



УДК 547.587.42

## ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ЛИНКЕРА НА ПРОЦЕСС ФОТОМОДИФИКАЦИИ ОСТАТКА ТИРОЗИНА В *N*-(ТИРОЗИЛ)-*N'*-(5-АЗИДО-2-НИТРОБЕНЗОИЛ)ДИАМИНОАЛКАНАХ

© 2001 г. Е. Л. Мищенко<sup>#</sup>, Л. А. Кожанова<sup>\*\*</sup>, А. Ю. Денисов\*, Ю. Я. Маркушин\*,  
П. В. Алексеев\*, Н. И. Черепанова<sup>\*\*\*</sup>, Т. М. Иванова\*

\* Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

\*\* Лимнологический институт СО РАН, Иркутск;

\*\*\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 16.01.2001 г. Принята к печати 11.05.2001 г.

Для изучения процесса фотомодификации остатков Туг в белках получено модельное соединение *N*-(тирозил)-*N'*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутан, содержащее остаток тирозина, связанный с фотоактивной арилизидной группой через диаминобутильный линкер. Методом компьютерного моделирования проведен анализ конформаций, соответствующих минимуму энергии, для синтезированного соединения и изученного ранее аналога с более коротким 1,2-диаминоэтильным линкером. Показано, что в этом соединении ароматические кольца остатков Туг и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты располагаются в параллельных плоскостях на расстоянии ~0.3 нм и вовлечены в стэкинг-взаимодействие. Ароматические же кольца соединения с более длинным диаминобутильным линкером располагаются перпендикулярно друг другу на расстоянии ~0.6 нм между центрами колец. Расчетный анализ подтвержден экспериментальными результатами. При изучении фотопреобразования соединения с диаминобутильным линкером не было обнаружено ни устойчивых продуктов фотомодификации по остатку Туг, ни неустойчивых продуктов, превращающихся в ходе темновых реакций в устойчивые, в то время как в случае соединения с диаминоэтильным линкером такие продукты ранее были идентифицированы. Общим для фотопроцессов обоих соединений является образование amino-, nitro-, azoxy- и azoproducts.

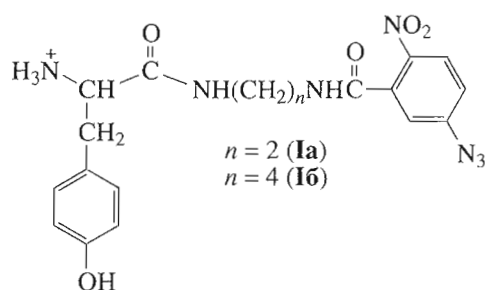
**Ключевые слова:** 5-азидо-2-нитробензоильные производные тирозина, фотопроизводные тирозина, фотопроизводные аминокислот.

### ВВЕДЕНИЕ

Метод фотоаффинной модификации широко используется для исследования активных центров ферментов, а также белок-нуклеиновых и белок-белковых взаимодействий в надмолекулярных структурах. При изучении связывающих центров белков с помощью аналогов субстратов, содержащих арилизидогруппы, были определены аминокислотные остатки, подвергающиеся фотомодификации [1]. Оказалось, что аналоги субстратов, несущие остаток 5-азидо-2-нитробензойной кислоты, в преобладающем числе исследованных случаев модифицируют остаток Туг [1–3]. Однако образующиеся продукты до сих пор не идентифицированы вследствие трудности накопления достаточных количеств индивидуальных фотомодифицированных пептидов для их анализа с помощью ЯМР-спектроскопии. Лишь в некоторых случаях для пептидов, содержащих остаток Туг, фотомодифицированный производным 5-азидо-2-нитробензойной кислоты, были зарегистриро-

ваны электронные спектры поглощения, которые в настоящее время являются единственной физико-химической характеристикой, проливающей свет на природу таких продуктов [2, 3].

Для изучения продуктов фотомодификации остатков Туг в белках производными 5-азидо-2-нитробензойной кислоты ранее мы синтезировали модельное соединение *N*-(тирозил)-*N'*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,2-диаминоэтан (**1a**) [4], в котором эти остатки связаны через диаминоэтильный линкер. Было показано, что образующийся при облучении водного раствора соединения (**1a**) светом



<sup>#</sup> Автор для переписки (эл. почта: smlen@niboch.nsc.ru).

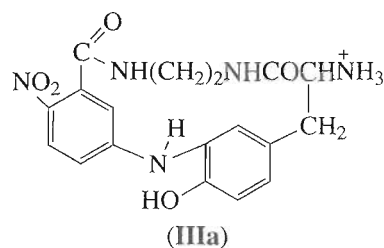
( $\lambda$  313–365 нм) триплетный 4-нитробензоилнитрен способен эффективно модифицировать остаток Туг той же молекулы модельного соединения с получением устойчивого циклического продукта (**IIIa**). Кроме того, был обнаружен неустойчивый продукт (**IIa**), практически полностью превращающийся в ходе темновых реакций в продукт (**IIIa**). Электронные спектры поглощения соединения (**IIIa**) ( $\lambda_{\text{max}}$  413 нм) и пептида фрагмента Кленова ДНК-полимеразы, в котором Туг766 фотомодифицирован остатком 5-азидо-2-нитробензойной кислоты, введенным по остатку U праймера в дуплекс праймер-матрица ( $\lambda_{\text{max}}$  410 нм) [3], были схожи в области 300–450 нм, что свидетельствует о том, что устойчивый продукт модификации по остатку Туг в этом белке близок по структуре соединению (**IIIa**).

Поскольку в модельном соединении (**Ia**) остаток Туг и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты были связаны через короткий неприродный линкер, важно было выяснить влияние увеличения длины линкера на процесс внутримолекулярной фотомодификации остатка Туг. В настоящей работе проведен синтез и изучен фотолиз *N*-(тирозил)-*N'*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутана (**Ib**) – модельной конструкции с линкером, удлиненным в сравнении с соединением (**Ia**) на два метиленовых звена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При создании новой модельной конструкции (**Ib**), так же как и для соединения (**Ia**) [4], предполагалось, что в растворе остатки 5-азидо-2-нитробензойной кислоты и Туг будут сближены на расстояние, сопоставимое с расстояниями между реагирующими центрами при фотоаффинной модификации белка. В то же время удлинение линкера на два метиленовых звена в соединении (**Ib**) может создать менее плотную пространственную структуру двух взаимодействующих ароматических колец молекулы, что, вероятно, позволило бы реализовать фотомодификацию не только по *орто*-положению остатка Туг с образованием продукта, аналогичного соединению (**IIIa**), но и по другим атомам, например, бензильному атому углерода этого остатка. Известно, что фотомодификация толуола перфторированными арилами осуществляется путем *орто*- и *пара*-замещения ароматического кольца толуола синглетными арилнитренами, а также путем реакции триплетных арилнитренов по C–H-связи бензильного атома углерода толуола [5].

Арилазидное производное тирозина (**Ib**) было получено ацилированием *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутана *N*-оксисукуцинимидным эфиром Вос-*L,D*-Туг(Вос) с последующим удалением Вос-защиты. Строение соединения (**Ib**) подтверждено с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-, УФ- и ИК-спек-



троскопии, а также MALDI-масс-анализа (данные приведены в “Эксперимент. части”). Спектральные параметры  $^1\text{H}$ -ЯМР, относящиеся к остаткам Туг и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты соединения (**Ib**), соответствовали данным, приведенным в литературе (соответственно [6, 4]). По данным ТСХ и обращенно-фазовой ВЭЖХ, соединение (**Ib**) было стабильно в течение шести месяцев при  $-20^\circ\text{C}$  в сухом виде, а также в виде раствора в метаноле (50 мМ).

Прежде чем исследовать фотопревращение соединения (**Ib**), методом компьютерного моделирования были проанализированы конформации модельных соединений (**Ia**) и (**Ib**), для которых возможна реализация внутримолекулярной модификации остатка Туг высокорекреационноспособным нитреном. Методом ограниченной молекулярной механики и динамики с учетом окружения модельных соединений молекулами воды [7] было обнаружено, что в одной из конформаций, соответствующей энергетическому минимуму для структуры соединения (**Ia**), ароматические кольца остатков Туг и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты располагаются в параллельных плоскостях на расстоянии  $\sim 0.3$  нм и вовлечены в стэкинг-взаимодействие. Ароматические же кольца реакционноспособных остатков соединения (**Ib**) по данным компьютерного моделирования располагаются перпендикулярно друг другу на расстоянии  $\sim 0.6$  нм между центрами колец (рис. 1). Расстояние от ближайшего к ароматическому кольцу атома азота в остатке арилазида до атома водорода, находящегося в *орто*-положении по отношению к гидроксильной группе остатка Туг, составляет 0.48 нм в соединении (**Ia**) и 0.70 нм в соединении (**Ib**). Из полученных расчетных данных следует, что более длинный линкер в модельном соединении (**Ib**) удаляет реакционноспособный остаток от мишени модификации, уменьшая тем самым вероятность их контакта.

Для экспериментальной проверки полученных результатов был изучен фотолиз соединения (**Ib**) в 0.15% водном метаноле (концентрации 0.031 и 0.062 мМ); облучение проводили в течение 40 с. Для концентрации 0.062 мМ использовали аэробные (растворы, насыщенные  $\text{O}_2$ , и без насыщения) и анаэробные условия облучения, для концентрации 0.031 мМ – только аэробные условия (без насыщения растворов  $\text{O}_2$ ). Образовавшаяся

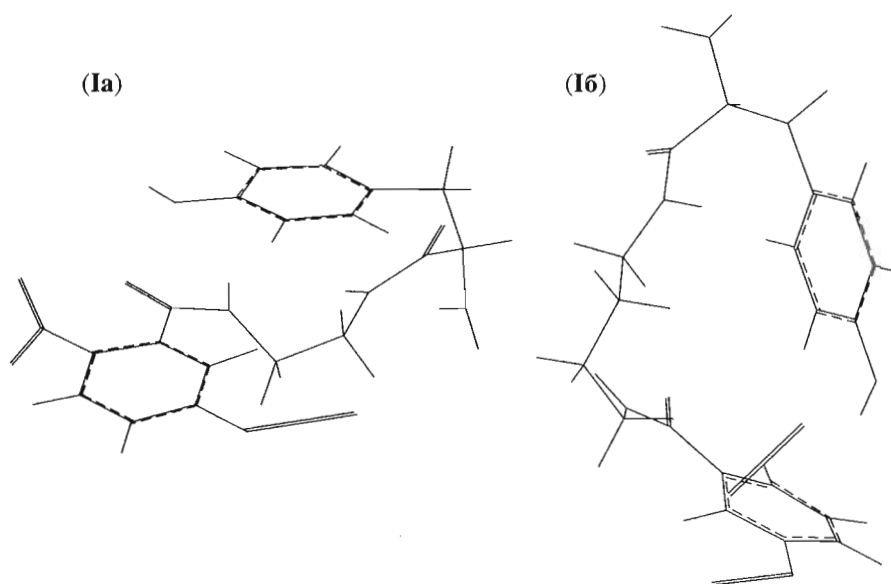


Рис. 1. Пространственные структуры модельных соединений (Ia) и (I6), соответствующие конформациям с энергетическим минимумом в водных условиях (молекулы воды не показаны).

смесь продуктов анализировали с помощью микроколочной обращенно-фазовой ВЭЖХ сразу же после облучения и после выдерживания смеси продуктов в темноте при 20°C в течение 1–24 ч.

Сразу после облучения соединения (I6) (0.062 мМ, аэробные условия без насыщения O<sub>2</sub>)

в смеси продуктов фотолиза было выявлено 8 пиков (рис. 2a). По спектральным характеристикам и результатам MALDI-масс-анализа соединения, соответствующие этим пикам, были отнесены к продуктам фотопревращения (IV6)–(VIII6) (схема 1). Следует отметить, что в смеси продуктов

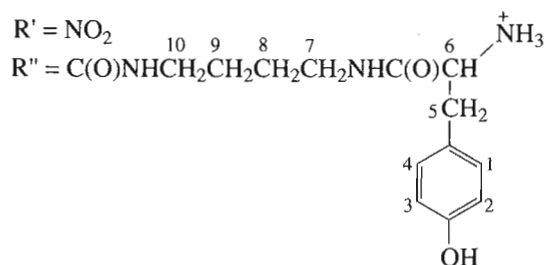
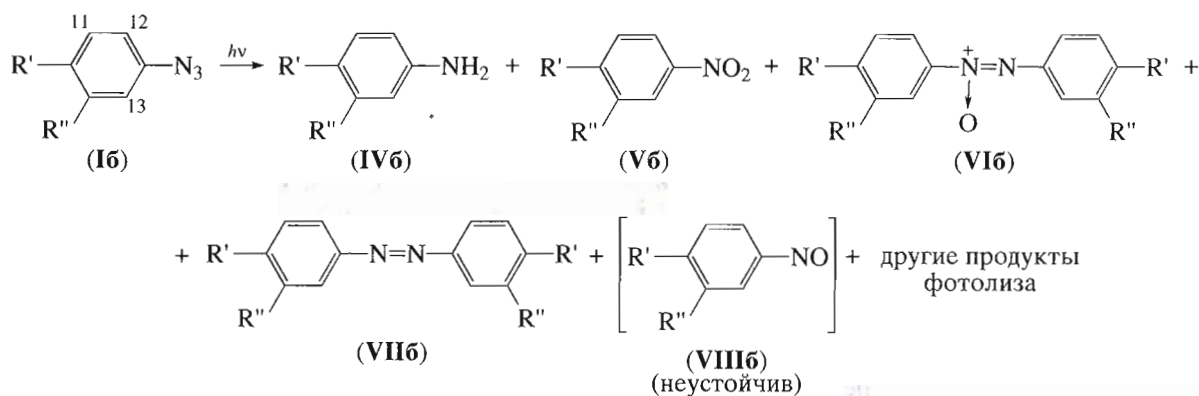
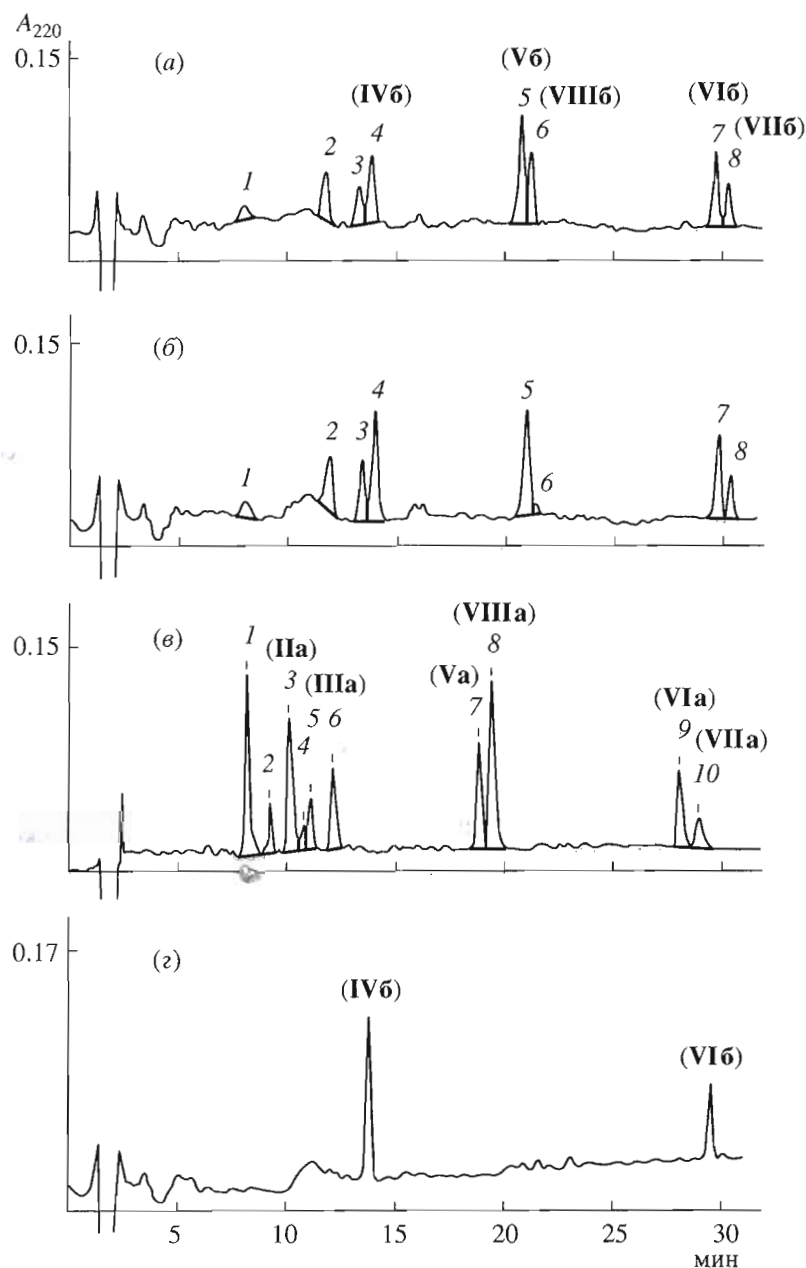


Схема 1. Продукты, образующиеся при фотолизе соединения (I6). Здесь и далее в “Эксперимент. части” нумерация атомов использована для удобства отнесения сигналов в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах.



**Рис. 2.** Анализ с помощью микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 5–20% в 0.1% TFA за 32 мин продуктов фотолиза (в течение 40 с) соединений **(Iа)** (**в**) и **(Iб)** (0.062 мМ, 0.15% водный метанол) сразу после облучения (**а**) и после выдерживания в темноте при 20°C в течение 20 ч (**б**); (**г**) – после концентрирования объединенных фракций 2 и 3, рис. 2а.

фотолиза не было найдено устойчивых продуктов фотомодификации остатка Туг.

После выдерживания смеси продуктов в темноте при 20°C в течение 1–24 ч (темновая стадия реакции) количественный состав продуктов менялся (рис. 2б). Было обнаружено, что количества соединений **(IVб)**, **(VIб)** и **(VIIб)** (пики 4, 7 и 8, соответственно) и соединений, элюирующихся как пики 2 и 3, увеличиваются за счет распада неустойчивого соединения **(VIIIб)** (пик б), которое че-

рез 20 ч темновой реакции практически исчезает. Количественные данные приведены в таблице.

Сравнение хроматографических профилей смесей продуктов фотолиза модельных соединений **(Iа)** (рис. 2в) и **(Iб)** (рис. 2а) показало, что процессы фотолиза этих соединений различаются. Основное отличие выявляется в группе пиков 1–6 (рис. 2в), среди которых был найден продукт внутримолекулярной фотомодификации остатка Туг **(IIIа)** (пик б). Среди соединений, соответствую-

Относительное содержание продуктов фотолиза соединения (**16**) непосредственно после фотолиза (А) и через 20 ч в темноте (Б) по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ\*

Концентрация ( <b>16</b> ), мМ	Продукты и их относительное содержание, %													
	Амино- ( <b>IV6</b> ) пик 4		Нитро- ( <b>V6</b> ) пик 5		Азокси- ( <b>VI6</b> ) пик 7		Азо- ( <b>VIII6</b> ) пик 8		(VIII6) (неустойчив) пик 6		Неидентифицированные соединения			
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	пик 2		пик 3	
0.062	14.8	23.0	20.1	20.2	14.0	15.8	7.6	9.0	13.1	–	12.2	14.8	8.5	12.0
0.062 насыщение O <sub>2</sub>	9.65	17.3	45.7	45.5	–	–	1.5	4.6	28.5	7.0	3.9	12.6	2.2	8.3
0.062 насыщение Ar	19.2	19.2	–	–	–	–	62.4	62.4	–	–	–	–	–	–
0.031	14.5	18.8	20.6	20.6	7.1	7.0	4.0	3.9	35.8	–	–	28.7	–	7.46

\* Условия ВЭЖХ см. “Эксперимент. часть”; количества фотопродуктов оценены интегрированием соответствующих хроматографических пиков; детекция при 220 нм.

А – хроматографические профили получены сразу после облучения соединения (**16**) (см. рис. 2а); Б – после выдерживания смеси фотопродуктов в течение 20 ч в темноте при 20°C (см. рис. 2б).

щих группе пиков 1–4 (рис. 2а), не было обнаружено устойчивых продуктов фотомодификации остатка Туг. Следует отметить, что соединения, соответствующие пикам 2 и 3 (рис. 2а), неустойчивы при концентрировании, поэтому их структуры не были определены. Сравнение времен удерживания пиков 7–10 (рис. 2в) и 5–8 (рис. 2а) показывает, что они близки, следовательно возможно, отвечают соединениям одинаковой природы. Ранее [4] продукты пиков 7, 9 и 10 (рис. 2в) идентифицированы как нитро- (**Va**), азокси- (**VIa**) и азо- (**VIIa**) производные соединения (**Ia**), неустойчивое же соединение (**VIIIa**) (рис. 2в, пик 8), практически полностью исчезающее за 20 ч темновой реакции, было на основании данных электронной спектроскопии и количественного анализа устойчивых продуктов, образующихся при облучении соединения (**Ia**) в различных концентрациях, предположительно отнесено к нитрозопроизводному соединения (**Ia**). Возможно, соединения, элюирующиеся как пики 5–8 (рис. 2а), являются соответственно нитро-, нитрозо-, азокси- и азопроизводными соединения (**16**). Поэтому продуктам фотолиза соединений (**Ia**) и (**16**), которые можно рассматривать как соответствующие производные одной природы, были присвоены одинаковые номера, например: (**Va**) (пик 7, рис. 2в) и (**V6**) (пик 5, рис. 2а).

Устойчивые продукты фотолиза соединения (**16**) (схема 1) были получены в количествах, достаточных для их идентификации методами <sup>1</sup>H-ЯМР- и УФ-спектроскопии и MALDI-масс-спектрометрии и путем сравнения с аналогичными характеристиками продуктов фотолиза соединения (**Ia**) (см. [4] и “Эксперимент. часть”).

Соединение (**IV6**) определено как аминокпродукт: по данным <sup>1</sup>H-ЯМР, оно содержит остаток Туг, структурно аналогичный остатку Туг в соединении (**16**), изменения химических сдвигов H11, H12 и H13 соединения (**IV6**) типичны для влияния amino-

заместителя [8]. Электронные спектры поглощения производных (**IVa**) ( $\lambda_{\max}$  384 нм [4]) и (**IV6**) ( $\lambda_{\max}$  385 нм) близки.

Продукты, элюирующиеся во фракциях 2 и 3 (рис. 2а), а также соединение (**VIII6**) (пик 6) не были идентифицированы вследствие их неустойчивости. Выяснилось, что все неустойчивые соединения появляются только при фотолизе в аэробных условиях (см. таблицу). Известно, что при облучении 4-нитрофенилазида образуется триплетный нитрен, который способен интенсивно взаимодействовать с кислородом с получением (4-нитрофенил)нитрозооксида в форме бирадикала, или цвиттериона. Быстрая димеризация (4-нитрофенил)нитрозооксида с образованием промежуточного неустойчивого циклического дипероксида приводит к 1,4-динитробензолу и 1-нитрозо-4-нитробензолу [9, 10]. Соединение (**VIII6**) мы предположительно отнесли к нитрозопродукту: электронные спектры поглощения фотопродуктов (**VIIIa**) ( $\lambda_{\max}$  278 нм [4]) и (**VIII6**) ( $\lambda_{\max}$  278 нм) практически совпадали и были близки к электронному спектру поглощения 1-нитрозо-4-нитробензола ( $\lambda_{\max}$  282 нм [11]). Количественный анализ продуктов, образующихся при облучении соединения (**16**) в аэробных условиях (0.062 мМ), показывает, что насыщение растворов O<sub>2</sub> ведет к более чем двукратному увеличению количеств продуктов нитро- (**V6**) и (**VIII6**). В анаэробных условиях облучения оба этих продукта отсутствовали (см. таблицу).

Неустойчивые же продукты, элюирующиеся во фракциях 2 и 3 (рис. 2а), образуются из соединения (**VIII6**) в ходе темновых процессов: эти продукты отсутствуют сразу после облучения раствора соединения (**16**) в низкой концентрации (0.031 мМ), но появляются после темновой стадии реакции за счет распада соединения (**VIII6**) (таблица). При облучении раствора соединения (**16**) в

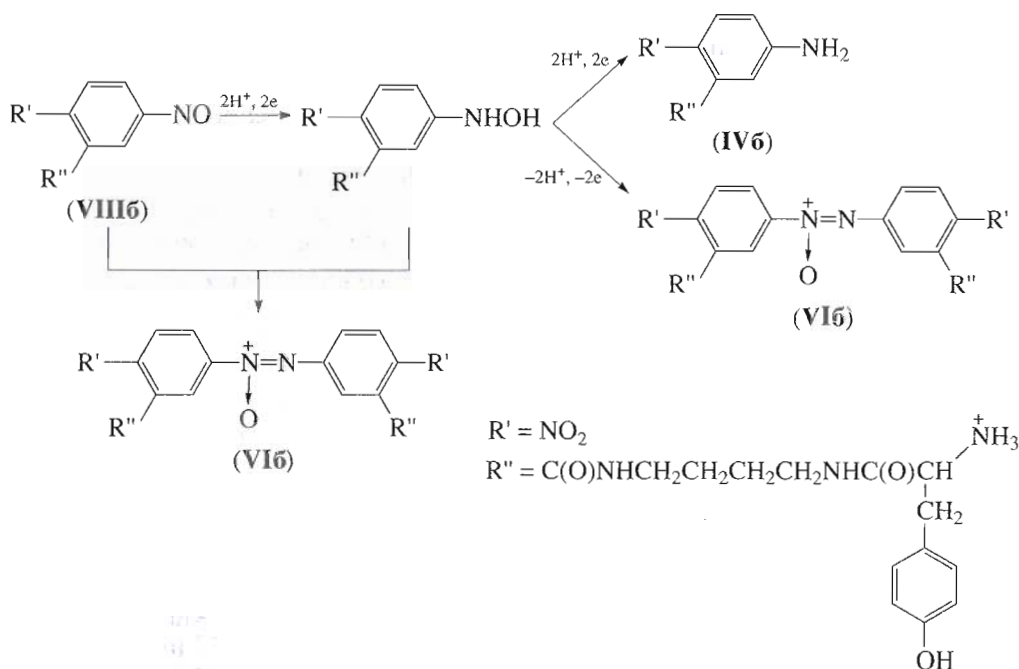


Схема 2. Продукты превращения предполагаемого соединения нитрозо- (VIIIб) в присутствии восстанавливающего агента (метанола).

более высокой концентрации (0.062 мМ) эти продукты появлялись сразу после облучения, однако их количества увеличивались после темновой стадии реакции также за счет распада соединения (VIIIб) (рис. 2а, б; таблица).

Смесь продуктов, образующаяся после облучения соединения (Iб) (0.062 мМ, аэробные условия без насыщения O<sub>2</sub>), была выдержана в темноте при 20°C в течение длительного времени (4 сут) и затем проанализирована с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Было обнаружено, что в этом случае продукты, соответствующие пикам 2 и 3, в смеси отсутствуют, в то же время количества amino- (IVб) (пик 4) и азокси- (VIб) (пик 7) продуктов увеличились на 15.3 и 8.3% соответственно, в сравнении с их количествами сразу после облучения соединения (Iб); одновременно на хроматографическом профиле наблюдался новый пик (время удерживания 22.49 мин) (данные не представлены). При концентрировании объединенных фракций 2 и 3, по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, УФ-спектроскопии и MALDI-масс-анализа, также происходит практически полное превращение этих соединений в amino- (IVб) (λ<sub>max</sub> 385 нм) и азокси- (VIб) (λ<sub>max</sub> 342 нм) продукты (рис. 2з).

Известно, что нитробензол достаточно легко восстанавливается с образованием фенилгидроксиламина. Взаимодействие нитробензола с фенилгидроксиламином приводит к образованию азоксибензола; фенилгидроксиламин также диспропорционирует с образованием анилина и азок-

сибензола [12]. Можно предположить, что аналогичные превращения могут происходить с соединением (VIIIб) в присутствии метанола как восстанавливающего агента (схема 2). Возможно, что соединение, элюирующееся во фракции 3, соответствует *N*-(тирозил)-*N'*-[*N*-(2-нитро-5-гидроксиламинобензоил)]-1,4-диаминобутану, т.к. электронный спектр поглощения этого соединения близок к приведенным в литературе спектральным характеристикам *N*-(4-нитрофенил)гидроксиламина (λ<sub>max</sub> 356 нм) [13].

В литературе отсутствуют сведения о продуктах взаимодействия фенолов или их аналогов с ароматическими нитрозосоединениями. В то же время известно, что нитрогруппа является аналогом карбонильной группы и вступает в сходные с ней реакции. Ввиду того, что для карбонилсодержащих соединений характерна реакция со спиртами с образованием неустойчивых полуацеталей, можно предполагать, что соединение, элюирующееся во фракции 2, является продуктом аналогичного взаимодействия нитрогруппы соединения (VIIIб) с гидроксильной группой тирозина.

Хорошо известно, что облучение ароматических азидов приводит к отщеплению молекулы азота и образованию синглетного арилнитрена [10, 14]. Однако при облучении 4-нитрофенилазида с высокой эффективностью образуется триплетный 4-нитрофенилнитрен вследствие чрезвычайно быстрого перехода синглетного 4-нитрофе-

нилнитрена в его основное триплетное состояние [9]. Исследование фотолиза модельных соединений (**Ia**) [4] и (**Ib**) показывает, что облучение этих соединений ведет к реакциям, характерным для химии триплетного 4-нитрофенилнитрена [9]: димеризации с образованием замещенного азобензола – (**VIIa**), (**VIIb**); восстановления до замещенного 4-нитроанилина – (**IVa**), (**IVb**); взаимодействия с кислородом и образования нитропродукта – (**Va**), (**Vb**) и замещенного азоксибензола – (**VIa**), (**VIb**) (см. схему 1). Однако при анализе продуктов фотолиза соединения (**Ib**) не было обнаружено продуктов фотомодификации по остатку Туг: ни устойчивых (аналогов (**IIIa**)), ни неустойчивых (аналогов (**IIa**) [4]), превращающихся в ходе темновых реакций в устойчивые.

Важность оптимальной длины линкера для эффективного протекания реакции внутримолекулярной модификации по фенильному остатку тирозина была показана в ряде работ [15–18]. Например, было обнаружено, что в соединениях  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $n = 2, 3$ , в случае более длинного линкера реакция внутримолекулярного алкилирования проходила с высоким выходом, в то время как в случае более короткого линкера были получены лишь следовые количества продукта циклизации [15]. Для соединений  $\text{PhCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $n = 4–8$ , наличие короткого линкера ( $n = 4$ ) обеспечивало высокий выход продукта циклизации, однако последовательное удлинение линкера ( $n = 5–8$ ) приводило лишь к продуктам межмолекулярного алкилирования [16].

В нашем случае удлинение линкера на два метиленовых звена подавляет образование продукта модификации по *орто*-С–Н-связи остатка Туг, который формируется при облучении модельного соединения (**Ia**) с более коротким линкером. Продуктов других вариантов модификации также не обнаружено. На основании расчетных и экспериментальных данных можно предположить, что удлинение линкера на два метиленовых звена не позволяет реализовать необходимую конформацию молекулы, в которой остатки Туг и 5-азидо-2-нитробензойной кислоты ориентированы оптимально относительно друг друга для образования устойчивого продукта модификации.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5-азидо-2-нитробензойную кислоту, TFA (Sigma, США), 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Aldrich, США). *N*-(5-Азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутан был синтезирован по методу, описанному в работе [4], *N*-оксисукцинимидный эфир Вос-*L,D*-Туг(Вос) – по методу, описанному в работе [19], в технологической лаборатории НИБХ СО РАН. Растворители 1,4-диоксан, ацетонитрил, *N,N*-диметилформамид, бензол, пиридин, ацетон, метанол, этанол, хлористый метилен,

эфир, этилацетат, *n*-гексан были очищены стандартными методами. Все использованные реактивы были марки “х.ч.”.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2100 (Япония) в кварцевых кюветах толщиной 0.1 см.

Инфракрасные спектры получали на спектрофотометре Bruker IFS 66 (Германия) в КВт.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры ( $\delta$ , м.д., *J*, Гц) записывали на спектрометре Bruker AM 400 (Германия, частота 400.13 МГц) в D<sub>2</sub>O при 25°C. Химические сдвиги рассчитывали относительно остаточного сигнала растворителя (вода,  $\delta$  4.80 м.д.). Для интерпретации записанных <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров использовали каталог ЯМР-спектров Sadtler Research Laboratories, Inc. и другие широко известные источники спектральной информации ЯМР.

Масс-спектры регистрировали на времяпролетном MALDI-масс-спектрометре VISION 2000 (Thermo Bio Analysis, Англия), используя азотный лазер VSL-337ND (337 нм, импульс 3 нс, энергия 150–200 мкДж/имп.). В качестве матрицы применяли 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. Образцы для MALDI-масс-спектрометрии готовили следующим образом: водные растворы исследуемых соединений (0.1–0.5 мМ, 0.3 мкл) смешивали на мишени с 0.3 мкл раствора матрицы (20 мг/мл в 20% водном ацетонитриле), высушивали и затем анализировали. Спектры получены при регистрации положительных ионов в режиме отражения.

Для ТСХ использовали пластинки с тонким слоем силикагеля DC-Alufolen Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия) и системы растворителей: метанол–водный аммиак, 4 : 1 (А); хлористый метилен–метанол, 9 : 1 (Б).

Аналитическую микроколоночную обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе MiliChrom A-02 [20] (EcoNova, Россия).

Наработку продуктов фотолиза осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром-4 (г. Орел, Россия).

Расчет пространственной структуры соединений (**Ia**) и (**Ib**) проводили методом ограниченной молекулярной механики и динамики по программе Amber 4.0 [7]. Визуализация структур и вращение относительно химических связей проведены с помощью программы HyperChem (HyperCube). Все расчеты осуществлялись на персональных компьютерах типа Pentium.

***N*-(*L,D*-Тирозил)-*N'*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутан (**Ib**)**. Раствор 36 мг (0.11 ммоль) *N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-1,4-диаминобутана в 2 мл абс. диоксана добавляли к раствору 57.5 мг (0.12 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира Вос-*L,D*-Туг(Вос) в 2 мл абс. диоксана. Реакцию проводили в темноте 10 мин при перемешивании. Реак-

ционную смесь упарили досуха, к сухому остатку добавили 5 мл воды и продукт экстрагировали этилацетатом (2 × 2 мл). Объединенный этилацетатный раствор сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение 24 ч, затем отфильтровали и упарили. Маслообразный остаток растворили в 1 мл диоксана и по каплям прибавили к 5 мл воды. Воду отделили декантацией. Маслообразный осадок сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> несколько дней, затем растворили в 1 мл метанола и к этому раствору добавили 0.4 мл метанола, насыщенного HCl. Раствор выдержали при комнатной температуре 48 ч и затем прилили к 14 мл холодного эфира. Маслообразный осадок несколько раз промыли эфиром, растворили в 1 мл метанола и высалили в 10 мл эфира. Осадок отфильтровали, промыли 2 мл эфира и высушили под вакуумом. Выход 30 мг (47%). *R<sub>f</sub>* 0.82 (А), 0.1 (Б); время удерживания 21.91 мин (условия ВЭЖХ см. ниже); УФ (10% водный метанол), λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 318 (8800); ИК (KBr, ν<sub>max</sub>, см<sup>-1</sup>): 1342, 1517 (–NO<sub>2</sub>), 1653 (–C=O<sub>амид</sub>), 2123 (–N<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-ЯМР: 8.21 (д, 1H, H11, *J* 9.0), 7.38 (дд, 1H, H12, *J* 9.0, 2.5), 7.22 (д, 1H, H13, *J* 2.5), 7.14 (д, 1H, H1 и H4, *J* 8.5), 6.82 (д, 1H, H2 и H3, *J* 8.5), 3.3–3.2 (м, 4H, H7 и H10), 3.18 (д, 1H, H6, *J* 7.0), 3.1–3.0 (м, 2H, H5), 1.6–1.5 (м, 4H, H8 и H9); MALDI\*, *m/z*: 386.6 [*M* + H – NO]<sup>+</sup> для продукта (IVб); 400.5 [*M* + H – O]<sup>+</sup> для продукта (IVб); 416.5 [*M* + H]<sup>+</sup> для продукта (IVб); 438 [*M* + Na]<sup>+</sup> для продукта (IVб).

**Облучение образцов** проводили с помощью ртутной лампы высокого давления ДРШ-1000, 1000 Вт. Две линии спектра 313 и 365 нм выделяли с помощью комбинации стеклянных светофильтров. Интенсивность падающего света (*J* (1.35 ± 0.01) × 10<sup>15</sup> фотонов с<sup>-1</sup> см<sup>-2</sup>) измеряли ферриоксалатным актинометром Хатчарда, Паркера [21].

Облучение соединения (Iб) проводили в 0.15% водном метаноле при концентрациях 0.031 и 0.062 мМ (точность ±5%). Молярный коэффициент поглощения соединения (Iб) определяли как сумму коэффициентов поглощения Туг (ε<sub>275</sub> 1230 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [22]) и арилазида (ε<sub>318</sub> 8800 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [2]).

**Аэробные условия облучения** создавали, используя растворы соединения (Iб) (0.062 мМ, 0.15% водный метанол) или продувая через эти растворы O<sub>2</sub> в течение 20 мин при 0°C.

**Анаэробные условия облучения** создавали, продувая через растворы соединения (Iб) (0.062 мМ, 0.15% водный метанол) Ar в течение 20 мин при 0°C.

**Анализ смеси продуктов фотолиза**, образующейся сразу после облучения соединения (Iб) и после ее выдерживания в темноте при комнатной тем-

пературе в течение 1–24 ч, проводили с помощью микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ на смоле Nucleosil 100–5C18, 5 мкм (Macherey-Nagel, Германия), колонка 2 × 75 мм, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 20% в 0.1% TFA за 32 мин со скоростью 100 мкл/мин.

Продукты фотолиза характеризовали по времени удерживания и по спектральным свойствам: определяли отношение поглощения на длинах волн 210, 274, 330 и 346 нм к поглощению на 220 нм. УФ-спектры продуктов записывали в процессе хроматографии в режиме “stop flow” хроматографа. Относительные количества продуктов оценивали интегрированием профиля хроматографии, полученного при 220 нм.

**Наработку продуктов фотолиза** проводили, используя обращенно-фазовую ВЭЖХ (колонка 2 × 64 мм), как описано выше.

**Концентрирование продуктов фотолиза** в водно-ацетонитрильном растворе проводили упариванием на вакуумном роторном испарителе при 32°C.

**Идентификация продуктов фотолиза соединения (Iб).** Были выделены и идентифицированы следующие продукты, образующиеся при облучении соединения (Iб).

**3-(Тирозиламинобутиламинокарбонил)-4-нитроанилин (IVб).** Время удерживания 14.06 мин; <sup>1</sup>H-ЯМР: 8.09 (д, 1H, H11, *J* 9.0), 7.14 (д, 1H, H1 и H4, *J* 8.0), 6.86 (д, 1H, H2 и H3, *J* 8.0), 6.81 (дд, 1H, H12, *J* 9.0, 2.5), 6.66 (д, 1H, H13, *J* 2.5), 4.11 (д, 1H, H6, *J* 7.0), 3.3–3.2 (м, 4H, α- и δ-CH<sub>2</sub>, Bu), 3.1–3.0 (м, 2H, H5), 1.5–1.4 (м, 4H, β- и γ-CH<sub>2</sub>, Bu); MALDI, *m/z* 386.6 [*M* + H – NO]<sup>+</sup>; УФ (раствор в 7% водном ацетонитриле, 0.1% TFA): λ<sub>max</sub> 385 нм.

**1,4-Динитро-3-(тирозиламинобутиламинокарбонил)бензол (Vб).** Время удерживания 21.35 мин; УФ (раствор в 9% водном ацетонитриле, 0.1% TFA): λ<sub>max</sub> 254 нм; MALDI, *m/z*: 439 [*M* + Na – NO]<sup>+</sup>; 452 [*M* + Li]<sup>+</sup>.

**[4,4'-Динитро-3,3'-ди(тирозиламинобутиламинокарбонил)-1,1'-азоксибензол (VIб).** Время удерживания 29.67 мин; УФ (раствор в 18% водном ацетонитриле, 0.1% TFA): λ<sub>max</sub> 342 нм; MALDI, *m/z*: 783 [*M* + H – 2(NO)]<sup>+</sup>; 814 [*M* + H – (NO)]<sup>+</sup>.

**[4,4'-Динитро-3,3'-ди(тирозиламинобутиламинокарбонил)-1,1'-азобензол (VIIб).** Время удерживания 30.21 мин; УФ (раствор в 18% водном ацетонитриле, 0.1% TFA): λ<sub>max</sub> 328 нм.

**Продукт (VIIIб)** неустойчив, предположительно 1-нитрозо-3-(тирозиламинобутиламинокарбонил)-4-нитробензол. Время удерживания 21.72 мин; УФ (раствор в 9% водном ацетонитриле, 0.1% TFA): λ<sub>max</sub> 278 нм.

Работа выполнена в рамках Программы научной кооперации между Восточной Европой и

\* Поскольку в методе MALDI используется ионизация лазером (λ 337 нм), одновременно происходит процесс фотолиза соединения (Iб) с образованием amino- (IVб) продукта.



Швейцарией (SCOPES 2000–2003) при частичной финансовой поддержке гранта 7SUPJ062336.

Авторы выражают благодарность д.х.н. Н.П. Грицан за интерес к работе и сделанные ценные замечания в процессе написания статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Godovikova T.S. // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 9–14.
2. Mishchenko E.L., Reinbolt J., Markushin Y.Ya., Ehresmann B., Godovikova T.S. // Photochem. Photobiol. B: Biol. 1998. V. 45. P. 9–18.
3. Catalano E., Allen D.J., Benkovic S.J. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 3612–3621.
4. Mishchenko E.L., Kozhanova L.A., Denisov A.Yu., Gritsan N.P., Markushin Y.Ya., Serebriakova M.V., Godovikova T.S. // Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000. V. 54. P. 16–25.
5. Young M.J.T., Platz M.S. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 2199–2202.
6. Sadtler Collection of Standard NMR Spectra. Philadelphia. PA. 1980.
7. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 5179–5197.
8. Gunther H. NMR Spectroscopy. Chichester: Wiley, 1980.
9. Liang T.-Y., Schuster G.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7803–7810.
10. Gritsan N.P., Pritchina E.A. // Adv. Chim. 1992. V. 61. P. 910–939.
11. Nakamoto K., Rundle R.E. // J. Am. Chem. Soc. 1956. V. 78. P. 1113–1118.
12. Knight G.T., Pepper B. // Tetrahedron. 1971. V. 27. P. 6201–6208.
13. Pedersen C.J. // J. Org. Chem. 1958. V. 23. P. 225–261.
14. Schuster G.B., Platz M.S. // Adv. Photochem. 1992. V. 17. P. 70–137.
15. Khalaf A.A., Roberts R.M. // J. Org. Chem. 1966. V. 31. P. 89–95.
16. Schubert W.M., Sweeney W.A., Latourette H.K. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 5462–5466.
17. Friedel-Crafts and Related Reactions. / Ed. G.A. Olah. New York: Interscience. Wiley, 1964. V. III. P. 911–1002.
18. Friedel-Crafts and Related Reactions. / Ed. G.A. Olah. New York: Interscience. Wiley, 1964. V. II. P. 785–977.
19. Вейко Н.Н., Карпунин А.В., Салимов А.Г., Немцова А.В., Ситковский Д.М. // Биотехнология. 1989. Т. 5. С. 414–419.
20. Baram G.I. // J. Chromatogr. A. 1996. V. 728. P. 387–399.
21. Calvert J.G., Pitts J.N. Photochemistry. New York: John Wiley, 1966. P. 780–788.
22. Edelhoch H. // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 1948–1954.

## The Effect of Linker Length on the Photomodification of Tyr Residue in *N*-(Tyrosyl)-*N'*-(5-azido-2-nitrobenzoyl)diaminoalkanes

E. L. Mishchenko<sup>#\*</sup>, L. A. Kozhanova<sup>\*\*</sup>, A. Yu. Denisov<sup>\*</sup>, Yu. Ya. Markushin<sup>\*</sup>, P. V. Alekseev<sup>\*</sup>, N. I. Cherepanova<sup>\*\*\*</sup>, and T. M. Ivanova<sup>\*</sup>

<sup>#</sup> E-mail: smlen@niboch.nsc.ru

<sup>\*</sup>Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*</sup>Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya ul. 3, Irkutsk, 664033 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

*N*-(Tyrosyl)-*N'*-(5-azido-2-nitrobenzoyl)-1,4-diaminobutane, containing a Tyr residue connected with the photoreactive aryl azide group through the diaminobutylene linker, was synthesized as a model for studying the photomodification of Tyr residues in proteins. This compound and the compound with a shorter, 1,2-diaminoethylene linker, obtained previously, were subjected to computer modeling to find their minimal-energy conformations. The aromatic rings of Tyr and 5-azido-2-nitrobenzoic acid residues in the latter compound were localized in parallel planes at a distance of approximately 0.3 nm between them and were shown to be implicated in stacking interactions. On the contrary, the planes of aromatic rings of the former compound with a longer, diaminobutylene linker were found to be situated perpendicularly to each other, with the distance between the centers of the rings being approximately 0.6 nm. The computer analysis was confirmed by experimental results: when studying the photomodification of the compound with the diaminobutylene linker, neither stable products of the Tyr photomodification nor unstable products capable of transformation into stable products in the dark were found. On the contrary, such products were previously identified in the case of the compound with diaminoethylene linker. The formation of amino, nitro, azoxy, and azo derivatives was common for the photomodification of both compounds. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** amino acid photoderivatives, 5-azido-2-nitrobenzoyltyrosine derivatives, tyrosine photoderivatives