



УДК 547.963.32

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ АНАЛОГИ СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ, АМР, АДФ, АТР И МЕЗИТИЛЕНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

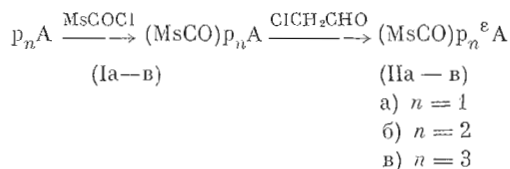
*Третьякова С. С., Ермолин С. В., Шалалберидзе М. В.,
Соколова Н. И., Шабарова З. А.*

*Межфакультетская проблемная лаборатория им. А. Н. Белозерского
и химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез смешанных ангидридов этеноаденозин-5'-моно-, ди-, трифосфатов и мезитиленкарбонической кислоты путем последовательной модификации АМР АДФ или АТР с помощью MsCOCl и хлорацетальдегида. Обсуждаются абсорбционно-флуоресцентные характеристики полученных соединений.

Смешанные ангидриды аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфатов и мезитиленкарбонической кислоты — $(\text{MsCO})_p\text{A}$, $(\text{MsCO})_{pp}\text{A}$ и $(\text{MsCO})_{ppp}\text{A}$ — используются в качестве специфических ингибиторов при изучении механизмов действия ряда ферментов, таких, как митохондриальная АТРаза [1], лейцил-тРНК-синтетаза [2] и др. Химические свойства этих соединений, обусловившие довольно широкое их применение, обсуждались нами ранее [3]. Дальнейшее развитие исследований ферментативных систем с помощью смешанных ангидридов аденозин-5'-полифосфатов и MsCOOH вызвало необходимость получения их флуоресцентных аналогов, использование которых позволило бы следить за включением ингибитора в активный центр. Для этих целей был осуществлен синтез этеновых производных ангидридов мезитиленкарбонической кислоты и $p\text{A}$, $pp\text{A}$ и $ppp\text{A}$, а также изучены их абсорбционно-флуоресцентные свойства, представляющие интерес для биохимического использования этих соединений.

Синтез проводили по схеме:



Смешанные ангидриды $(\text{MsCO})_p p_n\text{A}$ ($n = 1-3$) (Ia — в) получали по методике [4]. Вторая стадия синтеза — модификация смешанных ангидридов хлорацетальдегидом протекает с количественным выходом [5]. Соединения (II а — в) выделяли методом препаративной бумажной хроматографии. Хроматографические и электрофоретические характеристики приведены в таблице. Гомогенность полученных соединений показана микроколониной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine. Фосфодиэстераза змеиного яда гидролизует ди- и трифосфаты (IIб) и (IIв) до монофосфата $p^e\text{A}$.

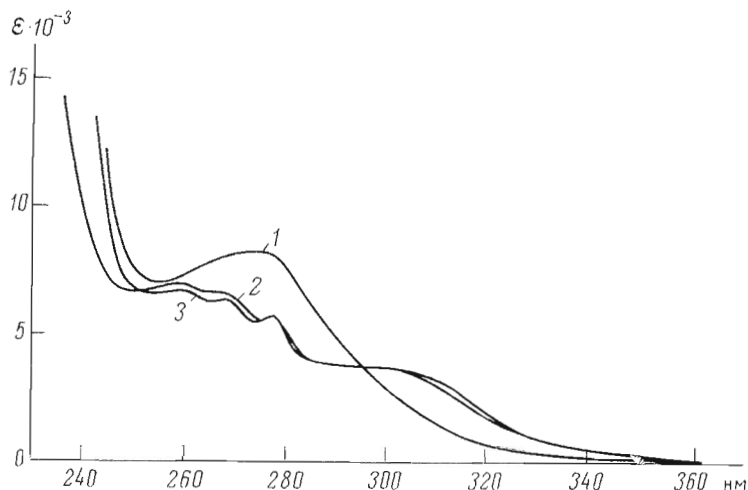


Рис. 1. УФ-спектры $(MsCO)pp^eA$: 1 — в 0,1 н. HCl; 2 — в 0,1 н. KOH; 3 — при pH 6,0

Ранее было установлено [3], что при синтезе смешанных ангидридов моно- и олигонуклеотидов с мезитиленкарбоновой кислотой гетероциклические основания не модифицируются. На основании этого сделана попытка изменить последовательность реакций: ввести сначала этеновую группу, а затем с помощью $MsCOCl$ в этеноаденозин-5'-моно- или полифосфатах модифицировать концевой фосфат. Такая последовательность реакций позволила бы для получения соединений (II а — в) использовать коммерческие препараты этенонуклеотидов.

Однако после обработки eAMP и eADP мезитиленкарбонилхлоридом в стандартных условиях в реакционных смесях методом БХ наряду с соединениями (IIа) и (IIб) обнаруживали 30—40% нефлуоресцирующих УФ-поглощающих продуктов с R_f 0.8—0.9. На основании литературных данных [6] можно предположить, что образование побочных продуктов связано с ацилированием второго имидазольного кольца этеноаденозина мезитиленкарбонилхлоридом, которое вызывает тушение флуоресценции. Следовательно, для синтеза соединений (II а — в) предложенная последовательность (см. схему) реакций является оптимальной.

УФ-спектры соединений (II а—в) практически идентичны, но отличаются от спектров этеновых производных MAP, ADP и ATP [5]. Эти различия, по-видимому, обусловлены наличием остатка мезитиленкарбоновой кислоты, поглощающей в той же области (см. рис. 1).

Смешанные ангидриды (II а—в) интенсивно флуоресцируют в нейтральных и щелочных растворах. Их спектры аналогичны спектрам этеноаденозина ($\lambda_{флуор}^{max}$ 415 нм, $\lambda_{возб}^{max}$ 300 нм) [7]. С понижением pH интенсивность флуоресценции понижается (рис. 2), но положения максимумов флуоресценции и возбуждения остаются неизменными. Вероятно, флуоресцирую-

Некоторые характеристики смешанных ангидридов этеноаденозин-5'-моно-, ди- и трифосфатов и мезитиленкарбоновой кислоты

Соединение	R_f		E_{AMP}	Квантовый выход флуоресценции, ф
	БХ	ТСХ		
$(MsCO)p^eA$ (IIа)	0,74	0,64	0,50	0,2
$(MsCO)pp^eA$ (IIб)	0,62	0,58	0,82	0,2
$(MsCO)ppp^eA$ (IIв)	0,56	0,48	0,84	0,2

щим хромофором в этих соединениях является депротонированная форма этеноаденина [8].

Квантовые выходы полученных нами соединений (II а—в), измеренные при использовании в качестве стандартов ϵ АТР ($\varphi = 0,59$) [7] и 9-аминоакридина ($\varphi = 0,98$) [9], ниже квантового выхода ϵ АТР. Такое тушение эмиссии можно объяснить тем, что ангидриды (II а—в) находятся не в развернутой конформации, а имеют определенную вторичную структуру с перекрыванием плоскостей аденина и ароматического кольца мезитиленкарбоновой кислоты. Аналогичная зависимость интенсивности флуоресценции от структуры была обнаружена Леонардом и сотр. [10] при изучении динуклеозидфосфатов. Благодаря достаточно интенсивной флуоресценции ($\varphi = 0,2$) соединения (II а—в) могут регистрироваться при концентрациях, меньших 10^{-8} М, что позволяет применять их для исследования ферментативных систем. Обнаружено, что (MsCO)pp ϵ А и (MsCO)ppp ϵ А по эффективности ингибирования АТРазной активности субмитохондриальных частиц и растворимой АТРазы практически не отличаются от соответствующих нефлуоресцентных аналогов [4].

В связи с этим можно надеяться, что и в других ферментативных системах замена смешанных ангидридов мезитиленкарбоновой кислоты и полифосфатов аденозина их этеновыми аналогами позволит значительно поднять эффективность исследований.

Экспериментальная часть

В работе использовали АМР, АДР, АТР, ϵ АМР и ϵ АДР фирмы Serva (ФРГ). Хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты получали как описано в работе [11].

Для аналитических целей использовали фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1. 4.1) фирмы Worthington (США), гидролиз проводили по описанной методике [12].

Хроматографию и электрофорез осуществляли на бумаге FN-1 (ГДР), ТСХ — на пластинках с закрепленным слоем силикагеля Silufol. Вертикальный электрофорез проводили в течение 1 ч при напряжении 900 В на приборе Labor (Венгрия). Для БХ использовали систему 1 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (рН 3, 2) — этанол (7 : 3), для ТСХ — изомасляная кислота — аммиак — вода (75 : 1 : 24), для электрофореза — 0,05 М триэтиламонийбикарбонатный буфер, рН 7,5. Микроколоночную хроматографию на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,18 М в 7 М мочевины осуществляли по методикам работы [13].

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Cary-16. Флуоресцентные измерения проводились на спектрофлуориметрах Aminco SPF-1000 CS и Aminco-Bowman при 20°.

Смешанные ангидриды (MsCO) p_n А (Iа—в) получали обработкой 10—100 мкмоль АМР, АДР или АТР при 0° в течение 3—5 мин 5-кратным избытком мезитиленкарбонилхлорида [4]. Их этеновые производные (IIа—в) получали с количественным выходом взаимодействием с хлорацетальдегидом в 0,1 М цитратном буфере, рН 4,5 при 37° в течение 4 ч [5].

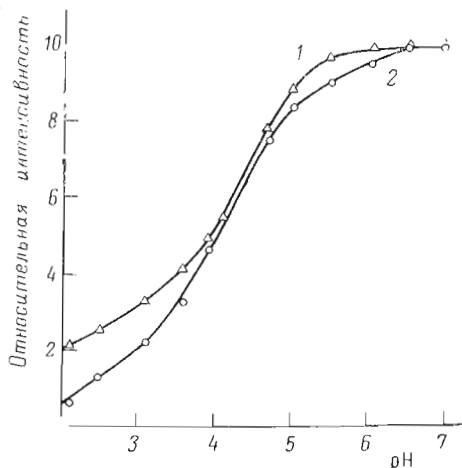


Рис. 2. pH-зависимость относительной интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}$ 310; $\lambda_{\text{исп}}$ 415); 1 — (MsCO)p ϵ А; 2 — (MsCO)pp ϵ А

Для оптических исследований по 15 мкмоль соединений (IIa—v) очищали электрофорезом на бумаге в триэтиламмонийбикарбонатном буфере, а затем гель-фильтрацией на колонке (1,3 × 33 см) с биогелем Р-2. Скорость элюции 30 мл/ч.

Авторы благодарят А. А. Коста за обсуждение полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов И. А., Шаламберидзе М. В., Новикова И. Ю., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1977) Биохимия, 42, 1704—1710.
2. Краусе Р., Ковалева Г. К., Гуляев Н. Н., Баратова А. А., Агаларова М. Б., Северин Е. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Киселев Л. Л. (1978) Биохимия, 43, 656—661.
3. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903—916.
4. Третьякова С. С., Друца В. Л., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1978) Биоорг. химия, 4, 911—916.
5. Кочетков Н. К., Шибяев В. И., Кост А. А., (1972) Докл. АН СССР, 205, 100—103.
6. Rose S. D. (1974) Biochim. et biophys. acta, 361, 231—235.
7. Secrist J. A., Barrio J. R., Leonard N. J., Weber G. (1972) Biochemistry, 11, 3499—3506.
8. Spencer R. D., Weber G., Tolman G. L., Barrio J. R., Leonard N. J. (1974) Eur. J. Biochem., 45, 425—429.
9. Strickler S. J., Berg R. H. (1962) J. Chem. Phys., 814—822.
10. Tolman G. L., Barrio J. R., Leonard N. J. (1974) Biochemistry, 13, 4869—4878.
11. Синтезы органических препаратов, под ред. Б. А. Казанского (1952) т. 3, с. 462, Изд-во иностр. лит., М.
12. McCutchan T. F., Gilman P. T. (1973) Biochemistry, 12, 4840—4846.
13. Грачев М. А. (1973) в кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, с. 104—122, «Наука», М.

Поступила в редакцию
6.V.1978

FLUORESCENCE ANALOGS OF MIXED ANHYDRIDES OF AMP, ADP ATP AND MESITOIC ACID

TRETIAKOVA S. S., ERMOLIN S. V., SHALAMBERIDZE M. V.,
SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

*A. N. Bologersky Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular
Biology and Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

Synthesis of mixed anhydrides of ethenoadenosine-5'-mono-, di- and triphosphates and mesitoic acid (MsCOpA, MsCOPP A, MsCOPPP A) was carried out by successive modification of AMP, ADP or ATP with MsCOCl and with chloroacetaldehyde. The absorption-fluorescence properties of the resultant compounds were discussed.