



УДК 547.963.32.07 + 577.159.02

ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

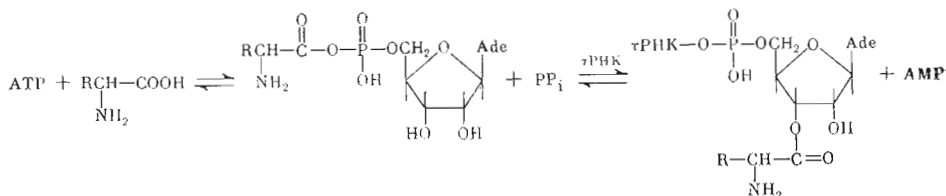
II. 2'(3')-АМИНОФОСФОНОВЫЕ ЭФИРЫ АМР—СИНТЕЗ
И ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ДЕЗАЦИЛИРОВАНИЯ ВАЛИЛ-ТРНК₁^{Val*}

*Осипова Т. И., Бирюков А. И., Гандурина И. А.,
Тарусова Н. В., Холутов Р. М.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы 2'(3')-О-(1-амино-2-метилпропил-1-фосфонил)аденозин-5'-фосфат и 2'(3')-О-(1-амино-2-фенилэтил-1-фосфонил)аденозин-5'-фосфат. Показано, что эти соединения слабо и неспецифично ингибируют аминоацилирование тРНК, катализируемое валил-тРНК-синтетазой. Установлено, что 2'(3')-О-(1-амино-2-метилпропил-1-фосфонил)аденозин-5'-фосфат является избирательным ингибитором ферментативного дезацилирования.

При исследовании механизма действия аминоацил-тРНК-синтетаз, катализирующих реакции

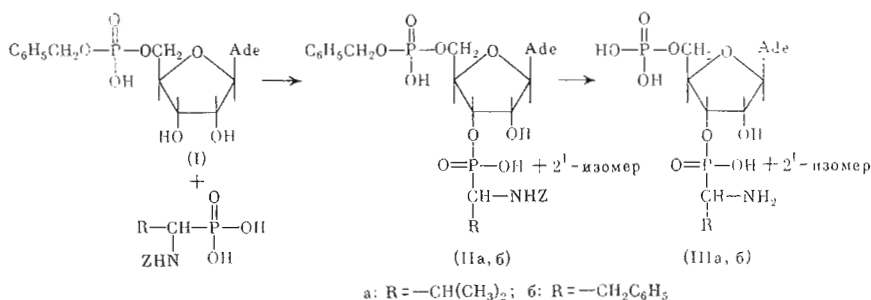


широко использовались производные и аналоги субстратов (аминокислот, АМР, АТР, тРНК), но не промежуточных соединений, например аминокциладенилатов, или продукта — аминокцил-тРНК. Недавно было показано, что смешанные ангидриды АМР и α-аминофосфоновых кислот являются мощными специфическими ингибиторами аминокцил-тРНК-синтетаз [2]. Особенности действия этих новых ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза белка были объяснены как структурным сходством с природными аденилатами по нуклеотидному фрагменту и остатку аминокислоты, так и близким соответствием фосфонильной группы переходному состоянию карбонильной группы аминокциладенилата. Представлялось интересным использовать фосфонатные аналоги аминокцил-тРНК для изучения их взаимодействия с синтетазами. Поскольку сами аминокфосфонил-тРНК практически недоступны (аминокцил-тРНК-синтетазы не катализируют аминокфосфонилирование тРНК [3]), то в качестве их «минимальных» аналогов мы исполь-

* Сообщение I см. [1].

зовали 2'(3')-аминофосфоновые эфиры АМР, синтез и взаимодействие которых с аминоксил-тРНК-синтетазой рассматриваются в этой работе.

Ранее было описано получение двух 2'(3')-аминофосфоновых эфиров аденозина [4] и ничего не сообщалось о стабильности эфирной связи. Однако невысокие выходы заставляли предполагать возможность ее расщепления при удалении используемых защитных групп. Синтез аминокфосфоновых эфиров АМР (III) осуществлен нами по схеме:



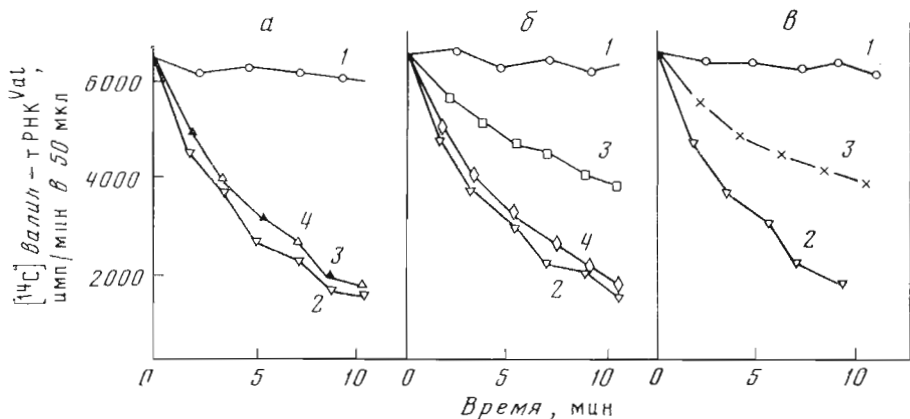
Эта схема предусматривала максимально мягкие условия снятия защитных групп. Конденсацией бензильного эфира АМР (I) с N-карбобензоксид-α-аминофосфоновыми кислотами под действием N,N'-дидицилогексилкарбодиимида были получены промежуточные эфиры (IIa, б), выходы которых после очистки на DEAE-целлюлозе составляли 50—60%. Каталитическое дебензилирование проводилось над палладиевой чернью в водной уксусной кислоте. Выходы индивидуальных по ТСХ и электрофорезу эфиров (IIIa, б) после хроматографии на DEAE-целлюлозе составляли 30—40%, их свойства приведены в таблице. Под влиянием щелочной фосфатазы гидролизывалась только 5'-фосфоэфирная связь соединения (IIIб), что согласовывалось с известными данными об устойчивости 5'-(аминометилфосфонил)нуклеотидных эфиров к действию этого же фермента [5]. Полученный таким образом 2'(3')-O-(1-амино-2-фенилэтил-1-фосфонил)аденозин был идентичен продукту, синтезированному по методике [4].

На валиновом ферменте в стандартных условиях реакции аминоксилации аналоги (IIIa, б) в концентрации порядка $7 \cdot 10^{-3}$ М уменьшали скорость образования валил-тРНК на половину. Торможение было неспецифичным, так как аналоги действовали практически одинаково. Эти соединения так же слабо ($8,5 \cdot 10^{-3}$ М) ингибировали и реакцию АТР—РР_i-обмена. Естественным объяснением такого эффекта могло быть отсутствие сходства между фосфонатами (III) и аминоксилнуклеотидами. Однако, по нашим предварительным данным, фосфонат (IIIб) в бесклеточной системе с рибосомами ингибировал аминоксилацию аминоксил-тРНК. Поэтому было изучено влияние соединений (III) еще на одно катализируемое синтетазой превращение — дезаминирование аминоксил-тРНК. Эта недавно обнаруженная реакция протекает в отсутствие АМР и РР_i (отличие от обратной реакции) и является высокоспецифической: аминоксил-тРНК, образованные суб-

Характеристики 2' (3')-аминофосфоновых эфиров АМР

Соединение	R _f в системах			E _{АМР} в буферах		Соотношение аденозин/фосфор	λ _{макс} (ε) в воде
	А	Б	В	Г	Д		
(IIIa)	0,17			0,76	1,2	0,9:1	259 (13500)
(IIIб)	0,2			0,7	1,15	0,95:1	259 (13500)
(IIIб) *	0,57	0,22; 0,4	0,19; 0,35	0,8			

* После гидролиза щелочной фосфатазой.



Деацилирование $[^{14}\text{C}]$ валил-тРНК $^{\text{Val}}$ в отсутствие (1) и в присутствии (2—4) фермента с добавлением нуклеотидов и их аналогов (приведена концентрация, М): а — АМР, $8 \cdot 10^{-4}$ (3) и СМР, $8 \cdot 10^{-4}$ (4); б — аналог (IIIа), $6 \cdot 10^{-4}$ (3) и аналог (IIIб), $5 \cdot 10^{-4}$ (4); в — СМР, $8 \cdot 10^{-4}$ и аналог (IIIа), $6 \cdot 10^{-4}$ (3)

стратными аминокислотой и тРНК, гидролизуются медленно, тогда как деацилирование «ошибочных» аминоацил-тРНК протекает очень быстро [7].

Как показано на рисунке а, гидролиз $[^{14}\text{C}]$ валил-тРНК $^{\text{Val}}$, медленно происходивший в отсутствие фермента, значительно ускорился под действием валил-тРНК-синтетазы. В соответствии с известными данными АМР не влиял на деацилирование. В присутствии аналога (IIIа) в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М скорость реакции уменьшалась вдвое. Торможение не сопровождалось его гидролизом и было специфичным, поскольку аналог (IIIб) при такой же концентрации практически не влиял на активность фермента (рисунок б). Очевидно, фосфонат (IIIа) моделировал 3'-концевой аминокислотный фрагмент тРНК, и поэтому было интересно выяснить, будет ли сказываться на ингибировании добавление СМР. Как видно на рисунке в, присутствие СМР в концентрации $8 \cdot 10^{-4}$ М не влияло на торможение. Это согласовывалось с тем, что удаление цитидина, соседнего с 3'-концевым аденозином, не изменяло сродство тРНК к ферменту [6].

В случае синтетаз влияние тРНК на свойства активного центра представляет собой один из важных аспектов проблемы узнавания. Отсутствие избирательности у аналогов (III) в реакции аминокислотирования свидетельствовало о том, что на конечных этапах аминокислотирования участок для аминокислотного фрагмента формировался под влиянием тРНК. С другой стороны, селективность фосфонатов (III) в реакции деацилирования указывала на относительную независимость уже образованного аминокислотного участка от тРНК.

Таким образом 2'(3')-аминофосфонатные эфиры АМР (III) выступают новыми ингибиторами реакции деацилирования. Известно, что аминокислотные эфиры АМР, а также тРНК ингибируют деацилирование [7], однако первые тормозят и прямую реакцию, а тРНК является ее субстратом. Для соединений (III) разница в ингибировании прямой реакции и деацилирования составляет примерно два порядка*. Поэтому аналоги (III) могли бы найти применение в тех специальных случаях, когда необходимо повысить степень аминокислотирования тРНК. Кроме того, они могли бы оказаться простым и удобным инструментом при исследовании реакции ферментативного деацилирования, в особенности деацилирования «ошибочных» аминокислот-тРНК.

* Разница в действительности еще больше, если учитывать, что фосфонаты (III) — смесь четырех диастереомеров.

УФ-спектры снимались на приборе Specord UV VIS (ГДР), ТСХ проводилась на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) в системах: А — изопропанол — конц. аммиак — вода, 7:1:3; Б — насыщенный сульфат аммония — ацетат аммония — изопропанол (79:19:12); В — насыщенный сульфат аммония — 0,05 М бура — 0,1 М ацетат натрия — изопропанол (60:19:19:2). Электрофорез проводили на бумаге FN-18 (ГДР) при градиенте напряжения 68 В/см в буферах: Г — 0,01 М ацетат натрия (рН 4,1) и Д — 0,01 М борат натрия (рН 9,2). Вещества обнаруживали по поглощению в УФ и нингидрином. Монобензиловый эфир АМР получен по методике [8], 1-амино-2-метилпропилфосфоновая кислота фирмы Calbiochem, N-карбобензоксид- α -аминофосфоновые кислоты — по методике [4].

2'(3')-О-(1-Амино-2-метилпропил-1-фосфонил)аденозин-5'-фосфат (IIIa). К водно-пиридиновому раствору 436 мг (1 ммоль) монобензилового эфира АМР добавляли 353 мг (1 ммоль) три-*n*-октиламина, упаривали и высушивали многократной отгонкой с абс. пиридином, остаток растворяли в 10 мл абс. пиридина, прибавляли 594 мг (2 ммоль) N-карбобензоксид- α -аминоизобутилфосфоновой кислоты, 10 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодимид и перемешивали 3 сут при 37°. Осадок отделяли, к фильтрату добавляли 10 мл воды, смесь экстрагировали эфиром (3 × 15 мл), водный слой упаривали в вакууме, остаток растворяли в водном этаноле и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (3,5 × 25 см; HCO₃⁻-форма). После промывания колонки водой для элюции использовали линейный градиент бикарбоната аммония (2 л воды в смесителе, 2 л 0,3 М бикарбоната аммония (рН 7,5) в резервуаре). Фракции, соответствующие 0,15—0,2 М концентрации бикарбоната аммония, упаривали в вакууме досуха, остатки бикарбоната аммония удаляли многократным упариванием с водой и этанолом. Выход соединения (IIa) 0,52 г (60%), R_f 0,7 (А). Раствор 0,5 г бензилового эфира (IIa) в 10 мл 80% уксусной кислоты гидрировали над палладиевой чернью (100 мг) в течение 6 ч, катализатор отфильтровывали, промывали водой, фильтрат упаривали досуха в вакууме, остаток после повторного упаривания в вакууме растворяли в водном этаноле и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (3,5 × 25 см, HCO₃⁻-форма). Элюцию проводили как описано выше. Фракции, соответствующие 0,17—0,2 М бикарбоната аммония, объединяли и после упаривания в вакууме и повторного упаривания с водой и спиртом остаток растворяли в 10 мл воды и лиофилизировали. Выход фосфоната (IIIa) в виде аммонийной соли 0,17 г (40%).

2'(3')-О-(1-Амино-2-фенилэтил-1-фосфонил)аденозин-5'-фосфат (IIIb). Монобензиловый эфир АМР (436 мг, 1 ммоль) растворяли в 50% пиридине, упаривали, 5 раз упаривали с абс. пиридином, растворяли в 10 мл абс. пиридина, добавляли 670 мг (2 ммоль) N-карбобензоксид- α -амино- β -фенилэтилфосфононовой кислоты, 10 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодимид и перемешивали 5 сут при 18°. Осадок отделяли, далее обработку и очистку проводили аналогично описанному выше. Выход бензилфосфата (IIb) 0,78 г (69%), R_f 0,66 (А), E_{АМР} 1,1 (Г). Гидрирование проводили в 5 мл 80% уксусной кислоты над палладиевой чернью в течение 5 ч. Катализатор отделяли, фильтраты упаривали в вакууме, дважды упаривали с водой и этанолом, лиофилизировали. Выход фосфоната (IIIb) в виде аммонийной соли 0,215 г (54%).

Устойчивость соединений (IIIa—б) к окислению периодатом проверяли следующим образом: готовили растворы нуклеотидов с оптической плотностью 1 (D₂₆₀), приливали равный объем раствора периодата натрия с оптической плотностью ~ 1 при 220 нм и наблюдали изменение поглощения при 220 нм. В качестве контрольного использовали раствор периодата натрия той же концентрации.

Гидролиз фосфата (IIIb) щелочной фосфатазой проводили 3 ч при 37°, инкубируя 2 ед. акт. фермента на 1 мг вещества при рН 9.

Валил-тРНК-синтетазу (КФ 6.1.1.1) и суммарную тРНК из *E. coli* выделяли как указано ранее [9]. Валиновую тРНК разделяли на две основные изоакценторные фракции хроматографией на бензоилированной ДЕАЕ-целлюлозе [10]. тРНК₁^{Val} очищали хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-25 (колонка 2,5 × 7 см, элюция градиентом NaCl от 0,3 до 1 М; 0,01 М ацетатный буфер, рН 4,5), за которой следовала рехроматография с обратным солевым градиентом на сефарозе 4В [11]. [¹⁴С]валил-тРНК₁^{Val} (1300 ммоль на ОЕ тРНК₁^{Val}) получена по методике [12].

Определение активности фермента по реакциям АТР — РР_i-обмена и аминокислотирования проводили согласно работе [9]. Влияние аналогов (IIIa — б) на аминокислотирование тРНК и АТР — РР_i-обмена определяли внесением 50 мкл раствора последних (10⁻² — 10⁻⁴ М) непосредственно в реакционную смесь перед добавлением фермента.

Реакция ферментативного дезацитирования [¹⁴С]валил-тРНК₁^{Val} проводили в описанных ранее условиях [13] с одновременным контролем спонтанного гидролиза [¹⁴С]валил-тРНК₁^{Val}. Инкубационная проба содержала в 0,36 мл (в мкмоль): трис-НСl-буфер (рН 7,6) — 54; KCl — 54; MgCl₂ — 3,6; [¹⁴С]валил-тРНК₁^{Val} — 5,0 и 0,05 мг валил-тРНК-синтетазы. Пробу инкубировали при 37°. За ходом реакции следили по уменьшению метки, осаждаемой трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Влияние соединений (IIIa, б) на дезацитирование определяли внесением аликвоты раствора последних (10⁻² — 10⁻⁴ М) в реакционную смесь перед добавлением [¹⁴С]валил-тРНК₁^{Val} (рисунок). Аликвоты (50 мкл) отбирали через каждые 2 мин инкубации и вносили в 5 мл 5% ТХУ при 0°, перемешивали и фильтровали через бумажные фильтры FN-18, промывали 30 мл 5% ТХУ, содержащей 0,5% валин. Фильтры промывали холодным этанолом и эфиром, высушивали под ИК-лампой и метку просчитывали на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-30, объединенном с ЭВМ Multi-20 в систему Multimat Intertechnique (Франция).

Авторы выражают благодарность В. В. Петухову за составление программ обработки экспериментальных данных на ЭВМ Multi-20.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жуков Ю. Н. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1391—1394.
2. Хомутов Р. М., Бирюков А. И., Осипова Т. И. (1978) Новости химии нуклеозидов и нуклеотидов (тезисы докладов I Всес. конф. по химии нуклеозидов и нуклеотидов), с. 118—119, «Зиватне», Рига.
3. Birjukov A. I., Ishmuratov B. Kh., Khomutov R. M. (1978) FEBS Lett., in press.
4. Zemlička J., Chládek S. (1969) Collect. Czech. Chem. Commun., 34, 1007—1014.
5. Gulyaev N. N., Holy A. (1972) FEBS Lett., 22, 294—296.
6. Tal J., Deutscher M., Littaver U. (1972) Eur. J. Biochem., 28, 478—491.
7. Kisselev L. L., Favorova O. O. (1974) Adv. Enzymology, 40, 141—238.
8. Соколова Н. И., Носова В. В., Вельмаго И. С., Шабарова З. А. (1975) Ж. орган. химии, 14, 1197.
9. Бирюков А. И., Осипова Т. И., Хомутов Р. М. (1976) Биохимия, 41, 1905—1906.
10. Gillam J. C., Tener G. M. (1974) in Methods in Enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 20, pp. 55—70, Acad. Press, N. Y.
11. Holmes W. M., Hurd R. E., Reid B. R., Rimerman R. A., Hatfield G. W. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1068—1071.
12. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F. (1960) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 46, 811—822.
13. Von der Haar F., Cramer F. (1976) Biochemistry, 15, 4131—4138.

Поступила в редакцию
2.I.1978

После доработки
14.IV.1978

ORGANOPHOSPHORUS ANALOGS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS.

II. AMP 2' (3')-AMINOPHOSPHONIC ESTERS: THE SYNTHESIS AND
SELECTIVE INHIBITION OF VALYL-tRNA₁^{Val} DEACYLATION

OSIPOVA T. I., BIRYUKOV A. I., GANDURINA I. A. ,
TARUSOVA N. B., KHOMUTOV R. M.

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

2'(3')-O-(1-amino-2-methylpropyl-1-phosphonyl)-5'-adenylic acid and 2'(3')-O-(1-amino-2-phenylethyl-1-phosphonyl)-5'-adenylic acid were synthesized. These compounds were demonstrated to be weak non-specific inhibitors of the valyl-tRNA synthetase catalyzed aminoacylation of tRNA. 2'(3')-O-(1-amino-2-methylpropyl-1-phosphonyl)-5'-adenylic acid proved a selective and effective inhibitor of enzymatic deacylation of Val-tRNA₁^{Val}.
