



УДК 547.963.32+577.155.2

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ А5

*Банникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

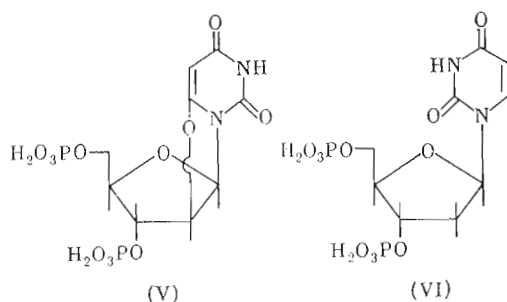
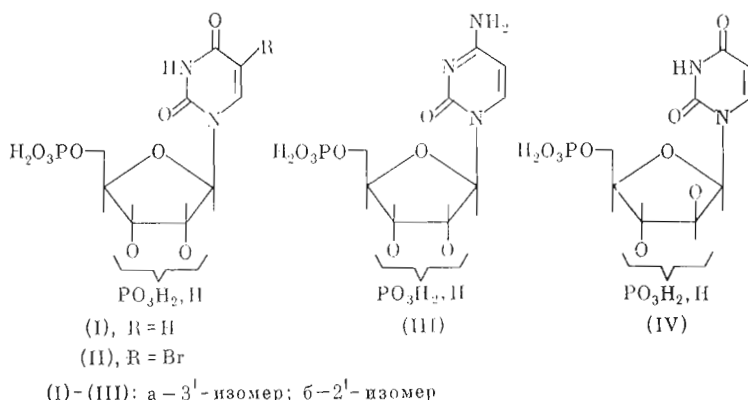
Работа посвящена синтезу конкурентных ингибиторов экзонуклеазы А5. Исследовался ряд пиримидиновых нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов с различными модификациями в гетероциклическом основании и углеводной части молекулы. Удобным методом получения подобных соединений является фосфорилирование соответствующих нуклеозидов полифосфорной кислотой. С помощью химических и ферментативных методов получены цитидин-2',5'-, цитидин-3',5'- и уридин-3',5'-дифосфаты. Для полученных нуклеотидов сняты спектры КД и определены константы ингибирования K_i .

Ранее была показана эффективность применения экзонуклеазы А5 для гидролиза суммарных дрожжевых РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов [1]. Существующая в настоящее время схема выделения данного фермента многостадийна и трудоемка [2].

Целью настоящей работы является получение эффективных конкурентных ингибиторов экзонуклеазы А5 [2, 3], которые можно использовать в качестве лигандов для биоспецифической очистки этого фермента [4]. Это, вероятно, облегчит выделение фермента в гомогенном состоянии в препаративных количествах, что даст возможность использовать его для получения в промышленном масштабе рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов и для различных исследований в биохимии и молекулярной биологии. При изучении действия нуклеозиддифосфатов типа rNp на реакцию, катализируемую экзонуклеазой А5, было установлено, что подобные соединения представляют собой конкурентные ингибиторы этого фермента [5], причем пиримидиновые производные являются более сильными ингибиторами, чем пуриновые. В связи с этим были синтезированы и исследованы пиримидиновые нуклеозиддифосфаты (I)–(VI).

Все указанные соединения получали путем фосфорилирования соответствующих нуклеозидов. Арабиноуридин получен с хорошим выходом, исходя из уридина по известному методу [6] через образование 2,2'-О-ангидроуридина [7]. Дифосфат арабиноуридина (IV) получен не только фосфорилированием арабиноуридина, но и фосфорилированием 2,2'-О-ангидроуридина, так как ангидросвязь легко разрушалась в процессе реакции. Арабиноуридин явился также удобным полупродуктом для синтеза 6,2'-О-ангидро-6-оксиуридина, полученного нами по схеме, предложенной японскими авторами [8].

Фосфорилирование рибо-, арабино-, 6,2'-О-ангидро-6-оксиуридина проводилось с помощью полифосфорной кислоты. Возможности этого фосфорилирующего агента, успешно примененного Кораной [9] для синтеза нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов, исследовались и другими авторами



ми [10], но использовались недостаточно. Нами были отработаны условия фосфорилирования полифосфорной кислотой синтезированных нуклеозидов, а также уридина, цитидина, 5-бромуридина, цитидин-2'-фосфата и цитидин-3'-фосфата; исследовались выделение и очистка полученных дифосфатов. Реакцию фосфорилирования проводили при 85° в течение 2 ч. Было установлено, что увеличение времени реакции приводит к более глубокому фосфорилированию нуклеозидов. В качестве побочных продуктов реакции выделены нуклеозидмонофосфаты, а также продукты фосфорилирования, содержащие три остатка фосфорной кислоты на одну молекулу нуклеозида и предположительно являющиеся нуклеозид-2',3',5'-трифосфатами (VII)–(IX).

Для выделения нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов применяли несколько вариантов обработки реакционной массы. Неорганические полифосфаты гидролизovali кислотой и осаждали гидроокисью лития, а продукты фосфорилирования разделяли с помощью ионообменной хроматографии. Использовали и более мягкие условия выделения продуктов реакции: реакционную массу при охлаждении растворяли в воде, быстро нейтрализовали и наносили на анионообменник. В этом случае не всегда удавалось полностью отделить неорганические полифосфаты и требовалась дополнительная очистка. Для более полного отделения неорганических полифосфатов использовали активированный уголь: водный раствор реакционной массы после нейтрализации наносили на колонку с активированным углем, предварительно смешанным с целитом, что существенно облегчало работу [11]. Неорганические фосфаты смывали водой, а нуклеотиды — водным спиртом, содержащим аммиак. Далее продукты реакции разделяли либо на анионообменнике, либо препаративно на бумаге.

Поскольку гликозидная связь у дезоксирибонуклеозидов менее устойчива, чем в рибозиде, для получения дифосфата дезоксиуридина использовали более мягкие условия фосфорилирования с помощью β-цианэтилфосфата [12]. Реакцию проводили в пиридине при ~ 20° в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида. После удаления цианэтильной группы нуклеозиддифосфат (VI) выделяли на анионообменнике или препаративно

Спектры КД и величины K_i нуклеозидполифосфатов

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$, нм	$[\theta] \cdot 10^{-3}$	$K_i \cdot 10^5$, М	Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$, нм	$[\theta] \cdot 10^{-3}$	$K_i \cdot 10^5$, М
(I)	265	+15,2	3,4	(IV)	264	+19,6	3,7
(Ia) *	266	+10,4	6,5	(V)	249	-46,5	13,2
(II)	281	+8,7	2,3	(VI)	267	+7,4	0,9
(III)	270	+20,4	7,6	(VII)	264	+16,1	3,7
(IIIa)	—	—	13,0	(VIII)	277	+19,8	4,1
(IIIa) *	270	+15,8	10,0	(IX)	263	+13,4	4,5
(IIIб)	—	—	5,5				

* Получены ферментативно.

на бумаге. Выход реакции из-за образования значительного количества побочных продуктов не превышал 40—50%.

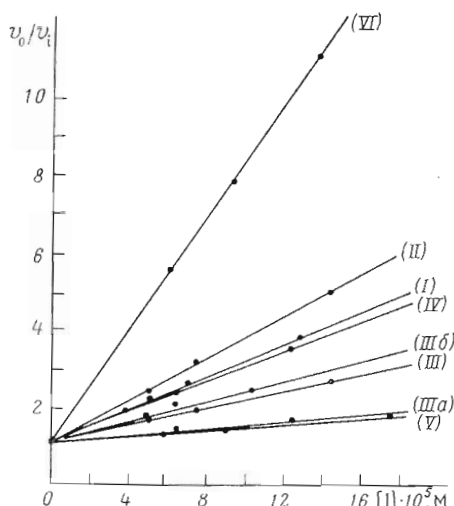
При фосфорилировании уридина, 5-бромуридина, арабиноуридина и цитидина получали смесь 2',5'- и 3',5'-дифосфатов. Чтобы выяснить, какими ингибирующими свойствами обладает каждый из изомеров, проводили разделение цитидин-2'(3')-монофосфатов (IIIa, б) на анионообменнике в Cl⁻-форме в градиенте pH, как описано в работе [13]. Фосфорилирование индивидуальных нуклеотидов осуществляли полифосфорной кислотой с выделением продукта в мягких условиях без кислотной обработки, способствующей миграции фосфатного остатка. Цитидин-3',5'-дифосфат (IIIa) получен также ферментативным путем. Для этого полицитидиловую кислоту инкубировали с эндонуклеазой A236 [14], а затем добавляли панкреатическую РНКазу, при этом с выходом около 20% получали нужный изомер. Аналогичным образом получен уридин-3',5'-дифосфат (Ia).

Ингибирующее действие на ферментативную реакцию будет больше в том случае, когда конформация ингибитора максимально соответствует сорбционной области фермента и образующийся комплекс ингибитор — фермент будет достаточно прочен. Круговой дихроизм является чувствительным методом изучения конформации пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов в растворе. На основании величин молекулярной эллиптичности $[\theta]$ мы судили о конформации ингибиторов в растворе. Для пиримидиновых нуклеозидов существует вполне приемлемая корреляция между торсионным углом $\varphi_{C,N}$, характеризующим взаимный поворот остатка сахара и гетероциклического основания вокруг гликозидной связи, и величиной $[\theta]$ [15, 16]. Как видно из таблицы, все синтезированные соединения, кроме соединения (V), имеют положительный эффект Коттона в дальней УФ-области. Следовательно, можно допустить, что в растворе эти соединения существуют преимущественно в *анти*-конформации. Напротив, соединение (V) в спектре КД имеет отрицательный эффект Коттона с большой амплитудой и находится в растворе в фиксированной *син*-конформации.

Константы ингибирования K_i были определены по методу, подробно описанному в работе [5], на основании зависимости отношения скорости реакции без ингибитора (v_0) к скорости реакции в присутствии ингибитора (v_i) от концентрации ингибитора [1]. В этом случае

$$K_i = \frac{K_m}{\lg \alpha (K_m + [S])}$$

В качестве субстрата использовали динуклеотид d(pApA) с K_m $2,4 \cdot 10^{-5}$ М [5]. Величины K_i , приведенные в таблице, указывают на то, что большинство полученных соединений может быть использовано в качестве лигандов для биоспецифической очистки экзонуклеазы А5. Наименьшую



Зависимость отношения скорости реакции гидролиза $d(pApA)$ без ингибитора (v_0) к скорости реакции в присутствии ингибитора (v_i) от концентрации ингибитора. Ингибиторы: (I) — уридин-2'(3'),5'-дифосфат; (II) — 5-бромуридин-2'(3'),5'-дифосфат; (III) — цитидин-2'(3'),5'-дифосфат; (IIIб) — цитидин-2',5'-дифосфат; (IV) — арабиноуридин-2'(3'),5'-дифосфат; (V) — 2',6-О-осиангидроуридин-3',5'-дифосфат; (VI) — 2'-дезоксипуридин-3',5'-дифосфат

биторные свойства, так и доступность. Видимо, для целей биоспецифической хроматографии нуклеаз следует использовать легкодоступные уридин-2'(3'),5'-дифосфат и 5-бромуридин-2'(3'),5'-дифосфат.

Экспериментальная часть

В работе использовали: уридин, цитидин, 5-бромуридин полиуридиловую и полицитидиловую кислоты (Reanal, Венгрия), дезоксиуридин (Merck, ФРГ); динуклеотид $d(pApA)$, синтезированный на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ; полифосфорную кислоту, содержащую 84,3% P_2O_5 (n_D 1,467), активированный уголь «Norit A» (Serva, ФРГ), сефадекс G-10 (Farmacia, Швеция), амберлит CG-400 (200—400 меш) и дауэкс 50 × 2 (50—100 меш) фирмы «Serva» (ФРГ), эндонуклеазу A236 (КФ 3.1.4.X) и экзонуклеазу A5 (КФ 3.1.4.1) (ИМБ АН СССР), панкреатическую рибонуклеазу (КФ 3.1.4.22; Koch-Light, Англия), щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1; Worthington, США).

ТСХ и ВХ проводили в системах: изомасляная кислота — вода — аммиак, 66 : 33 : 1 (А); *n*-пропиловый спирт — аммиак — вода, 11 : 7 : 2 (Б); этиловый спирт — 1 М ацетат аммония, 75 : 30 (В); *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 5 : 2 : 3 (Г). Для ТСХ использовали готовые стеклянные пластины со слоем целлюлозы фирмы «Merck» (ФРГ), для ВХ — бумагу FN-1 (ГДР) и ЗММ фирмы «Whatman» (Англия).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР). Скорости гидролиза определяли, как описано ранее [5], по изменению гиперхромного эффекта реакции при 265 нм, которое записывали на спектрофотометре фирмы «Hitachi» (Япония) на шкале 90—110% пропускания после ее преобразования в шкалу 0—0,08 ед. поглощения.

K_i имел дезоксиуридин-3',5'-дифосфат (VI). Ранее было отмечено [5], что дезоксирибонпроизводные являются более сильными ингибиторами экзонуклеазы A5, чем рибонпроизводные. По-видимому, это обусловлено тем, что гетероциклическое основание в 2'-дезоксинуклеотидах может более свободно вращаться вокруг гликозидной связи, принимая конформацию, благоприятную для связывания с ферментом.

Для рибонуклеозиддифосфатов исследовали влияние 2'-фосфата на ингибирующие свойства. Как видно из рисунка, существенного различия в ингибировании отдельными изомерами и их смесью не наблюдается. Вероятно, положение фосфатного остатка в рибозе несущественно для связывания таких ингибиторов с ферментом. Из полученных данных следует также, что фиксированная син-конформация (соединение (V)) наименее благоприятна для связывания с ферментом и это соединение не может рассматриваться как эффективный ингибитор экзонуклеазы A5.

Для практического использования конкурентного ингибитора существенное значение имеют как его инги-

Реакционные смеси объемом 2 мл содержали $1,25 \cdot 10^{-5}$ М d(pApA), 0,07 М буфер трис-HCl (рН 8,9), $5 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$, 2 ед. акт. фермента и ингибиторы в соответствующих концентрациях. Реакционную смесь термостатировали при 25°.

Спектры КД снимали на спектрополяриметре J-20 (JASCO, Япония). рН водных растворов составляла 7. Концентрации исследуемых растворов для расчетов [6] определяли, исходя из значений экстинкций в максимуме поглощения в УФ-области: рUр, ϵ 10 000; рСр, ϵ 9200 [17]. Для остальных соединений использовали экстинкции исходных нуклеозидов, поскольку введение фосфатных групп существенно не изменяет эти величины: дезоксиуридин, ϵ 10200 (каталог фирмы «Mersck»); арабиноуридин, ϵ 10500 [6], 5-бромурин, ϵ 8910 [18]; 2',6-О-оксигидроуридин, ϵ 16400 [8]; 5-бромарабиноуридин, ϵ 9360.

2,2'-О-Ангидроуридин. Получен как описано ранее [7]. Выход 74%. Т. пл. 241—243° (разл.). УФ, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 223, 251, 270 нм, плечо.

6,2'-О-Ангидро-6-оксиуридин. Получен как описано ранее [8]. Выход 73%. Т. пл. 251—253° (спирт). УФ, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 253 нм.

6,2'-О-Ангидро-6-оксиуридин-3',5'-дифосфат (V). К 0,15 г (0,62 ммоль) 6,2'-О-ангидро-6-оксиуридина добавляли 3 г полифосфорной кислоты. Смесь перемешивали при 85° в течение 2,5 ч до образования прозрачной, гомогенной массы, добавляли воду и доводили рН до 1 с помощью HCl. Раствор нагревали 15—20 мин при 120°, охлаждали и доводили рН до 10 с помощью 4,5 н. гидроокиси лития. Осадок отделяли центрифугированием, раствор концентрировали в вакууме и наносили на колонку (1×20 см) с амберлитом CG-400 в HCO_3^- -форме. Разделение проводили в линейном градиенте от 0 до 1 М триэтиламонийбикарбонатного буфера (рН 7,8). Скорость элюции 30 мл/ч. При разделении получали три пика: первый, выходящий с водой, соответствовал исходному нуклеозиду, второй — при элюции 0,2—0,35 М триэтиламонийбикарбонатным буфером — нуклеозидмонофосфату, а третий — при элюции 0,6—0,8 М буфером — 2',6-О-оксигидроуридину-3',5'-дифосфату (V). Фракции, соответствующие нужному продукту, объединяли, путем многократного упаривания удаляли триэтиламонийбикарбонатный буфер и вещество дополнительно очищали на колонке ($1,5 \times 50$ см) с сефадексом G-10, элюируя водой. Получали 0,1 г (67%) дифосфата (V). УФ, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 253 нм, R_f 0,24 (А), 0,15 (Б), 0,2 (Г).

Арабиноуридин-2'(3'),5'-дифосфат (IV). К 0,05 г (0,22 ммоль) 2'-ангидроуридина или 0,22 ммоль арабиноуридина добавляли 1 г полифосфорной кислоты, нагревали 2 ч, перемешивая при 80°. Реакционную массу при охлаждении растворяли в воде, быстро нейтрализовали концентрированным аммиаком и наносили на колонку (ϕ 2,5 см) с активированным углем. Колонку готовили следующим образом: в нее помещали суспензию целита-545 ($\sim 1,5$ см по высоте колонки), слой целита покрывали бумажным фильтром, затем наносили суспензию 2 г активированного угля и 2,5 г целита, промывали водой, 50% водным спиртом с аммиаком и снова водой. Неорганические фосфаты смывали с колонки водой, нуклеотиды — 50% водным спиртом с аммиаком (0,1 мл конц. аммиака на 100 мл спирта). Спиртовой элюат концентрировали в вакууме и нуклеозиддифосфат выделяли препаративно на бумаге в системе Б. После элюции с бумаги вещество дополнительно очищали на сефадексе G-10. Получали 0,035 г (70%) дифосфата (IV). УФ, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 263 нм, R_f 0,23 (А), 0,19 (Б), 0,22 (Г).

Аналогично получены уридин-2'(3'),5'-дифосфат (I), выход 80%, R_f 0,22 (А), 0,17 (Б), 0,17 (В); 5-бромурин-2'(3'),5'-дифосфат (II), выход 65%, R_f 0,26 (А), 0,21 (Б), 0,26 (Г); цитидин-2'(3'),5'-дифосфат (III), выход 73%, R_f 0,12 (Б), 0,13 (В), 0,13 (Г); цитидин-3',5'-дифосфат (IIIa), выход 77%; цитидин-2',5'-дифосфат (IIIб), выход 70%.

При фосфорилировании уридина, бромарабиноуридина и арабиноуридина кроме нуклеозиддифосфатов были выделены с выходом 5—10% соединения (соответственно (VII), (VIII) и (IX)), имеющие более низкую хроматографическую подвижность и содержащие около трех остатков фосфорной кислоты на одну молекулу нуклеозида. Для определения фосфора проводили при 37° в течение 3 ч ферментативный гидролиз этих соединений щелочной фосфатазой в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 8,9), содержащем 1 ммоль $MgCl_2$. Количество образовавшегося неорганического фосфата находили по модифицированному методу Фиске — Суббароу, используя 1% аскорбиновую кислоту в качестве восстановителя.

Дезоксиуридин-3',5'-дифосфат (VI). К раствору 0,047 г (0,206 ммоль) 2'-дезоксиуридина в 2 мл сухого пиридина добавляли 2,2 мл (2,2 ммоль) стандартного раствора β -цианэтилфосфата (раствор β -цианэтилфосфата готовили по методике, предложенной Тенером [12]). Раствор упаривали в вакууме, добавляли сухой пиридин и повторяли операцию еще 3 раза. Остаток растворяли в 3 мл сухого пиридина и добавляли 0,72 г (3,5 ммоль) N,N' -дициклогексилкарбодимида и оставляли при $\sim 20^\circ$ без доступа влаги воздуха. Через 2 сут к реакционной массе добавляли 1 мл воды и оставляли на 1 ч, после чего реакционную массу переносили в стакан с 20 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали. К фильтрату добавляли 0,2 мл конц. аммиака, раствор при кипении концентрировали до 8 мл, а затем кипятили с обратным холодильником еще 45 мин. Разделение продуктов реакции проводили на ионообменной смоле, очищали препаративно на бумаге в системе Б. Получали 0,023 г (50%) дифосфата (VI). УФ, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 262 нм, R_f 0,27 (А), 0,15 (Б), 0,16 (В).

Цитидин-3',5'-дифосфат (IIIa). К раствору 0,055 г полицитидиловой кислоты в 2,5 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 8), содержащего 1 ммоль $MgCl_2$, добавляли 2 мл эндонуклеазы А236 с уд. акт. 1000 ед/мл [14] и инкубировали 5 ч при 37°. Затем добавляли 2 мг панкреатической РНКазы и инкубировали 12 ч при 37°. Протекание ферментативного гидролиза контролировали хроматографически. Продукты гидролиза наносили на колонку (1 × 9 см) с амберлитом CG-400 в HSO_3^- -форме, элюировали водой. После выхода первого пика разделение проводили в линейном градиенте двууглекислого аммония (рН 8,8) от 0 до 0,8 М. Пик, вышедший при элюции 0,5—0,6 М двууглекислым аммонием, соответствовал цитидин-3',5'-дифосфату. Двууглекислый аммоний из элюата удаляли многократным упариванием с водой при 35—40°. Дополнительно дифосфат очищали на сефадексе G-10. Получали 0,01 г хроматографически чистого вещества.

Аналогично был получен уридин-3',5'-дифосфат (Ia).

Авторы благодарны Т. Н. Львовой и Р. И. Татарской за консультации и постоянный интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Мокеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В. (1975) Биоорганич. химия, 1, 816—820.
2. Львова Т. Н., Артамонова О. И., Татарская Р. И. (1975) Биохимия, 40, 703—710.
3. Tatarskaya R. I., Lvova T. N., Abrossimova-Amelyanchik N. M., Korenyako A. J., Bayev A. A. (1970) Europ. J. Biochem., 15, 442—449.
4. Черкасов И. А. (1972) Успехи химии, 41, 1911—1934.
5. Львова Т. Н., Татарская Р. И., Воюшина Т. Л., Симонян С. З., Варламов В. П., Вальковский Д. Г., Рогожин С. В., Баев А. А. (1978) Биохимия, 43, 350—364.
6. Ogilvie K. K., Iwacha D. J. (1974) Can. J. Chem., 52, 1789—1797.
7. Hampton A., Nichol A. W. (1966) Biochemistry, 5, 2076—2082.
8. Ikehara M., Tezuka T. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 479—489.
9. Hall R. H., Khorana H. G. (1955) J. Amer. Chem. Soc., 77, 1871—1875.
10. Wachneldt T. V., Fox S. W. (1967) Biochim. et biophys. acta, 134, 1—8.
11. Leloir L. F., Cabib E. (1963) Methods in Enzymology, VI, 777.

12. Tener G. M. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 159—168.
13. Wade H. E. (1960) Biochem. J., 77, 534—542.
14. Абросимова-Амельянчик Н. М., Артамонова О. И., Татарская Р. И., Баев А. А. (1972) Докл. АН СССР, 207, 985—987.
15. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 831—838.
16. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V. (1967) Biochemistry, 6, 843—850.
17. Sperling J., Havron A. (1976) Biochemistry, 15, 1489—1495.
18. Shih Yi Wang (1962) Photochem. Photobiol., 1, 37—40.

Поступила в редакцию
11.VII.1977

После переработки
25.XI.1977

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF EXONUCLEASE A5 INHIBITORS

BANNIKOVA G. E., VARLAMOV V. P., ROGOZHIN S. V.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A number of competitive inhibitors of exonuclease A5 have been synthesized. These were pyrimidine 2' (3'), 5'-diphosphates containing diversely modified either heterocyclic bases, or sugar moiety. Polyphosphoric acid-elicited phosphorylation was shown to represent a convenient route for preparing the compounds of a given type. Cytidine 3', 5'- and uridine 3', 5'-diphosphates were prepared by means of chemical and enzymatic methods, their CD spectra being taken and inhibiting activity characterized by measuring the inhibitor constants.
