



УДК 547.962.32

ТИОАЦИЛЬНЫЕ ЭФИРЫ НУКЛЕОТИДОВ: СИНТЕЗ 3'(2')-О-(N-АЦЕТИЛТИОЛЕЙЦИЛ)- АДЕНОЗИН-5'-ФОСФАТА И ЕГО ПЕПТИДДОНОРНАЯ АКТИВНОСТЬ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ С РИБОСОМАМИ

*Ажаев А. В., Котусов В. В., Озолс А. М.,
Викторова Л. С., Кужанова М. К., Краевский А. А.,
Готтих Б. П.*

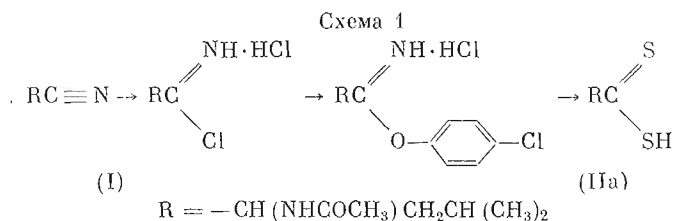
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Имидазолидным методом, исходя из N-ацетилдитиолейцина, 3-метилдитиомасляной и дитиопропионовой кислот, конденсацией с аденозин-5'-фосфатом синтезированы 5'-фосфаты 3'(2')-О-(N-ацетилтиолейцил)аденозина, 3'(2')-О-(3-метилтиобутирил)аденозина и 3'(2')-О-тиопропионаденозина соответственно. Показано, что 3'(2')-О-(N-ацетилтиолейцил)аденозин-5'-фосфат обладает пептиддонорной активностью в бесклеточной системе с рибосомами *E. coli*. Выделение в результате инкубация с рибосомами N-ацетилтиолейцилфенилаланина указывает на способность рибосом бактерий катализировать синтез тиоамидной связи.

N-Ациламинокислотные эфиры аденозин-5'-фосфата широко используются в качестве модельных субстратов пептидтрансферазы рибосом *E. coli* [1, 2]. С точки зрения изучения механизма действия пептидсинтезирующего центра рибосом известный интерес представляют аналоги N-ациламинокислотных эфиров, модифицированные по нуклеотидной или аминокислотной частям молекулы.

Ранее нами был разработан метод синтеза 3'(2')-О-тиобензоилнуклеозид-5'-фосфатов [3]. В этой работе сообщается о распространении метода на получение эфиров аденозин-5'-фосфата и алифатических дитиокислот и об исследовании пептиддонорных свойств этих соединений в бесклеточной рибосомальной системе.

N-Ацетилдитиолейцин (IIa) синтезировали по схеме 1, исходя из нитрила N-ацетиллейцина (I).



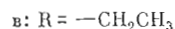
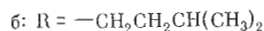
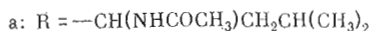
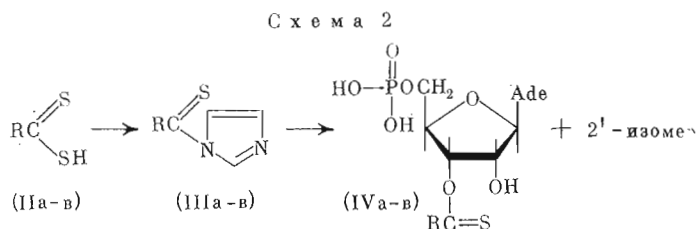
Дитиопропионовую и 3-метилдитиомасляную кислоты получали из этилмагнийбромида и 3-метилбутилмагнийбромида и сероуглерода известным методом [4]. Все синтезированные дитиокислоты были светло-

Оптические свойства дитиокислот (IIa-в)

Растворитель	Дитиопропионовая кислота (IIв)		N-Ацетилдитиолейцин (IIа)		3-Метилдитиомасляная кислота (IIб)	
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ)					
n-Пентан	308 (7998)	411 (106)	340 (7278)	411 (132)	—	—
1,2-Дихлорэтан	344 (6998)	411 (87)	344 (6237)	411 (76)	—	—
Тетрагидрофуран	—	—	345 (6081)	411 (70)	313 (7228)	411 (97)
Этанол	344 (6397)	411 (112)	345 (5916)	411 (80)	—	—
Вода	349 (5794)	400 (176)	—	—	—	—
0,1 н. КОН	336 (5395)	400 (146) плечо	335 (5636)	400 (121) плечо	—	—
0,1 н. H ₂ SO ₄	308 (6295)	439 (102)	—	440 (92)	—	—

желтыми маслами, за 2 сут полностью разлагающимися на воздухе. Их структура подтверждалась ЯМР, ИК- и УФ-спектрами (табл. 1).

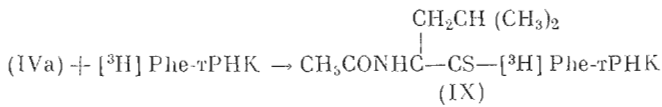
Взаимодействием дитиокислот (II) и N,N'-карбонилдиимидазола получены соответствующие N-имидазолиды (III), которые конденсацией с аденозин-5'-фосфатом превращены в 3'(2')-O-тиоацильные эфиры (IV) (схема 2).



Структура эфиров (IV) подтверждалась известным способом [3]. Низкий выход соединения (IVв) (табл. 2) объясняется сложностями выделения вследствие близости его хроматографической подвижности с подвижностью аденозин-5'-фосфата. Спектры ПМР всех эфиров (IV) (табл. 3) характеризовались двумя наборами сигналов, отнесенных к 2'- и 3'-изомерам [5, 6]. В равновесной смеси преобладал 3'-изомер, но при повышении температуры доля 2'-изомера увеличивалась. Для сравнения приведены данные спектров ПМР 3'(2')-O-(N-ацетиллейцил)аденозин-5'-фосфата (V) и 3'(2')-O-(4-метилвалероил)аденозин-5'-фосфата (VI), синтезированных по методу [7]. Сигналы H-1'-протонов 3'- и 2'-изомеров тиоацильных эфиров (IVa) и (IVб) несколько сдвинуты в слабое поле по сравнению с ацильными эфирами (V) и (VI), по-видимому, вследствие большего анизотропного влияния тиокарбонильной группы.

Испытание синтезированных тиоэфиров (IVa) и (IVб) на пептидонорную активность осуществляли в бесклеточной системе с рибосомами *E. coli*. В качестве акцептора пептида использовали [³H] Phe-tРНК. Активность соединений сравнивали с активностью эфира (V). Реакцию проводили по схеме 3 в присутствии цитидин-5'-фосфата, стимулирующего активность мононуклеотидных эфиров аминокислот [8, 9].

Схема 3



Как видно из рис. 1, тиоэфир (IVa) имеет заметную пептиддонорную активность, достигающую 60% активности соединения (V). В то же время эфиры (IVб), (VI), 3'(2')-О-тиобензоиладенозин-5'-фосфат (VII) и 3'(2')-О-бензоиладенозин-5'-фосфат (VIII) пептиддонорных свойств не проявляли. Для проверки рибосомальной природы этой реакции было испытано ингибирующее действие ряда антибиотиков, блокирующих образование пептидной связи в используемой системе [1, 2, 8, 9]. Из табл. 4 видно, что антибиотики хлорамфеникол и линкомицин эффективно ингибируют образование N-ацетилтиолейцилфенилаланил-tPHK (IX).

Структура продуктов реакции, катализируемой рибосомами, доказывалась двумя способами: сравнением хроматографической подвижности со специально синтезированным свидетелем; подтверждением наличия CSNH-группы. В первом случае инкубационная смесь подвергалась щелочному гидролизу, образующийся при этом ацетилтиодипептид после подкисления экстрагировался этилацетатом. Полученный таким образом

Таблица 2

Выходы и хроматографические свойства синтезированных соединений

Вещество	Выход, %	R_f в системе В	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{вода}}$, нм
(IVa)	36,8	0,60	259
(V)	42,5	0,58	259
(IVб)	9,0	0,30	259
(IVб)	43,0	0,50	259
(VI)	62,0	0,48	259
Аденозин-5'-фосфат	—	0,20	

Таблица 3

Данные спектров ПМР эфиров (IV) – (VI)

Вещество	Тип протона	δ , м.д. (J, Гц)	
		2'-изомер	3'-изомер
(IVa)	8-Н		8,62 с
	2-Н		8,12 с
	1'-Н	6,39 д (4,0)	6,26 д (6,5)
	5'-Н		4,08–4,26 м
	CH ₃ CO	1,85 с	1,96 с
(IVб)	8-Н		8,53 с
	2-Н		8,08 с
	1'-Н	6,40 д (4,0)	6,25 д (6,0)
	5'-Н		3,95–4,23 м
	CH ₃ CO	1,84 с	1,97 с
(V)	8-Н	8,49 с	8,34 с
	2-Н		7,93 с
	1'-Н	6,09 д (5,0)	5,95 д (7,0)
	5'-Н		4,06–4,24 м
	CH ₃ CO	1,84 с	1,97 с
(VI)	8-Н	8,48 с	8,50 с
	2-Н	8,19 с	8,21 с
	1'-Н	6,21 д (5,0)	6,10 д (7,0)
	5'-Н		4,10–4,25 м
	CH ₃ CO	1,84 с	1,97 с

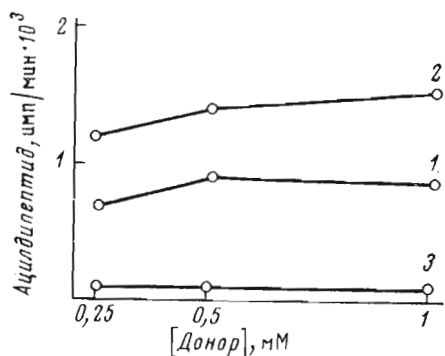


Рис. 1

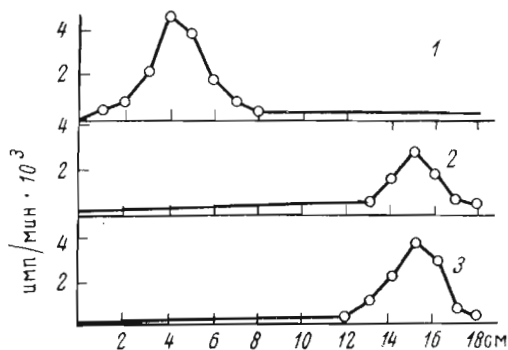


Рис. 2

Рис. 1. Пептидонорная активность модельных доноров при различных их концентрациях в реакции с $[^3\text{H}]\text{Phe-tPНК}$: 1 — (IVa), 2 — (V), 3 — (IVb), (VI), (VII) и (VIII). В пробу вносили $(3-4) \cdot 10^4$ имп/мин $[^3\text{H}]\text{Phe-tPНК}$

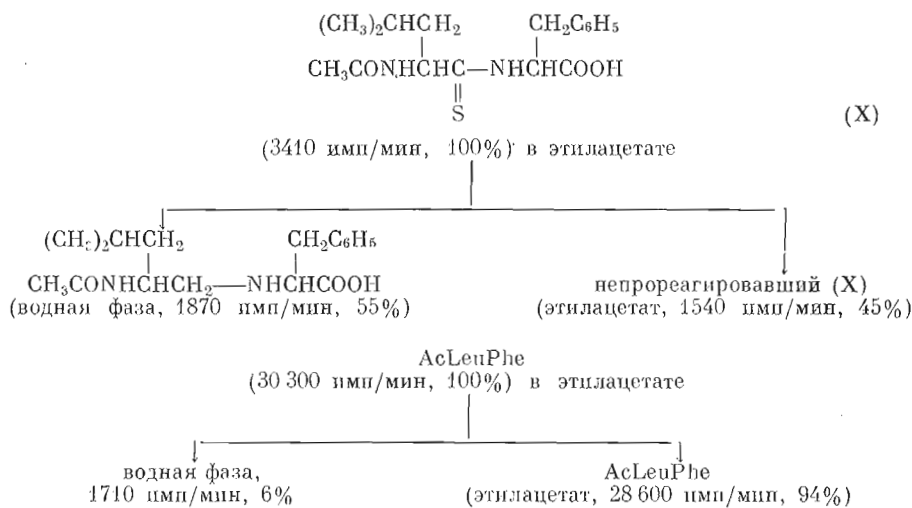
Рис. 2. Хроматограмма дипептида (X) на бумаге: 1 — фенилаланин, 2 — (X), синтезический образец, 3 — (X), синтезированный с участием рибосом

дипептид $\text{CH}_3\text{CONHCH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{CS-}[^3\text{H}]\text{Phe}$ (X) идентичен синтезическому свидетелю (рис. 2).

Во втором случае после экстракции продукта реакции этилацетатом восстанавливали его тиаомидную связь в присутствии скелетного никеля. Затем никель отделяли и проводили экстракцию разбавленной соляной кислотой (схема 4). Продукт восстановления экстрагировался в водную фазу. При этом в водном слое обнаружено 55% радиоактивного материала. Для сравнения подобную обработку проводили с веществом, получающимся после реакции эфира (V) с $[^3\text{H}]\text{Phe-tPНК}$. Водный слой содержал лишь 6% радиоактивности.

Схема 4

Обработка продуктов реакции с рибосомами над скелетным никелем



Таким образом, бактериальные рибосомы способны катализировать синтез тиаомидной связи. Ранее было показано, что рибосомы *E. coli* катализируют образование сложнэфирной [10] и тиаэфирной [11] связей. Авторы указанных работ использовали для этого модифицированные акцепторы пептида. Активным компонентом при образовании пептидной связи в рибосоме с энергетической точки зрения является донор пептида,

Таблица 4

Действие антибиотиков на пептиддонорную активность соединения (IVa)

Антибиотики (1 мМ)	Образование (IX)	
	имп/мин	%
Контроль *	1550	100
Хлорамфеникол	50	3
Линкомицин	30	2

* В качестве контроля приведен опыт без антибиотика.

Таблица 5

Влияние ацильных и тиоацильных эфиров аденозин-5'-фосфата на реакцию 3'(2')-O-(N-формилметионил)аденозин-5'-фосфата с [³H]Phe-тРНК

Концентрация исследуемых веществ, мМ	Реакция, %			
	(VI)	(VIII)	(IVб)	(VII)
Контроль *	100	100	100	100
0,5	98	89	98	99
1,0	97	84	93	98
2,0	95	84	88	95

* Инкубационная смесь (принята за 100%) содержала 0,5 мМ 3'(2')-O-(N-формилметионил)аденозин-5'-фосфата.

поэтому модификация доноров представляет собой новый подход к изучению пептидсинтезирующего центра рибосом.

Как упоминалось выше, соединения (IVб), (VI), (VII) и (VIII) пептиддонорных свойств не проявляли. Эфиры (IVб) и (VI) — это структурные аналоги соединений (IVa) и (V), но в них отсутствует CH_3CONH -группа. Поэтому было интересно понять причину столь большого различия в свойствах этих близких по структуре соединений. Отсутствие пептиддонорной активности эфиров (IVб) и (VI) можно объяснить либо энергетическими факторами (недостатком энергии сложноэфирной или тиоэфирной связи для прохождения реакции с акцептором пептида), «неправильным» связыванием с донорным участком пептидилтрансферазы рибосом или же полным отсутствием взаимодействия с последним. Нами было проведено исследование ингибирующей активности этих соединений при катализируемой рибосомой реакции 3'(2')-O-(N-формилметионил)аденозин-5'-фосфата с Phe-тРНК [1]. Как видно из табл. 5, ни одно из названных соединений не ингибировало эту реакцию, что говорит об отсутствии их связывания пептидилтрансферазой рибосом. Из этих данных можно заключить, что наличие амидной группировки в модельных донорах пептида весьма существенно для проявления ими пептиддонорной активности. Этот вывод косвенно свидетельствует в пользу предложенной гипотезы об участии амидных групп во взаимодействии субстратов с донорным участком рибосом [12].

Экспериментальная часть

УФ-спектры регистрировали на спектрометре Specord UV-VIS (ГДР), ИК-спектры — на спектрометре Specord IR (ГДР), спектры ПМР — на спектрометре BS 487C (ЧССР) с рабочей частотой 80 МГц в D_2O с *трет-*

бутанолом в качестве внутреннего стандарта или в CDCl_3 с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. ТСХ проводили на стандартных пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) в системах: дихлорэтан — метанол, 9 : 1 (А), *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 78 : 17 : 5 (Б), *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 3 : 2 (В).

Дитиопропионовая и 3-метилдитиомасляная кислоты (IIб, в) получены соответственно из этилбромида и 3-метилбутилбромида аналогично методике [5]. Желтые, быстро разлагающиеся масла. Выходы 34 и 27% соответственно. ИК (CHCl_3), ν , см^{-1} : 1125 (C=S) для обоих соединений.

Нитрил N-ацетиллейцина (I) получали из N-ацетиллейцинамида [6] аналогично методике работы [7]. Выход 52%. ИК (CHCl_3), ν , см^{-1} : 2210 ($-\text{C}\equiv\text{N}$). ПМР в CDCl_3 , δ , м.д.: 2, 0с (3H, CH_3CO), 0,85д (6H, $J_{\text{CH}_3-\text{CH}}$ 6 Гц, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$).

N-Ацетилдитиолейцин (IIа). Растворяли 0,5 г нитрила N-ацетиллейцина (I) в 10 мл сухого дихлорметана, охлаждали до 0° и к раствору приливали 30 мл 20% хлористого водорода в эфире. Реакционную смесь оставляли на 2 ч при 20°, упаривали досуха, остаток растворяли в 10 мл сухого диметилформамида, добавляли 0,84 г *n*-хлорфенола и оставляли на ночь. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 3 мл пиридина, вносили 3 мл жидкого H_2S , смесь помещали в стальную бомбу и оставляли на ночь при 37°. Пиридин упаривали, добавляли 25 мл дихлорэтана и 25 мл 10% HCl, органический слой отделяли, дважды промывали водой, сушили Na_2SO_4 , концентрировали до объема 1,5 мл и наносили на колонку (25 × 1,5 см) с силикагелем (Silica Gel L 100/160, Chemapol, ЧССР). Элюцию проводили системой А (контроль — ТСХ в системе А). Желтое, разлагающееся на воздухе масло. Выход 0,39 г (58%), R_f 0,60 в системе А. ИК (CHCl_3), ν , см^{-1} : 1690 (амид I), 1570 (амид II), 1125 (C=S); ПМР (CDCl_3), δ , м.д.: 1,81 с (3H, CH_3CO), 0,80д (6H, $J_{\text{CH}_3-\text{CH}}$ 6 Гц, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$).

3'(2')-O-(N-Ацетилтиолейцил)аденозин-5'-фосфат (IVа). К раствору 0,35 г N-ацетилдитиолейцина (I) в 2 мл сухого, свободного от перекисей эфира добавляли 0,28 мг N,N'-карбонилдиимидазола (Merck, ФРГ) и смесь перемешивали 1 ч при 20°. Эфир упаривали, остаток растворяли в 1 мл сухого диметилформамида и приливали раствор 0,82 г динатриевой соли аденозин-5'-фосфата (Reanal, ВНР) в 1 мл воды. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 20°, осаждали ацетоном, осадок отделяли центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин, 0°), промывали ацетоном, эфиром, сушили в вакууме, растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку (25 × 1,5 см) с силикагелем G (Woelm, ФРГ), уравновешенную системой Б. Вещество элюировали системой Б (30 мл/ч). К объединенным фракциям добавляли равный объем этилацетата и вещество экстрагировали водой. Водные экстракты объединяли, промывали этилацетатом и лиофильно высушивали. В отдельных опытах хроматографию проводили на пластинках (30 × 20 см) с силикагелем (Silica Gel LSL₂₅₄, 5/40 μ , Chemapol, ЧССР) в системе В. Вещество элюировали водой и лиофильно высушивали. Выход 0,23 г (36,8%).

5'-Фосфаты 3'(2')-O-(4-метилвалероил)аденозина (VI) и 3'(2')-O-(N-ацетиллейцил)аденозина (V) синтезировали по описанному методу [7], *3'(2')-O*-тиопропиониладенозина (IVв) и *3'(2')-O*-(3-метилтибутирил)аденозина (IVб) — по методу работы [3].

Рибосомы выделяли из бактерий *E. coli* MRE-600 по известной методике [13]. Препарат суммарной тРНК из *E. coli* В ферментативно аминацилировали [^3H]фенилаланином с удельной активностью 11 Ки/ммоль по методу [14]; 1 μ моль [^3H]Phe-тРНК содержал $1,3 \times 10^4$ имп/мин. Радиоактивность просчитывали на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). Донорную реакцию проводили по методике [9]. Для стимулирования реакции применяли цитидин-5'-фосфат (Reanal, ВНР). После проведения инкубации продукты реакции гидролизovali 1 н. NaOH и после подкисления ацилдипептиды экстрагировали этилацетатом.

Идентификацию ацетилтиодипептида $CH_3CONH[CH_2CH(CH_3)_2]CS \cdot [^3H]Phe$ (X), выделенного после инкубации с рибосомами и экстракции этилацетатом, проводили двумя методами.

1. Идентифицировали соединение (X) сравнением с химически синтезированным свидетелем с помощью хроматографии на бумаге Ватман 1 в системе Б (см. рис. 2).

2. Экстракты продукта (X) и AcLeuPhe в этилацетате, полученные в результате реакций на рибосомах, промывали водой (1/3 объема), сушили Na_2SO_4 и восстанавливали над порциями по 20—30 мг скелетного никеля, встряхивая в течение 30 мин. К реакционным массам добавляли по 1 мл 20% HCl и после полного растворения никеля органическую и водную фазы разделяли. Органическую фазу промывали 1 мл воды и высушивали Na_2SO_4 ; 1 мл ее просчитывали в 15 мл сцинтилляционной смеси толуоловый сцинтиллятор — метилцеллозольв (2 : 1). Водную фазу нейтрализовали 3 н. NaOH с добавлением 10—20 мг EDTA, аликвоту 0,2 мл просчитывали в 10 мл диоксанового сцинтиллятора. Результаты приведены в схеме 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Černa J., Rychlik I., Krayevsky A. A., Gottikh B. P. (1973) FEBS Lett., 37, 188—191.
2. Černa J., Rychlik I., Krayevsky A. A., Gottikh B. P. (1974) Acta biol. et med. Germ., 33, 877—883.
3. Azhaye V. V., Krayevsky A. A., Florientiev V. L., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 1433—1439.
4. Houbert J. (1906) Chem. Ber., 39, 3219—3226.
5. Fromageot H. P. M., Griffin B. E., Reese C. B., Sulston J. E., Trentham D. R. (1966) Tetrahedron, 22, 705—710.
6. Fromageot H. P. M., Reese C. B., Sulston J. E. (1968) Tetrahedron, 24, 3533—3540.
7. Gottikh B. P., Krayevsky A. A., Tarusova N. B., Purygin P. P., Tsilevich T. L. (1970) Tetrahedron, 26, 4419—4433.
8. Černa J. (1975) FEBS Lett., 58, 94—97.
9. Krayevsky A. A., Victorova L. S., Kotusov V. V., Kukhanova M. K., Treboganov A. A., Tarusova N. B., Gottikh B. P. (1976) FEBS Lett., 62, 101—104.
10. Fahnestock S., Neumann H., Shashoua A., Rich A. (1970) Biochemistry, 9, 2477—2483.
11. Gooch J., Hawtrey A. O. (1975) Biochem. J., 149, 209—220.
12. Krayevsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 2223—2236.
13. Lessard J. L., Restka S. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6909—6912.
14. Lewin J. G., Nirenberg M. (1968) J. Mol. Biol., 34, 467—478.

Поступила в редакцию
29.XI.1976

NUCLEOTIDE THIOACYL ESTERS: SYNTHESIS OF 3'(2')-O-(N-ACETYLTHIOLEUCYL)-ADENOSINE 5'-PHOSPHATE AND ITS PEPTIDE DONOR ACTIVITY IN THE CELL-FREE SYSTEM WITH RIBOSOMES

AZHAYEV A. V., KOTUSOV V. V., OZOLS A. M., VICTOROVA L. S.,
KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A., GOTTIKH B. P.

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

5'-Phosphates of 3'(2')-O-(N-acetylthioleucyl)-adenosine, 3'(2')-O-(3-methylthio-butyl)-adenosine and 3'(2')-O-thiopropionyladenosine were synthesized by imidazolidic method starting with N-acetyldithioleucine, 3-methylbutyric acid or dithiopropionic acid, respectively. Peptide donor activity of 3'(2')-O-(N-acetylthioleucyl)-adenosine 5'-phosphate in a cell-free system with *E. coli* ribosomes was observed. The isolation of N-acetylthioleucylphenylalanine after the reaction indicates that the ribosomes can catalyze the thioamide bond formation.