



УДК 547.963.32

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИЙ ADP и ATP  
С АНГИДРИДАМИ МЕЗИТИЛЕНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

*Третьякова С.С., Друца В.Л., Лебедев А.В.,  
Соколова Н.И., Шабарова З.А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;  
Новосибирский институт органической химии СО АН СССР*

Методом импульсной спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР исследовано взаимодействие ADP и ATP с хлорангидридом и ангидридом мезитиленкарбонической кислоты ( $\text{MsCOOH}$ ) в пиридине. Обнаружено, что ацилируются не только концевые, но и внутренние фосфатные группы. Образовавшиеся полиацильные производные неустойчивы и при обработке водой или *n*-бутиламинем быстро расщепляются, причем в смешанных ангидридах дизамещенного фосфата атака нуклеофильных агентов направлена по карбонильному углероду, а не по фосфору. Модифицирующая группа ( $\text{MsCO}-$ ) сохраняется только у концевого фосфата ADP или ATP. Предложены практические рекомендации по применению  $\text{MsCOCl}$  для модификации нуклеозид-5'-полифосфатов.

Смешанные ангидриды ADP и ATP с мезитиленкарбонической кислотой — ( $\text{MsCO}$ )ppA и ( $\text{MsCO}$ )pppA — нашли применение в качестве специфических ингибиторов митохондриальной ATP-азы [1], различных тРНК-синтетаз [2], а также как активные фосфорилирующие агенты при иммобилизации ADP и ATP на гексаметилендиаминосефарозу [3]. Однако при синтезе смешанных ангидридов нуклеозидполифосфатов с использованием хлорангидрида мезитиленкарбонической кислоты ( $\text{MsCOCl}$ ) не удавалось достичь количественных выходов целевых продуктов, в реакционной смеси всегда обнаруживались ацилированные и неацилированные продукты расщепления полифосфатов.

Целью настоящей работы было исследование реакций активных производных мезитиленкарбонической кислоты (хлорангидрида и ангидрида) с ADP и ATP методом импульсной спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Такой подход позволил непосредственно в реакционной смеси наблюдать за превращениями фосфатных групп и регистрировать образующиеся промежуточные продукты.

В первую очередь необходимо было выяснить устойчивость пирофосфатных связей в условиях синтеза ( $\text{MsCO}$ )ppA и ( $\text{MsCO}$ )pppA. Ранее было высказано предположение [3] о том, что расщепление пирофосфатных связей с образованием ряда побочных продуктов катализируется пиридином, в котором проводится синтез. Однако прямые эксперименты показали, что ADP довольно устойчив в пиридине и за 22 ч при 0° менее чем на 5% расщепляется до AMP и неорганического фосфата. В растворе ( $\text{MsCO}$ )ppA через 22 ч (0°) обнаруживается лишь 4% AMP и 8% ADP. Из полученных данных следует, что скорость расщепления пирофосфатных связей пириди-

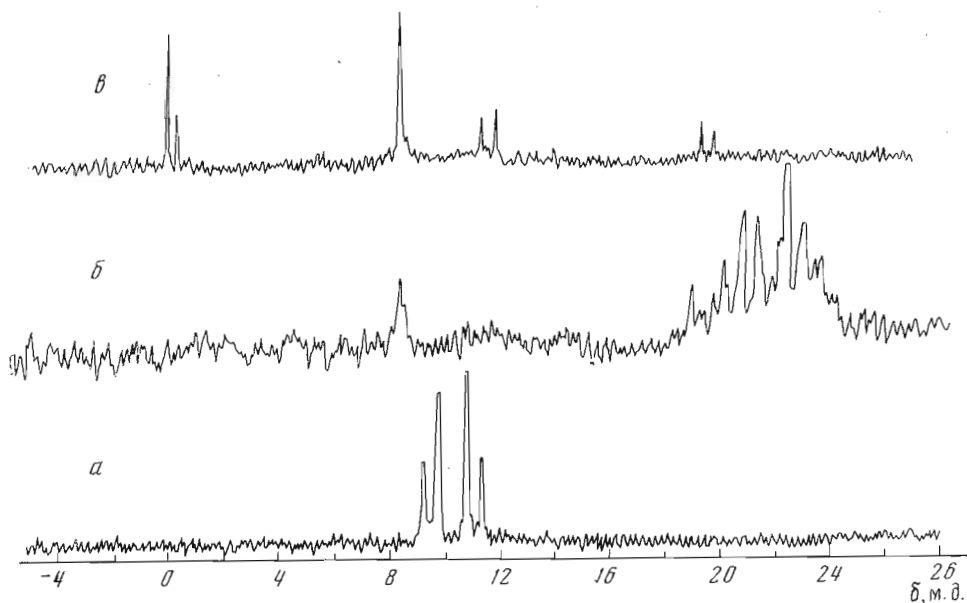
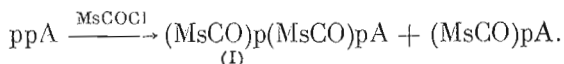


Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР: *a* — исходного АДФ в пиридине; *б* — реакционной смеси при взаимодействии АДФ (0,15 М) и  $\text{MsCOCl}$  (0,75 М) в пиридине при  $20^\circ$ , записанный через 2 мин после начала реакции; *в* — той же реакционной смеси через 19 ч после добавления воды

ном невелика и в условиях синтеза это не может приводить к существенной деградации фосфоангидридных связей. Можно предположить, что образование побочных продуктов связано непосредственно с реакцией ацилирования.

При обработке АДФ в абсолютном пиридине 5-кратным избытком  $\text{MsCOCl}$  при  $20^\circ$  ко времени первой записи спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, т. е. через 2 мин, весь АДФ был модифицирован. Как видно на рис. 1б, в спектре отсутствуют дублеты в области 9,4—11,4 м.д., характерные для исходного АДФ (рис. 1а), и регистрируются сигнал с химическим сдвигом 8,4 м.д. и мультиплет в районе 18—24 м.д. Сигнал с  $\delta$  8,4 м.д. может быть отнесен к  $(\text{MsCO})\text{pA}$ , полученному нами ранее [4]. Этот сигнал постепенно накапливается и составляет через 2 мин 5%, а через 6 мин — 15% от общей интенсивности сигналов фосфора. Поскольку образование новой ангидридной связи у атома фосфора смещает его сигналы на  $\sim 10$  м.д. в сильное поле [5], сложный сигнал в области 18—24 м.д. обусловлен, по-видимому, соединениями, в которых имеются две ангидридные связи. К структурам такого типа могут относиться  $\alpha$ ,  $\beta$ -димезитоильные производные (I). В этой же области должны регистрироваться сигналы диацильных производных неорганического фосфата, образующихся при расщеплении пирофосфатных связей.

Схему ацилирования АДФ избытком  $\text{MsCOCl}$  можно представить следующим образом:

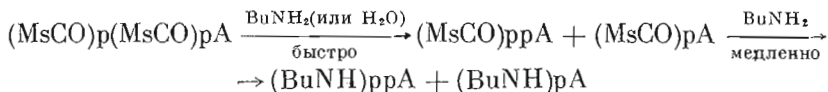


При добавлении к реакционной смеси воды спектр изменяется: мультиплет в области 18—24 м.д. постепенно исчезает и регистрируются два дублета с центрами при 11,8 и 19,7 м.д. ( $J_{\text{POP}} \sim 18$  Гц), отнесенные на основании спектра контрольного образца к  $(\text{MsCO})\text{ppA}$ . Кроме того, в спектре сохраняется сигнал с  $\delta$  8,7 м.д., характерный для  $(\text{MsCO})\text{pA}$  [4], и появляется новый синглет при 7,4 м.д., который может быть отнесен к ацили-

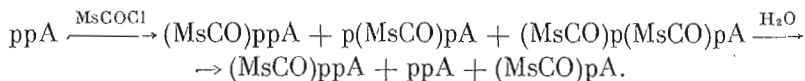
рованному неорганическому фосфату. Со временем в спектре появляются сигналы рА ( $\delta$  0,3 м.д.) и неорганического фосфата ( $\delta$  0 м. д.), образование которых вызвано гидролизом ацилированных моно- и дифосфатов водным пиридином (рис. 1а).

При добавлении к реакционной смеси вместо воды *n*-бутиламина уже через 6 мин в спектре появляются два дублета с центрами при 11 и 18,9 м.д., отнесенные нами к (MsCO)ppA, и сигнал при -1,3 м.д. Кроме того, в спектре сохраняется характерный для (MsCO)pA синглет с химическим сдвигом 8,7 м.д., зарегистрированный при реакции ADP с MsCOCl (рис. 1б). Образование (MsCO)pA при действии на соединение (I) *n*-бутиламина должно сопровождаться образованием эквимольного количества производного неорганического фосфата. На основании этой стехиометрии, а также из литературных данных об амидах [5] и ацилфосфатах [6] синглет с химическим сдвигом при -1,3 м.д. может быть отнесен к бутиламиду мезитоилфосфорной кислоты.

Таким образом, после разложения реакционной смеси *n*-бутиламином и водой спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР практически идентичны, за исключением сигналов с  $\delta$  -1,3 и 7,4 м.д., относящихся к производным неорганического фосфата. Очевидно, *n*-бутиламин, как и вода, в первую очередь атакует карбонильный атом углерода мезитоильного остатка  $\alpha$ -фосфата ADP. При более длительном выдерживании реакционной смеси с *n*-бутиламином наблюдается постепенное понижение интенсивности сигналов, отнесенных к (MsCO)ppA и (MsCO)pA и накопление новых — двух дублетов с центрами при 0,5 и 9,6 м.д. ( $J_{\text{P-OR}}$  21 Гц) и синглета с химическим сдвигом -7,3 м.д. По положению на спектре эти сигналы соответствуют фосфамидам — (BuNH)ppA и (BuNH)pA [4]. Кроме того, регистрируется синглет с  $\delta$  -11,6 м. д.; при снятии спектра без подавления спин-спинового  $^{31}\text{P}$ -{H}-взаимодействия этот сигнал регистрируется в виде триплета, что указывает на принадлежность его к бутиламиду неорганического фосфата [5]. Скорость образования фосфамидов довольно высока: как видно из рис. 2, за 6 ч (MsCO)ppA и (MsCO)pA количественно превращаются в соответствующие бутиламиды, что находится в полном соответствии с полученными ранее данными [7]:



Для определения возможности избирательного ацилирования  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатных групп ADP использовались небольшие избытки MsCOCl. Так, при молярном соотношении ppA: MsCOCl, равном 1 (рис. 3а), наблюдалось ацилирование  $\beta$ -фосфата, т. е. образование (MsCO)ppA (дублеты с центрами при 12,7 и 21,1 м.д.), количество которого через 2 мин составляло 30%. Одновременно накапливались сигналы в области 22—24 м.д., которые, очевидно, обусловлены производными ADP, ацилированными по  $\alpha$ -фосфатным группам. При разложении реакционной смеси водой регенерируется ADP и эти сигналы исчезают. Схему реакции можно представить следующим образом:



При взаимодействии ppA с двукратным избытком MsCOCl через 2 мин в спектре (рис. 3б) сигналы исходного ADP не регистрировались, а наблюдалось образование (MsCO)pA ( $\delta$  8,4 м.д.) и (MsCO)ppA (дублеты с центрами при 11,7 и 19,7 м.д.), количества которых составляли соответственно 5 и 62% от общей интенсивности сигналов  $^{31}\text{P}$ . Кроме того, регистрировался мультиплет в области 22—24 м.д., интенсивность которого увеличивалась во времени, что указывает на более глубокое ацилирование ADP.

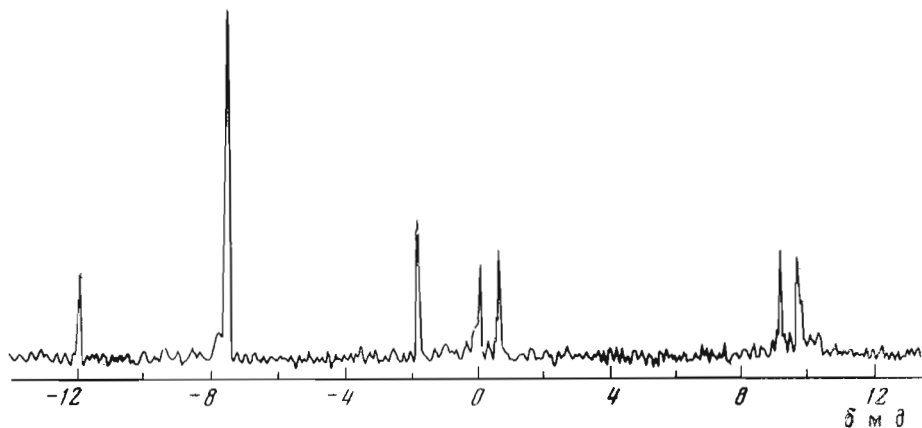


Рис. 2. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси, полученной через 6 ч после добавления  $\text{BuNH}_2$  к продуктам реакции  $\text{ADP}$  (0,15 M) с  $\text{MsCOCl}$  (0,75 M) в пиридине при  $0^\circ$  в течение 10 мин. Соотношение  $\text{ADP} - \text{BuNH}_2 = 1 : 45$

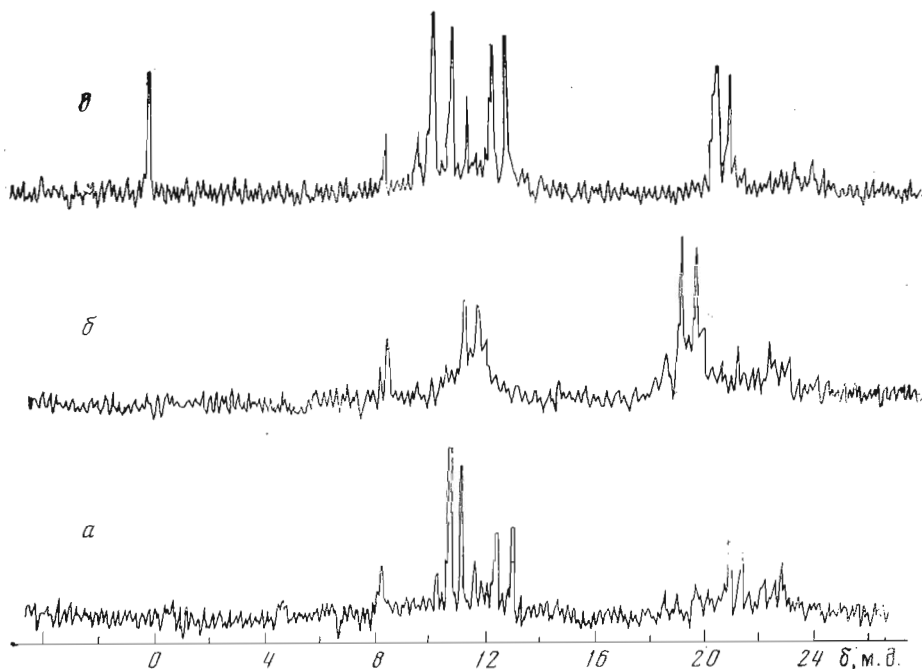


Рис. 3. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционных смесей: *а* —  $\text{ADP}$  (0,15 M) и  $\text{MsCOCl}$  (0,15 M) в пиридине при  $0^\circ$  через 2 мин после смешения реагентов; *б* —  $\text{ADP}$  (0,15 M) и  $\text{MsCOCl}$  (0,3 M), условия те же; *в* —  $\text{ADP}$  (0,15 M) и  $(\text{MsCO})_2\text{O}$  (0,75 M) в пиридине при  $20^\circ$  через 30 ч после начала реакции

Сравнивая опыты по модификации  $\text{ADP}$ , можно увидеть, что при увеличении избытка  $\text{MsCOCl}$  степень деструкции пирофосфатов растёт и в реакционной смеси в качестве основного побочного продукта накапливается  $(\text{MsCO})\text{pA}$ . В то же время при эквимолярных количествах  $\text{MsCOCl}$  в реакционной смеси остаются значительные количества исходного  $\text{ADP}$ . Таким образом, использование двух эквивалентов  $\text{MsCOCl}$  и проведение реакции в течение малых интервалов времени (2—3 мин) при  $0^\circ$  представляется оптимальным для синтеза  $(\text{MsCO})\text{ppA}$ . Полностью избежать деструкции пирофосфатной связи в  $\text{ADP}$  в процессе ацилирования не удастся, поскольку  $\text{MsCOCl}$  ацилирует не только  $\beta$ -, но и  $\alpha$ -фосфатные группы, что ведет к образованию лабильных промежуточных продуктов.

В связи с этим был исследован менее активный ацилирующий агент — ангидрид мезитиленкарбоновой кислоты  $(MsCO)_2O$ . Реакцию ADP с пятикратным молярным избытком  $(MsCO)_2O$  проводили в абсолютном пиридине при  $20^\circ$ . Согласно данным спектров  $^{31}P$ -ЯМР, ацилируется преимущественно  $\beta$ -фосфат ADP с образованием  $(MsCO)ppA$  (рис. 3в). Реакция протекает сравнительно медленно. Так, через 74 ч количество  $(MsCO)ppA$  составило 60%. В реакционной смеси постепенно накапливаются  $(MsCO)pA$  ( $\delta$  8,4 м.д.) и  $pA$  ( $\delta$  -0,4 м.д.), что указывает на расщепление пирофосфатных связей. Наблюдается также незначительное накопление сигналов в области 22—24 м.д., интенсивность которых через 74 ч после начала реакции не превышает 10%. Кинетические изменения соотношения компонентов этой реакционной смеси представлены на рис. 4.

Следовательно,  $(MsCO)_2O$  может использоваться в качестве более мягкого ацилирующего реагента при синтезе смешанных ангидридов нуклеозид-5'-полифосфатов с мезитиленкарбоновой кислотой.

Методом спектроскопии  $^{31}P$ -ЯМР было также исследовано взаимодействие ATP с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты. Принципиальных различий по сравнению с аналогичными реакциями с участием ADP не обнаружено.

При использовании пятикратного избытка  $MsCOCl$  также наблюдалось быстрое исчезновение сигналов  $\gamma$ - и  $\alpha$ -фосфатных остатков ATP ( $\delta$  10,0—10,6 и 12,4—13,0 м.д. соответственно) и появление мультиплета в области 19—24 м.д. и синглета с химическим сдвигом 8,8 м.д. ( $(MsCO)pA$ ). Кроме того, было зарегистрировано незначительное накопление сигналов в области 30 м.д. (до 5%  $^{31}P$ ), что указывает на образование соединений, в которых атом фосфора имеет три ангидридные связи.

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось установить, что при действии хлорангидрида и ангидрида мезитиленкарбоновой кислоты на аденозин-5'-полифосфаты ацилируются не только концевые, но и внутренние фосфатные группы. Поскольку с увеличением количества ацильных групп на молекулу аденозин-5'-полифосфата электрофильность атомов фосфора по отношению к воде и *n*-бутиламину возрастает, ацилирование будет способствовать деградации пирофосфатных связей в этих соединениях. При синтезе смешанных ангидридов нуклеозид-5'-полифосфатов следует применять умеренные избытки  $MsCOCl$  и проводить реакции ацилирования при пониженной температуре в течение малых промежутков времени либо применять более мягкий ацилирующий агент — ангидрид мезитиленкарбоновой кислоты.

### Экспериментальная часть

ADP и ATP (Serva, ФРГ) перед использованием очищали колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе при  $4^\circ$  в градиенте концентрации бикарбоната триэтиламмония от 0,05 до 0,35 М.  $(MsCO)_2O$  получали по методике работы [8].

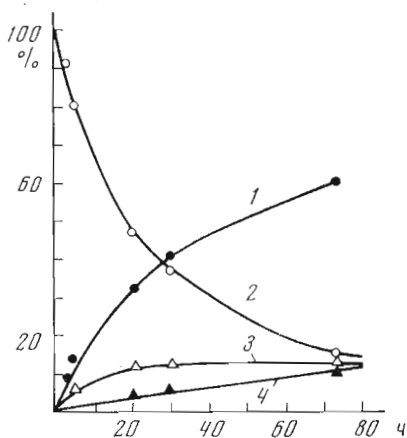


Рис. 4. Кинетические кривые содержания компонентов в реакционной смеси при взаимодействии ADP (0,15 М) и  $(MsCO)_2O$  (0,75 М) в пиридине при  $20^\circ$ : 1 —  $(MsCO)ppA$ ; 2 — ADP; 3 —  $pA$ ; 4 —  $(MsCO)pA$  (рассчитаны по интенсивности соответствующих сигналов в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР)

БХ проводили на бумаге FN-1 в системе этанол — ацетат аммония (7 : 3), рН 7,5.

Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в м.д. относительно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  как внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$ . Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Детали эксперимента приведены в работе [3]. Количественную обработку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей по всему спектру.

Реакцию ADP и ATP с  $\text{MsCOCl}$  проводили по описанной ранее методике [7], используя абсолютный бензол для высушивания их три-*n*-октиламмониевых солей.

*Реакция ADP с  $(\text{MsCO})_2\text{O}$ .* К раствору 0,225 ммоль триоктиламмониевой соли ADP в 1,5 мл сухого пиридина добавляли 1,125 ммоль  $(\text{MsCO})_2\text{O}$ . Реакционную смесь выдерживали при 20° и через определенные интервалы времени записывали спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР и отбирали пробы для бумажной хроматографии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов И. А., Шаламберидзе М. В., Новикова И. Ю., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1977) Биохимия, 42, 1704—1709.
2. Ковалева Г. К., Иванов Л. Л., Мадоян И. А., Фаворова О. О., Северин Е. С., Гуляев Н. Н., Баранова Л. А., Шабарова З. А., Соколова Н. И., Киселев Л. Л. (1978) Биохимия, 43, 525—534.
3. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 219, 1134—1136.
4. Drutsa V. L., Zarytova V. F., Knorre D. G., Lebedev A. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1978) Nucleic Acids Res., 5, 185—193.
5. Grutchfield M. M., Dungan C. H., Letcher J. H. (1967) Topics in phosphorus chemistry, vol. 5, Interscience publishers, N. Y.—London — Sydney.
6. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 3, 121—125.
7. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903—916.
8. Burton H., Praill P. F. G. (1955) J. Chem. Soc., 729—731.

Поступила в редакцию

11.XI.1977

После доработки

15.XII.1977

#### $^{31}\text{P}$ -NMR SPECTROSCOPY STUDY OF ADP AND ATP REACTIONS WITH MESITOIC ACID ANHYDRIDES

TRETIAKOVA S. S., DRUTSA V. L., LEBEDEV A. V., SOKOLOVA N. I.,  
SHABAROVA Z. A.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

$^{31}\text{P}$ -NMR pulse spectroscopy was used for studying the reaction of ADP and ATP with mesitoic acid ( $\text{MsCOOH}$ ) chloride and anhydride in pyridine. It was revealed that not only terminal, but also internal phosphate groups were acylated. The polyacyl derivatives thereby formed were unstable and rapidly splitted when treated with water or *n*-butylamine. In mixed anhydrides of disubstituted phosphate, the attack of nucleophilic agents was directed to the carbonyl carbon, rather than to phosphorus. The modifying group ( $\text{MsCO}$ ) was only retained in the terminal phosphate of ADP or ATP. Recommendations for the use of  $\text{MsCOCl}$  for modification of nucleoside 5'-polyphosphates were given.