



УДК 577.323.425

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ АНАЛОГИ P¹, P⁴-БИС(5'-АДЕНОЗИЛ)ТЕТРАФОСФАТА

Шумянцева В. В., Поляев А. И., Гичев Н. В.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

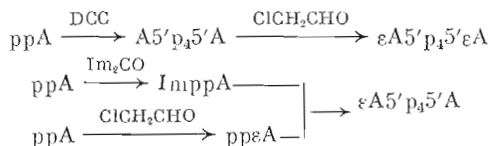
Синтезированы флуоресцентные аналоги P¹, P⁴-бис(5'-аденозил)тетрафосфата: P¹, P⁴-бис[5'-(1, N⁶-этноаденозил)]тетрафосфат и P¹-[5'-(1, N⁶-этноаденозил)]-P⁴-(5'-аденозил)тетрафосфат. Определены квантовые выходы флуоресценции этих соединений относительно εAMP (φ/φ_{εAMP}), равные соответственно 0,19 и 0,89. Высказано предположение о наличии вторичной структуры в синтезированных соединениях, вызывающей уменьшение эмиссии флуоресценции по сравнению с таковой у исходных соединений.

P¹, P⁴-Бис(5'-аденозил)тетрафосфат (A5'p₄5'A) — метаболический сигнал в регулировании и координировании многих внутриклеточных процессов. В настоящее время известно, где проявляется действие этого сигнального нуклеотида: высокоспецифическое связывание A5'p₄5'A с ДНК-полимеразой α млекопитающих, вызывающее «запуск» ДНК-репликации [1], ингибирование терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы [2] и ADP-рибозилирования гистонов [3], субстратные свойства по отношению к 2',5'-oligo(A)-синтетазе [4], накопление A5'p₄5'A и других аденилированных нуклеотидов в ответ на тепловой шок [5].

Для исследования того, как и по каким механизмам происходит регулирование перечисленных выше ферментных систем, ранее были синтезированы фосфорорганические аналоги A5'p₄5'A, содержащие метиленовые группы между P¹, P²- или между P², P³-атомами [6]. В настоящем сообщении описан синтез флуоресцентных производных A5'p₄5'A, содержащих этноаденозин: симметричный аналог εA5'p₄5'εA с модификацией двух адениновых ядер и несимметричный — εA5'p₄5'A — с модификацией одного остатка аденина.

Изучены абсорбционно-флуоресцентные свойства этих соединений, представляющие интерес для использования их в качестве флуоресцентных меток.

Синтез εA5'p₄5'εA и εA5'p₄5'A проводили по следующей схеме:



εA5'p₄5'εA и εA5'p₄5'A выделяли методом колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте бикарбоната аммония.

Фосфоноэстераза *E. coli* не расщепляет синтезированные соединения, а фосфодиэстераза змеиного яда гидролизует εA5'p₄5'εA до εAMP, а εA5'p₄5'A — до эквимольной смеси AMP и εAMP (ε₂₆₀^{AMP} 15 300, ε₂₆₅^{εAMP} 5700 [7]). УФ-спектры синтезированных соединений приведены на рис. 1. Тетрафосфаты характеризуются более низким коэффициентом молярного поглощения при pH 7, чем суммарное поглощение эквимольного количества нуклеотидов. Для εA5'p₄5'εA ε₂₆₀ 10 400, для εA5'p₄5'A ε₂₆₀ 18 000, что свидетельствует о частичном перекрытии плоскостей адениновых оснований в молекулах флуоресцентных аналогов A5'p₄5'A.

Сокращения: εA — 1, N⁶-этноаденозин; εAMP — 1, N⁶-этноаденозин-5'-фосфат; Im — амидазолил-1; DCC — N, N'-дипциклогексилкарбодимид.

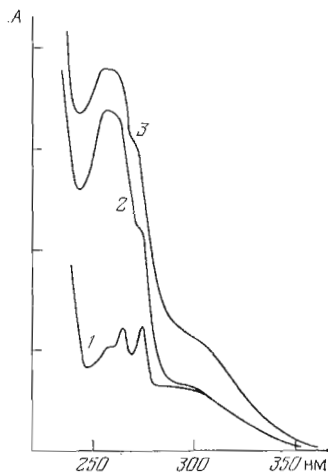


Рис. 1

Рис. 1. УФ-спектры в водных растворах (рН 7) ϵ AMP (1), ϵ A5'p,5'A (2) и ϵ A5'p,5'εA (3)

Рис. 2. Спектр флуоресценции ϵ A5'p,5'εA, возбуждение при 300 нм (форма спектра для ϵ A5'p,5'εA аналогична)

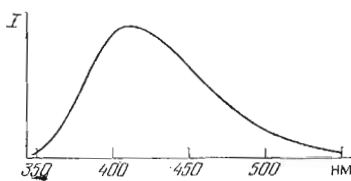


Рис. 2

ϵ A5'p,5'εA и ϵ A5'p,5'A интенсивно флуоресцируют в нейтральных водных растворах. Спектр флуоресценции этих соединений представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом в области 410 нм (рис. 2), наиболее эффективное возбуждение при 300 нм. Были определены квантовые выходы флуоресценции тетрафосфатов относительно ϵ AMP (таблица). В качестве стандарта использовали 9-аминоакридин (ϕ 0,98) и ϵ AMP (ϕ 0,59 [7]).

Приведенные в таблице данные показывают, что у полученных соединений наблюдается падение квантового выхода флуоресценции по сравнению с ϵ AMP. В случае ϵ A5'p,5'A наблюдаемый эффект можно объяснить как следствие взаимодействия между азотистыми основаниями этого динуклеозидтетрафосфата [8], поскольку в A5'p,5'A показано наличие вторичной структуры — типохромный эффект составляет 24% [6]. Еще большее падение квантового выхода флуоресценции у ϵ A5'p,5'εA может быть связано не только с влиянием на квантовый выход вторичной структуры (стекинга оснований), но и с дополнительным тушением флуоресценции за счет миграции энергии электронного возбуждения между контактирующими флуорохромами [8].

Флуоресцентные аналоги нуклеозидтетрафосфатов, как правило, проявляют свойства, сходные с немодифицированными субстратами: значения K_m близки, различаются лишь V_{max} [9]. По нашим предварительным данным, действие полученных тетрафосфатов в реакциях, катализируемых поли(AD-рибозо)-полимеразой и валил-тРНК-синтетазой, аналогично действию A5'p,5'A. Так как флуоресценция ϵ A5'p,5'εA и ϵ A5'p,5'A достаточно интенсивна, они могут быть количественно зарегистрированы при концентрациях 10^{-8} М [10]. Это позволяет применять их в качестве флуоресцентных маркеров в исследованиях различных ферментативных систем.

Экспериментальная часть

В работе использовали ADP (Reanal, Венгрия), щелочную фосфатазу *E. coli* и фосфодиэстеразу змеиного яда (Worthington, США), пластинки SilufoL UV₂₅₄ ЧССР, пластинки с PEI-целлюлозой (Merck, ФРГ), диме-

Относительные квантовые выходы флуоресценции $\phi/\phi_{\epsilon AMP}$ синтезированных соединений

| Соединение | $\phi/\phi_{\epsilon AMP}$ |
|----------------------|----------------------------|
| ϵ AMP | 1,0 |
| ϵ A5'p,5'εA | 0,19 |
| ϵ A5'p,5'A | 0,89 |

тилацеталь хлорацетальдегида (Merck, ФРГ), диэтиламиноэтилцеллюлозу DEAE-32 (Whatman, Англия).

Системы для ТСХ: на силуфоле — $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}-\text{NH}_4\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ 7:1:2 (А), на РЕИ-целлюлозе — 1 М LiCl (Б).

УФ-спектры получены на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР), спектры ЯМР — на спектрометре Varian XL-100-15 (США) в режиме фурье-преобразований. Образцы растворяли в D_2O и добавляли EDTA. Все химические сдвиги в ЯМР-спектрах даны относительно трет-бутилового спирта, использованного в качестве внутреннего стандарта (сокращения: с — синглет, д — дублет).

Спектры флуоресценции (спектры возбуждения и спектры испускания) были получены на спектрофлуориметре SPF-1000CS (Aminco, США) в режиме коррекции спектральной чувствительности прибора. Квантовые выходы флуоресценции были получены путем сравнения интегралов по полным скорректированным спектрам испускания, построенным в частотном отложении. В качестве стандарта с квантовым выходом 0,98 был использован раствор 9-аминоакридина в этаноле [7].

P^1, P^4 -Бис(5'-аденозил)тетрафосфат получали из ADP с помощью DCC по описанной методике [6], а $1, N^6$ -эпеноаденозин-5'-дифосфат — по методу [7].

Водный раствор хлорацетальдегида. 25 мл диметилацетата хлорацетальдегида кипятят 45 мин со 100 мл 50% H_2SO_4 . Затем при слабом вакууме (~50 мм рт. ст.) отгоняли гидрат хлорацетальдегида. Приемник сильно охлаждали смесью ацетона и сухого льда. Дистиллят обрабатывали 1 н. NaOH до pH 4,5 и еще раз перегоняли. Полученный раствор представляет собой 1,0–1,6 М хлорацетальдегид в воде [7].

P^1, P^4 -Бис[5'-($1, N^6$ -эпеноаденозил)]тетрафосфат. 40 мг Ar_4A (тетрааммониевая соль) растворяли в 2 мл водного раствора хлорацетальдегида (pH 4,5), оставляли на 3 сут при 20°С. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе (HCO_3^- -форма), используя линейный градиент NH_4HCO_3 (0,3–0,6 М, общий объем 2 л). Элюирующая концентрация NH_4HCO_3 — 0,4 М; фракции, содержащие $\epsilon\text{A}5'p, 5'\epsilon\text{A}$, упаривали в вакууме, обессоливали упариванием с водой и этанолом, лиофилизировали. Получено 30 мг $\epsilon\text{A}5'p, 5'\epsilon\text{A}$ (тетрааммониевая соль, 70%). R_f 0,30 (А), 0,17 (Б). ϵ_{260} 10 400. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 5,89 д (J 5 Гц, H-1'), 7,32 д (J 2 Гц, H-11), 7,72 д (J 2 Гц, H-12), 8,06 с (H-2), 8,32 с (H-8).

P^1 -[5'-($1, N^6$ -эпеноаденозил)]- P^4 -(5'-аденозил)тетрафосфат. Имидазолид аденозин-5'-дифосфата получали по стандартной методике с помощью N, N' -карбонилдимидазола [11]. 500 мг (1 ммоль) динатриевой соли ϵADP пропускали через колонку со смолой дауэкс 50×8 (H⁺-форма), элюировали ледяной водой, прибавляли 2 мл три-*n*-бутиламина, упаривали многократно с водным пиридином, сушили упариванием с абс. пиридином, растворяли в 5 мл диметилформамида и прибавляли к раствору 1 ммоль ImpprA в 5 мл диметилформамида, реакционную смесь перемешивали 24 ч при 4°С, затем упаривали. Разделение реакционной смеси проводили на колонке с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма) в градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0,2–0,6 М). Фракции, соответствующие 0,45 М NH_4HCO_3 , содержащие $\epsilon\text{A}5'p, 5'\epsilon\text{A}$, упаривали, обессоливали многократным упариванием с водой и этанолом, лиофилизировали. Получено 250 мг тетрафосфата в форме тетрааммониевой соли (40%). R_f 0,35 (А), 0,15 (Б), ϵ_{260} 18 000. Гидролиз щелочной фосфатазой и фосфодиэстеразой проводили аналогично гидролизу Ar_4A [6]. ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 5,63 д (J 5 Гц, H-1' от ϵA), 6,05 д (J 5 Гц, H-1' от А), 7,32 д (J 2 Гц, H-11), 7,72 д (J 2 Гц, H-12), 7,92 с (H-2 от ϵA), 8,16 с (H-2 от А), 8,46 с (H-8 от ϵA), 8,82 с (H-8 от А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zamecnik P. C., Rapoport E., Baril E. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 6, p. 1791–1794.
2. Ono K., Iwata J., Nakamura H., Matsukage A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 34–40.

3. *Ioshihara K., Tanaka J. J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 13, p. 6756-6761.
4. *Cayley P. J., Kerr I. M. Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 122, № 3, p. 601-608.
5. *Lee P. C., Bocher B. R., Ames B. N. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, № 24, p. 7496-7500.
6. *Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. М. Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 6, с. 838-843.
7. *Secrist J. A., Barrio J. R., Leonard N. J., Weber G. Biochemistry*, 1972, v. 11, № 19, p. 3499-3505.
8. *Tolman G. L., Barrio J. R., Leonard N. J. Biochemistry*, 1974, v. 13, № 24, p. 4869-4878.
9. *Yount J. R. Adv. in Enzymol.*, 1975, v. 43, p. 2-56.
10. *Barrio J. R., Secrist III J. A., Leonard N. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 46, № 2, p. 597-604.
11. *Rapaport E., Zamecnik P. C., Baril E. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 2, p. 838-842.

Поступила в редакцию
19.VI.1984

FLUORESCENT ANALOGUES OF P¹, P⁴-BIS(5'-ADENOSYL)TETRAPHOSPHATE

SHUMYANTSEVA V. V., POLETAEV A. I., GNCHEV N. V.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The fluorescent analogues of P¹,P⁴-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate have been synthesized: P¹,P⁴-bis[5'-(1,N⁶-ethenoadenosyl)]tetraphosphate and P¹-[5'-(1,N⁶-ethenoadenosyl)]-P⁴-(5'-adenosyl)tetraphosphate. The fluorescence quantum yields for these compounds relative to εAMP ($\varphi/\varphi_{\epsilon\text{AMP}}$) are 0,19 and 0,89, respectively. The fluorescence quenching, revealed from comparison with the quantum yields of the starting compounds, provided the grounds for supposition on the presence of secondary structure in the synthesized compounds.