



УДК 577.112.4:577.113.4:541.144

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ
 γ -*n*-АЗИДОАНИЛИДОВ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХБадашкеева А. Г., Галль Т. С., Кнорре Д. Г.,
Лебедев А. В.Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Ефимова Е. В., Мызина С. Д.

Новосибирский государственный университет им. Ленинского комсомола

Показано, что при облучении с длиной волны 313 нм γ -*n*-азидоанилида АТР в водном растворе образуется высокорекционноспособное промежуточное соединение А, активно реагирующее с NH- и SH-группами, типичными для боковых радикалов белков. Реакция производного А с морфолином приводит к γ -2,5-бисморфолино-*n*-аминоанилиду АТР, структура которого подтверждена встречным синтезом из 2,5-бисморфолино-*n*-фенилендиамин и аденозин-5'-триметафосфата. В 0,01 н. HCl соединение А гидролизуетс я с образованием *n*-бензохинона и АТР. Как интермедиат А, так и продукт его реакции с морфолином при окислении дают ADP. На основании структур продуктов превращения и идентичности продуктов окисления производного А и γ -*n*-аминоанилида АТР соединение А идентифицировано как γ -*n*-бензохинониминимид АТР.

Эффективным подходом к исследованию структуры и функции ферментов является метод фотоаффинной модификации [1]. В качестве фотоактивной функции у реагентов для такой модификации широко используются арилизидные группы [1, 2]. Несмотря на значительное количество исследований с применением ароматических азидов, сам процесс фотомодификации биологических систем изучен плохо. В настоящее время нет систематических данных о строении продуктов модификации белков и нуклеиновых кислот арилизидами. Малоисследованными остаются процесс фотолиза арилизидов в водных растворах и продукты их превращения, хотя они могут оказывать определенное воздействие на проведение реакции модификации биополимеров.

Цель настоящей работы — изучение процесса фотолиза в водных растворах γ -*n*-азидоанилидов нуклеозид-5'-трифосфатов, которые были предложены несколько лет назад в качестве реагентов для модификации NTP-зависимых ферментов. УФ-облучение γ -*n*-азидоанилида АТР с λ 313 нм в присутствии воздуха приводит к образованию сложной смеси продуктов, судя по отсутствию изобестических точек в УФ-спектрах и появлению поглощения в видимой области. Чтобы свести все побочные процессы, обусловленные присутствием O₂, к минимуму, перед облучением через раствор фотореагента барботировали аргон.

На рис. 1 представлены изменения спектров γ -*n*-азидоанилида АТР в ходе облучения в атмосфере аргона. Наблюдается сдвиг в длинноволновую область и появление «типичного» плеча в правой области спектра. При облучении γ -*n*-азидоанилида АТР и *n*-азидоанилида пиррофосфорной кислоты в УФ-спектрах также наблюдали появление продукта, имеющего аналогичное плечо в спектре [3]. Наличие изобестических точек указывает на накопление одного основного продукта (соединение А).

Сокращения: DCC — дициклогексилкарбодимид, MRX — микроколоночная хроматография, DMSO — диметилсульфоксид, СМЕС — *n*-толуолсульфонат циклогексил- β -[N-(N-метилморфолиний)этил]карбодимида.

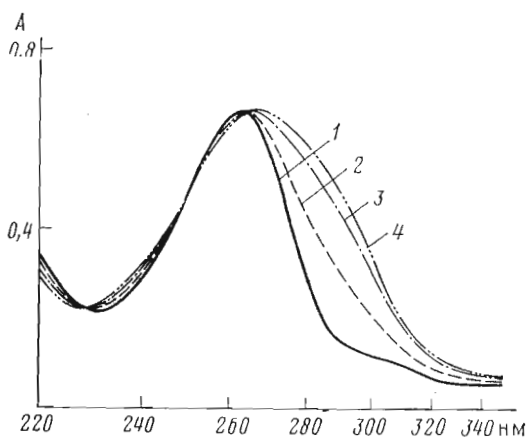


Рис. 1

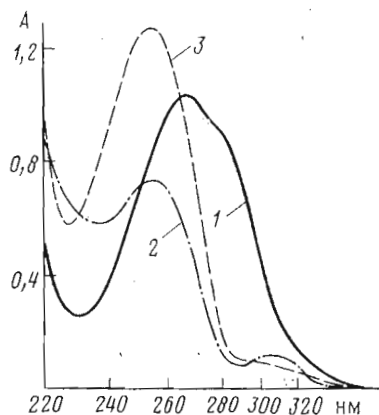


Рис. 3

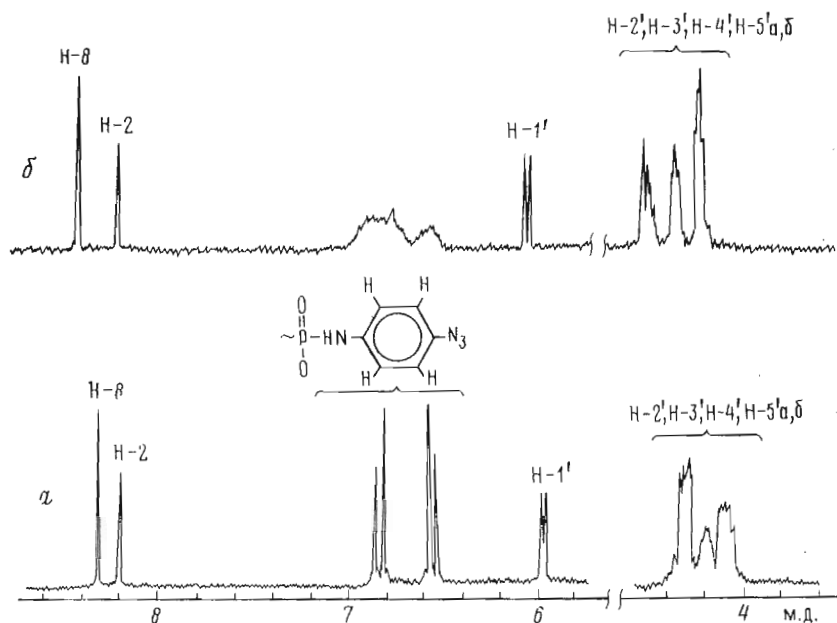


Рис. 2

Рис. 1. УФ-спектры γ -*n*-азидоанилида АТР (1) и его же после облучения в воде в атмосфере аргона в течение 60 (2), 75 (3) и 90 с (4)

Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектры $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора γ -*n*-азидоанилида АТР в D_2O до (а) и после (б) облучения

Рис. 3. УФ-спектры производного А (1), продукта взаимодействия А с морфолином (2), γ -*n*-аминоанилида АТР (3)

Образование нового соединения при фотоллизе γ -*n*-азидоанилида АТР регистрируется и в спектрах ^1H -ЯМР. На рис. 2 приведены спектры ^1H -ЯМР γ -*n*-азидоанилида АТР до и после облучения в течение 5 мин. Видно, что в результате фотоллиза произошло существенное изменение химических сдвигов сигналов ряда протонов (Н-8, протонов рибозы). Кроме того, резко изменилась структура сигналов в области 6,5–7,0 м.д. При этом спиновая АА'ВВ'-система превратилась в слаборазрешенный сигнал. Следовательно, у вновь образовавшегося соединения А все протоны ароматического кольца неэквивалентны. Для выяснения участия данного продукта фотоллиза в фотоаффинной модификации были изучены реакции продукта А с нуклеофилами, моделирующими функциональные группы белков.

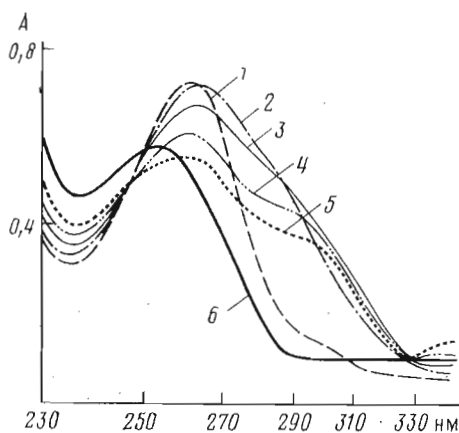


Рис. 4. УФ-спектры γ -*n*-азидоанилида АТР (1) и его же после облучения в 1 М изопропиламин в атмосфере аргона в течение 30 (2), 90 (3), 150 (4), 210 с (5), а также после облучения в течение 210 с с последующей инкубацией в темноте в течение 50 мин (6)

При добавлении к облученному γ -*n*-азидоанилиду АТР нуклеофилов (1 М растворы морфолина, β -меркаптоэтанола, имидазола, изопропиламина, *трет*-бутиламина) происходят изменения в УФ-спектре, что свидетельствует о протекании реакции с нуклеофильными реагентами, причем скорость реакции зависит от их нуклеофильности. Если изменения в УФ-спектрах при добавлении морфолина или β -меркаптоэтанола заканчиваются спустя 1,5 мин, то при добавлении имидазола продолжительность изменения в УФ-спектре увеличивается до 30 мин, а реакция с *трет*-бутиламином прекращается только через 150 мин.

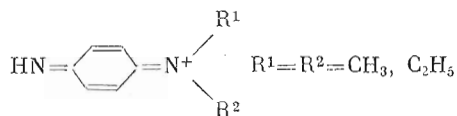
Общей чертой спектральных изменений является исчезновение «правого плеча», типичного для производного А. УФ-спектр производного А и продукта взаимодействия А с морфолином (продукт В) представлен на рис. 3 а, б.

Соединения с аналогичными УФ-спектрами накапливаются при облучении γ -*n*-азидоанилида АТР непосредственно в 1 М растворах вышеуказанных нуклеофилов. На рис. 4 приведены спектральные изменения в результате облучения γ -*n*-азидоанилида АТР в 1 М изопропиламин. Как видно, на первой стадии реакции происходит образование производного А, которое затем уже вступает в реакцию с изопропиламином. При облучении в присутствии морфолина реакция протекает настолько быстро, что уже в первые минуты регистрируется спектр конечного продукта реакции (соединение Б). Следует отметить, что соединение Б образуется и при проведении облучения γ -*n*-азидоанилида АТР в 1 М растворе морфолина без предварительного барботирования последнего аргоном. Это указывает на то, что в присутствии кислорода воздуха первоначальным продуктом фотолиза также является соединение А. Однако оно настолько нестабильно в водных растворах, что зарегистрировать его в присутствии O_2 не удается. Если облучение γ -*n*-азидоанилида АТР проводить в метаноле с 0,4% содержанием H_2O , то накопление соединения А можно регистрировать и при контакте раствора с воздухом.

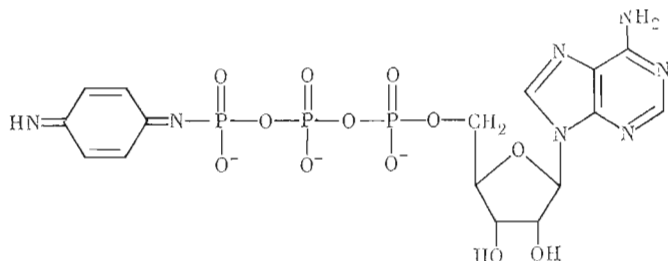
Совокупность всех результатов говорит о том, что бирадикал пиррена, который, как известно, является первичным продуктом фотопревращения арилазидов, в водных растворах легко превращается в относительно долгоживущее промежуточное соединение А, которое быстро реагирует с нуклеофильными реагентами.

Недавно нами было установлено, что при облучении *n*-азидоанилина в воде образуется триплетный нитрен, который затем превращается в реакционноспособный в отношении нуклеофилов *n*-бензохинондимин [3].

Ранее сходный результат был получен при фотолизе в воде *N,N*-дизамещенных *n*-азидоанилинов [4]. В ходе их облучения образуются *n*-бензохинониминиминиевые соли:



Эти результаты и данные по реакционной способности соединения А в отношении нуклеофилов позволяют предположить, что соединение А имеет следующую структуру:

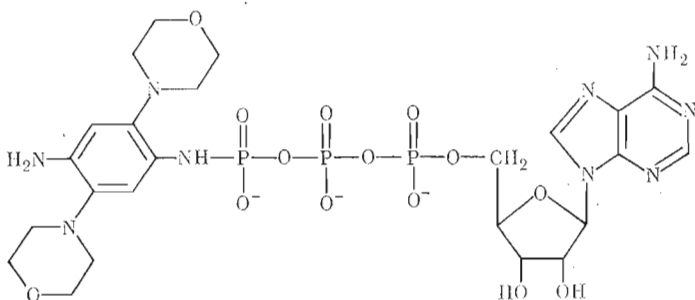


Сложный характер спектра ¹H-ЯМР γ -*n*-бензохинониминимида АТР в области 6,5–7 м.д., вероятно, обусловлен существованием γ -*n*-бензохинондииминного фрагмента в *син*- или/и *анти*-форме. В любом из этих случаев все четыре протона кольца оказываются неэквивалентными и должны давать спиновую ABCD-систему. Последняя, как известно, представляет собой суперпозицию из 56 линий [5].

При добавлении к продукту фотолиза γ -*n*-азидоанилида АТР 0,01 н. HCl образуются АТР и *n*-бензохинон, которые можно рассматривать как продукты кислотного гидролиза производного *n*-бензохинондиимина.

Как известно [6], производные *n*-бензохинондиимин образуются при окислении соответствующих *n*-фенилендиаминов. Чтобы установить структуру производного А, нами был синтезирован γ -*n*-аминоанилид АТР, УФ-спектр которого представлен на рис. 3. Однако из-за крайней неустойчивости производного А в отношении окислителей получить его в результате окисления γ -*n*-аминоанилида АТР не удалось. Конечные же продукты окисления идентичны продуктам дальнейшего превращения соединения А. Так, при упаривании аммиачного раствора соединения А на воздухе оно гидролизуетеся с образованием АРР. Аналогично при окислении γ -*n*-аминоанилида АТР Н₂О₂ в аммиачном растворе и последующем упаривании также наблюдается образование АРР. По данным МКХ, ТСХ, УФ-спектроскопии, соединение А в присутствии NaIO₄ превращается в продукты, идентичные веществам, образующимся при окислении γ -*n*-аминоанилида АТР NaIO₄.

Ранее [3] было показано, что образующийся в ходе облучения *n*-азидоанилида в воде *n*-бензохинондиимин реагирует с морфолином с образованием 2,5-бисморфолино-*n*-фенилендиамина. Для установления структуры соединения Б, образующегося при облучении γ -*n*-азидоанилида АТР в присутствии морфолина, нами был синтезирован γ -2,5-бисморфолино-*n*-аминоанилид АТР путем фосфорилирования 2,5-бисморфолино-*n*-фенилендиамина аденозин-5'-триметафосфатом. По данным МКХ на целлюлозе DE-41, ТСХ на силуфол в системе А, УФ-спектру в воде, это соединение идентично продукту Б. Полученные результаты позволяют предложить следующую структуру соединения Б:



Образование такого типа соединения при облучении γ -*n*-азидоанилида АТР в присутствии морфолина также свидетельствует о том, что обра-

зующееся в ходе фотолитиза соединение А имеет структуру γ -*n*-бензохинониминимида АТР.

Продукт В окисляется кислородом воздуха. При выдерживании с H_2O_2 в аммиачном растворе соединение гидролизуется с образованием АДФ и одно-двухзарядного продукта. Продукт В нестабилен в 0,1 н. НСl. В условиях гидролиза фосфамидной связи образуется сложная смесь продуктов, среди которых присутствуют АТР и АДФ.

Если предположить, что фотолитиз ароматических азидов в активном центре ферментов протекает так же, как и в водном растворе, то не исключено, что фотореагенты на основе *n*-азидоанилина будут претерпевать превращения в производное *n*-бензохинондиимина. Данное соединение в силу своей реакционной способности в отношении нуклеофилов будет реагировать с нуклеофильными функциональными группами биополимеров с образованием соединений типа В. Поэтому при выделении модифицированных пептидов необходимо учитывать данные по нестабильности такого типа соединений в отношении окислителей и кислот.

Экспериментальная часть

В работе были использованы DCC (Sigma, США), натриевые и триэтиламмониевые соли АТР (Reanal, ВНР), СМ-сефадекс С-25, DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), силикагель (Merck, ФРГ), абсолютные метиловый спирт, эфир и диметилсульфоксид. Триэтиламин, морфолин, *трет*-бутиламин, изопропиламин перегнаны над КОН. СМЕС и *n*-азидоанилин получены в группе наработки НИОХ.

Тонкослойную хроматографию на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, ЧССР) проводили в системах диоксан — аммиак — вода, 6 : 1 : 4 (А) и диэтиловый эфир (Б); МКХ — на DEAE-целлюлозе DE-41 (Whatman, Англия) в линейном градиенте концентраций калий-фосфатного буфера в 7 М мочеvine, рН 7,5, с использованием хроматографа «Обь-2» (СССР).

УФ-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра Spesord UV VIS (Carl Zeiss Jena, ГДР).

Спектры 1H -ЯМР записывали в импульсном режиме на спектрометре XL-200 (Varian, США) на частоте 200 МГц при 20° С в растворе D_2O , рD 6,5 (измерено на рН-метре рН-340 без поправки на изотопный эффект). Ширина радиочастотного импульса 5 мкс ($\sim 90^\circ$), задержка между импульсами 5 с, 400 накоплений. Шкала химических сдвигов приведена относительно тетраметилсилана.

Триэтиламмониевую соль АТР получали пропусканием раствора 600 мкмоль натривой соли нуклеотида в 10 мл H_2O через колонку с СМ-сефадексом С-25 в (Et_3NH^+ -форма, 40 мл, $1,8 \times 20$ см) с последующей элюцией водой со скоростью 20–30 мл/ч. Фракции, поглощающие при 260 нм, объединяли, упаривали досуха при 35–40° С, затем упаривали 3 раза с метанолом. Остаток растворяли в 5 мл метанола и по каплям добавляли к 100 мл эфира, осадок отделяли центрифугированием ($-20^\circ C$, 10 мин, 4000 об/мин), промывали эфиром (2×50 мл) и высушивали над P_2O_5 . Выход 0,52 ммоль (95 %).

γ -*n*-Азидоанилид АТР получали по методике [7]. γ -*n*-Аминоанилид АТР получали аналогично с выходом 25%, R_f 0,62 (А). Продукты были гомогенны по данным МКХ и ТСХ в системе А и соответствовали трехзарядным соединениям. УФ-спектр в метаноле представлен на рис. 3в. В 0,05 н. НСl при 37° С γ -*n*-аминоанилид АТР гидролизуется в течение 2 ч с образованием АТР и *n*-фенилендиимина.

Аденозин-5'-триметафосфат [2]. К раствору 5 мкмоль триэтиламмониевой соли АТР в 0,1 мл DMSO добавляли 10,3 мг (50 мкмоль) DCC и 0,64 мг пиридинийхлорида. Смесь выдерживали 12 мин (полнота активации в этих условиях количественная), после чего отделяли от выпавшей в осадок дициклогексилмочевины центрифугированием (10° С, 10 мин, 4500 об/мин). Супернатант по каплям добавляли к 7 мл эфира, осадок отделяли центрифугированием ($-20^\circ C$, 10 мин, 4000 об/мин), промывали эфиром (3×7 мл), растворяли в 0,1 мл DMSO, хранили при $-20^\circ C$ не более 30 мин.

Облучение проводили светом лампы ДРШ-1000 через комбинацию фильтров БС-4, УФС-2 и насыщенного раствора NiCl_2 при λ 313 нм и интенсивности падающего света $1,4 \cdot 10^{15}$ квант \cdot $\text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ (концентрация образцов 10^{-4} – 10^{-3} М, температура 20–25° С). Перед облучением для удаления кислорода через водный раствор образца, находящийся в кювете или ампуле ЯМР-спектрометра, барботировали в течение 30 мин аргон, очищенный от следов кислорода пропусканием через щелочной раствор пирогаллола.

Нуклеофилы к продукту фотоллиза γ -*n*-азидоанилида АТР добавляли при непрерывном барботировании аргоном так, чтобы их конечная концентрация была 1 М (при этом изменение объема составляло не более 5% объема реакционной смеси).

γ -2,5-Бисморфолино-*n*-аминоанилид АТР. а) 2,5-Бисморфолино-*n*-фенилендиамин. 5,36 мг *n*-азидоанилина растворяли в 6,6 мл 1 М раствора морфолина, облучали порциями по 0,38 мл в кювете длиной 0,2 см. За исчезновением азид следили ТСХ в системе Б. Облученный раствор *n*-азидоанилина упаривали досуха, растворяли в 2 мл хлороформа, пропускали через колонку с силикагелем (10 мл). Элюировали 50 мл эфира, после чего 10 мл хлороформа, а затем системой хлороформ – метанол, 1:1 (25 мл). Последний элюат, содержащий продукт, упаривали досуха, колбу с сухим веществом заполняли аргоном.

Физико-химические характеристики продукта приведены в работе [3]. Выход 20 мкмоль (50%).

б) γ -2,5-Бисморфолино-*n*-аминоанилид АТР. Раствор 2,5 мкмоль аденозин-5'-триметафосфата в 0,05 мл DMSO добавляли к 20 мкмоль 2,5-бисморфолино-*n*-фенилендиамина в 0,1 мл DMSO. Реакционную смесь продували аргоном 3 ч, после чего по каплям добавляли к 10 мл эфира. Осадок отделяли центрифугированием (10° С, 10 мин, 4500 об/мин), промывали хлороформом (5×5 мл), эфиром (2×5 мл). Выход 0,7 мкмоль (28%). R_f 0,64 (А). УФ-спектр (H_2O), $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 253,309; $A_{240}/A_{260}=0,88$, $A_{250}/A_{260}=1,04$, $A_{280}/A_{260}=0,25$, $A_{300}/A_{260}=0,16$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Colowik S. P., Kaplan N. O. In: Methods in Enzymology / Eds Jakoby W. B., Wilchek M. N. Y. — San Francisco — London: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 65–115.
2. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Soviet Scientific Reviews, Section D / Ed. Skulachev V. P. Chur — London — N. Y.: Harwood Acad. Publ. GmbH, 1981, v. 2, p. 107–143.
3. Badashkeyeva A. G., Gall T. S., Efimova E. V., Knorre D. G., Lebedev A. V., Mysina S. D. FEBS Lett., 1983, v. 155, № 2, p. 263–266.
4. Baetzold R. C., Tong L. K. I. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 6, p. 1347–1353.
5. Эмсли Дж., Финей Дж., Сарклиф Л. В кн.: Спектроскопия ЯМР высокого разрешения. М.: Мир, т. 1, с. 404–408.
6. Finley K. T., Tong L. K. I. In: The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond / Ed. Patai S. N. Y.: Interscience, 1970, v. 14, p. 663–729.
7. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 352–364.

Поступила в редакцию
20.X.1983

A STUDY ON PHOTOCONVERSION PRODUCTS OF NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATE γ -*p*-AZIDOANILIDES IN AQUEOUS SOLUTION

BADASHKEYEVA A. G., GALL T. S., KNORRE D. G.,
LEBEDEV A. V., EFIMOVA E. V., MYZINA S. D.

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Novosibirsk State University

It is shown that photolysis of arylazido group of ATP γ -*p*-azidoanilide in aqueous solution results in the formation of a highly reactive intermediate (A) which readily reacts with NH_2 - and SH-groups typical of protein side chains. The reaction of intermediate A with morpholine leads to ATP γ -2,5-bis-morpholino-*p*-aminoanilide. The structure of the latter was confirmed by synthesis from 2,5-bis-morpholino-*p*-phenylenediamine and adenosine-5'-trimetaphosphate. Hydrolysis of intermediate A in 0,01 N HCl results in the formation of *p*-benzoquinone and ATP. Oxidation of either intermediate A or of its reaction product with morpholine give rise to ADP. High reactivity towards nucleophiles, the hydrolysis products and the structure of morpholine derivative of the compound A have permitted to identify it as ATP γ -*p*-benzoquinoneimineimide.