxybenzophenone and amino acids. *In International Scientific Student Conference "Student and scientific and technological progress."* 2014, Novosibirsk, Russia. Book of Abstracts: P. 89
- A14. **Panov, M. S.** Investigation of the mechanism photoreaction between 3,3', 4,4' tetracarboxybenzophenone and histidine by ^{13}C -CIDNP. *International Scientific Student Conference "Student and scientific and technological progress."* 2013, Novosibirsk, Russia. Book of Abstracts:P. 97