



УДК 547.963.32.07

**СИНТЕЗ ФОТОАКТИВНЫХ АНАЛОГОВ  
1,N<sup>6</sup>-ЭТЕНОАДЕНОЗИН-5'-ДИ- И ТРИФОСФАТОВ***Невинский Г. А., Денисов А. Ю.**Институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Получен ряд новых соединений:  $\gamma$ -анилид  $\epsilon$ АТР,  $\beta$ -анилид  $\epsilon$ АДР,  $\gamma$ -бензиламид  $\epsilon$ АТР,  $\beta$ -бензиламид  $\epsilon$ АДР, а также  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ АТР и  $\beta$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ АДР, которые охарактеризованы данными УФ-спектроскопии и ТСХ. Флуоресцентные свойства полученных веществ существенно зависят от структуры радикала при  $\beta$ -фосфате  $\epsilon$ АДР и  $\gamma$ -фосфате  $\epsilon$ АТР. Показана возможность использования аналогов в качестве флуоресцентных зондов и аффинных меток при исследовании ферментов.

В настоящее время одним из наиболее информативных методов исследования ферментов можно считать метод аффинной модификации, позволяющий локализовать в активных центрах белков структурные аналоги субстратов. В связи с этим особый интерес представляют химически активные аналоги субстратов, которые обладают флуоресцентными свойствами. Применение таких реагентов дает возможность исследовать конформационные перестройки в ферментах под действием внешних условий, а также оценивать расстояния между различными центрами связывания лигандов [1].

Как показано в работах [2, 3],  $\epsilon$ АТР для ряда ферментов является либо субстратом, либо конкурентным по отношению к АТР ингибитором. В то же время аналоги АТР, содержащие при  $\gamma$ -фосфате ароматические группировки, эффективно взаимодействуют с нуклеотидсвязывающими центрами большого числа ферментов [4–7]. Это позволяло надеяться, что введение ароматических группировок по концевым фосфатам  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ АДР не приведет к исчезновению сродства аналогов к АТР-зависимым ферментам.

Данная работа посвящена синтезу некоторых фосфамидных аналогов  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ АДР и исследованию их флуоресцентных свойств в свободном состоянии и после ковалентного присоединения к ферменту.

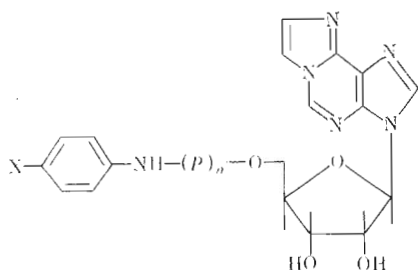
---

Принятые сокращения:  $\epsilon$ АТР — 1,N<sup>6</sup>-этенoАТР;  $\epsilon$ -АДР — 1,N<sup>6</sup>-этенoАДР, TNS — 2-толуидиннафтален-6-сульфонат; креатинкиназа — АТР: креатинфосфотрансфераза (КФ 2.7.3.2); НЕРЕС — 2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфонокислота; DCC — дициклогексилкарбодимид; СМЕ-DCC — *n*-толуолсульфонат N-циклогексил-N'-(4-метилморфолиний) этилкарбодимид.

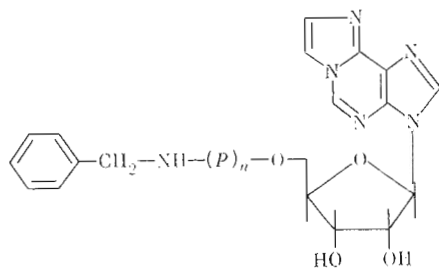
Данные УФ-спектров и хроматографической подвижности аналогов (I)–(VI)

Соединение	pH *	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм ( $\epsilon \cdot 10^{-3}$ , $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм ( $\epsilon \cdot 10^{-3}$ , $M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ )	$R_f$ (система)
(I)	2,0	275 (9,6)	247 (4,6)	0,64 (A), 0,36 (B)
	6,0	258 **: 268 (5,9); 276 (6,0); 300 **	250 (4,5)	
	13,0	258 **: 268 (5,9); 276 (6,0); 300 **	253 (5,1)	
(II)	2,0	275 (9,6)	247 (4,6)	0,52 (A), 0,26 (B)
	6,0	258 **: 267 (6,3); 276 (6,1); 300 **	250 (4,5)	
	13,0	258 **: 267 (6,0); 276 (5,9); 300 **	254 (5,1)	
(III)	2,0	265 (19,1)	242 (8,8)	0,76 (A), 0,46 (B), 0,26 (B)
	6,0	267 (17,2); 275 **: 300 **	246 (9,3)	
	13,0	266 (16,7); 275 **: 300 **	247 (10,1)	
(IV)	2,0	265 (20,9)	243 (10,0)	0,60 (A), 0,32 (B), 0,37 (B)
	6,0	267 (18,5); 275 **: 300 **	246 (10,0)	
	13,0	266 (17,5); 275 **: 300 **	247 (11,0)	
(V)	2,0	275 (9,6)	248 (4,3)	0,65 (A), 0,43 (B)
	6,0	260 **: 268 (6,0); 271 (6,1); 295 **	251 (4,3)	
	13,0	260 **: 268 (6,0); 271 (6,1); 295 **	253 (4,8)	
(VI)	2,0	275 (9,6)	248 (4,3)	0,56 (A), 0,37 (B)
	6,0	260 **: 268 (5,9); 277 (6,0); 295 **	251 (4,3)	
	13,0	260 **: 268 (5,9); 277 (6,0); 295 **	253 (4,8)	

\* pH 2,0 — спектры сняты в 0,1 н. HCl; pH 13,0 — спектры сняты в 0,1 н. NaOH.  
\*\* Плечо.



(I) X = H, n = 2; (II) X = H, n = 2  
(III) X = N<sub>3</sub>, n = 2; (IV) X = N<sub>3</sub>, n = 2



(V) n = 2  
(VI) n = 3

$\beta$ -Анилид  $\epsilon$ ADP (I),  $\gamma$ -анилид  $\epsilon$ ATP (II),  $\beta$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ ADP (III),  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ ATP (IV), а также  $\beta$ -бензиламид  $\epsilon$ ADP (V) и  $\gamma$ -бензиламид  $\epsilon$ ATP (VI) получены разработанными ранее в нашей лаборатории методами, основанными на взаимодействии аминов с производными ди- и трифосфатов, активированными с помощью СМЕ-DCC [8, 9], либо DCC [10]. Оба метода приводят к получению анилидов и бензиламидов ди- и трифосфатов этеноаденозина с высокими выходами (95–98%). Азидоанилиды  $\epsilon$ ADP и  $\epsilon$ ATP предпочтительнее получать с помощью первого метода. При использовании второго метода выход соединений (III) и (IV) составляет 50–70%. Синтезированные фосфаты выделены из реакционных смесей хроматографией на DEAE-целлюлозе (таблица).

При гидролизе соединений (I) – (VI) в течение 1 ч 0,1 н. HCl при 40°С получают соответствующие амины и  $\epsilon$ ADP или  $\epsilon$ ATP в соотношении 1:1. Продукты гидролиза идентифицированы с помощью метода ТСХ, микроколоночной хроматографии на DE-целлюлозе в системе Томлисона – Тенера и сравнением УФ-спектров исходных соединений с УФ-спектрами продуктов гидролиза. Наличие азидогруппы в анилидах (III) и (IV) подтверждается ИК-спектрами, в которых имеются по-

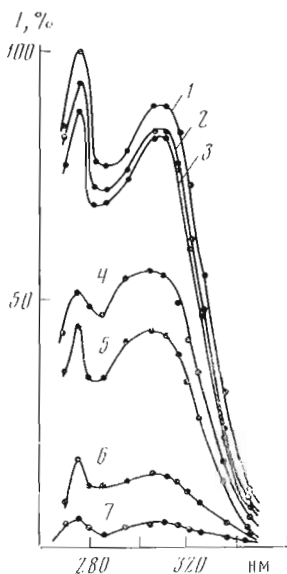


Рис. 1

Рис. 1. Спектры возбуждения флуоресценции (откорректированы, см. «Экспер. часть») соединений (I) — (VI) (максимум флуоресценции 405 нм): 1 —  $\beta$ -бензиламид  $\epsilon$ ADP (V); 2 —  $\epsilon$ ATP; 3 —  $\gamma$ -бензиламид  $\epsilon$ ATP (VI); 4 —  $\beta$ -анилид  $\epsilon$ ADP (I); 5 —  $\gamma$ -анилид  $\epsilon$ ATP (II); 6 —  $\beta$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ ADP (III); 7 —  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ ATP (IV). Спектр  $\epsilon$ ADP совпадает со спектром  $\epsilon$ ATP

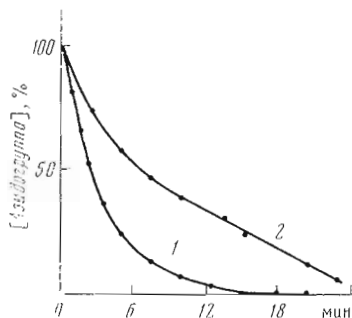


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые фотоиндуцируемого разложения азидогруппы водного раствора азидоанилида  $\epsilon$ ATP (IV) 0,06 (1) и 2 мМ (2) при pH 6,0

лосы поглощения в области  $2100\text{--}2140\text{ см}^{-1}$ . Структура соединений (1) — (VI) подтверждена также с помощью УФ-спектров (таблица).

Общий вид спектров возбуждения флуоресценции соединений (I) — (VI) и  $\epsilon$ ATP практически не различается (рис. 1). В то же время интенсивность флуоресценции синтезированных соединений существенно зависит от структуры ароматической группы при концевых фосфатах молекул  $\epsilon$ ADP и  $\epsilon$ ATP. Так, интенсивности флуоресценции бензиламидов (V), (VI) и  $\beta$ ATP практически одинаковы. У анилидов (I) и (II) они уменьшаются по сравнению с  $\epsilon$ ATP в 1,5 и 2 раза соответственно. Введение азидоарильной группировки в соединениях (III) и (IV) приводит к уменьшению интенсивности в 8 и 20 раз. После гидролиза аналогов (I) — (IV) 0,1 н. HCl ( $40^\circ\text{C}$ , 1—2 ч) их флуоресцентные характеристики возрастают до уровня свободной  $\epsilon$ ATP. Спектры испускания флуоресценции аналогов, снятых на максимуме возбуждения 305 нм, представлены одной бесструктурной полосой с  $\lambda_{\text{макс}}$  405 нм.

Известно, что молекула ATP имеет тенденцию к образованию свернутой конформации, в которой трифосфатная цепь сближена с пуриновым кольцом [11]. Дополнительное координирование трифосфатной группировки происходит в присутствии ионов металлов [12]. Скорее всего, эти свойства сохраняются и в  $\epsilon$ ATP. В таком случае в молекулах аналогов  $\epsilon$ ATP, которые имеют при  $\gamma$ -фосфате ароматический радикал, можно ожидать дополнительного взаимодействия последнего с модифицированным пуриновым кольцом молекулы аналога. По-видимому, наблюдаемые изменения в спектрах возбуждения флуоресценции  $\epsilon$ ATP и  $\epsilon$ ADP после введения по концевым фосфатам этих молекул анилидной и *n*-азидоанилидной группировок (рис. 1) связаны со стекинг-взаимодействием аро-

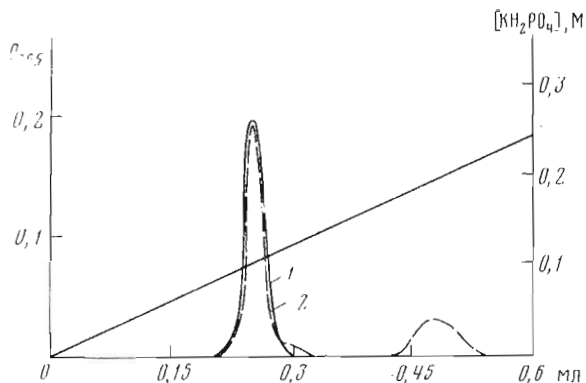


Рис. 3. Хроматографический анализ азидоанилида  $\epsilon$ АТР (IV) до облучения (1) и после облучения УФ-светом ( $\lambda > 300$  нм) (2) на микроколонке с DE-целлюлозой. Объем колонки 60 мкл, скорость элюции 25 мкл/мин. Использован градиент К-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 8 М мочевины

матических компонентов в аналогах (I)–(IV). Наличие более длинной трифосфатной группировки в аналогах (II) и (IV), вероятно, обеспечивает более эффективное взаимодействие ароматического радикала с нуклеозидной частью молекулы по сравнению с производными дифосфатов (I) и (III), что приводит к существенному уменьшению интенсивностей в спектрах возбуждения флуоресценции аналогов  $\epsilon$ АТР по сравнению с аналогами  $\epsilon$ АДР.

Были исследованы процессы фотоллиза *n*-азидоанилидов  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ АДР. В азидоанилиде трифосфата (IV) период полураспада азидогруппы составляет 2,5 мин при концентрации соединения 0,06 мМ и возрастает с увеличением концентрации до 2 мМ в 3 раза (рис. 2). Аналогичное увеличение периода полураспада было получено в случае дифосфата (III). Как видно из таблицы, фотоактивные соединения (III) и (IV) поглощают свет длиной волны свыше 300 нм, и увеличение времени полураспада фотоаналогов при увеличении их концентрации в облучаемой смеси вызывается не только азидогруппой.

В работе [13] показано, что облучение ультрафиолетовым светом бензиламида АТР может привести к частичному разрушению фосфамидной и фосфоэфирных связей в трифосфатной группировке. Для выяснения этого вопроса  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ АТР (IV) в концентрации 0,01 мМ облучали 30 мин. Хроматографический анализ продуктов фотоллиза (рис. 3) свидетельствует о том, что они имеют заряд, равный заряду аналога до облучения. Имеется также небольшое количество вещества с зарядом в два раза большим, чем у исходного соединения, по-видимому, за счет удвоения молекулы по азидогруппе [14]. Отсутствие соединений с меньшим зарядом, а также *n*-азидоанилина и  $\epsilon$ АТР указывает на то, что в выбранных условиях облучение ультрафиолетовым светом не приводит к разрыву фосфамидной и фосфоэфирных связей в фотоаналоге (IV). Интенсивность флуоресценции соединения (IV) после его облучения в течение 10–30 мин не изменяется.

Нам было изучено взаимодействие некоторых полученных соединений с креатинкиназой из скелетной мышцы кролика\*. Показано, что  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид)  $\epsilon$ АТР образует с ферментом специфичный фермент-ингибиторный комплекс и является аффинным реагентом креатинкиназы: УФ-облучение фермента с аналогом (IV) приводит к инактивации белка и ковалентному присоединению реагента к киназе. Субстраты — АДР и АТР — защищают фермент от инактивации.

\* Результаты будут опубликованы в журнале «Биохимия».

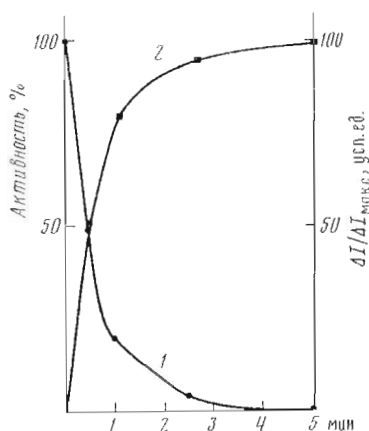


Рис. 4

Рис. 4. Зависимости активности креатинкиназы (1) и интенсивности флуоресценции системы фермента с азидаанилидом (IV) (2) от времени облучения системы УФ-светом ( $\lambda > 300$  нм). Условия см. «Экспер. часть».  $\Delta I_{\max}$  — максимальное приращение флуоресценции при длительном облучении системы ( $> 5$  мин)

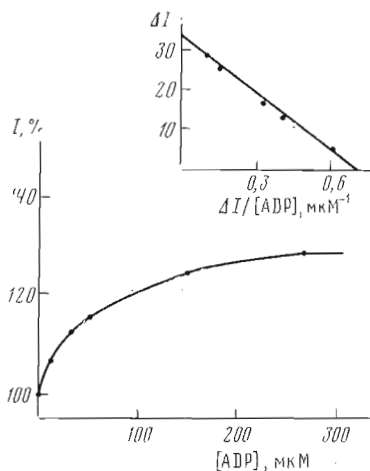


Рис. 5

Рис. 5. Зависимости от концентрации ADP интенсивности флуоресценции метки, ковалентно связанной с креатинкиназой. За 100% принята интенсивность флуоресценции метки после УФ-облучения аналога (IV) с ферментом  $> 5$  мин (см. рис. 4,  $\Delta I_{\max}$ )

В данной работе мы исследовали флуоресцентные свойства метки, ковалентно связанной с ферментом. Ковалентное присоединение аналога (IV) к креатинкиназе вызывает не только инактивацию фермента, но и возрастание интенсивности флуоресценции облученной системы (рис. 4). Кривые изменения флуоресценции облучаемой смеси и активности фермента достаточно хорошо коррелируют. Учитывая, что флуоресценция аналога (IV) после облучения в отсутствие фермента не изменяется, можно утверждать, что возрастание флуоресценции системы фермент + аналог (IV) связано только с ковалентным присоединением фотоактивного реагента (IV) в нуклеотидсвязывающем участке фермента.

Было показано, что интенсивность флуоресценции метки, ковалентно присоединенной к киназе, увеличивается примерно в 4–5 раз по сравнению со свободным аналогом (IV). Дополнительное увеличение флуоресценции происходит при добавлении АТР либо ADP к модифицированному меткой ферменту (рис. 5). Константа диссоциации комплекса фермента с ADP оказалась близкой к величине, полученной по методу флуоресцентного титрования с использованием зонда TNS ( $K_{\text{дисс}} 64 \mu\text{M}$ ), и равна  $46 \mu\text{M}$  (рис. 5, вставка). На вставке рис. 5 данные приведены в координатах Бинеси и Хилдебранда для получения  $K_{\text{дисс}}$  с помощью уравнения [15]:

$$\Delta I = \Delta I_{\text{полн}} - K_{\text{дисс}} \cdot \frac{\Delta I}{[L]},$$

где  $\Delta I$ ,  $\Delta I_{\text{полн}}$ ,  $L$  означают изменение флуоресценции при концентрации лиганда  $[L]$  и полное изменение интенсивности флуоресценции метки.

Таким образом, ковалентно связанная с ферментом метка оказалась чувствительной к присутствию субстратов. Представляется перспективным использование креатинкиназы, модифицированной с помощью  $\gamma$ -(*n*-азидоанилида)  $\epsilon$ АТР, для детального исследования взаимодействия центров связывания различных субстратов.

Синтезированные нами новые аналоги  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ ADP также, по-видимому, могут быть использованы в качестве зондов и аффинных меток при исследовании других ферментов.

## Экспериментальная часть

УФ-спектры регистрировали на спектрометре «Specord UV-VIS» (ГДР), ИК-спектры — на спектрометре IR (ГДР). Флуоресценцию аналогов измеряли в 0,05 М буфере HEPES — KOH (2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота — KOH), pH 7,3, на приборе «Hitachi MPF-2A» (Япония). Флуоресценцию аналогов в присутствии ферментов измеряли на спектрометре фирмы «Durrum», модель D-110 (США). Потенциометрические измерения проводили, используя pH-метр марки pH-121.

ТСХ осуществляли на стандартных пластинках «Silufol UV<sub>254</sub>» (Kavalier, СССР) в системах: дioxан — вода — аммиак, 6:4:1 (А); изомасляная кислота — вода — триэтиламин, 66:33:1 (Б); ацетонитрил — вода, 4:1 (В). Препараты  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ АДР любезно предоставлены Р. И. Гвоздевым (Институт химической физики, Черноголовка), препарат креатинкиназы из скелетных мышц кролика — Ж. И. Аюпяном (Институт экспериментальной биологии, Ереван).

Использовали 2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота (Farak, ФРГ), креатинфосфат (Reanal, ВНР). *n*-Азидоанилин синтезирован согласно методике [9]. Анилин и бензиламин очищали перегонкой.

Синтез соединений (I) — (VI) проводили по аналогии с методами, описанными в работах [9, 10].

*Метод А.* К 40 мг *n*-азидоанилина (анилина или бензиламина) в 10 мл воды добавляли 10 мкмоль  $\epsilon$ АТР (или  $\epsilon$ АДР). Раствор охлаждали до 10°С и титровали 1 н. HCl до pH 5,6. Затем к раствору добавляли 200 мг СМЕ-DCC в четыре приема через 10—20 мин. После каждого добавления СМЕ-DCC раствор титровали 1 н. HCl до pH 5,6 и поддерживали pH равным этой величине до последующего добавления конденсирующего реагента. После окончания реакции (определяли по прекращению подщелачивания реакционной смеси) pH доводили до 8,5 добавлением триэтиламина. Раствор разбавляли до 50 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (120 мл) в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме. Колонку промывали 400—500 мл 0,01 либо 0,02 М ТЕАВ-буфером, pH 7,5, для аналогов  $\epsilon$ АДР и  $\epsilon$ АТР соответственно. Продукт элюировали в линейном градиенте ТЕАВ от 0 до 0,3 М для аналогов трифосфата и от 0 до 0,2 М для аналогов дифосфата. Объем фракций 10 мл. За выходом продуктов следили по поглощению при 260 и 275 нм. Фракции, поглощающие в УФ-свете, объединяли и упаривали при 30—35°С. Для удаления ТЕАВ остаток несколько раз упаривали с небольшим количеством воды. Выходы 80—90%.

*Метод В.* К 10 мкмоль  $\epsilon$ АТР (или  $\epsilon$ АДР (триэтиламониевые соли)) добавляли 0,2 мл абс. диметилформамида и 150 мкмоль DCC. Полученную смесь оставляли на 4 ч при 20°С. Затем в смесь добавляли 40 мкмоль соответствующего амина, оставляли при 4°С на 12—14 ч и фильтровали. Избыток непрореагировавшего амина и DCC осаждали добавлением к раствору 50 мл абс. эфира. Операцию переосаждения повторяли 3 раза. Сухой остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Дальнейшие операции очистки проводили как описано в методе А. Выходы составляли 80—98% в случае амидов и анилидов нуклеотидов и 50—70% в случае *n*-азидоанилидов  $\epsilon$ АТР и  $\epsilon$ АДР.

При определении величин молярных коэффициентов поглощения соединений (I) — (VI) концентрацию этих соединений определяли с помощью колориметрического метода по образованию молибденовой сини [16, 17] после гидролиза соединений в смеси серной и азотной кислот [17].

Для облучения фотоактивных соединений (III) и (IV) применяли лампу СВД-120 А с фильтром БС-4 и дополнительным фильтром из плексигласа (толщиной 3 мм), пропускающими свет длиной волны свыше 300 нм. Эксперименты проводили в кварцевой кювете при 10°С. Интенсивность падающего света  $2 \cdot 10^{17}$  квант/с. О скорости разложения азидо-

группы судили по уменьшению поглощения растворов при 267 и 310 нм. После полного разложения азидогруппы поглощение растворов оставалось постоянной величиной и составляло примерно 50% от поглощения растворов до облучения.

Модификацию креатинкиназы с помощью фотоактивного аналога (IV) проводили в аналогичных условиях. Облучаемая смесь содержала 5–10 мкМ креатинкиназу, 20 мкМ азидоанилид (IV), 0,05 М HEPES — KOH-буфер (рН 7,5). Активность фермента определяли с помощью реакции образования креатинфосфата потенциометрическим методом [18]. Измерения проводили в термостатированной кювете (объемом 1,5 мл) при 30° С с непрерывным перемешиванием. Реакционная смесь содержала 40 мМ креатин, 4 мМ АТФ, 5 мМ уксуснокислый магний, 100 мМ уксуснокислый натрий, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,01 мМ EDTA. Реакцию запускали добавлением 2–3 мкг фермента. О начальной скорости судили по расходу 0,01 н. NaOH за первые 1–3 мин, поддерживая постоянным рН (8,5).

Спектры флуоресценции соединений (I) — (VI) сняты на максимуме возбуждения (305 нм). Спектры возбуждения флуоресценции были откорректированы с учетом поглощения метки и калибровочной кривой для лампы возбуждения. Поглощение учитывали по формуле [19]

$$I = I_{\text{изм}}K; K = \frac{X}{1 - e^{-X}},$$

где  $X = \epsilon_{\lambda} \cdot 2,3 \cdot c_0 \cdot d$ ,  $I$  — интенсивность флуоресценции аналога,  $d = 1$  см (длина оптического пути),  $c_0$  — концентрация аналога (М),  $\epsilon_{\lambda}$  — молярный коэффициент поглощения вещества. При концентрации аналога 0,02 мМ поглощение в диапазоне 290–350 нм составляло не более 10%.

Измерение флуоресценции модифицированного фермента проводили при концентрации фермента 8 мкМ в 0,05 М HEPES — KOH-буфере (рН 7,5). При добавлении к модифицированному ферменту лигандов (ADP или АТФ) регистрировали изменение флуоресценции с точностью до 1% с учетом поправки на разбавление.

Авторы благодарят О. И. Лаврик за активное участие в развитии работы и ценные обсуждения, проф. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес и внимание к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гвоздев Р. И., Когельников А. И., Пивоваров Д. П., Садков А. П., Кост А. А. Использование для исследования механизма действия нитрогеназы индуктивно-резонансного переноса энергии между ковалентно присоединенной по АТФ-азным центрам аффинной люминесцентной меткой с железосерными кластерами. — Биорган. химия, 1975, т. 1, № 2, с. 1207–1214.
2. Leonard N. J., Tolman C. L. Fluorescent nucleosides and nucleotides. — In: Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 255, p. 43–58.
3. Иванов М. В., Кост А. А. Исследование белков с помощью этенопроизводных аденина и цитозина. — В кн.: Успехи биологической химии. М.: Наука, 1980, т. 216, с. 112–129.
4. Lavrik O. I., Nevinsky G. A. Phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600. Activation by nucleotides and affinity modification of the effector binding sites. — FEBS Lett., 1980, v. 109, № 1, p. 13–17.
5. Бульчев Н. А., Лаврик О. И., Невинский Г. А. Сравнительный анализ аффинной модификации ряда аминокислот-тРНК-синтетаз с помощью γ-(п-азидоанилида) АТФ. — Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 3, с. 558–566.
6. Грицев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г., Стариков В. В. γ-Анилиды нуклеозид-5'-трифосфатов как субстраты ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. — Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 3, с. 575–585.
7. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Попов Р. А. Проявление кооперативности при взаимодействии креатинкиназы из скелетных мышц кролика с γ-анилидом АТФ. — Биохимия, 1981, т. 46, № 9, с. 1564–1569.
8. Бабкина Г. Т., Зарягова В. Ф., Кнорре Д. Г. Получение γ-амидов нуклеозид-5'-фосфатов в водном растворе с помощью водорастворимого карбодимида. — Биорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 611–615.

9. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. Выявление нуклеотидсвязывающих участков двух типов в триптофанил-тРНК-синтетазе и их модификация.— *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 3, с. 352–364.
10. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samucov V. V. General method for the synthesis of gamma-ATP-derivatives.— *FEBS Lett.*, 1976, v. 70, № 1, p. 105–108.
11. Parakhia D., Fullman B., Saran A. A. Molecular orbital probe into the conformation of ATP.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, № 6, p. 1284–1289.
12. Kuntz G. P. P., Glassman T. A., Cooper C., Swift T. J. The role of coordinated water in metal ion-adenine ring binding in complexes of adenosine triphosphate.— *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 4, p. 538–547.
13. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. Влияние структуры фотоактивных аналогов АТР на аффинную модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы. Модификация фермента по двум типам нуклеотидсвязывающих участков.— *Молекулярн. биология*, 1979, т. 13, № 5, с. 1001–1010.
14. Patai S. The chemistry of the azido group. New York — London: John Wiley and Sons, 1971, p. 26–40.
15. Holler E., Bennet E. L., Calvin M. 2-*p*-Toluidinylnaphtalene-6-sulfonate, a fluorescent reporter group for *L*-isoleucyl-tRNA synthetase.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1971, v. 45, № 2, p. 409–415.
16. Grindey G. B., Nichol Ch. A. Micro procedure for determination of pyrophosphate.— *Anal. Biochem.*, 1970, v. 33, № 1, p. 114–119.
17. Губен-Вейль. Методы органической химии. М.: Химия, 1967, т. 2, с. 31.
18. Milner-White E. J., Watt D. S. Inhibition of adenosine 5'-triphosphate-creatine phosphotransferase by substrate-ion complexes.— *Biochem. J.*, 1971, v. 122, № 5, p. 727–740.
19. Engel G., Heider H., Maelicke A., von der Haar A., Cramer F. Fluorescence studies on substrate binding to seryl-tRNA synthetase from yeast.— *Eur. J. Biochem.*, 1972, v. 29, № 1, p. 257–265.

Поступила в редакцию  
2.IV.1984

## SYNTHESIS OF PHOTOREACTIVE ANALOGS OF 1,N<sup>6</sup>-ETHENO ADENOSINE 5'-DI- AND TRIPHOSPHATES

NEVINSKY G. A., DENISOV A. Yu.

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

The following new compounds have been prepared:  $\epsilon$ ATP  $\gamma$ -anilidate,  $\epsilon$ ADP  $\beta$ -anilidate,  $\epsilon$ ATP  $\gamma$ -benzylanilidate,  $\epsilon$ ADP  $\beta$ -benzylanilidate,  $\epsilon$ ATP  $\gamma$ -(*p*-azidoanilidate),  $\epsilon$ ADP  $\beta$ -(*p*-azidoanilidate) and characterized by UV-spectroscopy data and TLC in several systems. It was shown that the fluorescence properties of the synthesized analogs significantly depend on the structure of the radical at  $\epsilon$ ADP  $\beta$ -phosphate and  $\epsilon$ ATP  $\gamma$ -phosphate. A possible utility of these compounds as fluorescence probes and affinity labels in the enzyme studies was demonstrated.