

ванные концевыми фосфатными группами. Выход смешанного ангидрида АТР в тех же условиях достигает 40% и в реакционной смеси обнаруживается до 15% монофосфата, образование которого, очевидно, обусловлено расщеплением нуклеозидтрифосфатов в среде абсолютного пиридина [2].

Выходы и хроматографические характеристики смешанных ангидридов нуклеозидди- и трифосфатов с мезитиленкарбоновой кислотой ($MCP(P)_n Nuc$, где $Nuc = Ado, GuO$ и $n = 1, 2$) приведены в табл. 1.

Таблица 1

Соединение	Выход. %	R_f в системах		
		А	Б	В
$MCP P Ado$	80	0,58	0,63	0,76
$MCP P GuO$	60	0,50	0,58	—
$MCP P P Ado$	40	0,53	0,51	—

Смешанные ангидриды $MCP(P)_n Nuc$ довольно устойчивы в водной среде. Так, $MCP P Ado$ имеет $\tau/2 = 4$ сут (0,004 М фосфатный буфер, рН 7,5, 37°), причем гидролизуются обе ангидридные связи.

Изучалось действие фосфогидролаз на смешанные ангидриды $MCP(P)_n Nuc$. Было обнаружено, что щелочная ФМЭ из *E. coli* за 2 ч (37°, рН 9) не гидролизует $MCP(P)_n Nuc$, в то время как исходные нуклеозидди- и трифосфаты в этих условиях расщепляются до нуклеозидов. Устойчивость к действию ФМЭ является доказательством модификации концевой фосфатной группы нуклеозидполифосфатов при их взаимодействии с МСС1. ФДЭ змеиного яда за 2 ч (37°, рН 8) гидролизует нуклеозидполифосфаты и их смешанные ангидриды с мезитиленкарбоновой кислотой до соответствующих нуклеотидов. Таким образом, эти два фермента можно использовать для анализа $MCP(P)_n Nuc$.

При взаимодействии с аминами, спиртами и меркаптанами $MCP(P)_n Nuc$ являются эффективными фосфорилирующими агентами. При выдерживании водных растворов $MCP P Ado$ при 37° с 10-кратным избытком аммиака, морфолина, бензиламина или диэтиламина через сутки смешанный ангидрид количественно превращается в соответствующий β -амид АРР. При использовании $MCP P P Ado$ в тех же условиях получаются γ -амиды АТР.

Способность смешанных ангидридов реагировать с аминами в водных растворах может быть использована для иммобилизации нуклеозидполифосфатов на сорбентах путем закрепления их через концевые фосфатные группы. В качестве примера такой иммобилизации может служить реакция $MCP P P Ado$ с гексаметилендиаминсефарозой по описанной ранее методике [3]. В результате удается профосфорилировать до 30% аминных групп носителя. Таким образом, смешанные ангидриды нуклеозидполифосфатов и мезитиленкарбоновой кислоты могут быть использованы для получения иммобилизованных субстратов и ингибиторов для аффинной хроматографии.

При добавлении к водно-пиридиновому раствору $MCP P Ado$ 10-кратного избытка C_2H_5SH наблюдалось образование $C_2H_5S P P Ado$, причем через 20 ч реакция проходит на 20% и полностью превращение смешанного ангидрида в тиоэфир заканчивается через 3 сут.

С этанолом в аналогичных условиях $MCP P Ado$ не реагирует. Превращение смешанного ангидрида в соответствующий β -этиловый эфир проходит лишь в безводной среде, при использовании абсолютного пиридина и спирта в соотношении 1 : 1. Очевидно, пиридин служит основным и нуклеофильным катализатором.

Таблица 2

Соединение	Выход, %	R_f в системах		
		А	Б	В
(I) $C_6H_5CH_2NHPPAdo$	80	0,53	0,58	0,67
(II) NH_2PPAdo	80	0,19	0,28	0,55
(III) $O(CH_2CH_2)_2NPPAdo$	90	0,43	0,34	0,71
(IV) $(C_2H_5)_2NPPAdo$	60	0,57	0,56	0,66
(V) $C_6H_5NHPPAdo$	40	0,51	0,59	0,71
(VI) NH_2PPGuo	80	0,12	0,25	—
(VII) NH_2PPAdo	60	0,15	0,30	—
(VIII) $O(CH_2CH_2)_2NPPAdo$	70	0,43	0,35	—
(IX) $C_6H_5CH_2NHPPAdo$	70	0,47	0,40	—
(X) $C_2H_5SPPAdo$	70	0,38	0,40	—
(XI) C_2H_5OPAdo	40	0,35	0,46	—

Выходы и хроматографические характеристики амидов и эфиров нуклеозидполифосфатов приведены в табл. 2.

Амиды нуклеозидди- и трифосфатов гидролизуются как в кислой, так и в щелочной средах. Так, β -бензиламид ADP при pH 3, 37° за 4 ч на 60% гидролизуетея по фосфоамидной связи с образованием ADP и бензиламина. В 0,1 н. HCl (37°, 2 ч) это соединение расщепляется до AMP, ADP и амина; в 0,5 н. NaOH (37°, 1 ч) — до AMP и амина.

Таким образом, хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты является удобным реагентом для избирательной модификации концевой фосфатной группы в нуклеозидди- и трифосфатах. Отсутствие побочных процессов при образовании смешанных ангидридов позволяет проводить синтез амидов и алкиловых эфиров полифосфатов одностадийно, не выделяя смешанные ангидриды. Из полученных данных очевидно, что скорость превращения $MC(P)_nNuc$ в амиды выше, чем в тиоэфиры и эфиры. Очевидно, это обусловлено понижением нуклеофильности в ряду $-NH_2 > SH- > OH-$.

Способность $MC(P)_nNuc$ реагировать с аминами и алкилмеркаптанами в водных растворах позволяет надеяться на использование таких смешанных ангидридов в качестве аналогов субстратов, которые в условиях ферментативной реакции будут реагировать со сближенными NH_2- , $SH-$ группами и другими нуклеофильными группами в активном центре фермента. Таким образом, смешанные ангидриды нуклеозидполифосфатов и мезитиленкарбоновой кислоты могут найти применение для аффинного мечения активных центров ряда ферментов.

Экспериментальная часть

Хроматографию проводили на бумаге № 1 и 3 («Filtrak», ГДР). При БХ использовали системы: этиловый спирт — 1 М ацетат аммония, 7 : 3, pH 7,5 (А); изопропиловый спирт — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б); *n*-пропиловый спирт — конц. аммиак — вода, 55 : 10 : 35 (В).

Гексаметилендиаминсефарозу получали обработкой активированной бромцианом сефарозы 4В гексаметилендиамином [4]. В работе использовали препараты ФМЭ из *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и ФДЭ змеяного яда (КФ 3.1. 4.1) фирмы «Wortington» (Англия). Гидролиз проводили по методикам [5].

Для анализа в синтезированных соединениях определяли соотношение азотистого основания (гидролиз 72% $HClO_4$, 1 ч, 100°) и общего фосфора, обнаруженного по методу [6].

Смешанные ангидриды нуклеозидди- и трифосфатов с мезитиленкарбоновой кислотой. К водному раствору 0,1 ммоль ADP добавляли спиртс-

вый раствор 0,3 ммоль (0,15 мл) три-*n*-октиламина. Смесь упаривали и высушивали многократной отгонкой с абсолютным пиридином. Оставшееся масло растворяли в 1 мл абсолютного пиридина и добавляли 0,5 ммоль (0,08 мл) MCCl . Реакционную смесь встряхивали 15 мин, затем разбавляли 1 мл воды и экстрагировали эфиром (3×2 мл). Водный слой препаративно хроматографировали в системе А. Полосу с R_f 0,58, соответствующую MCPPAdo , элюировали.

Выход MCPPAdo , определенный спектрофотометрически, составлял 80%.

Соотношение аденин:общий фосфор 1 : 1,93. В гидролизате MCPPAdo ФДЭ идентифицировали АМР и мезитиленкарбоновую кислоту. MCPPGuo и MCPPPAdo получали и анализировали аналогично.

Амиды и эфиры нуклеозидди- и трифосфатов (см. табл. 2) $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NHPPAdo(I)}$. К 0,1 мл водного раствора 0,01 ммоль MCPPAdo добавляли 10—15-кратный избыток бензиламина. Смесь выдерживали в течение суток при 37° , затем подвергали БХ в системе А. Смешанный ангидрид пацело превратился в соединение (I).

Найдено соотношение аденин : общий фосфор 1 : 1,82.

Соединения (II) — (X) получали аналогично соединению (I).

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OPPAAdo(XI)}$. 0,01 ммоль MCPPAdo упаривали, остаток высушивали отгонкой с абсолютным пиридином и растворяли в 0,5 мл смеси абсолютного этанола и пиридина (1 : 1). Реакционную смесь выдерживали 2 сут при 37° и затем разделяли БХ в системе А.

ADP-сефароза. К 1 мл гексаметилендиаминсефарозы с концентрацией аминогрупп 8 мкмоль/мл (определено методом кондуктометрического титрования) приливали раствор 24 мкмоль MCPPAdo в 2 мл воды. Смесь перемешивали 3 сут при комнатной температуре и затем осадок промывали водой до отсутствия в элюате поглощения при 260 нм. Количество ковалентно закрепленного ADP, рассчитанное по разности между количеством исходного и непрореагировавшего MCPPAdo составляло 3 ммоль.

Для анализа 0,5 мл ADP-сефарозы, предварительно отмытой от избытка MCPPAdo , обрабатывали 2 мл 0,6 М соляной кислоты при комнатной температуре в течение 12 ч при перемешивании. Затем сефарозу тщательно промывали водой на фильтре и по УФ-поглощению определили, что в элюате содержится ~ 3 ммоль нуклеотидного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова Н. И., Носова В. Б., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 206, 129—131.
2. Wehrly W. E., Verheyden D. L. M., Moffatt J. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1254—1255.
3. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 219, 1134—1136.
4. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B. (1971) Methods in Enzymology, 22, 345—385.
5. McCutchan T. F., Gilham P. T. (1973) Biochemistry, 12, 4840—4846.
6. Weil-Malherbe H., Green R. H. (1951) Biochem. J., 49, 286—292.

Поступила в редакцию
26. XII. 1974

MODIFICATION OF TERMINAL PHOSPHATE GROUPS IN NUCLEOSIDE DI- AND TRIPHOSPHATES

NOSOVA V. V., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

*Chemical Department and Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A new method for synthesizing various nucleoside di- and triphosphate derivatives, i. e. mixed anhydrides, amides and esters, is described. It involves selective activation of the terminal phosphate group by mesityl chloride.