



УДК 547.963.32.07

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ
СОЕДИНЕНИЯХ.* ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ 2'(3')-АМИНОАЦИЛАДЕНОЗИН-5'-
ФОСФАТА И АДЕНОЗИНА КАК ИНГИБИТОРЫ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Тарусова Н. В., Николаева Л. В., Буханова М. К.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

2'(3')-О-(R, S)-(α-амино-α-фенилэтилфосфонил)аденозин и его 5'-фосфат ингибировали реакцию пурамицина с AcPhe-тРНК в системе рибосом *E. coli*. На основании данных по влиянию этих веществ на связывание акцепторного фрагмента САССА-(Phe) показано, что они конкурировали с пурамицином, связываясь с акцепторным участком рибосом. Эти соединения не оказывали влияния на связывание донорного фрагмента.

Для выяснения механизма функционирования пептидилтрансферазного центра рибосом (ПТЦ)** существенное значение имеет изучение специфичности реакции образования пептидной связи.

Для доноров пептида в рибосомах на примере ряда аналогов было показано, что сложноэфирная группа, подвергающаяся нуклеофильной атаке, может быть модифицирована в широких пределах с сохранением субстратных свойств, например в случае замены этой группы на тиокарбонильную [2] и даже фосфинильную [1], хотя в последнем случае кардинально менялся весь механизм реакции. Фосфонатные аналоги «минимальных» доноров, несмотря на наличие кислой фосфонатной группы, сохраняли сродство к донорному участку ПТЦ и являлись конкурентными ингибиторами [3].

Интерес представляют и возможности модификации группы, акцептирующей пептид. Кроме аминогрупп сложных эфиров (аминоацил-тРНК, 2'(3')-О-аминоацилнуклеотиды [2]) или амидов (пурамицин и аминокислотные производные 2'-амино-2'-дезоксинуклеотидов [4]) с $pK \sim 8$ ацилировать в реакции транспептидации может и оксигруппа оксианалогов пурамицина и аминоацил-тРНК [5], pK которой на несколько порядков выше.

Таким образом, имелись веские основания предполагать, что 2'(3')-О-(R, S)-(α-амино-α-фенилэтилфосфонил)аденозин (I) и его 5'-фосфат (II) [6], аминогруппы которых более основны, чем в пурамицине и амино-

* Сообщение IX см. [1].

** Принятые сокращения: ПТЦ — пептидилтрансферазный центр рибосом, САССА-(Phe) и САССА-(AcLeu) — 2'(3')-О-фенилаланил- и 2'(3')-О-(N-ацетиллейцил)САССА.

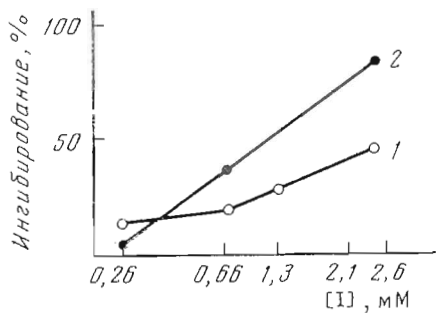


Рис. 1

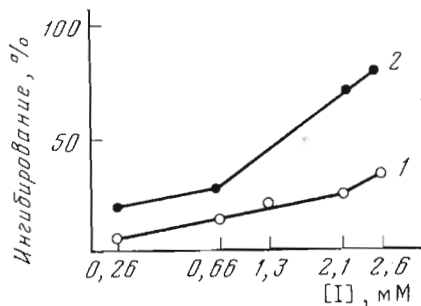
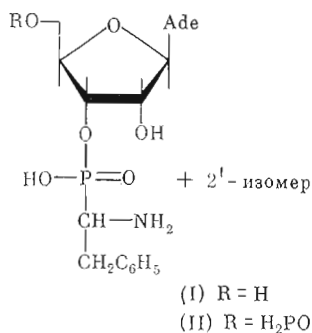


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость ингибирования реакции AcPhe-tPНК с пурамином от концентрации соединений (I) — 1 и (II) — 2. Реакцию проводили в системе с матрицей poly(U), в качестве акцептора использовали пурицин в концентрации 0,1 мМ

Рис. 2. Зависимость ингибирования реакции связывания акцепторного фрагмента САССА-(¹⁴C)Phe с рибосомами от концентрации соединений (I) — 1 и (II) — 2

ацилнуклеотидах (их рК 10–11 по данным для моноэфиров фосфоновых кислот [7]), могли бы обладать пурамициновыми свойствами.



Ранее было известно о синтезе некоторых 2'(3')-аминоалкилфосфонатов аденозина, в том числе соединения (I), и об ингибировании ими биосинтеза белка в рибосомах [8], характер которого не был, однако, изучен.

В настоящей работе показано, что оба вещества (I и II) ингибировали взаимодействие пурамицина и AcPhe-tPНК, катализируемое рибосомами *E. coli*, как в безматричной системе, так и в системе с poly(U) (рис. 1). При этом соединение (II) оказалось более сильным ингибитором. Оба соединения ингибировали также связывание акцепторного фрагмента САССА-(Phe) (рис. 2). В последнем случае зависимость ингибирования от концентрации веществ (I) и (II) имеет тот же характер, что и при их влиянии на пурамициновую реакцию. Эти данные свидетельствуют о конкуренции исследуемых соединений с пурамином и о связывании их на акцепторном участке рибосом. Чтобы определить, связано ли ингибиторное действие соединений фосфонатного типа с акцептированием остатка пептида или ацетиламинокислоты, как это известно для пурамицина, или это акцептирование отсутствует, была применена специальная методика, заключающаяся в подсчете баланса расхода донора Ac[³H]Phe-tPНК в присутствии веществ (I) или (II) в системе рибосом по сравнению с его расходом в реакции с пурамином. При этом исходное количество донора при наличии соединений (I) или (II) в пределах ошибки измерений не изменялось, что указывало на отсутствие акцептирования остатка ацетилфенилаланина аминогруппами ингибиторов (I) и (II). Основываясь на известных данных о реакционной способности аналогов пурамицина [4], можно предположить, что неспособность аминогрупп веществ (I) и (II) к ацилированию в условиях пурамициновой реакции обусловлена присут-

ствием кислой фосфонильной группы. Последняя не только повышает рK аминогруппы в соединениях (I) и (II) примерно на два порядка по сравнению с аминогруппой пуромицина, но и, по-видимому, влияет на пространственную ориентацию этих групп, определяющую акцепторные свойства аналогов.

Таким образом, производные (I) и (II) оказались субстратоподобными ингибиторами, связывающимися с акцепторным участком рибосом и не участвующими в реакции транспептидации. При исследовании взаимовлияний субстратов рибосом [4] ингибиторы такого типа представляли интерес. Было показано, что связывание донорного фрагмента САССА-(AcLeu) с рибосомами не зависело от наличия соединений (I) или (II) на акцепторном участке рибосом. Это свидетельствовало об отсутствии влияния акцептора на связывание донора пептида, о чем можно было судить только по некоторым косвенным данным.

Авторы выражают благодарность Р. М. Хомутову, который предложил тему настоящего исследования и участвовал в обсуждении результатов работы и ее написании, а также А. А. Краевскому за активную помощь при выполнении данной работы и обсуждении полученных результатов.

Экспериментальная часть

Соединение (I) было получено согласно методике [8]. Синтез производного (II) был проведен в соответствии с работой [6].

Рибосомы получали из клеток *E. coli* MRE-600 по ранее описанному методу [9]; Phe-тРНК, AcPhe-тРНК и AcLeu-тРНК — в соответствии с работой [10]; САССА-(^3H)Phe) и САССА-(Ac ^{14}C)Leu) — из ^3H]Phe-тРНК и Ac ^{14}C]Leu-тРНК — согласно [11]. Удельная радиоактивность ^3H]PheOH (СССР) 10 Ки/ммоль, 1 пмоль ^3H]Phe-тРНК и Ac ^3H]Phe-тРНК содержал 13 000 имп/мин. Удельная радиоактивность ^{14}C]LeuOH (Англия) 324 мКи/ммоль, 1 пмоль САССА-(Ac ^{14}C)Leu) соответствовал 700 имп/мин. Удельная радиоактивность ^{14}C]Phe (Amersham, Англия) 495 мКи/ммоль, 1 пмоль САССА- ^{14}C]Phe соответствовал 1050 имп/мин.

Пуромициновую реакцию проводили в системе с матрицей [12] и в безматричной системе [13].

В первом случае реакционная смесь в объеме 0,15 мл содержала 10 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 160 мМ NH₄Cl, 75 пмоль рибосом, 0,8 ОЕ poly(U) и ~1 пмоль Ac ^3H]Phe-тРНК. Смесь преинкубировали 5 мин при 30°С, добавляли пуромицин (10⁻⁴ мМ) или вместе пуромицин и исследуемое вещество в количествах, указанных на рис. 1. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 30°С, реакцию останавливали добавлением равного объема 0,5 н. NaOH. После проведения щелочного гидролиза (30 мин при 37°С) продукт реакции AcPhe-пуромицина экстрагировали 3 мл этилацетата. Радиоактивность органического слоя, высушенного Na₂SO₄, измеряли в толуоловом сцинтилляторе с метилцеллозольвом (10 и 5 мл соответственно).

Во втором случае реакционная смесь в объеме 0,15 мл содержала 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 400 мМ KCl, 75 пмоль рибосом, 0,8 пмоль Ac ^{14}C]Leu-тРНК и 50 мкл этанола. Концентрация пуромицина 10 мМ. Инкубацию и обработку реакции проводили в соответствии с методикой 1. Соединение (I) в концентрации 2,6 мМ ингибировало реакцию на 22%, а соединение (II) в той же концентрации понижало выход Ac ^3H]Phe на 56%. Связывание акцепторного фрагмента САССА-(^3H]Phe) по акцепторному участку в присутствии производных (I) и (II) определяли по методике [14] (результаты представлены на рис. 2).

При определении акцепторной активности соединений (I) и (II) инкубационная смесь в объеме 0,15 мл содержала 10 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 160 мМ NH₄Cl, 75 пмоль рибосом, 0,8 ОЕ poly(U) и 1 пмоль Ac ^3H]Phe-тРНК. Смесь преинкубировали 5 мин при 30°С, за-

тем к ней добавляли соединения (I) или (II) в концентрации 1 мМ (в контрольной пробе использовали пурамицин), инкубацию проводили 20 мин при 30°С. Реакцию останавливали добавлением 3 мл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, 20 мМ MgCl₂ и 160 мМ NH₄Cl (рН 7,5). Смесь фильтровали через фильтры VUFS (диаметр пор 0,23 мкм, Сулпроге, ЧССР), промывали буфером. Радиоактивность фильтров просчитывали в 5 мл толуолового сцинтиллятора. Значения радиоактивности до и после инкубации с соединениями (I) и (II) практически не различались.

Связывание донорного фрагмента САССА-(Ac[¹⁴C]Leu) в присутствии производных (I) или (II) проводили по методике [15]. По полученным данным, эти вещества не влияли на связывание донора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Викторова Л. С., Куханова М. К., Хомутов Р. М. (1981) Биоорганическая химия, 7, 248–255.
2. Краевский А. А., Куханова М. К., Готтих Б. П. (1977) Молекулярная биология, т. 9, серия «Итоги науки и техники», М.
3. Тарусова Н. Б., Куханова М. К., Хомутов Р. М. (1978) Биоорганическая химия, 4, 1175–1180.
4. Kravetsky A. A., Kukhanova M. K. (1979) Progr. in Nucl. Acids Research and Mol. Biol., 23, 1–51.
5. Fahnestock S., Neumann M., Shashoua V., Rich A. (1970) Biochemistry, 9, 2477–2483.
6. Бирюков А. И., Гандуркина И. А., Осипова Т. И., Тарусова Н. Б., Хомутов Р. М. (1978) Биоорганическая химия, 4, 1471–1475.
7. Петров К. А., Чаузов В. А., Ерохина Т. С. (1974) Успехи химии, 18, 2045–2087.
8. Zemlička J., Chládek S. (1969) Collect. Czech. Chem. Commun., 34, 1007–1014.
9. Lessard J. L., Pestka S. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6909–6912.
10. Lewin J. G., Nirenberg M. J. (1968) J. Mol. Biol., 34, 467–478.
11. Monro R. E., Cerna J., Marcker K. A. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 1042–1049.
12. Краевский А. А., Николаева Л. В., Куханова М. К., Гнучев Н. В., Готтих Б. П. (1975) Биоорганическая химия, 4, 368–374.
13. Monro R. E. (1971) Methods in Enzymol., 20, 472–481.
14. Hishizava T., Pestka S. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 147, 624–631.
15. Поповкина С. В., Завгородний С. Г., Ажаев А. В., Котусов В. В., Вигестале Л. С., Куханова М. К., Гнучев Н. В., Краевский А. А., Готтих Б. П. (1978) Молекулярная биология, 12, 397–403.

Поступила в редакцию
2.VII.1980

BIOLOGICALLY [ACTIVE] PHOSPHOROORGANIC COMPOUNDS. X. PHOSPHOROORGANIC ANALOGS OF 2'(3')-AMINOACYLADENOSINE-5'-PHOSPHATE AND ADENOSINE AS INHIBITORS OF PROTEIN BIOSYNTHESIS

TARUSOVA N. B., NIKOLAYEVA L. V., KUKHANOVA M. K.

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

2'(3')-O-(R, S)-(α-amino-α-phenylethylphosphonyl)adenosine and its 5'-phosphate inhibited the reaction of puromycin with AcPhe-tRNA in the *E. coli* ribosome system. From the effect on binding the acceptor fragment САССА-(Phe), it follows that these compounds compete with puromycin due to their binding to the acceptor site in ribosomes. Both compounds failed to affect the binding of the donor fragment.