



УДК 547.963.32.04

СИНТЕЗ АНАЛОГОВ (*L*-ФЕНИЛАЛАНИНИЛ)АДЕНИЛАТА  
И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
С ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗОЙ ИЗ *E. COLI*

Лаврик О. И., Моор Н. А., Невинский Г. А.

Институт органической химии СО Академии наук СССР, Новосибирск

Получены *L*-фенилаланинил-5'-, *N*-формил-*L*-фенилаланинил-5'- и *L*-фенилаланинил-8-бром-5'-аденилаты, а также окисленный периодатом натрия *L*-фенилаланинил-5'-аденилат и его восстановленный аналог. Эти соединения охарактеризованы с помощью УФ-, ПМР-спектроскопии и методами ТСХ и БХ в нескольких системах. Исследовано взаимодействие этих аналогов с фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli*. Показано, что все аденилаты являются конкурентными по отношению к АТР ингибиторами реакции аминоацилирования тРНК с достаточно высоким сродством, что может позволить при введении подходящих активных группировок по местам модификации аминоалкиладенилата исследовать полную топографию активного центра аминоацил-тРНК-синтетаз.

В настоящее время можно считать, что аминоациладенилаты — наиболее вероятные промежуточные продукты в реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой аминоацил-тРНК-синтетазами [1—4]. Структурными аналогами аминоациладенилатов являются аминоалкиладенилаты, в которых лабильная ангидридная связь заменена на более устойчивую к гидролизу и менее реакционноспособную сложноэфирную связь [5—7]. Такие аналоги выступают эффективными конкурентными по отношению к АТР и аминокислоте ингибиторами реакций, катализируемых аминоацил-тРНК-синтетазами [7—10]. Поэтому аминоалкиладенилаты удобны для изучения топографии участка фермента, формирующего аминоациладенилат. До сих пор для таких исследований применяли модифицированные аналоги АТР и аминокислот [11—20]. Однако полученные с их помощью данные не вполне раскрывают механизм взаимодействия аминоациладенилата с ферментом.

В литературе имеются немногочисленные примеры получения модифицированных аналогов аминоалкиладенилатов. Описано получение [<sup>3</sup>H]метионинаденилата, содержащего азидогруппировку в 8-м положении молекулы [21]. Показано, что при облучении метионил-тРНК-синтетазы в присутствии этого аналога наблюдается ковалентное присоединение 5—15% радиоактивной метки. Однако нет никаких дополнительных доказательств аффинности модификации. Изолейцинил-N<sup>6</sup>-(2-аминоэтил)-5'-аденилат использован для получения аффинной смолы и обогащения на ней изолейцил-тРНК-синтетазы из *E. coli* [9].

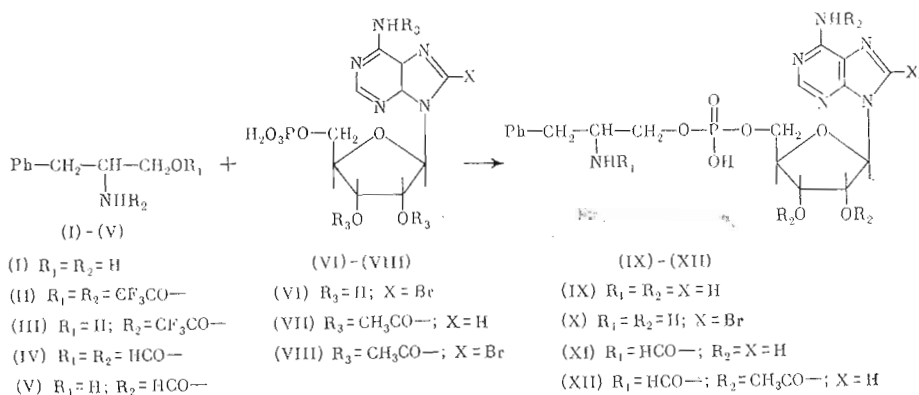
Сокращение: фенилаланинил- — PhCH<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O—.

Целью данной работы является синтез аналогов (*L*-фенилаланинил)-аденилата, модифицированных по  $\alpha$ -аминогруппе аминоспирта, пуриновому кольцу и рибозе, для оценки вклада этих частей молекулы во взаимодействие с фенилаланил-тРНК-синтетазой. Такое исследование представляет интерес для понимания механизма действия фермента, для синтеза аминокладенилатов с достаточно высоким сродством к ферменту, содержащих химически активные группировки, а также для получения на их основе аффинных смол, используемых при выделении аминоктил-тРНК-синтазы.

Восстановлением этилового эфира *L*-фенилаланина боргидридом натрия в водном спирте [22] получен аминоспирт (I), сохарактеризованный ТСХ и элементным анализом. При обработке аминоспирта (I) ангидридом трифторуксусной кислоты образуется диацетат (II). Водным гидролизом [23] снимали защитную группировку с оксигруппы. Полученный моноацетат (III) гомогенен по данным ТСХ.

Обработкой аминоспирта (I) смесью муравьиной кислоты и уксусного ангидрида по аналогии с формилированием аминокислот [24] получен диформиат (IV). Продолжительный водный гидролиз последнего давал моноформиат (V) в виде густого, плохо кристаллизующегося масла. Его гомогенность показана методом ТСХ в нескольких системах.

8-Бром-АМР (VI), триацетил-АМР (VII) синтезировали аналогично [25] и [26] соответственно. Триацетил-8-бром-АМР (VIII) получали ацетилированием 8-бром-АМР (VI) уксусным ангидридом в абс. пиридине в темноте. Данные УФ-спектров соединений (VI) и (VII) и их хроматографические характеристики соответствуют характеристикам, приведенным в литературе [25—27]. Образование триацетата (VIII) было показано методом ТСХ и БХ продукта.



Фенилаланиниладенилат (IX) и его аналоги (X) и (XI) синтезировали согласно приведенной схеме.

Конденсацию *N*-защитленного аминоспирта (III либо IV) и  $\text{N}^6, \text{O}^{2'}, \text{O}^{3'}$ -защитленного нуклеозидмонофосфата (VII либо VIII) проводили в пиридине в присутствии дидиклогексилкарбодиимида.

Ранее в работах по синтезу аминокладенилатов [7, 28] в качестве защитных групп для  $\text{NH}_2$ -группы применяли бензилоксикарбонильную и *трет*-бутилоксикарбонильную группировки. Мы использовали трифторацетильную и формильную, так как их введение проводится проще и быстрее. Кроме того, удаление трифторацетильной группировки проходит количественно в условиях снятия ацетильных групп с нуклеотидной части молекулы аминокладенилата. Формильная группировка была использована для получения аналога аминокладенилата, блокированного по аминогруппе аминоспиртовой части молекулы (XII). Она достаточно устойчива при обработке аналога (XII) 9 н. аммиаком. Вместо предлагае-

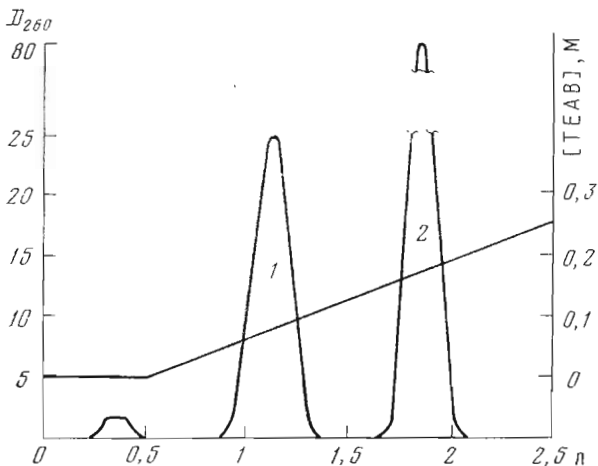


Рис. 1. Профиль хроматографии N-формилфенилаланил-аланил-5'-аденилата (XI) (1) на колонке (1,5 × 70 см) с DEAE-сефадексом А-25 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме. 2 — AMP

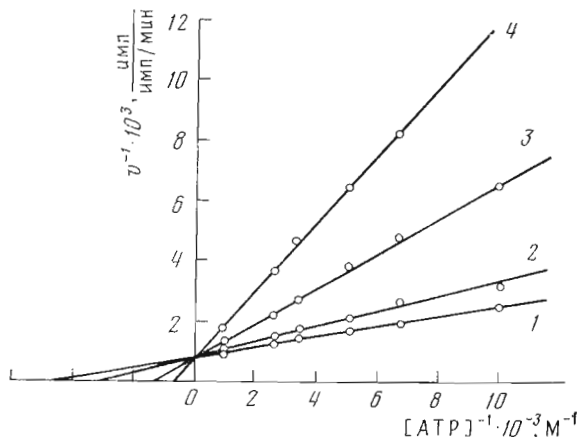


Рис. 2. Зависимость скорости аминоацелирования тРНК<sup>Phe</sup> от концентрации АТР (в обратных координатах) при различных концентрациях L-фенилаланил-3-бром-5'-аденилата (X): 1 — без ингибитора; 2 —  $1,3 \cdot 10^{-6}$  М; 3 —  $3,3 \cdot 10^{-6}$  М; 4 —  $10^{-5}$  М


мого в литературе метода очистки аминокладенилатов на колонке с силикагелем [7, 28] выделение гомогенных продуктов (IX) — (XI) проведено на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма) в градиенте концентрации бикарбоната тетрабутиламмония. Этот метод проще и дает более четкое разделение компонентов реакционной смеси. Пример такого разделения приведен на рис. 1. (Попытки выделения гомогенных продуктов на DEAE-целлюлозе не привели к желаемым результатам. Соединения (IX) и (X) элюировались с колонки с DEAE-целлюлозой водой вместе с нуклеотидным материалом реакционной смеси.) Выходы алкиладенилатов (IX) — (XI) при примененной очистке составили 25—40%, что несколько выше приведенных в литературе (15—30%), их гомогенность показана методами ТСХ и БХ в нескольких системах. Данные УФ-спектров этих соединений приведены в табл. 1. Структура соединений (IX) — (XI) подтверждена данными спектров ПМР (табл. 2). Видно, что в спектрах

Характеристики УФ-спектров аналогов *L*-фенилаланиладенилата

Соединение	рН 6		рН 11		Соединение	рН 6		рН 11	
	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$		$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$
(IX)	261,4	230	260	229,5	(XIII)	262	234	266	238
(X)	265,8	234,5	—	—	(XIV)	262	230	266	238
(XI)	261,4	230	260	229,5					

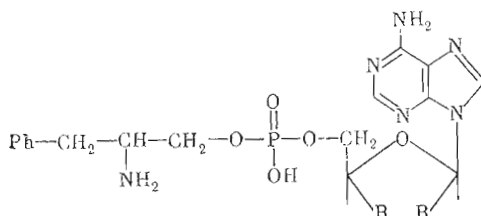
Таблица 2

Данные спектров ПМР аналогов *L*-фенилаланиладенилата и исходных соединенийВ  $^2\text{H}_2\text{O}$ , *tert*-бутанол — внутренний стандарт

Соединение	Химические сдвиги, $\delta$ , м. д. (J, Гц)						
	8-Н	2-Н	1'-Н	Рн *		рибоза	$\text{--CH}_2\text{--CH--}$ $\text{CH}_2\text{--}$ (аминоспирт)
(I)	—	—	—	7,24 с, 5Н	—	—	2,02—3,82
AMP	8,50 с, 1Н	8,04 с, 1Н	6,07 д, 1Н (5,0)	—	—	5,0—4,1	—
(IX)	8,37 с, 1Н	8,24 с, 1Н	6,07 д, 1Н (5,0)	7,14 с, 5Н	—	5,1—4,1	2,07—3,84
(X)	—	8,09 с, 1Н	6,10 д, 1Н (5,0)	7,20 с, 5Н	—	5,23—4,24	2,29—3,93
(XI)	8,47 с, 1Н	7,97 с, 1Н	6,15 д, 1Н (5,0)	7,21 с, 5Н	8,25 с, 1Н	5,02—4,1	2,68—3,82

\* Синглет уширенный.

ПМР этих соединений присутствуют сигналы протонов как аминоспиртового, так и нуклеотидного компонентов.

(XIII) R = —CH<sub>3</sub>(XIV) R = —CH<sub>2</sub>OH

Аналоги, модифицированные по рибозе, были получены окислением аденилата (IX) периодатом натрия (соединение (XIII)) и последующим восстановлением полученного продукта окисления боргидридом натрия (соединение (XIV)). Выделение гомогенных продуктов (XIII, XIV) проводили препаративной ВХ реакционных смесей. Нуклеотидный материал содержался только в одном пятне. Дополнительную проверку гомогенности

Величины констант ингибирования реакции  
аминоацилирования тРНК<sup>Ph<sup>e</sup></sup>, катализируемой  
фенилаланил-тРНК-синтетазой для аналогов  
(L-фенилаланил)аденилата

Соединение	$K_i \cdot 10^5, M$	Соединение	$K_i \cdot 10^5, M$
(IX)	$1,5 \cdot 10^{-2}$	(XIII)	3,3
(X)	$2,1 \cdot 10^{-1}$	(XIV)	3,3
(XI)	4,2		

Примечание. Все соединения были конкурентными ингибиторами реакции аминоацилирования тРНК<sup>Ph<sup>e</sup></sup> по отношению к АТР.

этих продуктов осуществляли методом ТСХ и БХ в нескольких системах. Характеристики УФ-спектров аналогов (XIII) и (XIV) приведены в табл. 1.

Для полученных аминоалкиладенилатов (IX) — (XI), (XIII) и (XIV) было исследовано их ингибирующее действие в реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli*. Из рис. 2 видно, что характер ингибирования фенилаланинил-8-бром-5'-аденилатом (X) конкурентный по отношению к АТР. Такой же тип ингибирования наблюдался и для остальных изученных аналогов. Полученные величины констант ингибирования реакции аминоацилирования по отношению к АТР приведены в табл. 3. Видно, что модификация по 8-му положению пуринового кольца (соединение (X)) приводит к уменьшению сродства аналога к ферменту на порядок по сравнению с фенилаланинил-аденилатом (IX). В то же время формилирование  $\alpha$ -аминогруппы в аминокислотной части молекулы аденилата (XI) приводит к уменьшению сродства аналога на два порядка. Столь же существенное (2 порядка) изменение сродства наблюдается при окислении рибозы в аминоалкиладенилате (XIII). Последующее восстановление диальдегидной группировки не приводит к изменению сродства полученного аналога (XIV) к ферменту по сравнению с соединением (XIII). Это свидетельствует о существенной роли неповрежденных аминокислотной группы аминокислотного остатка и рибозы в узнавании ферментом как аминоациладенилата, так и природных субстратов — аминокислоты и АТР.

По-видимому, менее существенной является модификация по 8-му положению пуринового кольца молекулы аденилата (X). Однако все использованные модификации не приводят к полной утрате ингибиторных свойств синтезируемых нами аналогов. Все аналоги имеют достаточно высокое сродство к ферменту ( $K_i \cdot 10^{-6} - 10^{-5} M$ ). В то же время модификации аминокислотной группы аминокислот приводят к снижению сродства на 2—3 порядка в случае фенилаланина [12] и тирозина [13] и к полному отсутствию связывания в случае изолейцина [11] и ряда других аминокислот [29]. Значительное уменьшение сродства аминокислот наблюдается и при введении групп, больших по размеру, чем водород либо галоген, в специфический радикал аминокислот [11, 12]. Практически единственное удобное место присоединения реакционноспособной группировки — карбоксильная группа аминокислот [11—14, 30—32].

Аналоги АТР, модифицированные по рибозе (АТР, окисленный периодат натрия, а затем восстановленный боргидридом натрия и 3'-дезоксид-АТР), полностью неактивны в реакциях, катализируемых аминокислот-тРНК-синтетазами [15, 16, 19]. Аналоги АТР, имеющие в 2'- либо 3'-положениях рибозы ОСН<sub>3</sub>-группы, неактивны в реакции аминоацилирования [15—16]. В ряде случаев они очень слабо ингибируют реакцию АТР — [<sup>32</sup>P]пирофосфатного обмена ( $K_i \cdot 2 - 5 \cdot 10^{-3} M$ ) [20]. 8-Бром-АТР для ряда

аминоацил-тРНК-синтетаз также не является ни субстратом, ни ингибитором [15—16]. В то же время избирательная модификация одной из частей аминокислотиденилата не приводит к полному исчезновению средства аналогов к ферменту ( $K_i$  не больше  $5 \cdot 10^{-5}$  М). Это согласуется с имеющимися в литературе данными об одновременном участии аминокислотной и нуклеотидной частей аминокислотиденилатов, вносящих почти одинаковый вклад в свободную энергию их связывания с аминокислотиденилатами [10].

Таким образом, введение подходящих химически активных группировок по различным положениям в аминокислотиденилатах скорее всего даст возможность получить аффинные реагенты аминокислотиденилатов с достаточно высоким сродством. По-видимому, с помощью химически активных аминокислотиденилатов возможно исследование полной топографии активного центра аминокислотиденилатов.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры регистрировали на спектрометре Specord UV VIS (ГДР), ИК-спектры — на спектрометре IR (ГДР), спектры ПМР — на спектрометре НХ-90 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на рабочей частоте 80 МГц в  $^2\text{H}_2\text{O}$  с трет-бутанолом в качестве внутреннего стандарта.

ТСХ проводили на стандартных пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (Kavalier, ЧССР) в системах: метанол — хлороформ, 1 : 9 (А), ацетон — вода, 1 : 1 (Б) и 7 : 3 (В), *n*-бутанол — метанол — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 11 : 11 : 4 (Г), этанол — ацетат аммония (1 М, рН 7,5), 7 : 3 (Д) и 5 : 2 (Е), изопропанол — конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$  — вода, 7 : 1 : 2 (Ж).

Фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* MRE-600 (КФ 6.1.1.20) была выделена согласно методу [34] с некоторыми модификациями.

*L*-Фенилаланинол (I) получали восстановлением этилового эфира фенилаланина боргидридом натрия в 50% водном спирте согласно работе [22]. Выход 85%. Т. пл. 90—91,5°. Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,23 (Б), 0,25 (В), 0,15 (А), 0,55 (Г). Найдено, %: С 71,35; Н 8,70; N 9,19.  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}$ . Вычислено, %: С 71,52; Н 8,61; N 9,27.

*N*-Трифторацетилфенилаланинол (III) получали обработкой аминокислота (I) (2,2 ммоль) трифторуксусным ангидридом (3,5 мл) в течение 16 ч при 20°. Затем раствор упаривали досуха, остаток (соединение (II)) растворили в 10 мл воды и оставляли при перемешивании на 3 ч при 20°. Раствор упаривали досуха, продукт перекристаллизовывали из метилового спирта. Выход 80%. Т. пл. 133,5—135°.  $R_f$  0,43 (А), 0,80 (Б), 0,94 (В), 0,77 (Г). Найдено, %: С 53,60; Н 4,95; F 23,08; N 5,57.  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2$ . Вычислено, %: С 53,44; Н 4,86; F 23,09; N 5,66.

*N*-Формилфенилаланинол (V) получали прибавлением к смеси аминокислота (I) (0,05 моль) и муравьиной кислоты (250 мл, 88%) уксусного ангидрида (83 мл) при температуре не выше 60°. Смесь выдерживали при 20° в течение 3 ч, добавляли 80 мл ледяной воды, оставляли на 10 ч при 20°. Затем смесь упаривали до консистенции вязкого масла. Продукт растворяли в метаноле и наносили на колонку (2 × 15 см) с силикагелем, уравновешенную смесью метанола с хлороформом в соотношении 1 : 9, и элюировали этим же раствором. Содержимое элюата проверяли на реакцию с пингидридом. Фракции, не дававшие окрашивания с пингидрином, объединяли и упаривали. Выход светло-желтого вязкого масла 70%. Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,3 (А), 0,78 (Б), 0,56 (Г).

8-Бромаденозинмонофосфат (VI) получали обработкой АМР бромной водой в 1 М ацетатном буфере, рН 4, аналогично работе [25]. Выход 75%. Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,14 (Д) и при БХ  $R_f$  0,39 (Д). УФ-спектры,  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon$ ): рН 1—262,5 (16 400); рН 11—264,5 (15 100);  $\lambda_{\text{мин}}$ , нм: рН 1—233; рН 11—232,5.

$\text{N}^6$ ,  $\text{O}^2$ ,  $\text{O}^3$ -Триацетиладенозинмонофосфат (VII) получали ацетилированием АМР (пиридиниевая форма) уксусным ангидридом аналогично

работе [26]. По данным ТСХ, продукт, имеющий  $R_f$  0,2 (Д), содержит примесь материала нуклеотидной природы с  $R_f$  0,47.

$N^6, O^2, O^3$ -Триацетил-8-бромаденозинмонофосфат (VIII) получали по аналогии с соединением (VII) ацетилизацией 8-бромаденозинмонофосфата (VI) уксусным ангидридом в пиридине. Выход 90%. Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,15 (В), 0,19 (Е).

(*L*-Фенилаланинил)аденилат (IX) получали конденсацией 1,52 ммоль соединения (III) с 0,38 ммоль фосфата (VII) в присутствии 3,8 ммоль дициклогексилкарбодиимида в 10 мл абс. пиридина. Реакцию проводили 14 сут при 20°. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали и фильтрат упаривали досуха. Для разложения избытка дициклогексилкарбодиимида к сухому остатку добавляли 40 мл воды и раствор оставляли при 20° на 12 ч. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали. Затем воду удаляли в вакууме и к остатку добавляли смесь 15 мл 9 н. водного аммиака с 5 мл метанола. Раствор оставляли на 16 ч при 20°. После удаления растворителя осадок промывали последовательно петролейным эфиром (т. кип. 30—70°, 4 × 70 мл) и эфиром (4 × 70 мл) методом центрифугирования. Продукт растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 (1,5 × 50 см) в  $НСО_3^-$ -форме. Колонку промывали водой (0,5 л) и продукт элюировали градиентом концентрации бикарбоната тетраэтиламмония от 0 до 0,2 М (2 л). Скорость хроматографии 60 мл/ч. Содержимое пиков анализировали методом ТСХ. Выход 40% (спектрофотометрически). Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,37 (В), 0,44 (Е), 0,65 (Ж) и БХ  $R_f$  0,59 (Д), 0,54 (Ж). УФ-спектр (вода):  $\lambda_{\max}$ , нм (рН): 261,4 (6), 260 (11);  $\lambda_{\min}$ , нм (рН): 230 (6), 229,5 (11).

*L*-Фенилаланинил-8-бром-5'-аденилат (X) синтезировали конденсацией аминок спирта (III) с триацетатом 8-бром-АМР (VIII) (пиридиниевая форма) в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Условия конденсации и последующего выделения продукта аналогичны вышеописанным для аденилата (IX). Выход продукта (спектрофотометрически) 25—30%. Продукт охарактеризован методом ТСХ.  $R_f$  0,49 (В), 0,49 (Е) и БХ  $R_f$  0,65 (Д), 0,61 (Ж). УФ-Спектр (вода):  $\lambda_{\max}$ , нм: 265,8;  $\lambda_{\min}$ , нм: 234,5.

*N*-Формил-*L*-фенилаланинил-5'-аденилат (XI) получали конденсацией спирта (IV) (3,3 ммоль) с триацетатом АМР (пиридиниевая форма, 1,1 ммоль) в 20 мл абс. пиридина в темноте в присутствии дициклогексилкарбодиимида (11 ммоль). Конденсацию проводили 30 сут при 20°. Дальнейшая обработка реакционной смеси и выделение продукта были аналогичны вышеописанным для аденилата (IX) (см. рис. 1). Выход продукта 25—30% (по УФ-поглощению). Продукт гомогенен по данным ТСХ.  $R_f$  0,8 (В), 0,59 (Е) и БХ 0,68 (Д), 0,59 (Ж). УФ-спектр,  $\lambda_{\max}$ , нм (рН): 261,4 (6), 260 (11),  $\lambda_{\min}$ , нм (рН): 230 (6), 229,5 (11).

Окисление *L*-фенилаланинил-5'-аденилата (XIV) соединением (IX) (8,5 мкмоль) проводили периодатом натрия (160 мкмоль) в 1 мл воды в течение 1,5 ч при 20°. Реакционную смесь хроматографировали на бумаге Whatman 3 MM в системе этанол — бикарбонат тетраэтиламмония (1 М, рН 7,5), 7 : 3. Продукт элюировали водой. Избыток бикарбоната удаляли многократным упариванием аденилата с небольшим количеством воды. Выход соединения (XIII) 80%. Полученное соединение гомогенно по данным ТСХ.  $R_f$  0,3 (В), 0,52 (Е), 0,76 (Ж) и БХ  $R_f$  0,6 (Д), 0,49 (Ж), УФ-спектр (вода):  $\lambda_{\max}$ , нм (рН): 262 (6), 266 (11);  $\lambda_{\min}$ , нм (рН): 234 (6), 238 (11).

Восстановление соединения (XIII) (1 мкмоль) осуществляли боргидридом натрия (100 мкмоль) в 0,1 М боратном буфере (рН 9) при 20° (30 мин.). Затем раствор упаривали досуха. Продукт выделяли препаративной хроматографией аналогично соединению (XIII). Выход диола (XIV) 80%. Соединение гомогенно по данным ТСХ.  $R_f$  0,52 (Е), 0,76 (Ж) и БХ  $R_f$  0,63 (Д). УФ-спектр (вода);  $\lambda_{\max}$ , нм (рН): 262 (6), 266 (11);  $\lambda_{\min}$ , нм (рН): 230 (6), 238 (11).

*Аминоацилирование тРНК [<sup>14</sup>C]фенилаланином, катализируемое фенилаланил-тРНК-синтетазой, проводили как описано в работе [33]. Реакционная смесь (0,25 мл) содержала 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1—1 мМ АТР, 0,01 мМ [<sup>14</sup>C]фенилаланин, 2 мг/мл тРНК (2% тРНК<sup>Phe</sup>), 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,8—1 мкг фенилаланил-тРНК-синтазы и переменное количество (0,1—100 мкМ) аналогов фенилаланиниладенилата. Количество образовавшейся [<sup>14</sup>C]-фенилаланил-тРНК определяли по радиоактивности, сорбируемой на мишенях (2,5 × 2,5 см) из бумаги FN-16, пропитанной 5% трихлоруксусной кислотой. Аликвоты (30 мкл) отбирали из реакционной смеси через 1, 2, 3, 5, 8, 10 и 15 мин. Мишени отмывали в 5% трихлоруксусной кислоте. Счет радиоактивности проводили в толуольном сцинтилляторе на счетчике Марк-II (Nuclear Chicago, США).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kim J.-J. P., Chakrabarty V., Mehler A. H. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 2698—2701.
2. Berg P. (1958) *J. Biol. Chem.*, **233**, 601—607.
3. Persht A. R., Kaethner M. M. (1976) *Biochemistry*, **15**, 818—823.
4. Hoagland M. B. (1955) *Biochim. et biophys. acta*, **16**, 288—289.
5. Berg P. (1956) *J. Biol. Chem.*, **222**, 1015—1023.
6. Moldave V., Castelranco P., Meister A. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 841—848.
7. Cassio D., Lemoine F., Waller J. P., Sandrin E., Boissonnas R. A. (1967) *Biochemistry*, **6**, 827—835.
8. Киселев Л. Л. (1971) Молекулярные основы биосинтеза белков, «Наука», М.
9. Rainey P., Bennett E. L., Calvin M. (1974) *Prep. Biochem.*, **4**, 227—241.
10. Flossdorf J., Marutzky R., Messer K., Kula M.-R. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 677—683.
11. Flossdorf J., Prätorius E.-J., Kula M.-R. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 147—155.
12. Santi D. V., Daneberg P. V. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4813—4820.
13. Calender R., Berg P. (1966) *Biochemistry*, **5**, 1690—1695.
14. Owens Sally L., Bell F. E. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 5515—5523.
15. Freist W., Von der Haar F., Sprinzi M., Cramer F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **64**, 389—393.
16. Freist W., Von der Haar F., Faulhammer H., Cramer F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 493—497.
17. Marutzky R., Flossdorf J., Kula M.-R. (1976) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2067—2077.
18. Mitra S. K., Mehler A. H. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **9**, 79—81.
19. Lawrence F., Shire D. J., Waller J. P. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **41**, 73—81.
20. Прасолов В. С., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 1226—1228.
21. Wetzel R., Söll D. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1681—1688.
22. Seki H., Koga K., Matsuo A., Ohki S., Matsuo I., Yamada S. I. (1965) *Chem. and Pharm. Bull.*, **13**, 995—1000.
23. Taurog A., Abraham S., Chaikoff I. L. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3473—3477.
24. Sheehan J. C., Ding-Dinh M. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 1154—1158.
25. Trayer I. P., Trayer H. R., Small D. A. P., Bottomley R. C. (1974) *Biochem. J.*, **139**, 609—623.
26. Rammner D. H., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 3112—3122.
27. Ikehara M., Uesugi S. (1969) *Chem. and Pharm. Bull.*, **17**, 348—354.
28. Sandrin E., Boissonnas R. A. (1966) *Helv. chim. acta*, **49**, 76—82.
29. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. (1972) В сб. Биопизика, т. 2, с. 6—100, Изд. ВИНТИ, М.
30. Rainey P., Holler E., Kula M. R. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **63**, 419—426.
31. Frolova L. Yu., Kovaleva G. K., Agalarova M. B., Kisselev L. L. (1973) *FEBS Lett.*, **34**, 213—216.
32. Silver J., Laursen R. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **340**, 77—89.
33. Ankilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. (1975) *FEBS Lett.*, **60**, 172—175.
34. Stulberg M. P. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1060—1064.

Поступила в редакцию  
21.III.1978

После доработки  
5.VI.1978



**SYNTHESIS OF (*L*-PHENYLALANYL)ADENYLATE ANALOGS AND STUDIES ON THEIR INTERACTION WITH PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. coli***

LAVRIK O. I., MOOR N. A., NEVINSKY G. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The following compounds have been prepared: *L*-phenylalanyl-5'-, N-formyl-*L*-phenylalanyl-5'- and *L*-phenylalanyl-8-bromo-5'-adenylates, as well as *L*-phenylalanyl-5'-adenylate oxidized with sodium periodate along with its reduced analog. These compounds were characterized by PMR and UV spectroscopy and by paper or thin-layer chromatography in several systems. The interaction of the above analogs with phenylalanyl-tRNA from *E. coli* was tested, whereby all of them proved rather effective competitive inhibitors, in respect to ATP, of the aminoacylation reaction. This opens the way, by incorporating appropriate active groupings at the sites of modification of aminoalkyladenylates, to probe the topography of the whole active site of aminoacyl-tRNA synthetases.

---