



УДК 547.962.32

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ И КОНФИГУРАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ НА АКТИВНОСТЬ МОДЕЛЬНЫХ
ДОНОРОВ ПЕПТИДА В РИБОСОМАХ*Харшан М. А., Вигестане Р. Я., Поповкина С. В.,
Куханова М. К., Краевский А. А., Готтих Б. П.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,
Москва*

Взаимодействием имидазолидов N-формилдипептидов с аденозин-5'-фосфатом получены N-формилдипептидильные эфиры аденозин-5'-фосфата, различающиеся природой и конфигурацией аминокислотных остатков. Исследована их пептиддонорная активность в бесклеточной системе с рибосомами *E. coli* MRE-600 в отсутствие матрицы, когда акцептором пептида служила Phe-tРНК. Показано, что все синтезированные эфиры обладают пептиддонорной активностью, которая эффективно стимулируется цитидин-5'-фосфатом. Активность эфиров зависит от природы аминокислотных остатков, порядка их расположения в дипептиде, а также от их конфигурации. Наиболее активны N-формилдипептидильные эфиры аденозин-5'-фосфата, в которых обе аминокислоты обладают L-конфигурацией. В случае пептидов, содержащих L- и D-аминокислоты, большее значение имеет конфигурация C-концевого аминокислотного остатка.

Ранее было показано, что N-ациламино кислотные эфиры аденозин-5'-фосфата обладают пептиддонорной активностью в бесклеточной системе с рибосомами *E. coli* в отсутствие матрицы, когда в качестве акцептора пептида использовали Phe-tРНК или ее 3'-концевой фрагмент CpApCpCpA(Phe) [1, 2]. При этом пептиддонорная активность таких модельных субстратов зависела от природы как аминокислотного остатка [2], так и ацильной группы на N-конце аминокислоты [3]. Оставалось не определенным, могут ли быть донорами пептида ацилпептидные эфиры аденозин-5'-фосфата. В то же время было интересно выяснить, влияет ли на донорные свойства конфигурация аминокислотных остатков в таких соединениях, так как известно, что конфигурация аминокислотных остатков в модельных акцепторах существенна для проявления ими пептид-акцепторной активности [2].

В качестве соединений, на примере которых исследовалась пептиддонорная активность, мы выбрали ряд N-формилдипептидильных эфиров аденозин-5'-фосфата. Эти эфиры различались, с одной стороны, строением и последовательностью аминокислотных остатков, с другой — конфигурацией аминокислотных остатков в обоих положениях пептида (с N- и C-концов).

Синтез исходных формилдипептидов проводился по схеме



Принятые сокращения: *f* Met — N-формилметионин; pA (*L-f*Met-Gly-) — (2')3'-O-(N-формилметионилглицил)аденозин-5'-фосфат.

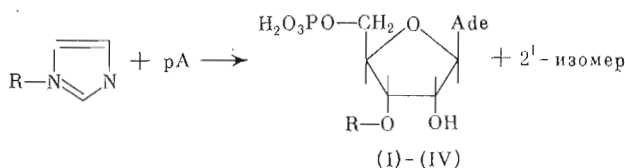
Выходы и характеристики N-формилдипептидов

Пептид	Выход на fLeu, %	$[\alpha]_D^{20-22^\circ}$	R_f в системе Б
<i>L-fLeu-L-Leu</i>	48,6	-28,5	0,25
<i>D-fLeu-L-Leu</i>	48,0	+7,5	0,25
<i>L-fLeu-D-Leu</i>	29,5	-41,4	0,30
<i>D-fLeu-D-Leu</i>	29,0	+27,2	0,28

N-формиллейцин активировали реакцией с этилхлоркарбонатом и образующийся смешанный ангидрид конденсировали с этиловым эфиром лейцина. Полученный этиловый эфир формилдипептида гидролизовали в N-формилдипептид. Чистоту и строение синтезированных соединений доказывали обычными методами, в отдельных случаях снимали спектры ПМР (табл. 1). Приготовление *L-fMet-Gly* и *fGly-L-Met* описано нами ранее [4].

Синтез N-формилдипептидных эфиров осуществлен разработанным в лаборатории методом конденсации N-имидазолидов формилдипептидов с рА [5] (схема 1).

Схема 1



- (I) R = *L-fLeu-L-Leu*
 (II) R = *D-fLeu-L-Leu*
 (III) R = *L-fLeu-D-Leu*
 (IV) R = *D-fLeu-D-Leu*

Выходы и физико-химические характеристики приведены в табл. 2, данные спектров ПМР соединений (I) и (III) — в табл. 3. Оба соединения представляют собой смесь 2'- и 3'-изомеров в соотношении ~1 : 1. Отношение сигналов сделано по аналогии с N-формиламиноокислотными эфирами аденозин-5'-фосфата, для которых были получены неизомеризуемые соединения с однозначной структурой. Характеристики рА(*L-fMet-Gly*-) и рА(*fGly-L-Met*-) сообщены в работе [4].

Одним из существенных вопросов при использовании имидазольного метода является возможность рацемизации. Ранее было установлено, что имидазолиды аминокислот с протонированной NH_2 -группой не рацеми-

Таблица 2

Выходы и характеристики N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфата

Вещество	Выход, %	УФ-спектр, λ_{\max} , нм	R_f в системе А
рА(<i>L-fLeu-L-Leu</i> -) (I)	15,0	260	0,60
рА(<i>D-fLeu-L-Leu</i> -) (II)	15,2	260	0,60
рА(<i>L-fLeu-D-Leu</i> -) (III)	14,2	260	0,59
рА(<i>D-fLeu-D-Leu</i> -) (IV)	14,1	259	0,58

Т а б л и ц а 3

Спектры ПМР рА (*L-fLeu-L-Leu*-) (I) и рА (*L-fLeu-D-Leu*-) (II)

Соединение	Химические сдвиги протонов, δ, м.д. ($J_{1,2}$, Гц),			
	H1'	H—CO	H2	H8
(I)				
3'-Изомер	6,08 д (7)	8,11 с	8,14 с	8,43 с
2'-Изомер	6,23 д (6)	8,00 с	8,14 с	8,60 с
(II)				
3'-Изомер	6,08 д (7)	8,13 с	8,08 с	8,43 с
2'-Изомер	6,23 д (5)	8,03 с	8,08 с	8,53 с

Т а б л и ц а 4

Изучение рацемизации N-формилдипептидов при
образовании их N-имидазолидов

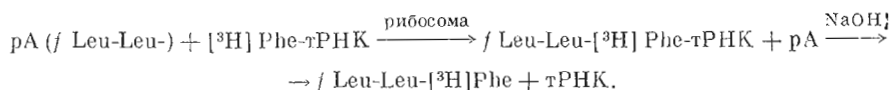
Соединение	$[\alpha]_D^{20-29^{**}}$		Рацемизация, %
	до реакции	после реакции	
<i>L-fLeu-L-Leu</i>	-28,50	-27,96	3,79

* с 1,2 в диметилформамиде — ацетоне.

зуются в условиях, близких к используемым здесь [5]. Однако подобных данных для пептидных производных получено не было. Нами исследование проведено следующим образом: N-формилдипептиды превращали в их имидазолиды и оставляли в условиях, подобных применяемым в реакциях. После мягкого кислого гидролиза исходные пептиды выделяли и определяли угол вращения. В табл. 4 приведены данные для наиболее достоверно определенного *L-fLeu-L-Leu*, из которых видно, что рацемизация не превышает 3—5%.

Катализируемая рибосомами реакция с участием N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфатов заключается в переносе формилдипептида на аминогруппу фенилаланина в [^3H]Phe-тРНК (схема 2). Для последующего тестирования образовавшейся формилтрипептидил-тРНК ее подвергали гидролизу и формилтрипептид экстрагировали из кислой среды в органический растворитель.

С х е м а 2



Пептидонорная активность всех синтезированных эфиров исследовалась в системе с рибосомами *E. coli* MRE-600 без матрицы [1]. Акцептором пептида была Phe-тРНК. На рис. 1 приведены результаты этих испытаний, выраженные в процентах к донорной активности рА (*L-fMet*-), используемого обычно как стандарт [1—3]. За 100% принята максимальная пептидонорная активность этого стандарта.

Ранее было сообщено, что пептидонорная активность рА(*fMet*-) интенсивно стимулируется с помощью рС [6]. Механизм этого стимулирования заключается, на наш взгляд, в том, что рС связывается с областью донорного участка, обычно занимаемой вторым с 3'-конца нуклеотидным

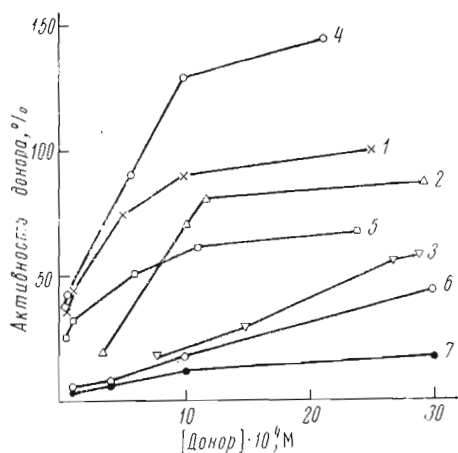


Рис. 1. Пептиддонорная активность N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфата при различных концентрациях доноров: 1 — pA(L-fMet-) (принята за 100%, соответствует 2250 имп/мин); 2 — pA(L-fMet-Gly-); 3 — pA(fGly-L-Met-); 4 — (I); 5 — (II); 6 — (III); 7 — (IV)

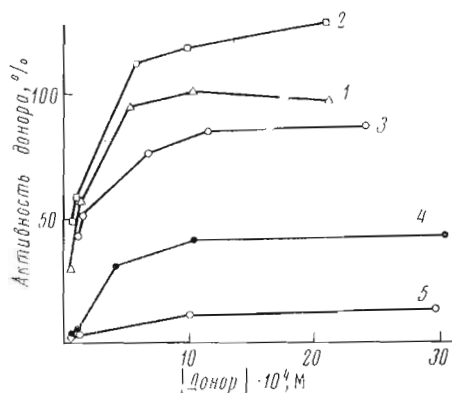


Рис. 2. Пептиддонорная активность N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфата при концентрации pC $1 \cdot 10^{-3}$ M: 1 — pA(L-fMet-) (принята за 100%, соответствует 3345 имп/мин); 2 — (I); 3 — (III); 4 — (II); 5 — (IV)

остатком в цепи пептидил-тРНК [7]. Связываясь с этой областью, pC повышает способность pA(L-fMet-) служить донором пептидного остатка.

Мы исследовали влияние pC на пептиддонорную активность синтезированных эфиров. Как видно из табл. 5, pC стимулирует процесс в 1,5—3 раза, что полностью соответствует влиянию pC на пептиддонорную активность pA(L-fMet-) [5—6]; в то же время это дополнительно подтверждает рибосомальную природу процесса.

В табл. 6 приведены результаты опытов по ингибированию рибосомальной реакции антибиотиками хлорамфениколом и линкомицином. Наличие такого ингибирования можно считать одним из основных доказательств рибосомальной природы процесса.

На рис. 2 даны результаты проверки донорной активности N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфата в присутствии pC. Из данных рис. 1 и 2 можно сделать ряд выводов.

1. N-формилдипептидные эфиры аденозин-5'-фосфата подобно N-формиламинокислотным эфирам являются эффективными донорами пептид-

Таблица 5
Влияние pC на донорную активность N-формилдипептидных эфиров аденозин-5'-фосфата

Донор пептида	Получено N-формилдипептидилфенилаланина (имп/мин) при концентрации донора, M									
	$5 \cdot 10^{-5}$		$1 \cdot 10^{-4}$		$5 \cdot 10^{-4}$		$1 \cdot 10^{-3}$		$2,5 \cdot 10^{-3}$	
		+pC		+pC		+pC		+pC		+pC
pA(L-fMet-)	790	1751	912	1948	1664	3173	2000	3347	2447	3263
pA(L-fLeu-L-Leu-) (I)	850	1600	967	1918	2020	3624	2934	3930	3280	4260
pA(D-fLeu-L-Leu-) (II)	570	1360	763	1720	1148	2536	1430	2840	1500	2870
pA(L-fLeu-D-Leu-) (III)			103	334	210	2300	410	3070	1030	3176
pA(D-fLeu-D-Leu-) (IV)			187	305	205	415	305	950	445	1020

Примечание. В пробу вносили по $3 \cdot 10^4$ имп/мин (2,2 пмоль) $[^3\text{H}]\text{Phe-tРНК}$, концентрация pC $1 \cdot 10^{-3}$ M, рибосом 5,8 ОЕ₂₆₀ или 145 пмоль.

Таблица 6

Ингибирование антибиотиками
реакции N-формилдипептидных
эфиров аденозин-5'-фосфата
с $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$

Донор пептида (концентрация 1 мМ)	Донорная актив- ность при ингиби- ровании антибио- тиками, %	
	хлорамфе- никол, 1 мМ	линко- мидин, 1 мМ
pA (<i>L-fMet</i> -)	20	2
(I)	29,3	7
(II)	30	4
(III)	12,5	3
(IV)	4	4
pA (<i>fGly-L-Met</i> -)	20 *	3
pA (<i>L-fMet-Gly</i> -)	22 *	2

* Концентрация хлорамфеникола 0,1 мМ.

стием рибосом образующиеся полипептиды содержат аминокислоты *L*-ряда. Но такое объяснение не раскрывает существа процесса. Представляется сомнительным наличие в донорном участке рибосом ориентированных в пространстве областей связывания боковых радикалов аминокислот таким образом, что они могут взаимодействовать лишь с радикалами *L*-аминокислот. Это противоречило бы тому факту, что в каждый последующий момент эти области должны связывать различные по структуре белковые радикалы. Мы же исходим из тезиса, что для переменных по структуре элементов пептидил-тРНК не должно существовать специфических областей связывания [2]. Мы полагаем, что возможны два объяснения этой зависимости. Во-первых, структура и конфигурация аминокислотных остатков существенно влияют на конформацию всей молекулы модельного донора. Вследствие этого молекула приобретает либо более выгодную конформацию для взаимодействия с областями связывания, либо менее выгодную. Во-вторых, синтезирующаяся пептидная цепь пептидил-тРНК должна иметь в рибосоме организованную структуру, например α -спираль. Поэтому аминокислотные остатки, вызывающие нарушение этой структуры (пролин или *D*-аминокислоты), должны понижать субстратное сродство несущих их модельных соединений к донорному участку связывания. Последующие исследования, как мы надеемся, позволят более четко объяснить найденные факты.

Экспериментальная часть

В работе использовались аминокислоты фирмы Chemapol (ЧССР), pA и pC (Na-соли) фирмы Reanal (Венгрия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV-Vis (ГДР), спектры ПМР — на приборе BS487C (ЧССР), рабочая частота 80 МГц, в D_2O . Углы вращения определяли на поляриметре Perkin-Elmer 141 (ФРГ). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Woelm (ФРГ), а тонкослойную — на пластинках фирмы Kavalier (ЧССР) в системах: *n*-бутанол — AcOH — вода, 5 : 2 : 3 (А); ацетон — вода, 2 : 1 (Б) и *n*-бутанол — AcOH — вода, 78 : 5 : 17 (В) (по объему). Электрофорез проводили при 800 В в 1 п. AcOH (рН 2,5) на бумаге FN-3 (ГДР).

ного остатка в системе без матрицы с рибосомами *E. coli*.

2. Пептиддонорная активность зависит от природы и последовательности аминокислотных остатков в этих эфирах. Эфир с С-концевым глицином примерно вдвое активнее, чем с N-концевым.

3. Существенное значение имеет конфигурация аминокислотных остатков. Более важной при этом является конфигурация С-концевой аминокислоты. Пептиддонорная активность как в присутствии pC, так и без стимулятора уменьшалась в следующем ряду изомеров в пептидном остатке молекулы:



Зависимость пептиддонорной активности от конфигурации аминокислотных остатков можно объяснить тем, что в природном процессе с уча-

Рибосомы выделяли из *E. coli* MRE-600 по методике работы [8]. [³H]Phe-тРНК приготавливали из [³H]фенилаланина удельной активности 10 Ки/ммоль и суммарного препарата тРНК из *E. coli* В по методике работы [9]. Полученный препарат содержал $1,3 \cdot 10^4$ имп/мин на 1 пмоль. Реакцию пептидных эфиров с [³H]Phe-тРНК на рибосомах проводили, как описано ранее [8].

N-Формиллейциллейцин (типовая методика). К суспензии 2,2 г (11,2 ммоль) хлоридрата этилового эфира лейцина в 10 мл безводного тетрагидрофурана при 0° приливали 1,95 мл (14 ммоль) триэтиламина и оставляли на 10 мин при 20°. К раствору 1,78 г (11,2 ммоль) *N*-формиллейцина и 1,53 мл (11,2 ммоль) триэтиламина в 15 мл безводного тетрагидрофурана при -15° и перемешивании приливали 1,21 г (11,2 ммоль) этилхлоркарбоната, смесь перемешивали еще 10 мин при той же температуре и переносили в раствор этилового эфира лейцина. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 20°, фильтровали, раствор упаривали досуха, остаток распределяли между 40 мл этилацетата и 15 мл 10% HCl, органический слой промывали 10% HCl (2 × 3 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 4 мл) и водой, сушили над Na₂SO₄, растворитель упаривали. Маслообразный остаток (*R_f* 0,25 в системе Б) растворяли в 15 мл абс. этанола, добавляли 5 мл 2 н. NaOH, оставляли на 1 ч при 20°, упаривали до небольшого объема, приливали 10 мл воды и 15 мл этилацетата, водный слой отделяли, подкисляли 1 н. H₂SO₄ до pH 3 и вещество экстрагировали этилацетатом (3 × 15 мл). Органический слой промывали водой (2 × 5 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали досуха. Полученные маслообразные вещества анализировали с помощью ТСХ и определяли [α]_D (см. табл. 1). Отсутствие исходных соединений доказывали после удаления формильной группы (1 ч, 18% HCl в 50% водном спирте) с помощью электрофореза при pH 2,5 и ТСХ в системе Б.

3'(2')-O-(N-Формиллейциллейцил)-аденозин-5'-фосфат (типовая методика). К раствору 0,53 г (2,0 ммоль) *N*-формиллейциллейцина в 1,5 мл диметилформамида прибавляли 0,40 г (2,5 ммоль) *N,N'*-карбонилдимидазола, через 5 мин вносили суспензию 0,67 г (1,6 ммоль) аденозин-5'-фосфата (Na-соли) в 1,5 мл воды и реакционную массу перемешивали 3,5 ч. Контроль реакции осуществляли с помощью ТСХ в системе А. К раствору приливали 10 мл ацетона, осадок отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 10 мин), раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 1,5 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с силикагелем (1,5 × 30 см). Вещество элюировали системой В со скоростью 45 мл/ч; контроль фракции осуществляли с помощью увикорда и ТСХ в системе А. Фракции с *R_f* 0,60 объединяли, добавляли равный объем эфира, вещество экстрагировали водой (3 × 5 мл), водный экстракт промывали эфиром, остаток эфира удаляли в вакууме и вещество лиофильно высушивали. Полученные эфиры анализировали с помощью ТСХ, ПМР и УФ-спектров (табл. 2 и 3).

Определение степени рацемизации. Растворяли 0,32 г формиллейцина в 1,5 мл диметилформамида, вносили 0,25 г *N,N'*-карбонилдимидазола и через 5 мин — 1,5 мл воды. Реакционную массу выдерживали 3,5 ч при 20°, подкисляли 10% HCl до pH 3. Через 10 мин вещество экстрагировали в эфир (3 × 10 мл), экстракт промывали водой (2 × 3 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали. Взвешивали вещество и определяли в одном опыте [α]_D^{20-22°} исходного и обработанного эфиров (см. табл. 4).

Авторы выражают благодарность А. В. Ажаеву за регистрацию и интерпретацию спектров ПМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Černa J., Rychlik I., Krayevsky A. A., Gottikh B. P. (1973) FEBS Lett., 37, 188—191.
2. Krayevsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. (1975) Nucleic Acids Research, 2, 2223—2236.
3. Černa J., Rychlik I., Krayevsky A. A., Gottikh B. P. (1974) Acta biol.med. germ., 33, 877—883.
4. Краевский А. А., Пурьгин П. П., Рудзите Л. Н., Белова З. С., Готтих Б. П. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 378—382.
5. Готтих Б. П., Краевский А. А., Пурьгин П. П. (1971) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2529—2535.
6. Černa J. (1975) FEBS Lett., 58, 94—98.
7. Krayevsky A. A., Victorova L. S., Kotusov V. V., Kukhanova M. K., Trebogonov A. D., Tarusova N. B., Gottikh B. P. (1976) FEBS Lett., 62, 101—104.
8. Lessard J. L., Pestka S. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6909—6912.
9. Lewin J. G., Nirenberg M. (1968) J. Mol. Biol., 34, 467—478.

Поступила в редакцию
1.X.1976

EFFECTS OF THE STRUCTURE AND CONFIGURATION OF THE AMINO ACID RESIDUES ON THE ACTIVITY OF MODEL PEPTIDE DONORS IN RIBOSOMES

KHARSHAN M. A., VIGESTANE R. Ya., POPOVKINA S. V.,
KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A., GOTTIKH B. P.

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

A number of N-formyl-dipeptidyl esters of adenosine 5'-phosphate, differing in nature and configuration of amino acid residues, were obtained by reaction of N-formyl-dipeptides with adenosine 5'-phosphate. Their peptide donor activity was assayed in cell-free *E. coli* MRE-600 ribosomal system without template using Phe-tRNA as a peptide acceptor. All the synthesized esters were shown to possess a peptide donor activity, which was effectively stimulated by cytidine 5'-phosphate. The activity of esters depends on the nature and configuration of amino acid residues and the position of the ester in dipeptide. The N-formyl-dipeptidyl esters of adenosine 5'-phosphate in which both amino acids are of *L*-configuration were the most active donors. With peptides having *D*- and *L*-amino acids, the configuration of C-terminal residue is of primary importance.