



УДК 547.963+32.854

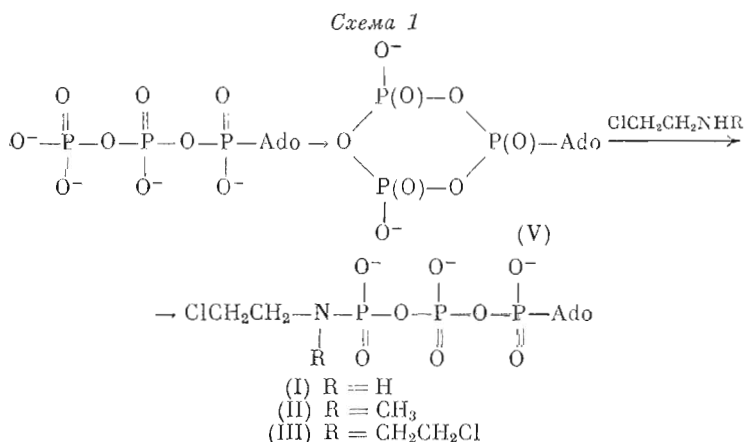
γ-АМИДЫ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА — ПРОИЗВОДНЫЕ АЗОТИСТЫХ ИПРИТОВ

*Грачев М. А., Мустаев А. А., Курбатов В. А.,
Сазонов И. Т., Сафронов И. В.*

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Синтезированы γ-амиды АТР — продукты фосфорилирования азотистых ипритов. Продукт фосфорилирования N-метил-2-хлорэтиламина проявляет как алкилирующую, так и фосфорилирующую активность. Этот аналог АТР является аффинным реагентом для РНК-полимеразы из *E. coli* и для креатинкиназы из мышц кролика.

В настоящей работе описаны синтез и свойства трех производных АТР и азотистых ипритов (I) — (III).



Эти реагенты предполагалось использовать для алкилирования АТР-связывающих ферментов по участкам, находящимся вблизи мест связывания трифосфатного остатка.

В отличие от других описанных в литературе реагентов, несущих реакционноспособные группы при γ-фосфатном остатке АТР [1], у реагентов подобной структуры расстояние между γ-атомом фосфора и алкилирующей функцией минимально.

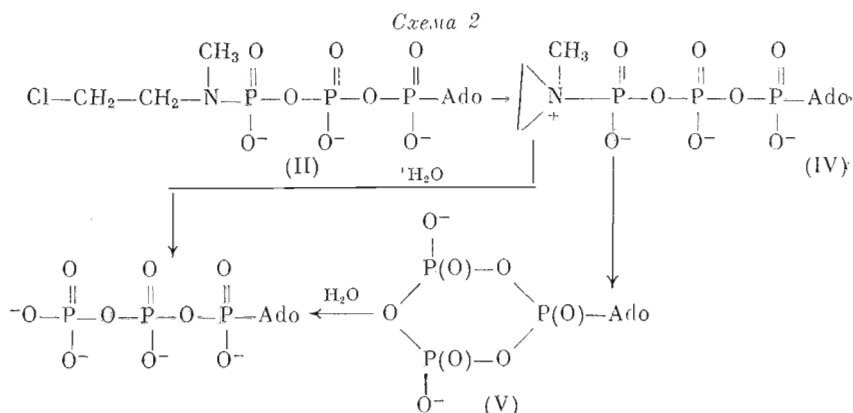
Для получения реагентов (I) — (III) мы воспользовались общим методом синтеза γ-амидов АТР [2] (см. схему 1), включающим превращение АТР в циклический аденозин-5'-триметафосфат (V) под действием дидецилкарбодиимидов в диметилсульфоксиде и последующую реакцию производного (V) с аминами. Поскольку амины, использованные при синтезе соединений (I) — (III) — 2-хлорэтиламин, N-метил-2-хлорэтиламин, бис(2-хлорэтил)амин — высокореакционноспособны и поэтому неустойчивы, их получали из хлоридратов путем обработки триэтиламиноном непосредственно в реакционных смесях, содержащих триметафосфат (V).

Сокращения: МАБА — N-метил-(4-аминобензил)амин, DCC — N,N'-дидецилкарбодиимид, SDS — додецилсульфат натрия, DMSO — диметилсульфоксид.

Выделение соединений (I)–(III) из реакционных смесей осуществляли путем осаждения их литиевых солей 1% LiCl в ацетоне. После трехкратной отмывки ацетоном и однократной — метанолом продукты не требовали дополнительной очистки и содержали стехиометрические количества ковалентно связанного хлора, определенного по методике [2]. Они были гомогенны, по данным микроколоночной жидкостной хроматографии [3] на DEAE-целлюлозе, и имели заряд -3 . Обработка $0,01$ M HCl в течение 1 ч при 40°C приводила к количественному превращению соединений (I)–(III) в АТР благодаря гидролизу фосфамидной связи (ср. [2]). УФ-спектры соединений (I)–(III) совпадали с УФ-спектрами АТР.

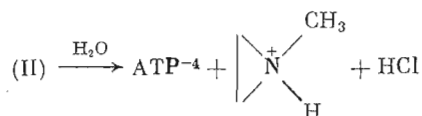
Способ синтеза соединений (I)–(III), приведенные выше данные, а также описанные ниже свойства подтверждают приписываемую им структуру.

Реакционная способность синтезированных аналогов АТР наиболее подробно исследована на примере соединения (II). Оказалось, что оно гидролизуется до АТР не только в кислой среде, но и при pH 7,5, т. е. в таких условиях, при которых обычные γ -амиды АТР совершенно устойчивы [4]. Наиболее вероятным представляется следующий механизм этой реакции:



Известно [4], что при атаке водорастворимым карбодимидом на АТР в водной среде образуется короткоживущее соединение с положительно заряженным заместителем при γ -фосфатном остатке — производное O -фосфорилизоомочевины, которое затем гидролизуется до АТР и параллельно превращается, благодаря внутримолекулярной реакции, в триметафосфат (V). Последний затем также гидролизуется до АТР, но с умеренной скоростью. Тот факт, что АТР (заряд -4), по данным микроколоночной хроматографии, является единственным УФ-поглощающим продуктом гидролиза соединения (II), говорит в пользу родственного механизма (схема 2). Если бы реакция шла не по указанному пути, а по пути алкилирования воды этилениммониевым катионом (IV), то должен был бы образовываться γ -[N-метил-N-(2-оксиэтил)]амид АТР, заряд которого равен -3 .

В ходе гидролиза соединения (II) кинетика накопления ионов хлора совпадает с кинетикой накопления протонов (рис. 1) в соответствии с уравнением



Этот факт говорит о том, что промежуточное соединение (IV) высокореакционноспособно и не накапливается в значительных количествах.

Далее мы исследовали протекающее в водной среде взаимодействие соединения (II) с N-метил(4-аминобензил)амином (МАВА) при pH 10, т. е. в таких условиях, при которых обе аминогруппы МАВА депротонированы, и атаке подвергается поэтому более нуклеофильная, имеющая алифатические заместители аминогруппа. Эта реакция, по данным микроколонной хроматографии с многоволновой детекцией (DEAE-целлюлоза, pH 7,5), приводит к смеси двух поглощающих УФ-свет продуктов (рис. 2). Первый из этих продуктов имеет заряд -2 и спектральное отношение $A_{240}/A_{260}=0,83^*$, а второй — заряд -3 и спектральное отношение $A_{240}/A_{260}=0,95$. Оказалось, что УФ-спектр первого продукта является суперпозицией УФ-спектров аденозина и протонированного по алифатической аминогруппе МАВА. УФ-спектр и хроматографическая подвижность второго продукта оказались идентичными соответствующим характеристикам γ -[N-метил-N-(4-аминобензил)амида АТР (VII), который был получен встречным синтезом из АТР и МАВА общим методом [2]. Исходя из этого можно заключить, что первый продукт — соединение (VI) — является продуктом алкилирования алифатической аминогруппы МАВА соединением (II), а второй — соединение (VII) — обязан

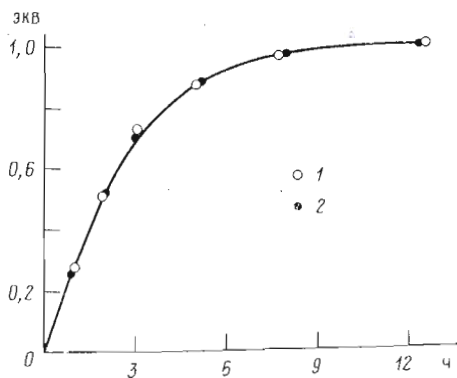


Рис. 1. Накопление ионов хлора (1) и протонов (2) в процессе гидролиза соединения (II) при pH 7,5 и 40° С

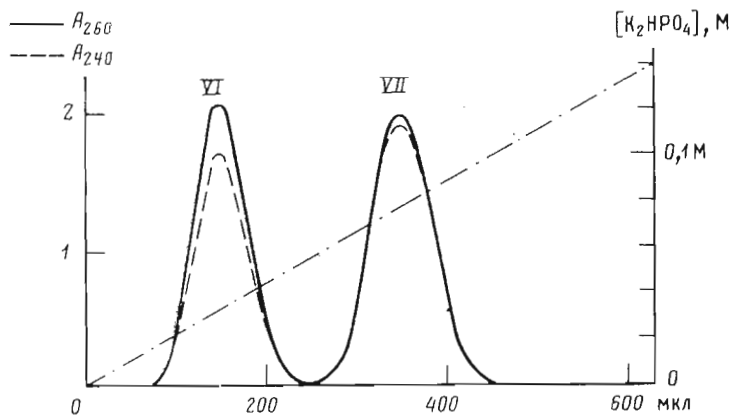
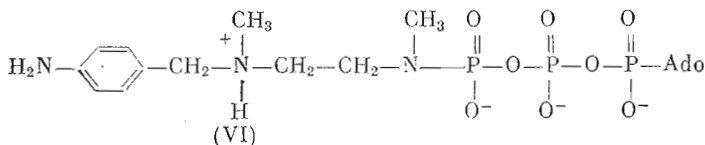
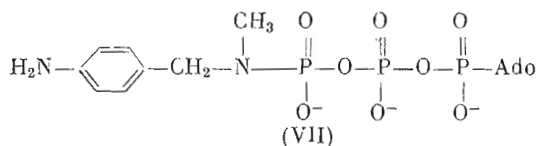


Рис. 2. Ионообменная хроматография продуктов реакции 0,01 М реагента (II) с 0,1 М МАВА при pH 10 и 40° С на колонке с DEAE-целлюлозой (4×0,2 см), линейный градиент K_2HPO_4 (pH 7,5) в 7 М мочевины, скорость подачи элюента 25 мкл/мин

своим происхождением реакциям фосфорилирования, протекающим через промежуточные соединения (IV) и (V).



* Спектральное отношение — отношение поглощения при какой-то длине волны (в данном случае 240 нм) к поглощению при опорной длине волны (в данном случае 260 нм).



Подтверждением структуры веществ (V) и (VI) служит то, что при мягком кислотном гидролизе (0,01 М HCl, 40° С, 1 ч) оба вещества количественно превращаются в АТР. Итак, соединение (II) проявляет как алкилирующую, так и фосфорилирующую активность.

Мы попытались оценить вклад алкилирования и двух упомянутых путей фосфорилирования в конечный результат взаимодействия фосфамида (II) с МАВА. Общий путь превращений может быть представлен в виде схемы 3.

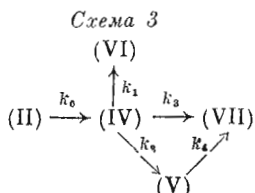


Схема 3 может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[(VI)]}{dt} &= k_1[(IV)]c \\
 \frac{d[(VII)]}{dt} &= k_3[(IV)]c + k_4[(V)]c \\
 \frac{d[(V)]}{dt} &= k_2[(IV)] - k_4[(V)]c
 \end{aligned}$$

где c — концентрация МАВА. Соотношение продуктов алкилирования и фосфорилирования находится из уравнения (1):

$$\frac{d[(VI)]}{d[(VII)]} = \frac{k_1[(IV)]}{k_3[(IV)] + k_4[(V)]} \quad (1)$$

Из предположения стационарности по триметафосфату (V) получаем

$$[(V)] = \frac{k_2[(IV)]}{k_4c}$$

Для высоких значений c уравнение (1) можно представить в виде

$$\frac{d[(VI)]}{d[(VII)]} = \frac{k_1}{k_3}$$

Напротив, для малых значений c получаем

$$\frac{d[(VI)]}{d[(VII)]} = \frac{k_1}{k_2}c$$

Таким образом, кинетический анализ указывает на то, что при высоких концентрациях нуклеофильного реагента соотношение продуктов алкилирования и фосфорилирования не зависит от его концентрации и определяется только факторами конкуренции реакций второго порядка между МАВА и соединением (IV). Это связано с тем, что при высоких значениях c относительный вклад внутримолекулярной реакции, приводящей к триметафосфату (V), становится малым. С другой стороны, при малых c отношение выходов продуктов алкилирования и фосфорилирования является линейной функцией концентрации МАВА.

Исследовав реакционные смеси методом микроколоночной хроматографии, мы определили отношения выходов продуктов (VI) и (VII), полученные при разных концентрациях МАВА. Оказалось, что при c 0,1 М это

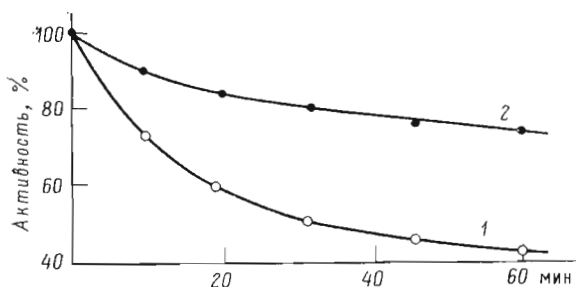


Рис. 3

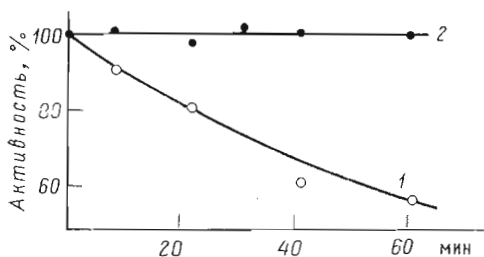


Рис. 4

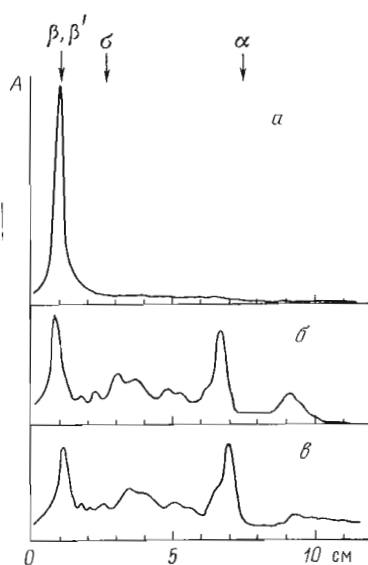


Рис. 5

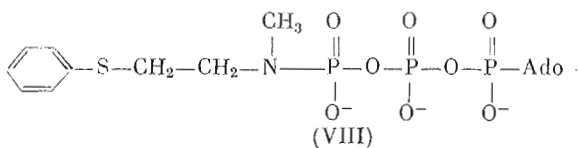
Рис. 3. Инактивация креатинкиназы 1 мМ реагентом (II) в отсутствие АТР (1) и в присутствии 25 мМ АТР (2)

Рис. 4. Инактивация РНК-полимеразы 1 мМ реагентом (II) (1) и тем же реагентом в присутствии 1 мМ УТР (2)

Рис. 5. Денситограммы радиоавтографов гель-электрофореграмм продукта модификации РНК-полимеразы комбинацией реагента (II) и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$ (а), продуктов частичного трипсинолиза такой модифицированной РНК-полимеразы (б) и продуктов частичного трипсинолиза РНК-полимеразы, модифицированной комбинацией соединения (V) и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$ (в) [6]. Стрелками указаны положения субъединиц РНК-полимеразы. Условия разделения см. в «Экспер. части»

отношение равно 1, а при c 1 М оно составляет 4. Таким образом, основной вывод из кинетической схемы находит экспериментальное подтверждение.

Алкилирующая способность соединения (II) наиболее ярко может выражаться в реакциях с различными тиопроизводными, так как они малоактивны в реакциях фосфорилирования и в то же время проявляют чрезвычайно высокую реакционную способность в реакциях алкилирования. Известно, что триметафосфат (V) не реагирует с тиофенолом [2]. Реакция соединения (II) с тиофенолом при pH 10 приводила с количественным выходом к продукту алкилирования (VIII):



В пользу предполагаемой структуры (VIII) говорит тот факт, что при мягком кислотном гидролизе это соединение количественно превращается в АТР. Кроме того, УФ-спектр этого продукта близок к сумме УФ-спектров АТР и алкилированного тиофенола, полученного в модельной реакции (см. «Экспериментальную часть»). При гидролизе соединения (VIII) в УФ-спектре реакционной смеси наблюдался гиперхромный эффект (15%).

Реакционная способность двух других синтезированных в настоящей работе веществ — соединений (I) и (III), — как упоминалось выше, исследована менее подробно. Гидролиз соединения (III) при pH 7,5, как и следовало ожидать, идет значительно медленнее, чем гидролиз соединения (II) (время полупревращения 2 ч при 50°C). Основным поглощаю-

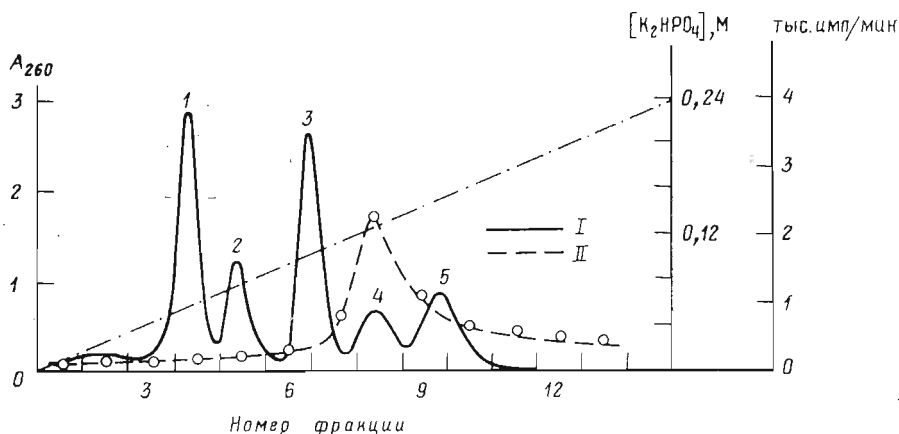


Рис. 6. Ионнообменная хроматография смеси, содержащей радиоактивный низкомолекулярный продукт исчерпывающей демодификации РНК-полимеразы. Условия разделения см. в «Экспер. части». Маркеры: I — γ -[N-(6-аминогексил)]амид АТР; 2 — АДФ; 3 — АТР; 4 — рррАрU (заряд -5); 5 — бис(γ -аденилил-5'-трифосфорил)-гексаметилендиамин. Детекция по A_{260} (I) и по радиоактивности (II)

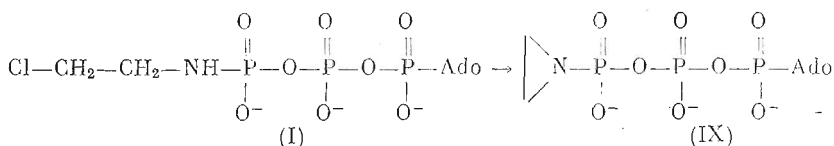
щим УФ-свет продуктом реакции, как и в случае соединения (II), является АТР. Очевидно, что механизм гидролиза соединения (III) в нейтральной среде аналогичен механизму гидролиза соединения (II).

Соединение (I) в результате гидролиза при pH 7,5 превращается в устойчивый продукт (IX) с зарядом -3 , который при мягком кислотном гидролизе (0,01 M HCl, 40° C, 1 ч) количественно превращается в АТР.

Свойства γ -амидов АТР по данным исследования их гидролиза при pH 7,5 и 40° C

Соединение	Константа скорости накопления хлор-ионов, с^{-1}	Константа скорости накопления протонов, с^{-1}	Константа скорости образования АТР, с^{-1}
(I)	$6 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	—
(II)	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
(III)	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	—

Очевидно, что образующийся в данном случае продукт (IX) устойчив при pH 7,5, потому что он не несет на атоме азота азиридинового остатка положительного заряда.



Некоторые свойства соединений (I)–(III) суммированы в таблице.

Соединение (II), по предварительным данным, является аффинным реагентом для креатинкиназы (КФ 2.7.3.2) из мышц кролика: фермент инактивируется при инкубации с соединением (II). Субстрат (АТР) защищает фермент от инактивации (рис. 3).

Аффинную модификацию ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* соединением (II) изучали в системе, содержавшей полный фермент $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ и промоторный фрагмент ДНК фага T7, несущий промоторы A_0, A_1, A_2, A_3 [5]. При инактивации РНК-полимеразы соединением (II) (рис. 4) в отличие от инактивации, протекающей под действием АТМР [6], УТР вызывает не ускорение, а замедление инактивации.

На рис. 5 показан результат гель-электрофореза реакционной смеси после обработки РНК-полимеразы нерадиоактивным соединением (II) в

присутствии промоторной матрицы и последующей инкубации с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Можно видеть, что ковалентно связанная с белком радиоактивность мигрирует в области β -субъединицы. Тот факт, что модифицируется именно β -, а не β' -субъединица, вытекает из сходства продуктов неполного трипсинолиза РНК-полимеразы (рис. 5б), модифицированной соединением (II) в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, с продуктами неполного трипсинолиза РНК-полимеразы, модифицированной комбинацией три-

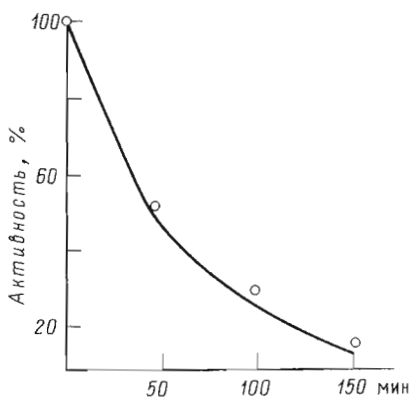


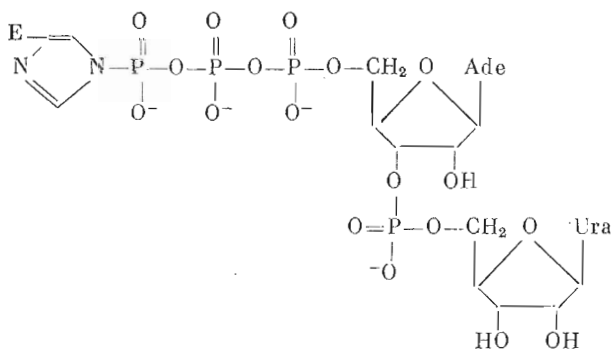
Рис. 7. Демодификация РНК-полимеразы в триэтиламинном-ацетатном буфере, рН 4,9, при 20°С (точки). Сплошной линией показана кинетика гидролиза фосфамидной связи в γ -имидазолиде АТР, рассчитанная из известной константы скорости ($k=2,5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$)

метафосфата (V) и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (рис. 5в, ср. [6]). В последнем случае, как известно, модифицируется исключительно β -, но не β' -субъединица.

Очевидно, что остаток, содержащий радиоактивную метку, связывается с белком ковалентно благодаря катализируемому РНК-полимеразой синтезу фосфодиэфирной связи между аденозином и уридином.

При кислотной обработке модифицированного фермента был получен низкомолекулярный радиоактивный продукт с зарядом -5 (рис. 6). Отсюда можно было по аналогии с работой [7] заключить, что в результате модификации с ферментом ковалентно связывался остаток pprAr^+U (звездочкой обозначен радиоактивный атом фосфора).

Для того чтобы определить тип ковалентной связи, мы исследовали кинетику демодификации фермента. Оказалось, что она совпадает с кинетикой гидролиза γ -имидазолида АТР (рис. 7). Скорость демодификации в десятки раз выше, чем скорость гидролиза амидной связи в γ -(N-метил)-амиде АТР (ср. [7]). Поэтому может быть сделан вывод, что модифицированное звено β -субъединицы имеет следующую структуру:



Таким образом, в настоящей работе получены соединения (I)–(III), реакционноспособные аналоги АТР. Соединения (II) и (III) обладают как алкилирующей, так и фосфорилирующей активностью. Соединение (I) превращается в водной среде в малореакционноспособный γ -этилен-имид АТР.

Соединение (II) выступает как аффинный реагент для креатинкиназы (по предварительным данным) и РНК-полимеразы. В последнем случае реакция аффинной модификации идет по пути фосфорилирования.

Представляет интерес исследование соединений (II) и (III) как аф-

финных реагентов для других использующих АТФ ферментов. Эти соединения могли бы служить хорошими зондами для обнаружения остатков цистеина вблизи участка связывания трифосфатного остатка, так как надлежащим образом расположенные меркаптогруппы должны модифицироваться ими быстро и исключительно по пути алкилирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали нуклеозид-5'-трифосфаты (Reanal, ВНР), [^{14}C]УТР (Amersham, Англия), [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]УТР отечественного производства. Хлоргидраты 2-хлорэтиламиннов синтезированы из соответствующих оксипроизводных по методике [8]. N-Метил-(4-аминобензил)амин любезно предоставлен В. П. Кумаревым, рестриционный фрагмент *Bsp*-1-1462 ДНК фага T7, содержащий промоторы A_0 , A_1 , A_2 , A_3 [5], — Е. Ф. Зайчиковым, а РНК-полимераза, выделенная по методике [9], с уд. акт. 5000 ед/мг — Ю. В. Смирновым. Креатинкиназа — продукт фирмы Reanal, трипсин — фирмы Worthington (США). Остальные реактивы имели квалификацию х.ч. и ос.ч. Чистоту синтезированных γ -амидов АТФ и их заряд определяли методом микроколоночной жидкостной хроматографии на хроматографе «Обь-4» [3] на DEAE-целлюлозе DT-52. Использовали линейный градиент (0–0,2 М) K_2HPO_4 (рН 7,5) в 7 М мочеvine. Содержание ковалентно связанного хлора определяли методом потенциометрического титрования после гидролиза 1 М КОН при 100°С в течение 1 ч, как описано в работе [2]. УФ-спектры поглощения записывали на приборе Spereord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР).

Активность РНК-полимеразы определяли при 37°С в смеси (50 мкл), содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 8,5), 0,05 М NaCl, 10 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ АТФ, СТР, ГТР, [^{14}C]УТР (уд. акт. 50 мКи/ммоль). Для определения активности креатинкиназы пользовались стандартным набором фирмы Boehringer Mannheim (ФРГ).

Аденозин-5'-триметафосфат (V) синтезировали по модифицированной методике [2]. К 100 мг (0,1 ммоль) триэтиламинной соли АТФ в 1 мл DMSO добавляли 200 мг (1 ммоль) DCC и 100 мкл 1 М раствора хлористого пиридиния в DMSO. Через 1 ч полноту превращения АТФ в (V) определяли по реакции с этилендиамином. Обычно она составляла 98–100%. Полученный раствор триметафосфата (V) использовали для синтеза γ -амидов АТФ.

Синтез соединений (I)–(III). К 0,3 мл полученного раствора триметафосфата (V) в DMSO добавляли по 0,3 мл метанольных растворов, содержащих по 0,3 ммоль хлоргидрата соответствующего хлорэтиламина и триэтиламина. Через 40–50 мин продукты осаждали 20 мл 1% раствора LiCl в ацетоне и промывали три раза ацетоном и один раз метанолом. Сушили в вакууме. Выходы 95–100% в расчете на трилтиевые соли. Количество ковалентно связанного хлора — 95–100%. Заряд, по данной хроматографии микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе, равен –3. В результате кислотного гидролиза (0,01 М HCl, 40°С, 1 ч) количественно образуется АТФ.

γ -[N-Метил-N-(4-аминобензил)]амид АТФ (VII). К 0,1 мл (10 мкмоль) раствора триметафосфата (V) добавляли 10 мкл (100 мкмоль) МАВА в 0,1 мл метанола. Через 30 мин к смеси добавляли 50 мкл триэтиламина и выделяли продукт как описано выше. Выход 90–100%. УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$: 243, 258 нм. $A_{240}/A_{260}=0,95$. Заряд –3. В результате кислотного гидролиза количественно образуется АТФ.

Накопление ионов хлора при гидролизе соединений (I)–(III). Аналог АТФ (30 мкмоль) растворяли в 1 мл 1 М K_2HPO_4 (рН 7,5) и термостатировали при 40 или 50°С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (100 мкл) и определяли концентрацию ионов хлора потенциометрическим титрованием.

Накопление протонов при гидролизе соединений (I)–(III). Водный раствор аналога АТФ (20 мМ) термостатировали при 40 или 50°С и 0,2 М раствором КОН довели рН до 7,5. О скорости накопления протонов:

судили по количеству щелочи, необходимому для поддержания постоянного рН.

Реакция соединения (II) с МАВА. Инкубировали при 40° С 100 мкл 10 мМ соединения (II) и 0,1 — 1 М МАВА при рН 10. Через 10 ч состав реакционной смеси определяли методом микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе с детекцией на длинах волн 240, 260, 360 нм [3].

Реакция соединения (II) с тиофенолом. К раствору, содержащему 10 мкл тиофенола в 100 мкл воды, оттитрованному 1 М КОН до рН 10, добавляли 1 мг соединения (II) в 100 мкл воды и выдерживали 20 ч при 37° С. Затем рН смеси доводили 0,2 М раствором 2-морфолиноэтансульфокислоты до 6 и экстрагировали избыточный тиофенол тремя порциями эфира по 600 мкл. Состав полученного раствора определяли методом микроколоночной хроматографии.

Алкилирование тиофенола N,N-диэтил-2-хлорэтиламином. Реакцию проводили в кварцевой кювете толщиной 1 см в 0,1 М боратном буфере при рН 10,5 и 20° С. Концентрация N,N-диэтил-2-хлорэтиламина составляла 7 мМ, тиофенола — 0,8 ОЕ₂₆₃/мл. За реакцией следили по уменьшению поглощения в области максимума поглощения тиофенолят-иона (ϵ_{263} 13 000). Реакция протекает количественно за 30 мин. Продукт реакции имеет максимум поглощения в области 253 нм (ϵ_{253} 6500).

Аффинная модификация РНК-полимеразы. Реакционную смесь (90 мкл), содержащую 50 мМ трис-НСl (рН 8,5), 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,01% NaN₃, 15 пмоль промоторного фрагмента, 70 пмоль РНК-полимеразы и в указанных случаях 1—5 мМ UTP, инкубировали при 37° С в течение 5 мин и добавляли 10 мкл 10—25 мМ раствора реагента (II). Из смеси в определенные промежутки времени отбирали аликвоты и определяли активность фермента в условиях, указанных выше. Для специфического введения радиоактивной метки фермент в комплексе с промоторным фрагментом обрабатывали соединением (II) в тех же условиях в течение 1 ч, добавляли [α -³²P]UTP (400—2000 Ки/ммоль, 1 мКи/мкл) и через 20 мин наносили на колонку (12×0,45 см) с сефадексом G-50 «fine», уравновешенным буфером состава: 0,01 М трис-НСl (рН 8,5), 0,05 М NaCl 0,1% SDS, 0,01% NaN₃ (буфер А). Полимерный пик собирали и хранили при 4° С. К аликвоте, содержащей 5000 имп/мин радиоактивности в объеме 50 мкл, добавляли 5 мкл 10% раствора SDS и 1 мкл 2-меркаптоэтанол, выдерживали 45 мин при 37° С и наносили на 10% полиакриламидный гель. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях [10] в 10% полиакриламидном геле в трис-боратном электродном буфере (рН 8,0) и 0,1% SDS в присутствии EDTA в течение 15 ч при напряжении 150 В. Положения субъединиц определяли окрашиванием гелей красителем кумасси В-250. Сканирование осуществляли с помощью микрофотометра ИФО-451 (ЛОМО). Весь радиоактивный материал мигрировал в области β - и β' -субъединиц (рис. 5).

Демодификация РНК-полимеразы в слабокислой среде. К аликвоте (300 мкл) модифицированного фермента, содержащего 20—40 тыс. имп/мин радиоактивного материала, добавляли равный объем 0,1 М ацетата триэтиламмония, рН 4,9, и инкубировали при 20° С. Из смеси с интервалом времени 50 мин отбирали аликвоты (60 мкл), добавляли 5 мкл 1 М трис-НСl (рН 8,5), 1 мкл 0,1 М АТР и проводили гель-фильтрацию в условиях, указанных выше. Определяли радиоактивность во фракциях, соответствующих полимеру и мономеру.

Исчерпывающую демодификацию РНК-полимеразы проводили по методике [7] в смеси, содержащей 10% HCOOH, 0,1% SDS и 0,05 М NaCl, при 37° в течение 1 ч. Для удаления кислоты раствор упаривали два раза с добавлением воды. Остаток растворяли в 50 мкл воды, добавляли 1 мкл раствора РНК-полимеразы, содержащего 10 мг фермента в 1 мл, 1 мкл 0,1 М раствора АТР и проводили гель-фильтрацию в условиях, указанных выше. Определяли радиоактивность во фракциях, соответствующих полимеру и мономеру. Практически весь радиоактивный материал оказался в мономерной фракции, т. е. происходила полная демодификация фер-

мента. К мономерной фракции, содержащей $5 \cdot 10^3$ тыс. имп/мин радиоактивности в 150 мкл, добавляли маркеры и проводили хроматографию (рис. 6) на колонке ($4 \times 0,15$ см) с DEAE-целлюлозой (линейный градиент концентрации K_2HPO_4 (0–0,24 М), рН 7,5, в 7 М мочеvine; общий объем 1,2 мл, скорость подачи элюента 10 мкл/мин). Собирали фракции по 50 мкл и определяли их радиоактивность.

Частичный трипсиновый гидролиз модифицированной РНК-полимеразы. К растворам, содержащим в 20 мкл по 5 мкг фермента (20 тыс. имп/мин ковалентно связанной радиоактивности), аффинно модифицированного комбинацией соединения (II) и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ УТР, добавляли трипсин в количествах 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 5000 (по массе) по отношению к РНК-полимеразе. Гидролиз проводили при 20° С в течение 5 мин, после чего к каждой пробе добавляли по 3 мкл смеси, содержащей 10% SDS и 10% 2-меркаптоэтанол, пробы объединяли, выдерживали 45 мин при 37° С и наносили на 10% полиакриламидный гель. Разделение проводили в денатурирующих условиях по методике [10] (рис. 5б).

Аффинная модификация креатинкиназы. Инкубационную смесь объемом 200 мкл, содержащую 1 мг/мл креатинкиназы, 1 мМ соединение (II), 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), а в опыте по защите от инактивации с помощью АТР – 25 мМ АТР, термостатировали при 37° С. Через определенные промежутки времени из смеси отбирали аликвоты по 20 мкл и разбавляли их до 4 мл 0,05 М трис-НСl (рН 9,0). Затем 10 мкл полученного раствора добавляли к 200 мкл стандартного раствора для определения активности креатинкиназы («монотест КФК») производства фирмы Boehringer Mannheim GmbH, ФРГ); рН реакционной смеси для определения активности креатинкиназы 7,0. За протеканием реакции следили по увеличению поглощения при длине волны 340 нм в кювете, термостатированной при 25° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Soviet Scientific Reviews, Section D, Biology Reviews / Ed. Skulachev V. P. Switzerland: Harwood Academic Publishers GmbH, 1981, v. 2, p. 107–143.
2. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. FEBS Lett., 1976, v. 70, № 1, p. 105–108.
3. Baram G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. J. Chromatography, 1983, v. 264, № 1, p. 69–90.
4. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Петесов С. В. Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1976, т. 2, вып. 1, с. 117–123.
5. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 2, с. 475–478.
6. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1113–1116.
7. Grachev M. A., Mustaev A. A. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 89–94.
8. Росс У. Биологические алкилирующие вещества. М.: Медицина, 1964, с. 121–135.
9. Gonzalez N., Wiggs J., Chamberlin M. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 182, № 2, p. 404–408.
10. Grachev M. A., Zaychikov E. F. FEBS Lett., 1981, v. 130, № 1, p. 23–26.

Поступила в редакцию
22.III.1984

ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE γ -AMIDES — DERIVATIVES OF NITROGEN MUSTARDS

GRACHEV M. A., MUSTAEV A. A., KURBATOV V. A.,
SAZONOV I. T., SAFRONOV I. V.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Phosphorylation of aliphatic nitrogen mustards by adenosine 5'-trimetaphosphate afforded ATP γ -amides. The product of N-methyl-(2-chloroethyl)amine phosphorylation exhibits both alkylating and phosphorylating activity. It acts as an affinity reagent towards rabbit muscle creatine kinase and *E. coli* RNA-polymerase.