



УДК 547.962.32

СИНТЕЗ И ПЕПТИДАКЦЕПТОРНЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТНЫХ ЭФИРОВ — АНАЛОГОВ ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ

Тарусова Н. Б., Викторова Л. С., Цилевич Т. Л.,
Вигестане Р. Я., Куханова М. К., Краевский А. А.,
Готтлик В. П.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,
Москва

Конденсацией аналогов динуклеозидфосфатов, в которых рибоза 5'-концевого нуклеозида заменена на оксипропильный остаток, с имидазолидами *трет*-бутилоксикарбониламинокислот с последующим удалением защиты синтезированы 3'(2')-О-аминокислотные эфиры этих аналогов, моделирующие аминоацильные производные природных динуклеозидфосфатов. Все полученные соединения исследованы как акцепторы пептидов в бесклеточной рибосомальной системе с матрицей и без матрицы. Из испытанных соединений активным акцептором оказался только фенилаланиновый эфир аналога СрА.

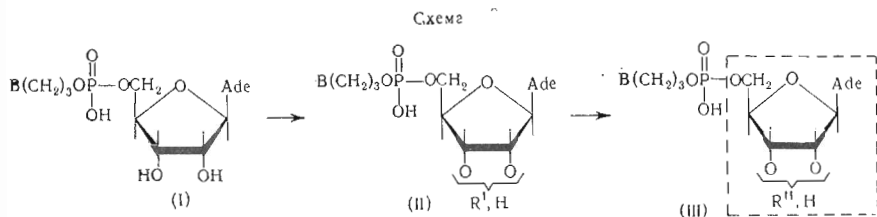
Изучению субстратной специфичности А-участка ПТЦ рибосом посвящено большое количество работ [см. 1, 2]. Тем не менее отдельные критерии отбора А-участком подходящих ему низкомолекулярных субстратов остаются до настоящего времени невыясненными. Наиболее непонятен при этом тот факт, что различные аминокислотные эфиры аденозина обладают разной степенью активности в качестве акцепторов пептида, в то время как в составе аминоацил-тРНК влияние аминокислотного остатка, по видимому, несущественно. Из аминокислотных эфиров аденозина высокой активностью обладают А-Phe-Н и А-Trp-Н и практически не акцептируют пептиды А-Trp-Н и А-Gly-Н. Активность эфиров остальных аминокислот колеблется в широких пределах и зависит при этом от условий испытаний [3].

Акцепторная активность аминокислотных эфиров динуклеозидфосфатов несколько отличается от активности соответствующих аминоациладенозинов. Так, высокоактивными акцепторами пептида являются СрА-Phe-Н [4] и Ср6Me₂А-NH-Phe-Н [5]. В то же время С2'p5'А-Phe-Н практически неактивен [6], а СрА-Gly-Н обладает значительно меньшей пептидакцепторной способностью [7], чем соответствующий фенилаланиновый эфир. Среди амидоаналогов некоторой активностью обладал Ср6Me₂А-NH-Gly-Н, а Ур6Me₂А-NH-Gly-Н, Ср6Me₂А-NH-Gly-Н и Ар6Me₂А-NH-Gly-Н вообще не связывались с рибосомами [5, 8].

Используемые сокращения: А-участок ПТЦ рибосом — акцепторный участок пептидилтрансферазного центра рибосом; Ср6Me₂А-NH₂-цитидилл-(3'-5')-9-(β-D-3'-дезоксип-3'-аминорибофуранозил)-N⁶-диметиладенин; Ур6Me₂А-NH₂, Ср6Me₂А-NH₂, Ар6Me₂А-NH₂ расшифровываются по аналогии с Ср6Me₂А-NH₂; С2'p5'А — цитидилл-(2'-5')-аденозин, А-Phe-Н — 2'-(3')-фенилаланиладенозин; сокращения остальных аминокислотных эфиров нуклеотидов образованы аналогично.

Все эти факты позволили нам предположить, что пептидакцепторная активность низкомолекулярных модельных субстратов определяется не только наличием необходимых элементов структуры, но и общей конформацией молекулы. Именно это конформационное соответствие А-участку ПТЦ дает возможность субстрату проявлять акцептирующие свойства.

С этой целью нами был изучен ряд фенилаланиновых эфиров (III) модифицированных динуклеозидфосфатов (I) (схема), где В — нуклеиновое основание, R' — Вос-Phe- или Вос — Gly-, R'' — Phe- или Gly-.



Выбор исходных соединений (I) в качестве моделей динуклеозидфосфатов мотивирован тем, что по своим физико-химическим и конформационным свойствам они довольно близки к соответствующим природным динуклеозидфосфатам [9]. В то же время аминоацилирование их удается осуществлять направленно по 2',3'-гидроксилам концевого аденозина. Кроме того, изученные соединения (III, R'' = Phe-) содержат элементы структуры, уже сами по себе достаточные для проявления пептидакцепторной активности (фрагмент в (III), обведенный на схеме пунктиром). Остальная часть молекулы может оказывать влияние на конформацию этого остатка аденозина, искажая ее за счет стэкинга оснований или по какой-либо другой причине. Таким образом, эти соединения можно представить как частично заторможенные конформационные состояния А-Phe-Н.

Синтез 3'(2')-О-аминокислотных эфиров (II, В = Ade, Cyt, Ura, R = Вос-Phe-) проводили на основе разработанного ранее метода аминоацилирования нуклеотидов [10]. Очистку эфиров (II) от исходных соединений и 2',3'-диаминоацильных эфиров модифицированных динуклеозидфосфатов проводили при помощи распределительной хроматографии на силикагеле или бумаге. Бутилоксикарбонильную защиту удаляли трифторуксусной кислотой, после чего соединения (III, В = Ade, Cyt, Ura, R'' = Phe-) испытывали как акцепторы пептида в рибосомах. Аналогично был получен глициновый эфир (III, В = Cyt, R'' = Gly-). Полученные соединения представляют собой 3'(2')-О-аминокислотные эфиры (I), поскольку их УФ-спектры свидетельствуют об отсутствии замещения по аминокислотным основаниям, а электрофоретическая подвижность, соотношенная с подвижностями веществ известной структуры, указывает на наличие в молекуле (I) одного остатка аминокислоты. Все аминокислотные эфиры (III) в слабощелочной среде гидролизовались до (I) и аминокислот с той же скоростью, что и аминокислотные эфиры адениловой кислоты [10]. Условия синтеза эфиров (II) и характеристики полученных соединений (II) и (III) приведены в табл. 1.

На примере динуклеозидфосфата (I, В = Cyt) и имидазолида трифторацетата фенилаланина была также показана возможность синтеза сложных эфиров (III) из (I) и имидазолидов N-протонированных аминокислот в условиях, разработанных для аминоацилирования динуклеозидфосфатов [11]. Выход соответствующего эфира (III) составил 9%, однако, несмотря на низкий выход, преимуществом метода можно считать быстроту процедуры синтеза и выделения продукта (III).

Испытание синтезированных аминокислотных эфиров (III) на пептидакцепторную активность проводили как в матричной, так и безматрич-

Таблица 1

3'(2')-О-аминокислотные эфиры аналогов динуклеозидфосфатов

В	R'	Эфиры (II)			Эфиры (III)			
		избыток имидазолида по отношению к эфирам (I)	выход, %	R _f (система)	R''	E _{Gly}	λ _{макс.} нм	R _f (I)
Ade	Вос-Phe-	15	7	0,3(2)	Phe	1,15	260	—
Cyt	»	25	29	0,66(I)	»	1,24	264	0,16
»	»	15	12	0,66(I)	»	1,24	264	0,16
»	Вос-Gly-	25	22	0,55(I)	Gly-	1,22	264	0,12
»	»	15	11	0,55(I)	»	1,22	264	0,12
Ura	Вос-Phe-	25	40	0,56(I)	Phe	0,9	260	0,30
»	»	15	26	0,56(I)	»	0,9	260	0,30

Таблица 2

Зависимость пептидакцепторной активности эфира (III, В = Cyt, R'' = Phe-) от концентрации (в сравнении с пурамином) *

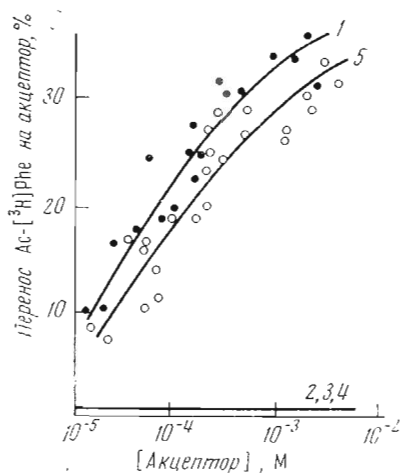
Акцептор	Концентрация акцептора ×10 ⁵ , М	Осталось Ac-Phe-тРНК ** после инкубации, имп/мин	Перенесено на акцептор (за вычетом неспецифического переноса)	
			имп/мин	%
III, В-Cyt	4	9500	2125	16,5
»	7	8480	3160	24,5
»	12	8150	3490	27,8
»	27	7600	4040	31,3
»	40	7710	3930	30,5
»	84	7280	4360	34,0
»	144	7290	5190	40,3
Пурамицин	6,6	9460	2180	17,0
»	13	8695	2945	23,0
»	26	8430	3210	25,0
»	33	7425	4215	32,8
»	66	7860	3780	30,2
»	80	7700	3940	30,7
»	170	5380	5260	41,0

* Приведены результаты инкубаций в системе без матрицы. В системе с матрицей наблюдалась аналогичная зависимость.

** Радиоактивность внесенной в каждую пробу Ac-[³H]Phe-тРНК 12850 имп/мин. Неспецифический фон 1110 имп/мин.

ной рибосомальных системах с рибосомами *E. coli* штамма MRE-600. В качестве донора пептида была использована Ac- [³H] Phe-тРНК. Активность соединений сравнивали с активностью пурамицина в данной системе.

Как видно из рисунка и табл. 2, высокой пептидакцепторной активностью обладал исключительно (III, В = Cyt, R'' = Phe-), моделирующий CpA-Phe-H. Его акцептирующая способность даже выше, чем у пурамицина, что соответствует литературным данным для природного CpA-Phe-H [4, 5]. Отсутствие пептидакцепторной активности у (III, В = Ade, R'' = Phe и В = Ura, R'' = Phe-), включающих остаток A-Phe-H, трудно объяснить чем-либо, кроме значительного конформационного изменения этого остатка, вызванного заместителями В (Ade или Ura) по сравнению с его формой в pA-Phe-H или в (III, В = Cyt, R'' = Phe-). С этой точки зрения становится понятным также отсутствие пептидакцепторной активности у C2'p5'A-Phe-H [6], что не укладывалось в рамки опубликованной



Акцепторная активность аминокислотных эфиров — аналогов динуклеозидфосфатов (III). 1 — В = Cyt, R" — Phe-; 2 — В = Cyt, R" = Gly-; 3 — В = Ade, R" = Phe-; 4 — В = Ura, R" = Phe-; 5 — пурамицин (○)

такого заместителя нуклеиновое основание В, присоединенное достаточно гибкой углеводородной цепочкой, определяющим, по-видимому, является взаимодействие оснований В и Ade.

Экспериментальная часть

ТСХ проводили на пластинках с FND-целлюлозой (ГДР), препаративную хроматографию осуществляли на бумаге FN-18 (ГДР) и силикагеле Л 100/160 (ЧССР). Хроматографические системы для разделения: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 3 : 2 (1); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 78 : 17 : 5 (2). Электрофорез проводили на бумаге «Whatman» 1, 800 В, при градиенте потенциала 22 В/см, 1 ч, в 6%-ной уксусной кислоте и измеряли подвижность относительно глицина (E_{Gly}). Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометры СФ-4а и «Spectrum UV-VIS» (ГДР).

В работе использовали следующие препараты: [3H] фенилаланин, удельная активность 6 Ки/ммоль фирмы «Amersham» (Англия), пурамицин фирмы «Serva» (Швейцария), неорганические соли квалификации о. с. ч. фирмы «Реаким» (СССР). Рибосомы *E. coli* штамма MRE-600 выделяли так же, как описано в работе [14]. [3H]Phe-тРНК получали из суммарной тРНК или обогащенной на 18% тРНК^{Phe} из *E. coli* и [3H]фенилаланина по методу [15]. Радиоактивность продуктов, осажденных с помощью трихлоруксусной кислоты, измеряли в толуольном сцинтилляторе на нитроцеллюлозных фильтрах AUFS (ЧССР) и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 фирмы «Intertechnique» (Франция).

3'(2')-О-трет-бутилоксикарбониламинокислотные эфиры аналогов динуклеозидфосфатов (II). К 0,1 ммоль соединения (I)* (Li^+ - или NH_4^+ -форма), растворенного в 1,5 мл воды, добавляли 0,3 мл раствора имидазолида N-Вос-аминокислоты в диметилформамиде, полученного из 1,5 ммоль Вос-аминокислоты и 1,6 ммоль N,N'-карбонилдимидазола (в случае Вос-Phe для полного растворения добавляли 0,6 мл ацетонитрила). Реакционную смесь перемешивали 2,5 ч при 20°, осаждали 50 мл ацетона, центрифуги-

* Аналоги динуклеозидфосфатов (I) были любезно предоставлены канд. хим. наук В. Л. Флорентьевым (Институт молекулярной биологии).

ранее модели структуры А-участка ПТЦ, постулирующей специфические зоны связывания остатков цитозина, аденина и ароматического кольца фенилаланина [12]. В использованных нами условиях (безматричная система по Монро [13]) неактивным оказался также и аналог СрА-Gly-H.

Таким образом, из всей совокупности литературных данных [1, 2], а также полученных нами сведений можно сделать заключение, что для проявления пептидакцепторной активности субстрата, содержащего аминокислотный остаток аденозина, необходимо совокупное влияние заместителя по 5'-гидроксилу аденозина и аминокислотного остатка, определяющих конформацию модельного акцептора. Что касается непосредственного влияния заместителя по 5'-гидроксилу, то, как показано на данных модельных соединениях (III), содержащих в качестве

ровали, осадок промывали ацетоном, растворяли в 0,5 мл воды и хроматографировали эфир (II, B = Ade, R' = Вос-Phe-) на пластинке с силикагелем в системе 2, а эфир (II, B = Cyt, Ura, R' = Вос-Phe-, Вос-Gly-) — на бумаге в системе 1. Соединения (II) элюировали водой, лиофилизировали и высушивали в вакууме над P₂O₅. Выходы и значения R_f приведены в табл. 1.

3'(2')-O-L-аминокислотные эфиры аналогов динуклеозидфосфатов (III).

а) Вос-аминокислотные эфиры (II) растворяли в 0,5 мл абс. трифторуксусной кислоты при 0°, встряхивали 15 мин при 0°, упаривали при 10 мм рт. ст. и высушивали при 0,1 мм рт. ст. Остаток растворяли в 0,1 мл воды, центрифугировали, вещества из раствора осаждали 50 мл ацетона, центрифугировали и осадок сушили в вакууме над P₂O₅. Значения R_f и E_{Gly} приведены в табл. 1.

б) K 0,1 ммоль (I, B = Cyt) в 2,0 мл воды добавляли 0,5 мл раствора имидазолида трифторацетата фенилаланина в формамиде (получен из 1,5 ммоль трифторацетата фенилаланина и 1,65 ммоль N,N'-карбонилдимидазола), перемешивали 1,5 ч, осаждали 50 мл ацетона, центрифугировали, осадок растворяли в воде, раствор наносили на бумагу и проводили электрофорез. Соединение (III) элюировали водой и раствор лиофилизировали. Выход 9%.

Гидролиз эфиров (III) и идентификацию продуктов гидролиза проводили по методике [10].

Проверка пептидакценторной активности эфиров (III) в двух бесклеточных системах с рибосомами *E. coli*. Реакционная смесь для безматричной системы содержала в объеме 0,15 мл: Ac-[³H] Phe-тРНК — (5—10) · 10³ имп/мин с удельной активностью 10⁵ имп на 1 мг тРНК, 3 ОЕ рибосом при λ 260 нм, 0,057 М трис-НСl-буфера (рН 7,6), 0,4М КСl, 0,02М MgCl₂ и исследуемые соединения в концентрациях, указанных в табл. 2. Реакцию начинали прибавлением метилового спирта до конечной концентрации 33%. Пробы инкубировали 1 ч при 24°. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной трихлоруксусной кислоты, осадок фильтровали на нитроцеллюлозных фильтрах. Перенос Ac-[³H]Phe с Ac-[³H] Phe-тРНК на акцептор определяли по разности между радиоактивностью, оставшейся на фильтрах в присутствии и в отсутствие акцептора.

в) Реакционная смесь для рибосомальной системы в присутствии поли(U) содержала в объеме 0,1 мл: 0,05М трис-НСl-буфер (рН 7,6), 0,01М MgCl₂, 0,05М КСl, 3 ОЕ рибосом при λ 260 нм, 0,7 ОЕ поли(U) при λ 260 нм и исследуемые соединения в концентрациях, указанных в табл. 2. Пробы инкубировали 20 мин при 30°. Дальнейшую обработку проводили так же, как описано выше.

Авторы выражают глубокую признательность В. Л. Флорентьеву за предоставленные соединения и помощь при обсуждении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Готтих В. П., Красевский А. А. (1971) в сб. Молекулярные основы биосинтеза белков, «Наука», М.
2. Готтих В. П., Красевский А. А., Куханова М. К. (1974) в сб. Успехи биологической химии, 15, 25—64.
3. Rychlik I., Cerna J., Chládek S., Pulkrabek P., Zemlička J. (1970) Eur. J. Biochem., 16, 136—148.
4. Ringer D., Chládek S. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 56, 760—766.
5. Vanin E. F., Greenwell Ph., Symons R. H. (1974) FEBS Lett., 40, 124—126.
6. Hengesh E. J., Morris A. J. (1973) Biochim. et biophys. acta, 299, 654—661.
7. Rychlik I., Chládek S., Zemlička J. (1967) Biochim. et biophys. acta, 138, 640—643.
8. Symons R. H., Harris R. J., Clarke L. P., Wheldrake J. F., Elliott W. H. (1969) Biochim. et biophys. acta, 179, 248—256.
9. Михайлов С. П., Крицын А. М., Колобушкина Л. И., Флорентьев В. Л. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 915—916.
10. Gottikh V. P., Kravetsky A. A., Tarusova N. B., Purygin P. P., Tsilevich T. L. (1970) Tetrahedron, 26, 4419—4433.

11. Цилевич Т. Л., Тарусова Н. Б., Готтих Б. П. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 916—921.
12. Harris R. J., Symons R. H. (1973) Bioorg. Chem., 2, 286—292.
13. Monro R. E., Cerna J., Marker K. A. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 1042—1046.
14. Lessard J. L., Pestka S. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6909—6912.
15. Lewin J. C., Nirenberg M. (1968) J. Mol. Biol., 34, 467—478.

Поступила в редакцию
14.VII.1975

THE SYNTHESIS AND PEPTIDE ACCEPTOR PROPERTIES OF AMINO ACID ESTERS OF DINUCLEOSIDE PHOSPHATE ANALOGS

TARUSSOVA N. B., VICTOROVA L. S., TSILEVICH T. L.,
VIGHESTANE K. Y., KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A.,
GOTTIKH B. P.

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

The models of natural 3'(2')-O-aminoacyl dinucleoside phosphates, where the ribose of the 5'-end nucleotide was replaced by the hydroxypropyl residue, were synthesized using the imidazole method. The obtained compounds were investigated as peptide acceptors in cell-free ribosomal system with or without template. It was found that only phenylalanyl ester of CpA analog is active as peptide acceptor.
