



УДК 577.314.337: 547.963.3: 541.144.8

ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ АНАЛОГИ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II НА ОСНОВЕ АРИЛАЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ γ -АМИДОФОСФАТОВ NTP: СИНТЕЗ, ХИМИЧЕСКИЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

© 2005 г. Д. Г. Кнорре*, Н. В. Кудряшова*, Т. В. Попова*, М. М. Шакиров^{2*},
В. С. Мальшакова^{3*}, О. Е. Шпенев^{3*}, Л. К. Савинкова^{4*},
М. В. Серебрякова^{5*}, Т. С. Годовикова^{*#}

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

^{2*}Институт органической химии СО РАН, Новосибирск;

^{3*}Новосибирский государственный университет;

^{4*}Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

^{5*}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Поступила в редакцию 21.02.2005 г. Принята к печати 05.03.2005 г.

Синтезированы фотоактивируемые производные $Ar-NH-(CH_2)_n-NHpppV$, где Ar = n -азидофенильная группа, V = Ado, n = 2 (**Ia**) и 4 (**Ib**); Ar = 5-азидо-2-нитробензоильная группа, n = 2 (**IIa**) и 4 (**IIb**); Ar = 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоильная группа, n = 3, V = Ado (**IIIa**) и Guo (**IIIb**). Обнаружено, что стабильность фосфамидной связи в фотоаналогах NTP определяется не только природой гетероциклического основания, но и структурой фотоактивируемой группы. В случае соединения (**IIIa**) наблюдается гидролиз с регенерацией арилизидного остатка и АТР, в то время как фотоактивируемые производные (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**) и (**IIIb**) в водных растворах устойчивы. В условиях специфической инициации транскрипции, осуществляемой под контролем позднего промотора аденовируса, фотоаналоги (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**) и (**IIb**) обладают свойствами иницирующего субстрата по отношению к РНК-полимеразе II из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, что фотолитиз N -(4-азидофенил)-1,4-диаминобутана и N -(5-азидо-2-нитробензил)-1,3-диаминопропана – функциональных фрагментов фотоаффинных реагентов – в водных растворах приводит к образованию производного n -бензохинондиимина и n -нитрозамещенного N -арилгидроксиламина, соответственно. Последний в водных растворах претерпевает ряд превращений с образованием нитрозосоединения. Сделан вывод, что при использовании реагентов на основе n -нитрофенилазида частицей, принимающей участие в модификации белков, может быть не нитрен, как считали ранее, а продукт его дальнейшего превращения – нитрозосоединение.

Ключевые слова: фотоаналоги нуклеозид-5'-трифосфатов, ароматические азиды, фотолитиз, транскрипция, РНК-полимераза II.

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения динамических аспектов функционирования транскрипционного комплекса одним из перспективных является метод фотоаффинной модификации с использованием арилизидных реагентов [1, 2]. Введение фотоактивируемой группировки по концевой фосфатной группе позволяет сохранить способность полученных реагентов к аффинному связыванию [2]. Субстратная активность γ -производных NTP открыла возможность разработки нового подхода к аффинной модификации РНК-полимеразы [3, 4]. Идея этого подхода состоит в том, что в реакционную смесь, содержащую

матрицу и фермент, добавляют нерадиоактивное производное NTP с потенциально реакционноспособной функцией в находящемся при γ -фосфате заместителе и еще один или два радиоактивных NTP. При этом синтезируется олигонуклеотид с фотоактивируемой группой, присоединенной к 5'-трифосфатному остатку, длина и структура которого определяются структурой матрицы и набором нуклеозид-5'-трифосфатов, добавляемых в смесь с транскрипционно активным комплексом (схема 1).

Транскрипт, образующийся при облучении фотоактивируемой группы светом с соответствующей длиной волны, может ковалентно связаться с РНК-полимеразой. При этом сам факт ковалент-

Автор для переписки (факс: (383 2) 33-36-77; эл. почта: godov@niboch.nsc.ru).

ного связывания радиоактивной молекулы транскрипта с белком является веским критерием аффинности модификации, так как фотоактивируемый субстрат $N_3AgpppX$ не радиоактивен, а радиоактивный субстрат pp^*pY не связывается ковалентно с белком. Таким образом, с использованием комбинации двух субстратов, один из которых – фотоактивируемое производное NTP по γ -фосфату, а второй – радиоактивно меченный NTP, открывается уникальная возможность для изучения “коридора выхода” РНК, т.е. фактически “следа” перемещения образующегося продукта на ферменте по мере его удаления от каталитического центра, в котором происходит биосинтез.

В качестве фотоактивируемых аналогов иницирующего субстрата ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* ранее использовались γ -(*n*-азидоанилиды) АТР и GTP [5], а также γ -(*n*-азидо)бензиламид GTP [6]. Последний реагент отличается низкой чувствительностью к ближнему УФ-свету, что ограничивает его применение в исследованиях макромолекулярных комплексов, чувствительных к УФ-свету. Производные *n*-азидоанилина [7, 8], реагирующие при облучении через промежуточное образование высокоэлектрофильного производного *n*-бензохинондиимина [7, 9, 10], перспективны для селективной модификации аминокислотных остатков белков. Однако, если *n*-азидоанилин присоединен непосредственно по концевому фосфату нуклеозид-5'-трифосфата или олигонуклеотида, реагент в ходе модификации может отщепляться от аффинного фрагмента, создавая определенные трудности при идентификации продуктов фотомодификации [7, 11]. Разрыв связи можно предотвратить, если фотоактивируемую группу и аффинную часть в реагенте соединить полиметиленовым спейсером $-(CH_2)_n-$ ($n = 2, 4, 6$) [8, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлен синтез и характеристика ряда производных NTP по γ -фосфату, различающихся как природой арилизидного остатка (4-азидофенильный, 5-азидо-2-нитро- и 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоильный), так и размером спейсера, соединяющего последний с нуклеотидным фрагментом. Функциональные фрагменты этих реагентов существенно различаются по фотохимическим свойствам, поскольку при облучении УФ-светом они генерируют разные активные промежуточные частицы. Для 5-азидо-2-нитробензоильного остатка характерно образование триплетного нитрена [13, 14], для *n*-азидоперфторбензоильного – синглетного [15, 16]. *n*-Азидоанилин и его производные, как уже было отмечено выше, при облучении образуют арилнитрены, которые в водных растворах практически мгновенно превращаются в производные *n*-бензохинондиимина [8–10]. Изменение длины линке-

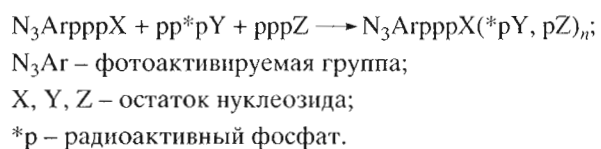


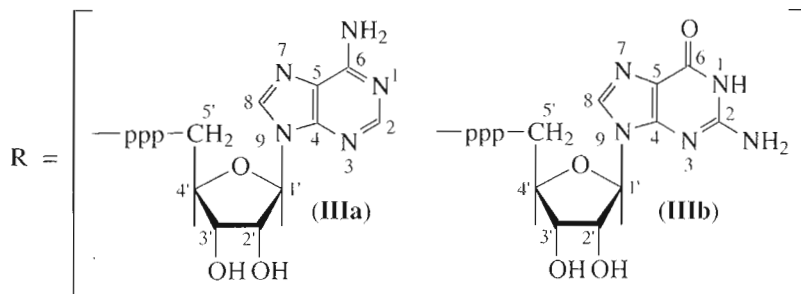
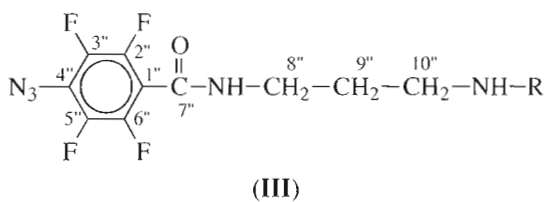
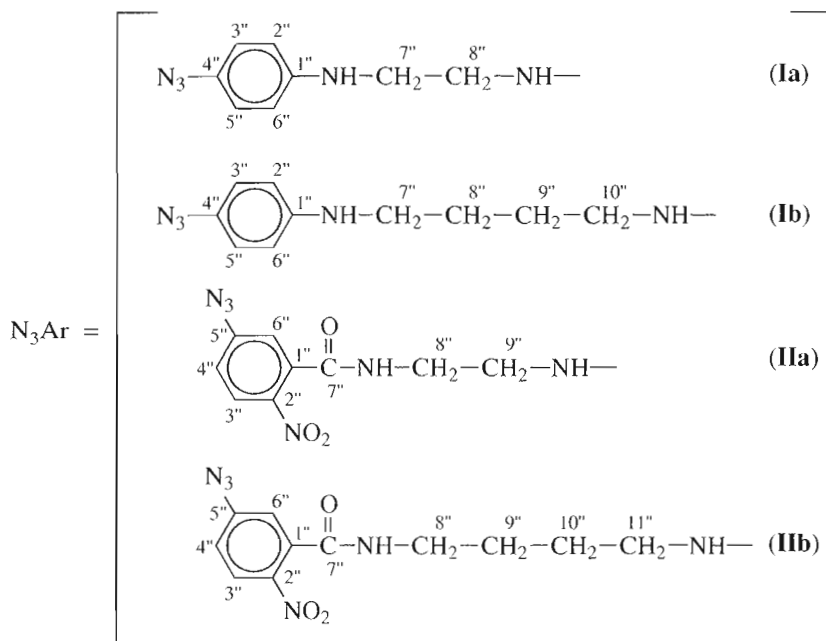
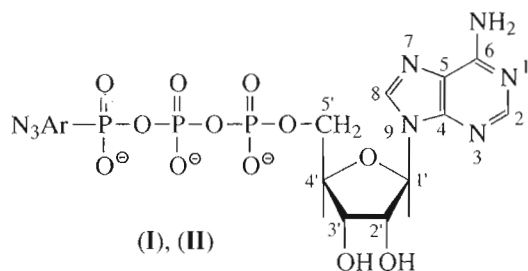
Схема 1. Синтез в системе РНК-полимеразы II радиоактивно меченного транскрипта, содержащего фотоактивную группу на 5'-конце.

ра, соединяющего фотоактивируемую группу с γ -фосфатом NTP, может оказаться полезным при изучении белкового окружения не только в непосредственной близости от нуклеиновой кислоты, но и на значительном расстоянии от нее.

Присоединение различных групп по γ -фосфату можно осуществить через взаимодействие их с циклическим нуклеозид-5'-триметафосфатом [2]. Среди многочисленных активирующих реагентов наиболее широкое применение для получения последнего нашли карбодиимиды [2] и смесь трифенилфосфина с 2,2'-дипиридилдисульфидом [17]. В неводных растворителях, в ходе активации обоими типами реагентов нуклеозид-5'-триметафосфат образуется с количественным выходом. Однако при проведении реакции в апротонных растворителях для обеспечения их должной растворимости необходимо получать подходящие три- или тетраалкиламмониевые соли NTP. Это приводит к увеличению времени процесса и к неизбежной потере нуклеотидного материала.

Кинетические исследования кислотно-катализируемой активации АТР с помощью *n*-толуолсульфоната дициклогексил- β -[*N*-(*N*-метилморфолиний)]этилкарбодиимиды показали, что в водном растворе также накапливается аденозин-5'-триметафосфат [18]. Однако при этом практически невозможно добиться количественного выхода нуклеозид-5'-триметафосфата из-за протекающего параллельно гидролиза. Проведение активации NTP в присутствии нуклеофила – акцептора триметафосфата, могло бы, тем не менее, привести к высокому выходу γ -производного NTP. В то же время для этого необходимо, чтобы акцептор сочетал высокую нуклеофильность с малой основностью, так как сильные основания резко замедляют реакции с участием водорастворимого карбодиимиды. Например, высокие выходы γ -производных АТР (амидофосфатов) были получены только с анилином и его производными [19]. При реакции с более основными аминами результаты оказались неудовлетворительными.

Ранее [17] были предложены оптимальные условия для проведения реакции селективного амидирования монозамещенных фосфатных групп в водном *N,N*-диметилформамиде с использованием окислительно-восстановительной пары – трифенилфосфин/2,2'-дипиридилдисульфид [$PhP_3/(PyS)_2$].



Структуры фотоаналогов АТФ и ГТФ.

Однако, как и в случае водорастворимого карбодиимида, выход амидофосфатов в водно-органическом растворителе зависел от основности и концентрации амина [20]. Таким образом, представляло ин-

терес найти оптимальные условия синтеза амидофосфатов АТФ в присутствии воды при использовании в качестве активирующих реагентов смеси $PhP_3/(PyS)_2$.

Учитывая зависимость реакции активации от основности аминоспейсера фотореагента, а также, для того чтобы предотвратить восстановление азидогруппы в присутствии окислительно-восстановительной пары, мы разделили во времени стадии активации и аминолитиза. Активацию нуклеозид-5'-трифосфата проводили в апротонном растворителе (DMSO) в присутствии 5–10% воды. При обработке натриевой соли АТР 6-кратным избытком активирующих реагентов происходит быстрое и количественное образование соединения с триметафосфатной структурой, которая является методом импульсной спектроскопии. Уже через 10 мин в спектрах ^{31}P -ЯМР реакционной смеси регистрируются сигналы, характерные для аденозин-5'-триметафосфата [2]: триплет (-20.9 м.д., 1P , J 21 Гц) и дублет (-22.4 м.д., 2P , J 21 Гц). После выделения нуклеозид-5'-триметафосфата из реакционной смеси путем осаждения эфиром к нему добавляли водные растворы ароматических азидов. Образующиеся при аминолитизе продукты выделяли из реакционной смеси осаждением в раствор 6% LiClO_4 в ацетоне. В случае неполной степени превращения АТР в его фотоактивируемое производное последнее выделяли из реакционной смеси ВЭЖХ на смоле с обращенной фазой. Выходы продуктов присоединения арилизидных остатков к АТР были не ниже 80%.

Синтезированные фотоактивируемые производные НТР (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**), (**IIIa**), (**IIIb**) индивидуальны по данным ионообменной и высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Уменьшение времени удерживания на анионообменной смоле в соответствии с уменьшением суммарного заряда на 1, а также смещение сигнала γ -фосфата на $\delta \sim 6$ м.д. в слабое поле свидетельствуют о превращении нуклеозид-5'-трифосфата в алифатический фосфамид. На наличие в выделенных продуктах гидрофобных ароматических остатков указывает тот факт, что нуклеотидные производные элюируются с обращенной фазы при более высокой концентрации ацетонитрила по сравнению с исходным НТР. Из данных спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H (см. "Эксперимент. часть") видно, что в состав производных (**Ia**) и (**Ib**) входит *n*-азидофенильная группа ($\delta \sim 6.8$ и ~ 7 м.д. в D_2O), в то время как в соединениях (**IIa**) и (**IIb**) присутствует 5-азидо-2-нитробензоильный остаток (δ 7.25, 7.28, 8.2 м.д. в D_2O) [21]. В электронном спектре поглощения соединений (**II**) наблюдается дополнительный максимум (λ_{max} 320 нм), близкий к максимуму поглощения исходного *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,2-диаминоэтана [21]. В спектрах ^{19}F -ЯМР соединений (**IIIa**) и (**IIIb**) регистрируются сигналы, характерные для перфторазидобензоильного остатка (δ 13.18, 22.05 м.д. в D_2O). В ИК-спектрах синтезированных производных присутствует характерная для азидогруппы полоса поглощения [22] в области 2114–2130 cm^{-1} .

Известно [23], что в ряде случаев остаток аденина может выступать в роли внутримолекулярного катализатора гидролиза разного типа связей. В связи с этим нами была детально исследована устойчивость синтезированных фотоаналогов НТР. Водные растворы соединений (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**), (**IIIa**) и (**IIIb**) выдерживали при 4°C. За ходом гидролиза следили путем записи спектров ^{31}P -ЯМР. Было обнаружено, что уже через сутки в спектрах водного раствора соединения (**IIIa**) регистрируются сигналы, характерные для аденозин-5'-трифосфата [2]: триплет (-22.9 м.д., 1P , J 19 Гц) и два дублета (-11.5 и -7.6 м.д., оба 1P , J 19 Гц). Продукт гидролиза в соответствии со своей структурой элюировался с анионообменной смолы как соединение, имеющее на один заряд больше, чем исходный γ -амидофосфат АТР. Время полупревращения соединения (**IIIa**) в АТР составляет 120 ч. В то же время фотоаналоги (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**) и (**IIIb**) в условиях проведения эксперимента были устойчивы. Таким образом, устойчивость фосфамидной связи арилизидных производных γ -амидофосфата НТР к гидролизу определяется не только природой гетероциклического основания, но и структурой фотоактивируемой группы.

Возможность включения фотоаналогов (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**) в транскрипт была исследована нами с использованием реакционной смеси для синтеза РНК в системе РНК-полимеразы II и базальных факторов транскрипции из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для реакции транскрипции в качестве матрицы использовали суперскрученную ДНК, содержащую поздний промотор аденовируса (AdML) ($-39/+20$). Известно, что для инициации специфической транскрипции на ДНК достаточно присутствия минимального набора базальных факторов транскрипции [24, 25]. Согласно используемому нами методу выделения [26], в системе с РНК-полимеразой II и минимальным набором транскрипционных факторов должны присутствовать и остальные базальные факторы транскрипции, ТФIIЕ и ТФIIН. Для образования на ТАТА-боксе промотора AdML промоторного комплекса РНК-полимеразу сначала преинкубировали с ДНК. Затем в реакционную смесь добавляли три природных субстрата (УТР, GTP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$), а вместо АТР одно из синтезированных нуклеотидных производных (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**). В соответствии со структурой матрицы, в условиях проведения транскрипции, должен нарабатываться РНК-продукт следующего состава $\text{rrrA}(\text{CU})_3\text{UC}_2\text{GCU}_2\text{CGCUGU}$. Транскрипты выделяли методом фенол-хлороформной экстракции согласно работе [27] и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях, с последующей радиоавтографией [28].

На рис. 1 представлены результаты анализа реакционной смеси после синтеза РНК в присут-

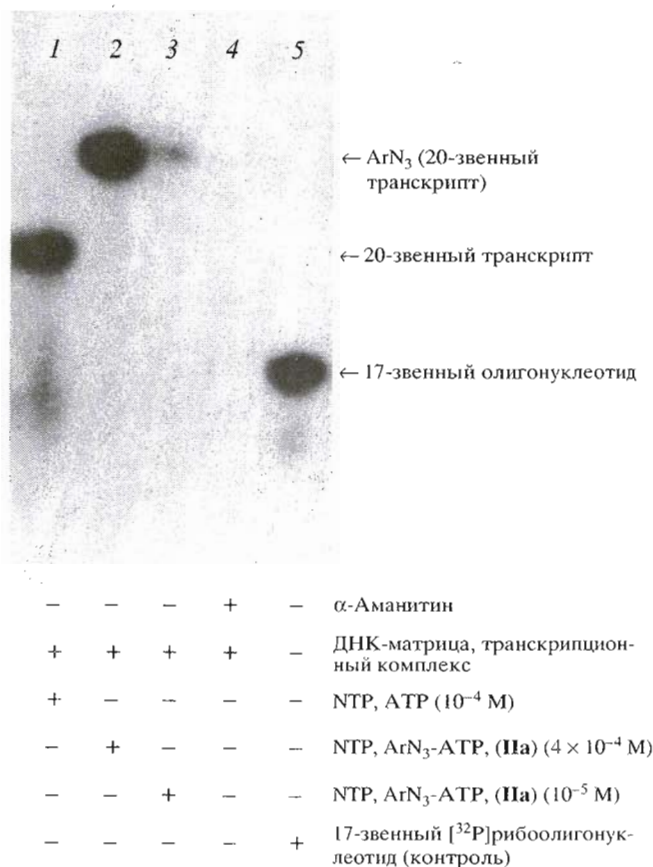


Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического анализа (20% ПААГ с SDS, 8 М мочевины) РНК-продуктов при транскрипции в присутствии природных субстратов (1) или фотоаналога (IIa) в концентрации 0.4 (2) и 0.01 мМ (3); дорожка 4 – транскрипция в присутствии α-аманитина; 5 – гетерогенный ³²P-меченный 17-звенный рибоолигонуклеотид.

ствии фотоаналога (IIa). Появление транскрипта в реакционной смеси (дорожки 2 и 3) указывает на то, что соединение (IIa) является иницирующим субстратом РНК-полимеразы II. Уменьшение подвижности транскрипта в геле по сравнению с транскриптом, полученным в системе синтеза РНК с природным иницирующим субстратом (рис. 1, дорожка 1) может свидетельствовать о наличии арилизидного остатка в составе РНК-продукта. Известно, что подвижность нуклеиновых кислот при гель-электрофоретическом разделении определяется отношением заряда компонента разделяемой смеси к его размеру. Присоединение арилизидного фрагмента по γ-фосфату приводит, с одной стороны, к уменьшению его заряда, с другой стороны, к увеличению молекулярной массы.

Аналогичное появление транскрипта наблюдалось при добавлении в реакционную смесь с транскрипционно активным комплексом и других

фотоактивируемых производных АТР: (Ia), (Ib), (IIb) (данные не представлены). При исключении из реакционной смеси фотоаналогов АТР полоса, соответствующая по подвижности синтезируемому РНК-продукту, на гель-радиоавтографе отсутствовала. Синтез РНК также не наблюдался, если в реакционную смесь добавляли 1 мкг/мл α-аманитина – ингибитора эукариотической РНК-полимеразы II [29] (рис. 1, дорожка 4). Совокупность полученных данных указывает на то, что в условиях специфической инициации транскрипции, осуществляемой под контролем позднего промотора аденовируса, фотоактивируемые аналоги АТР обладают свойствами иницирующего субстрата РНК-полимеразы II. Это позволяет получать фотоактивируемые транскрипты, содержащие на 5'-конце модифицированный нуклеотид.

Фотоактивируемые группы, входящие в состав синтезированных производных АТР, ранее широко использовались в составе других аффинных реагентов, в том числе и при изучении систем матричного синтеза [1, 30]. Тем не менее, до сих пор малоисследованными остаются процесс фотолиза арилизидов такого типа в водных условиях и продукты их фотопревращения, хотя они могут определенным образом влиять на результаты, получаемые при модификации биополимеров [11]. В литературе доминирует мнение, что в случае реагентов на основе ряда ароматических азидов, в том числе и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты, реакционноспособными частицами, модифицирующими функциональные группы белков, являются генерируемые при облучении арилнитрены [31, 32]. Эти выводы основаны на дедуктивных рассуждениях по исследованию кинетики реакций и идентификации стабильных продуктов, изолированных после фотолиза азидов в органических средах, т. е. в условиях, далеких от условий проведения фотоаффинной модификации белков. В то же время в литературе встречаются данные, указывающие на то, что в модификации белков могут принимать участие частицы, время жизни которых значительно превосходит время жизни арилнитренов. Так, например, авторами работы [33] было обнаружено, что максимальная степень модификации мишени (мышинные моноклональные антитела к эстрадиолу) с помощью б α - и б β -(5-азидо-2-нитробензоил)амидоэстрадиола достигалась при увеличении времени облучения до 15 мин, тогда как время полного фотолиза фотореагента составляло 15 с.

Для того чтобы понять, какие долгоживущие интермедиаты могут принимать участие в модификации белков при использовании реагентов на основе *n*-нитрозамещенных фенилизидов, мы исследовали фотолиз амида 5-азидо-2-нитробензойной кислоты в условиях проведения фотоаффинной модификации белков, т. е. в водном растворе. Из результатов хроматографического разделе-

ния продуктов реакционных смесей, образующихся при облучении *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (IV) в водных растворах с различным содержанием кислорода видно, что в присутствии O₂ (рис. 2, профили б, в) образуется соединение, которое элюируется с обращенной фазы при более высокой концентрации ацетонитрила (пик б) по сравнению с соединениями, образующимися при облучении соединения (IV) в атмосфере аргона (рис. 2, профиль а). Известно [34], что некоторые арилнитрены, генерируемые при облучении ароматических азидов в органических растворителях, реагируют с кислородом даже при температуре жидкого азота. В результате реакции, как утверждают авторы работ [34, 35], образуется либо полярный нитрозооксид, либо молекула бирадикальной структуры, дальнейшее превращение которых приводит к образованию *l*-нитрозонитробензола. Однако данные инструментальных методов структурного анализа продуктов фотолиза соединения (IV) говорят о том, что в водных растворах реализуется другой кислородозависимый путь превращения ароматического нитрена. На основании результатов, приведенных ниже, соединению, соответствующему пику б, может быть приписана структура *N*-(3-аминопропил)-5-{3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-нитрофенил-*NNO*-азокси]фенил-*ONN*-азокси}-2-нитробензамида (V).

В спектре ¹H-ЯМР выделенного нами продукта фотолиза протоны амидных групп -C(O)NH- проявляются в виде трех триплетов с δ: 9.037, 8.987 и 8.895 м. д. (раствор в дейтеродиметилсульфоксиде). Это свидетельствует о присутствии в структуре трех типов бензоильных фрагментов. В ароматической части ¹H-ЯМР-спектра можно увидеть три типа идентифицируемых сигналов: три дублета с константой *J* ~ 9 Гц, соответствующей константе вицинального взаимодействия через двойную связь; три дублета с *meta*-константой спин-спинового взаимодействия (*J* ~ 2 Гц) и три дублета дублетов (*J* ~ 9 и ~ 2 Гц). Смещение сигналов ароматических протонов в слабое поле указывает либо на появление в структуре заместителей с отрицательным индукционным эффектом, либо на образование функциональных групп, анизотропный эффект которых приводит к возрастанию дезэкранирования протонов. Азокси группы, предложенные на роль функциональных групп соединения (V), не противоречат перечисленным выше свойствам [36].

Дополнительным подтверждением образования соединения с такой структурой служат данные MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Так, в масс-спектре MALDI продукта фотолиза наблюдается пик с *m/z* 959.25, соответствующий массе иона соединения (V) с дополнительно присоединенными двумя молекулами трифторацетата и ионом натрия, т.е. [M_(V) + 2CF₃COO⁻ + Na]⁺. Трифторацетат в

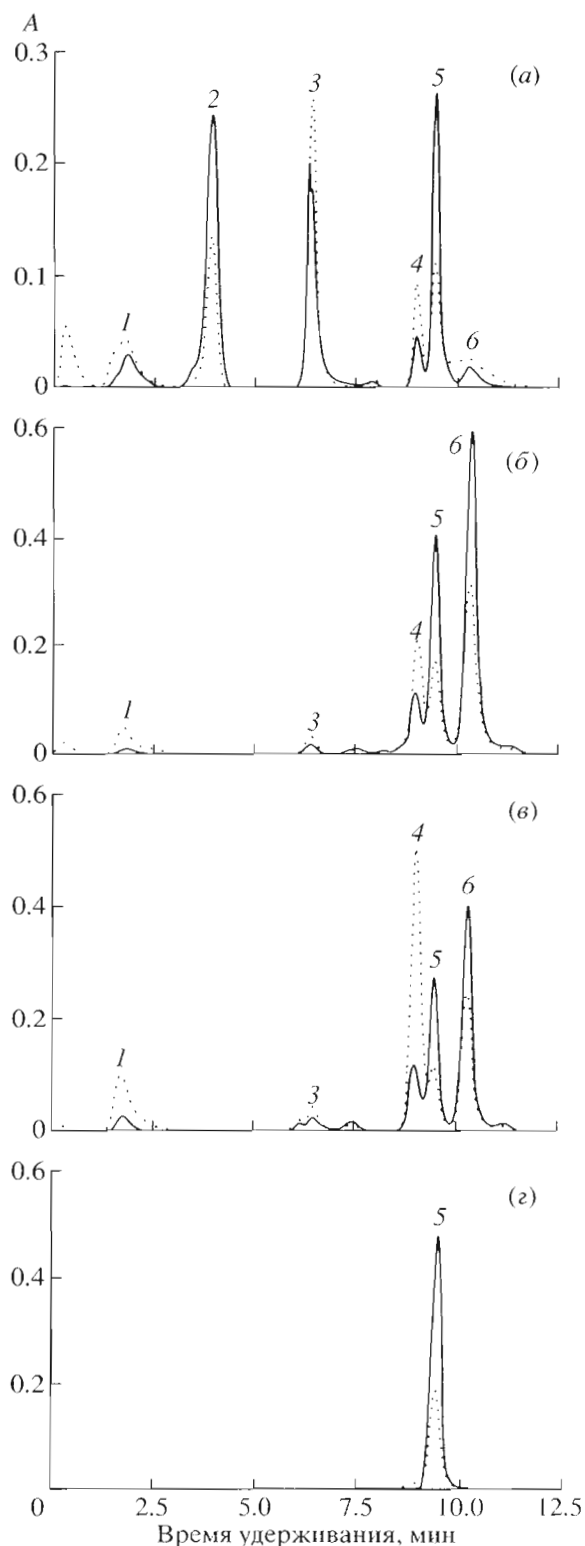
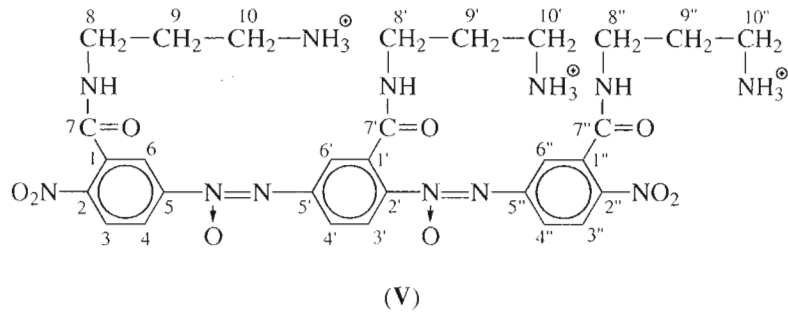


Рис. 2. Профили обращенно-фазового хроматографического анализа *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (г) и продуктов, образующихся при его облучении (λ 313 нм) в водном растворе (9 × 10⁻⁴ М) в течение 90 с. Фотолиз: (а) – в атмосфере аргона, (б) – при нормальном содержании кислорода, (в) – в атмосфере кислорода. Элюент: линейный градиент концентрации ацетонитрила (0 – 70%) в 0.1% TFA; детектируемые длины волн: 280 (···) и 360 нм (—).



Структура *N*-(3-аминопропил)-5-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-нитро-фенил-*NNO*-азокси]фенил-*ONN*-азокси]-2-нитробензамида (V).

составе соединения выявляется также ^{19}F -ЯМР-спектроскопией. Появление его в качестве протоннона протонированного аминоспейсера обусловлено использованием раствора трифторуксусной кислоты в качестве элюента в процессе хроматографического разделения продуктов фотолиза арилазида (IV).

Наряду с соединением (V) из реакционной смеси с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ было выделено еще два мажорных продукта фотолиза. Соединения, соответствующие пикам 3 и 4, были идентифицированы как *N*-(5-амино-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропан (соединение (IVd), схема 2) и *N*-(2,5-динитробензоил)-1,3-диаминопропан (соединение (IVe), схема 2), соответственно. До настоящего времени такие продукты фотолиза арилазидов рассматривались как результат

превращения триплетного нитрена [13, 33, 35]. Впервые на роль предшественника всех выявленных продуктов фотолиза нами предлагается *n*-нитрозамещенный *N*-арилгидроксиламин (соединение (IVb), схема 2). Образование *N*-арилгидроксиламина было впервые зарегистрировано нами при облучении в водных растворах *n*-нитрофенилазида [37]. Видимо присутствие такого сильного электроноакцепторного заместителя как нитрогруппа приводит к значительному повышению активности арилнитренов, что может обеспечить протекание реакции нуклеофильного присоединения даже с таким слабым нуклеофилом, как вода.

Ароматические гидроксиламины очень чувствительны к окислителям; в водном растворе при действии кислорода воздуха они довольно быстро превращаются в азоксисоединения [38]. Послед-

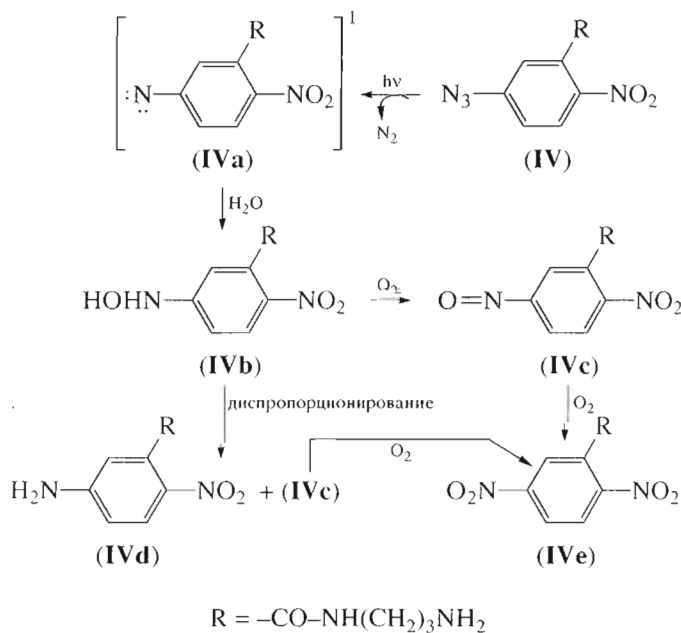


Схема 2. Механизм фотохимического превращения *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (IV) в водном растворе.

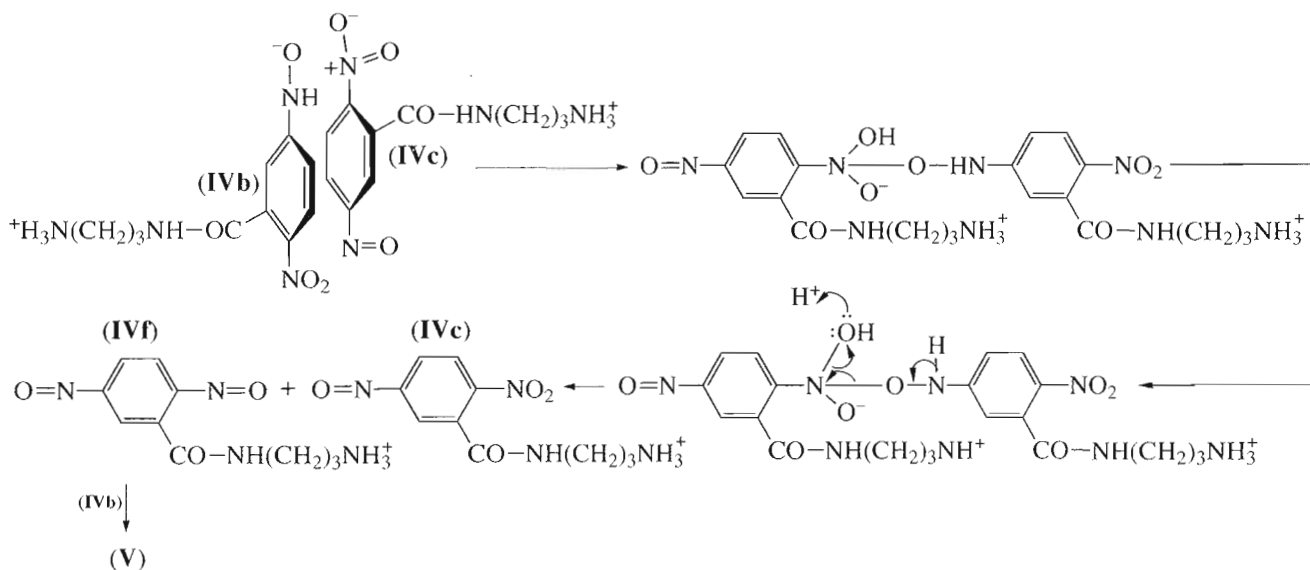


Схема 3. Механизм образования *N*-(3-аминопропил)-5-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-нитрофенил-*NNO*-азокси]фенил-*ONN*-азокси]-2-нитробензамида (**V**) при облучении *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (**IV**) в водном растворе.

ние являются продуктами конденсации исходного *N*-арилгидроксиламина с образующимся в процессе окисления нитрозосоединением. Из всех возможных химических процессов с участием *N*-арилгидроксиламинов именно окисление кислородом воздуха и диспропорционирование представляют наибольший интерес с точки зрения метода фотоаффинной модификации. В обоих случаях может образоваться реакционноспособное в отношении функциональных групп белков нитрозосоединение (**IVc**) (схема 2).

Характер конечных продуктов реакции диспропорционирования будет определяться рядом факторов. Известно, что диспропорционированию способствует формирование комплекса с переносом заряда [39]. Для *N*-арилгидроксиламинов с нитрогруппой в качестве заместителя в *n*-положении характерно образование таких комплексов при $pH \sim 10$. В нашем случае наличие в молекуле производного гидроксиламина аминокислотного остатка, pK_a которого находится в области значения pK_a для гидроксигруппы *n*-нитрозамещенного гидроксиламина ($pK_a = 10.2$) [39], может способствовать смещению равновесия в сторону образования цвиттер-иона (**IVb**) (схема 3). Взаимодействие последнего с электронодефицитным нитрозосоединением (**IVc**) приведет к формированию комплекса с переносом заряда. В результате восстановления нитрогруппы в реакционной смеси будет накапливаться 2,5-динитрозопроизводное (**IVf**). Для нитрозосоединений характерно вступать в реакции с *N*-арилгидроксиламинами с образованием азоксисоединений [38]. Вероятно, тример (**V**) является продуктом азоксисочетания динитрозо-

производного (**IVf**) с двумя молекулами *N*-арилгидроксиламина (**IVb**) (схема 3). Следует отметить, что среди мажорных продуктов фотолиза отсутствует димерное азоксисоединение – продукт азоксисочетания нитрозосоединения (**IVc**) с гидроксиламином (**IVb**). Это связано вероятно с тем, что динитрозопроизводное (**IVe**) обладает большей реакционной способностью в реакции азоксисочетания, чем мононитрозосоединение (**IVc**).

Ароматические нитрозосоединения отличаются реакционной способностью по отношению к функциональным группам белков [40, 41]. Таким образом, в случае использования реагентов на основе 5-азидо-2-нитробензойной кислоты частицей, принимающей участие в темновой стадии модификации белков, может быть нитрозонитробензоильное производное типа (**IVc**), генерируемое при окислении *N*-арилгидроксиламина.

Ранее [7, 9] было показано, что облучение *n*-азидоанилина, функционального фрагмента реагентов для фотоаффинной модификации белков в водных растворах, приводит к образованию *n*-бензохинондиимина. Последний является высокоэлектрофильным реагентом, способным реагировать с боковыми цепями аминокислотных остатков – имидазольным фрагментом гистидина и ϵ -аминогруппой лизина [7–10, 42, 43]. При сближении в пространстве amino- и азидной групп путем объединения их в пределах одной молекулы не всегда удается зарегистрировать образование производного *n*-бензохинондиимина. Так, например, авторами работы [44] было показано, что при облучении *N*-(4-азидофенил)-1,2-диаминоэтана в водных растворах образуется неустойчивое промежуточ-

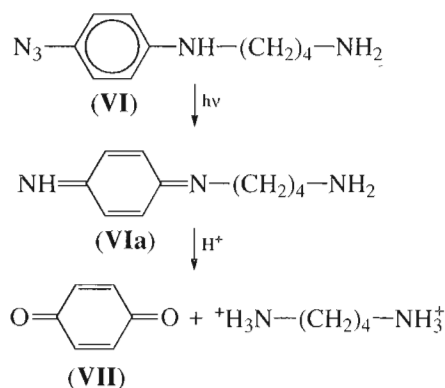


Схема 4. Механизм фотохимического превращения *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутана (VI) в водном растворе (рН 9.6).

ное соединение (вероятно, 6-аминотетрагидрохиноксалин), которое в течение нескольких часов превращается в 6-аминохиноксалин. Нами было обнаружено, что при удлинении аминоспейсера на два метиленовых звена продукты внутримолекулярного взаимодействия аминогруппы спейсера с образующимся производным *n*-бензохинондиимина не выявляются.

По данным электронной спектроскопии, в ходе облучения *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутана (VI) в водных растворах (рН 9.6) накапливается продукт с характерным спектром в УФ-области (λ_{\max} 271 нм). При добавлении к облученному образцу HCl наблюдается образование соединения, электронный спектр поглощения которого идентичен спектру поглощения *n*-бензохинона [45] (λ_{\max} 246 нм, $I_{\text{г}} \varepsilon$ 4.3). После экстракции дейтерохлороформом продукты органической фракции были проанализированы методами электронной, ИК-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. На основании сопоставления полученных данных с литературными [22, 45, 46] был сделан вывод, что соединением, присутствующим в органической фракции является *n*-бензохинон (VII). Известно [47], что *n*-бензохинон может образовываться при гидролизе *n*-бензохинондиимина. Таким образом, можно сделать вывод, что продуктом фотолиза *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутана в водных растворах является соединение с хиноидной структурой (VIa) (схема 4).

Совокупность полученных нами результатов указывает на то, что фотоаффинные реагенты, несущие 5-азидо-2-нитробензоильный или 4-азидофениламиноалкильный остатки, при облучении могут генерировать долгоживущие интермедиаты: производные *n*-бензохинондиимина или нитрозосоединения соответственно. Последние, в силу своей реакционной способности, могут взаимодействовать с функциональными группами белков, что не-

обходимо учитывать при анализе данных по фотоаффинной модификации биополимеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы: трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, дитиотреит, глицерин, альбумин человека (Fluka, Швейцария), Трис-HCl (Merck, Германия), [α - ^{32}P]СТР (АОЗТ "Биосан", Новосибирск, Россия). DMF, DMSO, ацетон, ацетонитрил, диэтиловый эфир очищены согласно [48].

N,N'-Бис(трифторацетил)-*N*-(4-азидофенил)-1,2-диаминоэтан, *N,N'*-бис(трифторацетил)-*N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутан, *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-1,2-диаминоэтан, *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-1,3-диаминопропан, *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-1,4-диаминобутан гидрохлориды синтезированы и любезно предоставлены Т.М. Ивановой (ИХБФМ СО РАН).

Для снятия трифторацетильной защиты с аминогруппы этанольный раствор (0.4 мл) *N,N'*-бис(трифторацетил)-*N*-(*n*-азидофенил)-1,2-диаминоэтана или *N,N'*-бис(трифторацетил)-*N*-(*n*-азидофенил)-1,4-диаминобутана (0.06–0.1 ммоль) смешивали с 0.1 мл раствора NaOH (0.5 М). Реакционную смесь выдерживали при 20°C в течение 20–40 мин и экстрагировали этилацетатом (3 × 1.3 мл). Этилацетатный раствор упаривали досуха. Выход 90%.

***N*-(5-Азидо-2-нитробензоил)-1,2-диаминоэтан, *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-1,3-диаминопропан и *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутан** получали из соответствующих гидрохлоридов обработкой спиртового раствора арилазида 0.4 мл (0.1–0.3 ммоль) 0.2 мл 2 М раствора NaOH. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3 × 1 мл). Этилацетатный раствор упаривали досуха. Выход продуктов реакции 90%.

Для реакции транскрипции в качестве матрицы использовали суперскрученную ДНК промотора AdML (-39/+20), встроенную в плазмиду pUC119, любезно предоставленную проф. Дж. Кадонагой (University of California, San Diego, La Jolla, Ca) [49]. Нуклеозид-5'-трифосфаты были синтезированы и любезно предоставлены В.С. Богачёвым (ИХБФМ СО РАН).

РНК-полимеразу II и базальные факторы транскрипции выделяли из дрожжей *S. cerevisiae* по методу [26]. Суммарная концентрация белка в полученном препарате РНК-полимеразы II и базальных факторов транскрипции составляла 40 мкг/мл. Анализ белка методом электрофореза в 4–20% ПААГ в нативных условиях и окрашивание AgNO_3 показали, что препарат не содержит примесных белков. Микроколоночную ВЭЖХ выполняли с использованием хроматографа Милихром-1 (Научприбор, Орел, Россия). Анионообменную хромато-

графию (анализ соединений (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**), (**IIIa**), (**IIIb**)) осуществляли на колонке (1.5×45 мм) со смолой Polysil-SA, 10–15 мкм (НПО “Вектор”, Кольцово, Россия) в ступенчатом градиенте NaCl (0 М – 400 мкл, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 М по 300 мкл) в 0.05 М Трис-НСl общим объемом 2.2 мл, скорость 50 мкл/мин, многоволновая детекция. Анализ продуктов фотолиза *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана проводили на колонке (1.5×45 мм) со смолой Nucleosil 100–10 C_{18} , 10 мкм (Macherey-Nagel, Duren, Германия) в линейном градиенте концентрации CH_3CN (0 → 70%, 100 мкл/мин) в 0.1% TFA. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы “Chrom” (разработчик А.Г. Зенков, ИХБФМ СО РАН).

Препаративное выделение синтезированных фотоаналогов и продуктов фотолиза соединения (**IV**) выполняли на препаративном хроматографе Waters 600E (США) на колонке (7×220 мм) со смолой LiChrosorb-RP 10 (Merck, Германия) в линейном градиенте концентрации CH_3CN (0 → 40%) (выделение соединений (**Ia**), (**Ib**), (**IIa**), (**IIb**), (**IIIa**), (**IIIb**)) и на колонке (4.6×250 мм) Bondapak C_{18} , 15–20 мкм (Waters Corporation, США) в линейном градиенте концентрации CH_3CN (0 → 70%, 300 мкл/мин) в 0.1% TFA (выделение продуктов фотолиза соединения (**IV**)).

Спектры 1H -, ^{13}C -, ^{31}P - и ^{19}F -ЯМР записывали на спектрометре AM-400 (Bruker, Германия) (рабочая частота 400.13, 100.61, 162.00 и 376.46 МГц соответственно). Запись спектров осуществляли при 25°C в 5-мм ампуле. Все химические сдвиги в 1H -ЯМР-спектрах были оценены относительно растворителей (H₂O, δ 4.80 м. д., CHCl₃, δ 7.24 м. д., CH₃OH, δ 3.34 м. д.). Химические сдвиги в случае ^{31}P -ЯМР определяли относительно H₃PO₄ (δ 0 м. д.). Химические сигналы ^{13}C были оценены относительно растворителей (CHCl₃, δ 76.9 м. д., CH₃OH, δ 49.3 м. д. и CH_3CN , δ 1.3 м. д.). Приведены химические сдвиги в шкале δ и КССВ – в герцах.

Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Karl Zeiss, Jena, Германия) в водных растворах и метаноле при комнатной температуре; спектры ИК – в воде и в таблетках с KBr на спектрометре Bruker IFS 66 (Bruker, Rheinstetten, Германия).

Масс-спектры снимали на времяпролетном MALDI-масс-спектрометре VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, Англия), используя азотный лазер (VSL-337ND, 337 нм, импульс 3 нс, энергия 150–200 мкДж/импульс). В качестве матрицы применяли 2,5-дигидробензойную кислоту. Образцы для анализа подготавливали следующим образом: 0.3 мкл 0.5 мМ водного раствора соединения (**IV**) смешивали на мишени с 0.3 мкл раствора матрицы

(20 мг/мл в 20% водном CH_3CN), высушивали и затем анализировали.

Образцы облучали светом лампы ДРШ 1000 через комбинацию стеклянных фильтров УФС-2, ЖС-3 в кюветах толщиной 0.1 см с расстояния 15 см. Интенсивность света 1.2×10^{15} квант $s^{-1} cm^{-2}$. Определение интенсивности облучения проводили по методике [50] с помощью ферриоксалатного актиометра. Концентрацию образцов варьировали от 1×10^{-4} до 9×10^{-4} М. Фотоактивацию проводили в водных растворах. За ходом реакции следили по изменению электронных спектров поглощения реакционных смесей в области 200–800 нм. Анаэробные или аэробные условия облучения обеспечивали, продувая Ar или O₂ перед облучением через растворы *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (9×10^{-4} М) в течение 20 мин при 0°C.

Условия проведения ДНК-зависимого синтеза РНК. Реакционная смесь (30 мкл) для синтеза РНК в системе РНК-полимеразы II из дрожжей *S. cerevisiae* содержала: 80 мМ Нерес-КОН, pH 7.8, 15 мМ Mg(OAc)₂, 2.5 мМ дитиотреит, 10% глицерин, 0.2 М АТФ, УТР и 1 мкл 0.1 мкМ [α - ^{32}P]СТР (3000 Ки/ммоль), 0.4 мкг фермента и базальных факторов транскрипции, 1 мкг ДНК-матрицы и 5 ед. плацентарного ингибитора РНКаз. В условиях эксперимента РНК-полимеразу II сначала преинкубировали с ДНК-матрицей, чтобы на ТАТА-боксе промотора AdML образовался промоторный комплекс. Затем в реакционную смесь добавляли субстраты, один из которых ^{32}P -меченный. Инкубацию проводили при 25°C в течение 30 мин. Для терминации реакции транскрипции добавляли 100 мкл стоп-смеси: 20 мМ Трис-НСl, pH 7.9, 0.5% SDS, 10 мМ EDTA. Транскрипты выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [27] и анализировали с помощью электрофореза в 20% ПААГ с SDS и 8 М мочевиной [28]. Для определения субстратных свойств синтезированных производных АТФ в реакционной смеси АТФ заменяли на фотоактивируемый аналог АТФ (5×10^{-5} – 2×10^{-4} М).

Синтез γ -{1-[2-(*n*-Азидофениламино)этил]}-(Ia**), γ -{1-[4-(*n*-азидофениламино)бутил]}-(**Ib**), γ -{1-[2-(5-азидо-2-нитробензоил)аминоэтил]}-(**IIa**) и γ -{1-[4-(5-азидо-2-нитробензоил)аминобутил]}-(**IIb**), γ -{1-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)аминопропил]}-(**IIIa**) фосфамиды АТФ и γ -{1-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)аминопропил]} фосфамид GTP (**IIIb**).** К раствору 0.15–0.6 мкмоль Na-соли NTP в 5 мкл H₂O добавляли 61 мкмоль (13.45 мг) (PyS)₂ и 61 мкмоль (16.05 мг) Ph₃P в 110 мкл DMSO; выдерживали 15 мин при 20°C. К реакционной смеси добавляли 1 мл серного эфира, осадок собирали центрифугированием, промывали эфиром (1 мл). К осадку добавляли 0.05 М (50 мкмоль) водного раствора соответствующего

арилазида. Реакционную смесь выдерживали в темноте при 20°C 70 мин, осаждали в 6% раствор LiClO₄ в ацетоне (1 : 10, по объему), осадок собирали центрифугированием, промывали ацетоном (1 мл), эфиром (1 мл). Целевые соединения выделяли ВЭЖХ на смоле с обращенной фазой.

Выход соединения (**Ia**) 81%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 262.3 (25400). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2130 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -22 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 20, J_{β,γ} 20); -10.6 (д, 1 P, P^α, P^β, J_{α,β} 20); -0.6 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 20). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 3.14 (дт, 2 H, H^{8''}, J_{8'',Pγ} 11, J_{8'',7''} 6.0); 3.27 (т, 2 H, H^{7''}, J_{7'',8''} 6.0); 4.25–4.35 (м, 2 H, H^{5'}); 4.4–4.5 (м, 1 H, H^{4'}); 4.55–4.65 (м, 1 H, H^{3'}); 4.65–4.75 (м, 1 H, H^{2'}); 6.17 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 6.89 (д, 2 H, H^{2''}, H^{6''}, J_{2'',3''} 4.5, J_{2'',6''} < 1.5); 7.03 (д, 2 H, H^{3''}, H^{5''}, J_{3'',2''} 4.5, J_{3'',5''} < 1.5); 8.32 (с, 0.7 H, H²); 8.57 (с, 1 H, H⁸).

Выход соединения (**Ib**) 80%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 262.3 (25400). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2114 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -21.2 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 20, J_{β,γ} 20); -10.2 (д, 1 P, P^α, P^β, J_{α,β} 20); -0.1 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 20). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 1.66 (м, 4 H, H^{8''}, H^{9''}); 3.14 (м, 2 H, H^{10''}); 3.37 (т, 2 H, H^{7''}, J_{7'',8''} 6.0); 4.25–4.35 (м, 2 H, H^{5'}); 4.4–4.5 (м, 1 H, H^{4'}); 4.55–4.65 (м, 1 H, H^{3'}); 4.65–4.75 (м, 1 H, H^{2'}); 6.17 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 6.67 (д, 2 H, H^{2''}, H^{6''}, J_{2'',3''} 4.5, J_{2'',6''} < 1.5); 6.85 (д, 2 H, H^{3''}, H^{5''}, J_{3'',2''} 4.5, J_{3'',5''} < 1.5); 8.32 (с, 0.7 H, H²); 8.57 (с, 1 H, H⁸).

Выход соединения (**Ia**) 97%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 260 (15400), 320 (9100). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2127 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -21.8 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 20, J_{β,γ} 20); -10.7 (д, 1 P, P^α, P^β, J_{α,β} 20); -1.0 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 20). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 3.27 (дт, 2 H, H^{9''}, J_{9'',Pγ} 11, J_{9'',8''} 6.0); 3.58 (т, 2 H, H^{8''}, J_{8'',9''} 6.0); 4.3–4.4 (м, 2 H, H^{5'}); 4.42–4.52 (м, 1 H, H^{4'}); 4.53–4.64 (м, 1 H, H^{3'}); 4.63–4.7 (м, 1 H, H^{2'}); 6.18 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 7.25 (д, 1 H, H^{6''}, J_{6'',4''} 2.5); 7.28 (дд, 1 H, H^{4''}, J_{4'',3''} 9, J_{4'',6''} 2.5); 8.2 (д, 1 H, H^{3''}, J_{3'',4''} 9); 8.35 (с, 0.8 H, H²); 8.59 (с, 1 H, H⁸).

Выход соединения (**Ib**) 95%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 259 (15000), 319 (9200). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2120 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -21.08 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 20, J_{β,γ} 20); -9.87 (д, 1 P, P^α, P^β, J_{α,β} 20); -0.19 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 20). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 1.77 (м, 4 H, H^{9''}, H^{10''}); 3.22 (дт, 2 H, H^{11''}, J_{11'',Pγ} 11, J_{11'',10''} 6.0); 3.41 (т, 2 H, H^{8''}, J_{8'',9''} 6.0); 4.25–4.35 (м, 2 H, H^{5'}); 4.4–4.5 (м, 1 H, H^{4'}); 4.55–4.65 (м, 1 H, H^{3'}); 4.65–4.75 (м, 1 H, H^{2'}); 6.21 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 7.25 (д, 1 H, H^{6''}, J_{6'',4''} 2.5); 7.28 (дд, 1 H, H^{4''}, J_{4'',3''} 9, J_{4'',6''} 2.5); 8.2 (д, 1 H, H^{3''}, J_{3'',4''} 9); 8.42 (с, 0.8 H, H²); 8.67 (с, 1 H, H⁸).

Выход соединения (**Ia**) 94%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 259 (32700). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2190 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -21.4 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 16, J_{β,α} 14.2); -10.3 (д, 1 P, P^α, J_{α,β} 14.2); 0.7 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 14.2). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 1.51–1.60 (м, 2 H, H^{9''}); 3.02–3.17 (м, 2 H, H^{8''}); 3.31–3.41 (м, 2 H, H^{10''}); 4.25–4.35 (м, 2 H, H^{5'});

4.4–4.5 (м, 1 H, H^{4'}); 4.55–4.65 (м, 1 H, H^{3'}); 4.65–4.75 (м, 1 H, H^{2'}); 6.21 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 8.22 (с, 0.8 H, H²); 8.47 (с, 1 H, H⁸). Спектр ¹⁹F-ЯМР (D₂O): 13.23 (м, 2 F, F^{3'}, F^{5'}), 22.16 (м, 2 F, F^{2'}, F^{6'}).

Выход соединения (**Ib**) 90%. УФ-спектр, λ_{\max} , нм (ϵ , M⁻¹ см⁻¹): 256 (29300). ИК-спектр (H₂O), ν , см⁻¹: 2180 (-N₃). Спектр ³¹P-ЯМР (H₃PO₄): -21.08 (т, 1 P, P^β, J_{β,α} 19.2, J_{β,γ} 20); -9.87 (д, 1 P, P^α, J_{α,β} 19.2); -0.19 (д, 1 P, P^γ, J_{γ,β} 19.2). Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 1.53–1.62 (м, 2 H, H^{9''}); 3.02–3.17 (м, 2 H, H^{8''}); 3.33–3.42 (м, 2 H, H^{10''}); 4.15–4.25 (м, 2 H, H^{5'}); 4.31–4.42 (м, 1 H, H^{4'}); 4.52–4.57 (м, 1 H, H^{3'}); 4.65–4.75 (м, 1 H, H^{2'}); 6.05 (д, 1 H, H^{1'}, J_{1',2'} 4.0); 7.87 (с, 1 H, H⁸). Спектр ¹⁹F-ЯМР (D₂O): 13.18 (м, 2 F, F^{3'}, F^{5'}), 22.05 (м, 2 F, F^{2'}, F^{6'}).

Фотолиз (4-азидофенил)-1,4-диаминобутана (VI). Раствор (4-азидофенил)-1,4-диаминобутана (0.32 мМ) в карбонатном буфере (pH 9.6) помещали в кварцевую кювету (0.1 см) и облучали светом ртутной лампы в течение 40 с через комбинацию стеклянных фильтров. За ходом реакции следили путем записи электронных спектров поглощения. После прекращения изменений в УФ-спектре добавляли HCl до pH 0.1. Реакционную смесь экстрагировали CDCl₃ (2 × 0.3 мл). Продукт хлороформной фракции охарактеризован методами УФ-, ИК-, ¹H-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии.

***n*-Бензохинон (VII).** УФ-спектр, λ_{\max} , нм (lgε): 246 (4.3). ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 1656 (C=O). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 6.77 (с, 4 H). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 187.11 (с, C1, C4), 136.45 (с, C2, C3, C5, C6).

Идентификация продуктов фотолиза *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (IV). Водный раствор *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропана (IV) (0.9 мМ) помещали в кварцевую кювету (0.1 см) и облучали в течение 120 с светом ртутной лампы через комбинацию стеклянных фильтров. За ходом реакции следили путем записи электронных спектров поглощения. После прекращения изменений в УФ-спектре основной продукт фотолиза выделяли ВЭЖХ на смоле с обращенной фазой.

***N*-(5-Амино-2-нитробензоил)-1,3-диаминопропан (IVd).** УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 390. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 2.05 (м, 2 H, H⁹); 3.13 (м, 2 H, H¹⁰); 3.54 (м, 6 H, H⁸); 6.67 (д, 1 H, H⁶, J_{6,4} 2.4); 6.80 (дд, 1 H, H⁴, J_{4,6} 2.4, J_{4,3} 9); 8.01 (д, 1 H, H³, J_{3,4} 9) (нумерация протонов аналогична нумерации в соединении (V)).

***N*-(2,5-Динитробензоил)-1,3-диаминопропан (IVe).** УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 258. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 2.02 (м, 2 H, H⁹); 3.12 (м, 2 H, H¹⁰); 3.50 (м, 2 H, H⁸); 8.24 (д, 1 H, H³, J_{3,4} 9); 8.53 (д, 1 H, H⁶, J_{6,4} 2.4); 8.56 (дд, 1 H, H⁴, J_{4,6} 2.4, J_{4,3} 9) (нумерация протонов аналогична нумерации в соединении (V)).

***N*-(3-Аминопропил)-5-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-[3-(3-аминопропилкарбамоил)-4-нитрофенил-*NNO*-азокси]фенил-*ONN*-азокси]-2-нитробензамид (V).** УФ-спектр (H₂O), λ_{max}, нм: 342. MALDI-масс-спектр: *m/z* 959.25 (соответствует рассчитанной величине молекулярного иона [M + 2CF₃COOH + Na]⁺). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO): 1.83 (м, 6 H, H9, H9', H9''); 2.92 (м, 6 H, H10, H10', H10''); 3.37 (м, 6 H, H8, H8', H8''); 7.75 (м, 9 H, NH₃⁺); 8.11 (д, 1 H, H6'', J_{6'',4''} 2.4); 8.14 (д, 1 H, H6', J_{6',4'} 2.4); 8.22 (дд, 1 H, H4'', J_{4'',6''} 2.4, J_{4'',3''} 9); 8.26 (д, 1 H, H3'', J_{3'',4''} 9); 8.29 (дд, 1 H, H4', J_{4',6'} 2.4, J_{4',3'} 9); 8.33 (д, 1 H, H3', J_{3',4'} 9); 8.34 (д, 1 H, H3, J_{3,4} 9); 8.47 (д, 1 H, H6, J_{6,4} 2.4); 8.56 (дд, 1 H, H4, J_{4,6} 2.4, J_{4,3} 9); 8.90 (т, 1 H, NHCO'', J_{8'',9} 6); 8.99 (т, 1 H, NHCO', J_{8',9} 6); 9.04 (т, 1 H, NHCO, J_{8,9} 6). Спектр ¹³C-ЯМР (CD₃OD): 26.2 (3 C, C9, C9', C9''); 36.7 (3 C, C10, C10', C10''); 36.9 (3 C, C8, C8', C8''); 122.6 (1 C, C6''); 123.2 (1 C, C4''); 124.7 (1 C, C4'); 125.3 (1 C, C6'); 125.5 (1 C, C3); 126.1 (1 C, C4); 126.3 (1 C, C6); 126.6 (1 C, C3''); 127.2 (1 C, C3'); 132 (2 C, C1, C1'); 132.4 (1 C, C1''); 144.4 (1 C, C5'); 146.7 (1 C, C5''); 147.1 (1 C, C2''); 150.2 (1 C, C2'); 152.2 (1 C, C2); 154.3 (1 C, C5); 167.9 (1 C, C7''); 168.8 (1 C, C7'); 168.9 (1 C, C7).

Авторы выражают благодарность Г.Г. Балакиной (Новосибирский институт органической химии) за регистрацию ИК-спектров, Д.В. Семенову (ИХБФМ) за синтез радиоактивно меченных препаратов нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 02-04-48080) и гранта ведущих научных школ НШ-1419.2003.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Лаврик О.И. // Успехи химии. 1997. Т. 66. С. 401–413.
- Грачев М.А., Кнорре Д.Г., Лаврик О.И. // Успехи биол. химии. 1986. Т. 27. С. 30–73.
- Свердлов Е.Д., Царев С.А. // Биооргани. химия. 1980. Т. 6. С. 1110–1113.
- Grachev M.A., Zaichikov E.F. // FEBS Lett. 1981. V. 130. P. 23–26.
- Свердлов Е.Д., Царев С.А., Модянов Н.Н., Липкин В.М., Грачев М.А., Зайчиков Е.Ф., Плетнев А.Г. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. С. 1278–1280.
- Sverdlov E.D., Tsarev S.A., Kuznetsova N.F. // FEBS Lett. 1980. V. 112. P. 296–298.
- Годовикова Т.С., Березовский М.В., Кнорре Д.Г. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 858–867.
- Кнорре Д.Г., Биченкова Е.В., Коваль В.В., Алексеев П.В., Кнорре В.Д., Нордхоф Э., Годовикова Т.С. // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 663–669.
- Галль Т.С., Грищан Н.П., Мызина С.Д., Бажин Н.М., Немцева Е.В. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. С. 883–887.
- Badashkeeva A.G., Gall T.S., Efimova E.V., Knorre D.G., Lebedev A.V., Mysina S.D. // FEBS Lett. 1983. V. 155. P. 263–265.
- Кудряшова Н.В., Шаманина М.Ю., Годовикова Т.С., Ананько Е.А., Ахмадиева Ф.Ф., Ромащенко А.Г. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 224–233.
- Godovikova T.S., Knorre V.D., Maksakova G.A., Sil'nikov V.N. // Bioconjugate Chem. 1996. V. 7. P. 343–348.
- Staros J.V., Bayley H., Standring D.N., Knowles J.R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 80. P. 568–572.
- Будыка М.Ф., Кантор М.М., Алфимов М.В. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 48–74.
- Schuster G.B., Platz M.S. // Adv. Photochem. 1992. V. 17. P. 69–143.
- Schnapp A.K., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 172–177.
- Мишенина Г.Ф., Самуков В.В., Шубина Т.Н. // Биооргани. химия. 1979. Т. 5. С. 886–894.
- Бабкина Г.Т., Грачев М.А., Зайчиков Е.Ф., Кнорре Д.Г., Ковригина В.С. // Изв. СО АН СССР. № 7. Сер. хим. наук. 1975. Вып. 3. С. 128–132.
- Бабкина Г.Т., Зарытова В.Ф., Кнорре Д.Г. // Биооргани. химия. 1975. Т. 1. С. 611–615.
- Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Лебедев А.В., Райт В.К., Самуков В.В. // Изв. СО АН СССР. № 5. Сер. хим. наук. 1986. Вып. 2. С. 110–115.
- Mishchenko E.L., Reinbolt J., Markushin Yu.Ya., Ehrestmann V., Godovikova T.S. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 1998. V. 45. P. 9–18.
- The Sadtler Standard Infrared Grating Spectra. Philadelphia, 1980.
- Shabarova Z.A. // Progress in Nucleic Acid Res. & Mol. Biology. 1970. V. 10. P. 145–182.
- Buratowski S. // Cell. 1994. V. 77. P. 1–3.
- Parvin J., Sharp P.A. // Cell. 1993. V. 73. P. 533–540.
- Sayre M.H., Tschochner H., Kornberg R.D. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 23376–23382.
- Мэнли Дж. // Транскрипция и трансляция. Методы / Ред. Хеймс Б., Хиггинс С. М.: Мир, 1987. С. 92–98.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N. Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- Sentenac A. // Crit. Rev. Biochem. 1985. V. 18. P. 31–91.
- Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Лаврик О.И. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 486–502.
- Knorre D.G., Godovikova T.S. // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 9–14.
- Meisenheimer K.M., Koch T.H. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 32. P. 101–140.
- Rousselot P., Mappus E., Blachere T., de Ravel M.R., Grenot C., Tonnelles C., Cuilleron C.Y. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 7860–7868.
- Грищан Н.П., Притчина Е.А. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 910–939.
- Brinen J. C., Singh B. // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 6623–6626.

36. Mishchenko E.L., Kozhanova L.A., Denisov A.Yu., Gritsan N.P., Markushin Yu.Ya., Serebriakova M.V., Godovikova T.S. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2000. V. 54. P. 16–25.
37. Popova T.V., Mal'shakova V.S., Alekseyev P.V., Kudryashova N.V., Shakirov M.M., Savinkova L.K., Drachkova I.A., Godovikova T.S. // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2004. V. 23. P. 921–925.
38. Nakamoto K., Rundle R.E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1956. V. 78. P. 1113–1118.
39. Heyrowsky M., Vavricka S., Exner O. // *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 1972. V. 37. P. 2858–2863.
40. Saito K., Kato R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 124. P. 1–5.
41. Greci L., Sgarabotto P. // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 1984. V. II. P. 1281–1284.
42. Adams R., Reifschneider W. // *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1958. P. 23–65.
43. Knorre D.G., Alekseyev P.V., Gerassimova Yu.V., Sil'nikov V.N., Maksakova G.A., Godovikova T.S. // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 397–410.
44. Кнорре В.Д., Маркушин Ю.Я., Лабусов В.А., Попов В.И., Денисов А.Ю., Кнорре Д.Г. // *Докл. АН*. 1999. Т. 368. С. 489–491.
45. Corbett J.F. // *J. Chem. Soc. (B)*. 1969. V. 3. P. 213–216.
46. Sadtler Collection of Standard NMR Spectra. Philadelphia, PA, 1980.
47. Corbett J.F. // *J. Chem. Soc. (B)*. 1969. V. 3. P. 207–212.
48. Гордон А., Форд Р. Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 437.
49. George C.P., Lira-DeVito L.M., Wampler S.L., Kadonaga J.T. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 1049–1059.
50. Calvert J.G., Pitts J.N. *Photochemistry*. New York: Wiley, 1966. P. 780–788.

Photoactivatable Analogues of the Initiating Substrates of RNA Polymerase II Based on Arylazide Derivatives of NTP γ -Amidophosphate: Synthesis and Chemical and Photochemical Reactions of Functional Groups

D. G. Knorre*, N. V. Kudryashova*, T. V. Popova*, M. M. Shakirov**, V. S. Mal'shakova***, O. E. Shpenev****, L. K. Savinkova*****, M. V. Serebryakova*****, and T. S. Godovikova**

Fax: (3832) 33-3677; e-mail: godov@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

*** Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

****Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

***** Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Photoactivatable derivatives Ar-NH-(CH₂)_n-NHpppB (where Ar = *p*-azidophenyl (**A1**), 5-azido-2-nitrobenzoyl (**A2**), or 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoyl (**A3**) group; B = Ado or Guo; *n* = 2, 3, or 4) were synthesized. The phosphoramidate bond stability was found to depend on the structure of both the heterocyclic and the photoactivatable groups. The derivative with **A3**, Ado, and *n* = 3 is hydrolyzed with regeneration of aryl azide and ATP, whereas the other derivatives are stable in aqueous solutions. The photoanalogues with **A1** and **A2**, B = Ado, and *n* = 2 or 4 were found to behave as initiating substrates toward the RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae* under the conditions of specific transcription initiation and control of the adenovirus late promoter. The photolysis of *N*-(4-azidophenyl)-1,4-diaminobutane and *N*-(5-azido-2-nitrobenzoyl)-1,3-diaminopropane, two functional fragments of the photoaffinity reagents, in aqueous solutions was established to result in the formation of *p*-benzoquinone diimine and *p*-nitro-*N*-arylhydroxylamine derivatives, respectively. The arylhydroxylamine derivatives undergo a number of transformations in aqueous solution leading to nitroso derivatives. We concluded that it is these nitroso derivatives (products of nitrene transformation, rather than the nitrene itself) that may modify proteins with reagents containing *p*-nitrophenylazide fragment. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aromatic azides, nucleoside triphosphate analogues, photolysis, RNA polymerase II, transcription