



УДК 547.963.3.04

СИНТЕЗ ФОТОАКТИВНЫХ АНАЛОГОВ ФЕНИЛАЛАНИНА
И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
С ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗОЙ ИЗ *E. COLI* MRE-600

Даврик О. И., Цевинский Г. А., Ходырева С. И.

Институт органической химии СО Академии наук СССР, Новосибирск

Моор Н. А.

Новосибирский государственный университет

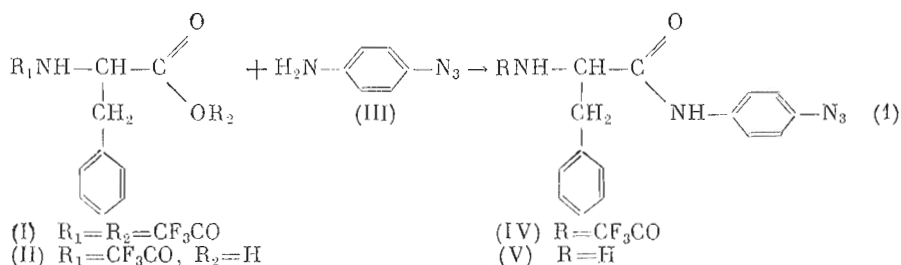
Получены фотоактивные аналоги фенилаланина: *n*-азидоанилид фенилаланина и β -(*n*-азидоанилид)фенилаланилпирофосфат. Исследовано взаимодействие этих аналогов с фенилаланил-тРНК-синтеазой из *E. coli* MRE-600. Оба аналога проявляют конкурентный по отношению к фенилаланину тип ингибирования в реакции аминоацилирования тРНК с достаточно высоким средством ($1,6 \cdot 10^{-4}$ и $3,1 \cdot 10^{-5}$ М соответственно). Аналоги ингибируют реакцию по смешанному и бесконкурентному типам по отношению к АТР соответственно. Исследована аффинная модификация фенилаланил-тРНК-синтеазы с помощью этих аналогов.

Изучение структурно-функциональной топографии многоцентровых ферментов — одно из важнейших направлений энзимологии. Для этой цели в случае аминоацил-тРНК-синтеаз (КФ 6.1. 1.20) успешно применяется метод аффинной модификации [1]. К настоящему времени для блокирования активных центров этих ферментов были использованы как фотоактивные, так и алкилирующие производные АТР и тРНК [2–7]. В то же время для модификации участков связывания субстратных аминокислот применяли только один тип аналогов: хлор- и бромметилкетоны аминокислот [8–11]. Настоящая работа посвящена синтезу фотоактивных производных фенилаланина и изучению их взаимодействия с фенилаланил-тРНК-синтеазой из *E. coli* MRE-600. Реакционноспособные группы были присоединены к карбоксильной группе молекулы фенилаланина, дающей минимальный вклад в специфическое комплексообразование [12].

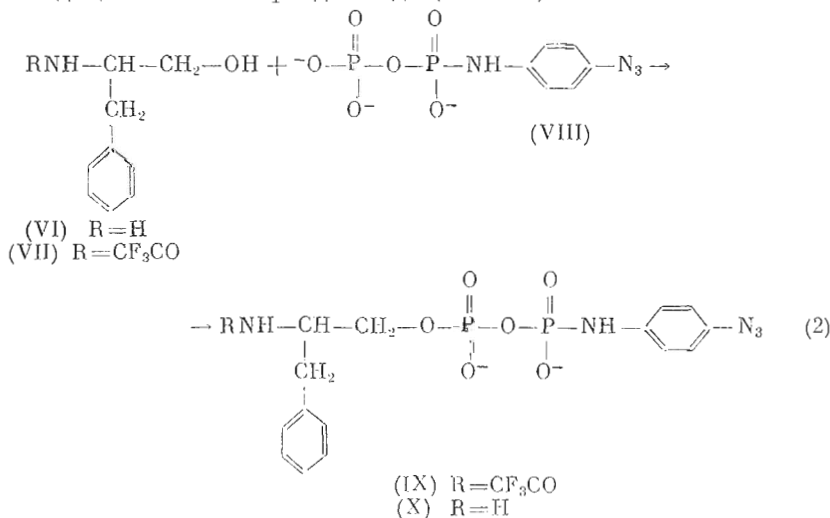
Были получены два аналога: *n*-азидоанилид фенилаланина и β -(*n*-азидоанилид)фенилаланилпирофосфат. В первом соединении фотоактивная группировка связана с карбоксилем фенилаланина, принимающим непосредственное участие во взаимодействии с АТР при формировании промежуточного соединения синтеазной реакции — аминоациладенилата. Второе соединение не содержит карбоксильной группы, но имеет остаток пирофосфата, который может, по-видимому, взаимодействовать с фосфат-связывающим участком активного центра фермента. Таким образом, как в первом, так и во втором случае возможны контакты реакционноспособного радикала с АТР-узнающими участками на ферменте и другими участками в центрах формирования аденилата. Исследование взаимодействия данных аналогов с фенилаланил-тРНК-синтеазой представляет интерес

для понимания механизма действия многосубстратного и многоцентрового фермента.

Синтез *n*-азидоанилида фенилаланина (V) проводили конденсацией *n*-азидоанилида (III) с *N*-трифторацетилфенилаланином (II) в присутствии дициклогексилкарбодимида (схема 1) с последующим удалением трифторацетильной защитной группировки и выделением искомого продукта при хроматографии на колонке с дауэксом 50.



β -(*n*-Азидоанилид)фенилаланинилпирофосфат (X) получали по аналогии с синтезом фенилаланиниладенилата [13] конденсацией *n*-азидоанилида пирофосфата (VIII) с *N*-трифторацетилфенилаланином (VII) в присутствии дициклогексилкарбодимида (схема 2).



Последующая обработка *N*-трифторацетилфенилаланинилпирофосфата (IX) водным раствором 9 *n*. аммиака и разделение продуктов реакционной смеси на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте концентраций бикарбоната триэтиламмония позволили выделить конечный продукт (X). Результаты хроматографии представлены на рис. 1.

Для полученных аналогов фенилаланина (V) и (X) было проведено исследование их ингибирующего действия в реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600. Из рис. 2 видно, что характер ингибирования реакции аналогом (X) конкурентен по отношению к аминокислоте. Такой же тип ингибирования по отношению к фенилаланину наблюдался и для *n*-азидоанилида фенилаланина (V). Полученные величины констант ингибирования приведены в табл. 1. Видно, что оба аналога имеют достаточно высокое сродство к ферменту. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о минимальном влиянии карбоксильной группы аминокислот на комплексобразование аналогов последних с аминоацил-тРНК-синтетазами [12].

Поскольку структура синтезированных аналогов аминокислот предполагает возможность их взаимодействия с участками связывания других

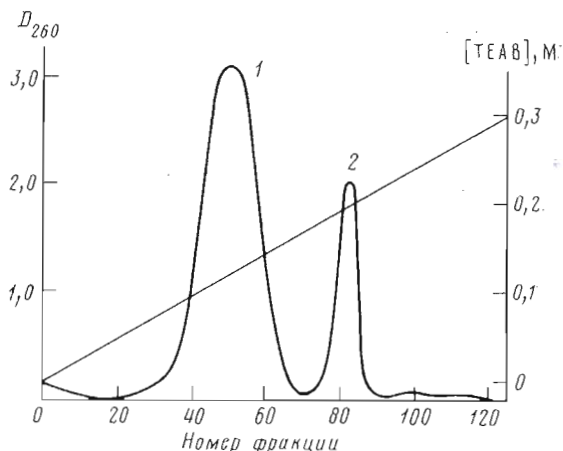


Рис. 1. Хроматографическое выделение β -(*n*-азидоамилид)фенилаланинилпирофосфата (X) на DEAE-целлюлозе А-25. Пик 1 — β -(*n*-азидоамилид)фенилаланинилпирофосфат, 2 — *n*-азидоамилид фосфата

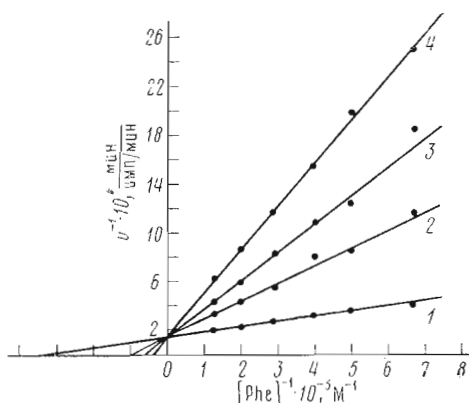


Рис. 2. Зависимость скорости реакции аминоацелирования тРНК^{Phe} от концентрации фенилаланина (в обратных координатах) при различных концентрациях β -(*n*-азидоамилид)фенилаланинилпирофосфата (X) (M): 1 — 0; 2 — $8,0 \cdot 10^{-5}$; 3 — $1,3 \cdot 10^{-4}$; 4 — $2,0 \cdot 10^{-4}$

субстратов фенилаланил-тРНК-синтазы, мы исследовали ингибиторные свойства аналогов по отношению к АТР и тРНК. Согласно рис. 3, *n*-азидоамилид (V) ингибирует реакцию аминоацелирования тРНК, проявляя смешанный тип ингибирования по отношению к АТР. Это может свидетельствовать о локализации структурных элементов данного аналога вблизи АТР-связывающего центра фермента либо о наличии каких-то косвенных взаимодействий, влияющих на взаимодействие фермента с АТР. Константа ингибирования аналога, определенная по отношению к АТР, незначительно отличается от K_i , определенной по отношению к фенилаланину (табл. 1).

В случае пирофосфата (X) наблюдался бесконкурентный характер ингибирования реакции по отношению к АТР (рис. 4). В данном случае, по-видимому, не существует прямого взаимодействия аналога с АТР-связывающим центром фермента.

Аналог (X) проявляет неконкурентный тип ингибирования по отношению к тРНК в реакции синтеза фенилаланил-тРНК (рис. 5). Это также свидетельствует об отсутствии непосредственной конкуренции аналога и

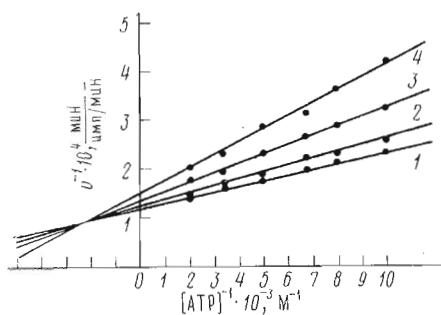


Рис. 3

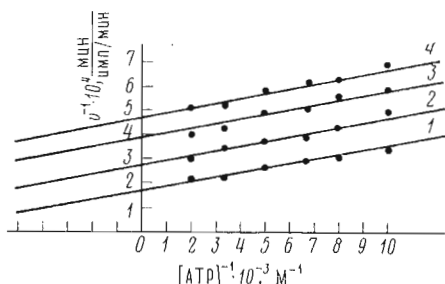


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость скорости реакции аминоацелирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР (в обратных координатах) при различных концентрациях *n*-азидоанилида фенилаланина (V) (M): 1 — 0; 2 — $1,0 \cdot 10^{-4}$; 3 — $2,0 \cdot 10^{-4}$; 4 — $4,0 \cdot 10^{-4}$

Рис. 4. Зависимость скорости реакции аминоацелирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР (в обратных координатах) при различных концентрациях β-(*n*-азидоанилид)-фенилаланилпирофосфата (X) (M): 1 — 0; 2 — $8,0 \cdot 10^{-5}$; 3 — $1,3 \cdot 10^{-4}$; 4 — $1,6 \cdot 10^{-4}$

тРНК за одни и те же контактные участки на ферменте, однако указывает на взаимное влияние аналога и тРНК при связывании с последним. Наши результаты согласуются с литературными данными по интеркаляции участков связывания тРНК и аминокислот в случае аминоацил-тРНК-синтаз [14–17].

При облучении УФ-светом ($\lambda > 300$ нм) в присутствии аналогов наблюдается инактивация фенилаланил-тРНК-синтазы (рис. 6). На основе кинетических данных были рассчитаны величины $k_{\text{нак}}$ для реакции модификации фенилаланил-тРНК-синтазы аналогами фенилаланина. Характер зависимости величин $k_{\text{нак}}$ от концентрации реагентов (рис. 7) свидетельствует об аффинной модификации.

Важным критерием аффинной модификации является защита биополимера от модификации аналогом в присутствии субстрата. Результаты исследования защитного влияния субстратов (*L*-фенилаланина и АТР) от инактивации фенилаланил-тРНК-синтазы *n*-азидоанилидом (V) показывают (табл. 2), что фенилаланин полностью защищает фермент от инактивации. Заметное уменьшение степени инактивации фермента под действием данного аналога наблюдается также в присутствии АТР, что может говорить о перекрывании центров связывания анилида фенилаланина и АТР. Этот результат коррелирует с данными о характере ингибирования аналогом реакции аминоацелирования по отношению к АТР.

В случае пирофосфата (X) не наблюдается полной защиты в присутствии *L*-фенилаланина от инактивации фермента (см. табл. 2). Возможно, наличие пирофосфатной группы в соединении (X) приводит к взаимодействию его с другими участками активного центра фенилаланил-тРНК-синтазы. Однако аналог не является конкурентным ингибитором по отно-

Таблица 1

Величины констант ингибирования реакции аминоацелирования тРНК^{Phe}, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтазой, для аналогов фенилаланина

Соединение	Субстрат	Тип ингибирования	$K_i \cdot 10^4, \text{M}$
(V)	<i>L</i> -Phe	Конкурентный	1,6
(V)	АТР	Смешанный	3,6
(X)	<i>L</i> -Phe	Конкурентный	$3,1 \cdot 10^{-1}$
(X)	АТР	Бесконкурентный	1,5
(X)	тРНК ^{Phe}	Неконкурентный	1,1

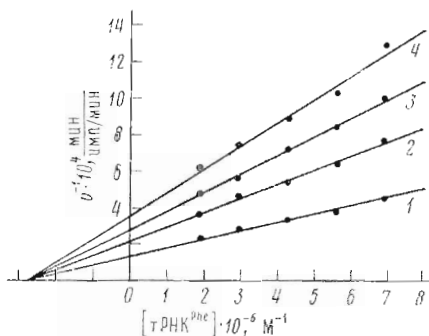


Рис. 5. Зависимость скорости реакции аминиацелирования $tRNA^{Phe}$ от концентрации $tRNA^{Phe}$ (в обратных координатах) при различных концентрациях β -(*n*-азидоанилид)фенилаланилпирофосфата (X) (M): 1 - 0; 2 - $7,9 \cdot 10^{-5}$; 3 - $1,3 \cdot 10^{-4}$; 4 - $1,8 \cdot 10^{-4}$

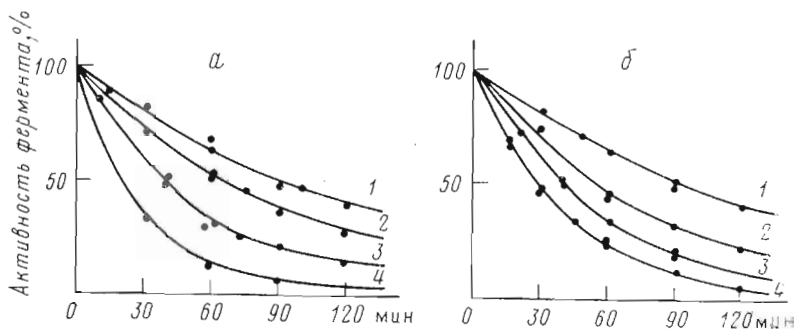


Рис. 6. Кинетические кривые инактивации фенилаланил- $tRNA$ -синтетазы с помощью (а) *n*-азидоанилида фенилаланина (1 - $8,6 \cdot 10^{-5}$ M; 2 - $1,5 \cdot 10^{-4}$; 3 - $3,0 \cdot 10^{-4}$; 4 - $6,0 \cdot 10^{-4}$ M) и (б) β -(*n*-азидоанилид)фенилаланилпирофосфата (1 - $1,7 \cdot 10^{-5}$ M; 2 - $3,0 \cdot 10^{-5}$; 3 - $6,0 \cdot 10^{-5}$; 4 - $1,2 \cdot 10^{-4}$ M). Условия модификации фермента см. в «Экспер. части»

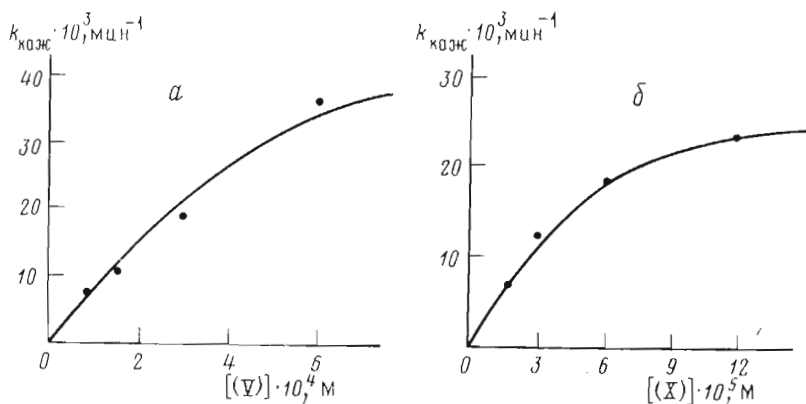


Рис. 7. Зависимость величин $k_{иакт}$ реакции инактивации фенилаланил- $tRNA$ -синтетазы аналогами фенилаланина (V) (а) и (X) (б) от их концентрации

шению к АТР и не наблюдается защитного действия от инактивации фермента в присутствии АТР и пирофосфата (см. табл. 2). Защитный эффект *L*-фенилаланил-5'-аденилата, устойчивого аналога аминиацелиденилата, не отличается от защитного действия *L*-фенилаланина. Эти результаты доказывают отсутствие контактов аналога (X) с АТР-узнающим участком фермента. Возможно, существуют дополнительные контакты аналога с другими нуклеотидсвязывающими участками фермента. Не исключено, что причиной слабого защитного влияния субстратной аминокислоты от инактивации фенилаланил- $tRNA$ -синтетазы соединеншем (X) является механизм фотоаффинной модификации. Этот вопрос требует дополнительного исследования.

Влияние субстратов и их аналогов (приведена концентрация соединений, М) на инактивацию фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью фотоактивных аналогов фенилаланина

Фотоактивный аналог	Phe	АТР	РРi	Аденилат	Инактивация фермента *, %	*Защита от инактивации, %
E (V), $2 \cdot 10^{-4}$ М	$2,5 \cdot 10^{-4}$				50	
		$1,0 \cdot 10^{-4}$			0	100
X (X), $3 \cdot 10^{-5}$ М	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$			27	46
					0	100
	$4,0 \cdot 10^{-4}$				50	
	$8,2 \cdot 10^{-4}$				35	30
	$1,6 \cdot 10^{-3}$				20	60
		$1,0 \cdot 10^{-4}$			17	66
			$1,0 \cdot 10^{-4}$		50	0
	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$		35	30
	$8,2 \cdot 10^{-4}$			$3,3 \cdot 10^{-5}$	20	60
					37	26

* Среднее отклонение значения активности фермента 2—4%.

Таким образом, для исследованных аналогов фенилаланина наблюдается сложный характер взаимодействия с фенилаланин-, АТР- и тРНК-связывающими участками фенилаланил-тРНК-синтетазы. Данные соединения могут оказаться перспективными для исследования взаимного влияния центров связывания различных субстратов как в пределах одной, так и на разных субъединицах этого фермента, что представляет интерес для понимания механизма катализа.

Экспериментальная часть

Гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле препарат фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 получили описанными ранее методами [18, 19] с некоторыми модификациями.

Суммарная тРНК из *E. coli* MRE-600 была выделена согласно работе [20]. Полученный препарат тРНК содержал 2% тРНК^{Phe}. В работе использовали АТР (Reanal, ВНР), *L*-фенилаланин (Reanal, ВНР), пирофосфат натрия (Merck, ФРГ), *L*-[¹⁴C]фенилаланин (UVVVR, ЧССР). Дициклогексилкарбодимид любезно предоставлен В. П. Кумаревым (ИЦиГ, СО АН СССР). *n*-Голуолсульфонат *N*-циклогексил-*N*-β-(4-метилморфолиний)-этилкарбодимид — препарат отечественного производства. *n*-Азидоанилин был получен согласно [24]. *L*-Фенилаланинол синтезировали согласно [22], *N*-трифторацетилфенилаланинол и *L*-фенилаланинил-5'-аденилат — как описано ранее [13]. Все остальные реактивы были аналитической чистоты.

В работе использованы дауэкс 50×2 (Serva, ФРГ), DEAE-сефадек А-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлоза отечественного производства.

УФ-спектры регистрировали на спектрометре «Specord UV VIS» (ГДР). ИК-спектры сняты в таблетке с КВг на спектрометре IR (ГДР).

ТСХ проводили на стандартных пластинках силифол UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) в системах этанол — ацетат аммония (рН 7,5; 1 М), 7 : 3 (А); изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б); *n*-бутанол — метанол — конц. водный аммиак, 11 : 11 : 4 (В); ацетон — вода, 7 : 3 (Г).

Количество фосфата в продуктах синтеза *n*-азидоанилида пирофосфата и β-(*n*-азидоанилид)фенилаланинилпирофосфата (X) определяли с помощью колориметрического метода, основанного на образовании молибденовой сини [23]. Калибровочную кривую строили, используя в качестве

стандарта раствор KH_2PO_4 . Перед употреблением KH_2PO_4 прокаливали при $250\text{--}300^\circ\text{C}$ в течение 4 ч и анализировали на содержание воды. В качестве восстановителя применяли SnCl_2 . Интенсивность окраски молибденовой сини измеряли по поглощению при 720 нм.

Реакцию аминокислотирования тРНК^{Phe} проводили при 25°C . Инкубационная смесь объемом 0,25 мл содержала $10^{-4}\text{--}10^{-3}$ М АТФ, $10^{-6}\text{--}10^{-5}$ М $L\text{-}[^{14}\text{C}]$ фенилаланин, $5 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7, 5), 0,2–2 мг/мл суммарной тРНК, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,5–1,0 мкг фенилаланил-тРНК-синтетазы, $5 \cdot 10^{-5}\text{--}4 \cdot 10^{-4}$ М *n*-азидоанилид фенилаланина (V) или $8 \cdot 10^{-5}\text{--}2 \cdot 10^{-4}$ М β -(*n*-азидоанилид) фенилаланинилпирофосфат (X). Аликвоты по 30–50 мкл реакционной смеси наносили на мишени из бумаги FN-16 размером $2,5 \times 2,5$ см, пропитанные раствором 5% трихлоруксусной кислоты, и промывали мишени последовательно в трех сосудах с этим же раствором. Счет радиоактивности проводили в толуоловом сцинтилляторе на счетчике радиоактивности «Mark-II» (Nuclear Chicago, США).

Характер ингибирования аналогами реакции аминокислотирования тРНК^{Phe} по отношению к различным субстратам определяли графическим методом в координатах Лайнуивера – Бэрка. Значения констант ингибирования уточняли с помощью метода наименьших квадратов.

Модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы фотоактивными аналогами проводили по описанной ранее методике [24]. Реакционная смесь (0,15 мл) содержала $2 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7, 5), 0,8 мг/мл ($1,7 \cdot 10^{-6}$ М) фермента, $1,7 \cdot 10^{-5}\text{--}1,2 \cdot 10^{-4}$ М β -(*n*-азидоанилид)-фенилаланинилпирофосфат или $8,6 \cdot 10^{-5}\text{--}6 \cdot 10^{-4}$ М *n*-азидоанилид фенилаланина. Реакционную смесь делили на две части. Одну часть (0,1 мл) облучали в кварцевой кювете УФ-светом при 10°C , другую (0,05 мл) инкубировали в темноте в тех же условиях. Для облучения применяли лампу СВД-120А с фильтром из плексигласа, пропускающим область спектра с длиной волны выше 300 нм. Из реакционной смеси отбирали пробы объемом 5 мкл через разные промежутки времени и использовали для определения активности фермента в реакции аминокислотирования тРНК^{Phe}. Остаточную активность фермента в результате модификации рассчитывали из сравнения активности белка, облученного с аналогом, с активностью белка в темновом опыте.

В опытах по изучению защитного влияния субстратов и других лигандов на модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы аналогами фенилаланина реакционная смесь содержала $2,0 \cdot 10^{-5}$ М *n*-азидоанилид фенилаланина или $3,3 \cdot 10^{-5}$ М β -(*n*-азидоанилид) фенилаланинилпирофосфат и различные лиганды в концентрациях, указанных в табл. 2. Смесь облучали 4 ч и определяли активность фермента как описано выше.

N-Трифторацетилфенилаланин (II) получали обработкой *L*-фенилаланина (3 ммоль) трифторуксусным ангидридом (1,4 мл) в этилацетате (8 мл) в течение 14 ч при 20°C . Затем раствор упаривали досуха. Остаток (соединение (I)) обрабатывали 30 мин 50% водным этанолом и упаривали раствор досуха. Продукт перекристаллизовывали из петролейного эфира с добавлением этилацетата. Выход 70%. Т. пл. $105\text{--}106,5^\circ\text{C}$. Охлаждение расплавленной массы приводит к кристаллизации соединения с образованием игольчатых кристаллов, которые при повторном плавлении вещества имеют т. пл. $119,5\text{--}120,5^\circ\text{C}$ (лит. данные [25]: т. пл. $119,4\text{--}120,6^\circ\text{C}$).

n-Азидоанилид фенилаланина (V) получали конденсацией 0,42 ммоль производного (II) с 0,35 ммоль *n*-азидоанилина (III) [21] в присутствии 0,53 ммоль диметилформамида в 1,7 мл диметилформамида. Реакцию проводили при 20°C в темноте в течение 30 ч. Осадок диметилформамида был отфильтрован, фильтрат упарен. Остаток, соединение (IV), обрабатывали 20 ч 9 н. водным аммиаком при 20°C и перемешивании. После удаления аммиака в вакууме остаток растворяли в 1%

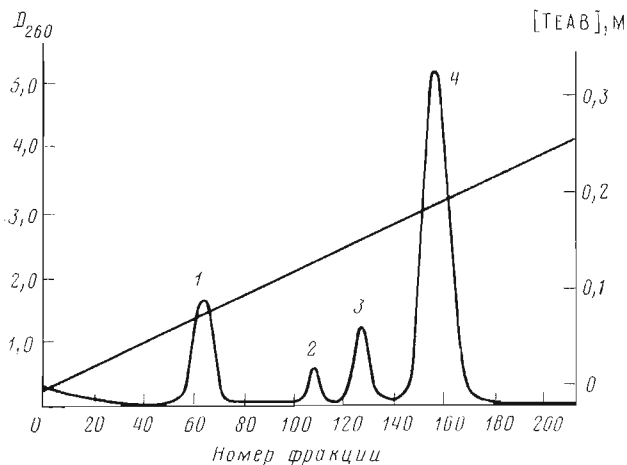


Рис. 8. Профиль хроматографии *n*-азидоанилида пирофосфата (VIII) на колонке с DEAE-целлюлозой в HCO_3^- -форме. Пик 1 — *n*-толуолсульфат, 2 — *n*-азидоанилид фосфата, 3 — α,β -ди-(*n*-азидоанилид) пирофосфата, 4 — *n*-азидоанилид пирофосфата

водном диметилформамиде (400 мл) и наносили на колонку с дауэксом 50×2 ($1,2 \times 50$ см) в H^+ -форме. Колонку промывали водой (400 мл) и продукт элюировали 1 н. водным аммиаком, следя за выходом продукта по поглощению при 260 нм. Скорость элюции 40 мл/ч. Выход продукта 86%. Вещество является гомогенным по данным ТСХ. R_f 0,76 (А); 0,93 (Б); 0,89 (В). УФ-спектр (вода, pH 6; 0,1 н. HCl, 0,1 н. KOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм; $\lambda_{\text{мин}}$ 232 нм. ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3455 (NH_2 , широкая полоса), 2130 (N_3), 1670 (NHC=O), 1520 (CON-H), 1630 (NH_2). Гидролиз соединения (V) в течение 7 ч в 2 н. HCl при 100° С приводит к получению фенилаланина и *n*-азидоанилина.

Синтез n-азидоанилида пирофосфата (VIII) проводили по разработанному ранее в нашей лаборатории методу [26] с некоторыми изменениями. Раствор *n*-азидоанилина (0,9 ммоль) и пирофосфата натрия (0,09 ммоль) в воде (15 мл) охлаждали до 10° С и оттитровывали 1 н. HCl до 5,6. К смеси добавляли водорастворимый карбодимид (50 мг), перемешивали 10 мин, снова добавляли карбодимид (50 мг) и оставляли на 3 ч, постоянно поддерживая pH 5,6. По окончании реакции pH раствора доводили до 8,5 добавлением триэтиламина, раствор охлаждали в течение 1 ч при 0° С и фильтровали через стеклянный фильтр. Фильтрат разбавляли водой до 120 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (2×55 см) в HCO_3^- -форме. Колонку промывали водой (400 мл). Продукт элюировали в градиенте концентраций бикарбоната триэтиламония от 0 до 0,27 М (рис. 8). Скорость элюции 50 мл/ч. Объем фракции 10 мл. За выходом продуктов следили по поглощению при 260 нм. Выход основного продукта реакции (рис. 8, 4) составляет 50%. Вещество гомогенно по данным ТСХ. R_f 0,32 (А). УФ-спектр (вода, pH 6): $\lambda_{\text{макс}}$ 264 нм (ϵ 7800); $\lambda_{\text{мин}}$ 229 нм. УФ-спектр анилида пирофосфата (VIII) соответствует спектру исходного амина и имеет плечо в области 290–320 нм, обусловленное присутствием азидогруппы (Patai, 1971).

β -(*n*-Азидоанилид) фенилаланинилпирофосфат (X) получали конденсацией 1,2 ммоль *N*-трифторацетилфенилаланинола (VII) с 0,3 ммоль *n*-азидоанилида пирофосфата (VIII) в присутствии 3 ммоль дициклогексилкарбодимида. Реакцию проводили в темноте при 20° С в абс. пиридине в течение 10 сут. Реакционную смесь отфильтровывали от дициклогексилмочевины, промывали осадок пиридином ($6 \times 1,5$ мл), фильтрат упари-

вали досуха. Остаток (соединение (IX)) обрабатывали 15 ч 30 мл 9 н. водного аммиака при 20°С. Продукт выделяли хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 (2×55 см) в HCO₃⁻-форме в линейном градиенте концентрации бикарбоната триэтиламмония от 0 до 0,3 М. Скорость элюции 50 мл/ч. Объем фракции 10 мл. Выход основного продукта составил 20%. Соединение гомогенно по данным ТСХ. R_f 0,76 (А); 0,88 (Б); 0,84 (В). УФ-спектр (вода, рН 6): λ_{макс} 252 нм (ε 11 800); λ_{мин} 229 нм. УФ-спектр (0,1 н. HCl): λ_{макс} 251 нм; λ_{мин} 228 нм. УФ-спектр (0,1 н. KOH): λ_{макс} 262 нм; λ_{мин} 234 нм. Гидролиз дизамещенного пирофосфата (X) в течение 3—4 ч в 1 н. HCl при 100°С приводит к образованию фенилаланинола, *n*-азидоанилина и фосфата. Гомогенность продукта доказана также микроколоночной хроматографией в системе Томлинсона — Тенера.

Авторы благодарны И. И. Горшковой за проведение расчетов величин K₁ и В. Н. Анкиловой за выделение фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knorre D. G., Lavrik O. I. Affinity labelling of aminoacyl-tRNA synthetases.— In: Theory and practice in affinity techniques. London — New York — San Francisco: Academic Press, 1978, p. 169—189.
2. Bartmann P., Hanke T., Hammer-Raber B., Holler E. Selective labelling of the β-subunit of L-phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* with N-bromoacetyl-L-phenylalanyl-tRNA^{Phe}.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, № 2, p. 743—747.
3. Gorshkova I. I., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. Affinity labelling of phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600 by *E. coli* tRNA^{Phe} containing photoreactive group.— Nucleic Acids Res., 1976, v. 3, № 6, p. 1577—1589.
4. Wetzel R., Söll D. Analogs of methionyl-tRNA synthetase substrates containing photolabile groups.— Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1681—1694.
5. Akhverdjan V. Z., Kisselev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. Affinity labelling of tryptophanyl-transfer RNA synthetase.— J. Mol. Biol., 1977, v. 113, № 3, p. 475—501.
6. 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 П. И., Киселев Л. Л. Ингибирование триптофанил-тРНК-синтетазы модифицирующими аналогами АТФ.— Биохимия, 1978, т. 43, № 3, с. 525—534.
7. Lavrik O. I., Nevinsky G. A. Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* MRE-600. Activation by nucleotides and affinity modification of the effector sites.— FEBS Lett., 1980, v. 109, № 1, p. 13—17.
8. Frolova I. Yu., Kovaleva G. K., Agalarova M. B., Kisselev L. L. Irreversible inhibition of beef liver valyl-tRNA synthetase by an alkylating derivative of L-valine.— FEBS Lett., 1973, v. 34, № 2, p. 213—216.
9. Silver J., Laursen R. A. Inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases by amino acid chloromethylketones.— Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 340, № 1, p. 77—89.
10. Rainey P., Hammer-Raber B., Kula M.-R., Holler E. Modification of L-isoleucyl-tRNA synthetase with L-isoleucyl-bromomethylketone. The effect on the catalytic steps.— Eur. J. Biochem., 1977, v. 78, № 1, p. 239—249.
11. Rainey P., Holler E., Kula M.-R. Labelling of L-isoleucine: tRNA ligase from *Escherichia coli* with L-isoleucyl-bromomethylketone.— Eur. J. Biochem., 1976, v. 63, № 2, p. 419—426.
12. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. Аминоацил-тРНК синтетазы.— В сб.: Биофизика. М.: Итоги науки и техники, ВИНТИ, 1972, т. 2, с. 6—100.
13. Лаврик О. И., Моор Н. А., Невинский Г. А. Синтез L-(фенилаланинил)-аденилата и исследование их взаимодействия с фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli*.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1480—1487.
14. Yarus M., Berg P. Recognition of tRNA by isoleucyl-tRNA synthetase. Effect of substrates on the dynamics of tRNA-enzyme interaction.— J. Mol. Biol., 1969, v. 42, № 2, p. 171—189.
15. Fasiolo F., Remy P., Poyet J., Ebel J.-P. Yeast phenylalanyl-tRNA synthetase. Molecular weight and interaction with tRNA^{Phe} and phenylalanine.— Eur. J. Biochem., 1974, v. 50, № 1, p. 227—236.
16. Fasiolo F., Ebel J.-P., Lazdunski M. Non-equivalence of the sites of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase during catalysis.— Eur. J. Biochem., 1977, v. 73, № 1, p. 7—15.
17. Pachmann V., Zachau H. G. Yeast seryl-tRNA synthetase: interactions between the ATP binding site and the sites for tRNA^{Ser} and L-serine.— Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, № 3, p. 975—985.
18. Stalberg M. P. The isolation and properties of phenylalanyl ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli*. B.— J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 5, p. 1060—1064.

19. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Невинский Г. А., Хуторянская Л. З. Специфическая модификация фенилаланин: тРНК-лигазы из *E. coli* MRE-600 при помощи N-хлорамбуцил-[¹⁴C]-фенилаланил-тРНК.— Молекулярн. биология, 1975, т. 9, вып. 4, с. 509—515.
20. Садахчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чучаев В. М. Применение сорбции на аминоэтилцеллюлозе для выделения тРНК из водного слоя после фенольной экстракции.— Молекулярн. биология, 1967, т. 1, вып. 4, с. 463—466.
21. Silberrad O., Smart B. J. The preparation of *p*-bistriazobenzene.— J. Chem. Soc., 1906, v. 89, pt. 1, p. 170—171.
22. Seki H., Koga K., Matsuo A., Ohki S., Matsuo J., Yamada S. I. Studies on optically active amino acids. Synthesis of optically active *L*-aminoalcohols by the reduction of *L*-amino acid esters by sodium borohydride.— Chem. and Pharm. Bull., 1965, v. 13, № 8, p. 995—1000.
23. Grindey G. B., Nichol Ch. A. Micro procedure for determination of pyrophosphate and orthophosphate.— Anal. Biochem., 1970, v. 33, № 1, p. 114—119.
24. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. Влияние структуры фотоактивных аналогов АТФ на аффинную модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы. Модификация фермента по двум типам нуклеотидсвязывающих участков.— Молекулярн. биология, 1979, т. 13, вып. 5, с. 1001—1010.
25. Shallenberg E. E., Calvin M. Ethyl thioltrifluoroacetate as an acetylating agent with particular reference to peptide synthesis.— J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 77, № 9, p. 2779—2783.
26. Бабкина Г. Т., Зарыгова В. Ф., Клоппе Д. Г. Получение γ -амидов нуклеозид-5'-трифосфатов в водном растворе с помощью водорастворимого карбодимеда.— Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 611—615.

Поступила в редакцию
31.X.1980

SYNTHESIS OF PHENYLALANINE PHOTOREACTIVE ANALOGS AND INVESTIGATION OF THEIR INTERACTION WITH PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. COLI* MRE-600

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

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

Photoreactive analogs of phenylalanine: phenylalanine *p*-azidoanilide (1) and β -(*p*-azidoanilide)phenylalaninyl pyrophosphate (2) have been synthesized. The interaction of these compounds with phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600 was investigated. Each of them manifested competitive inhibition towards phenylalanine in the aminoacylation of tRNA, the affinity being $1,6 \cdot 10^{-4}$ and $3,1 \cdot 10^{-5}$ M for (1) and (2), respectively. In respect to ATP, analog (1) behaved as a mixed-type inhibitor and analog (2) — as a non-competitive inhibitor. Inactivation of phenylalanyl-tRNA synthetase took place under UV-irradiation in the presence of these analogs. A substrate protection against inactivation was studied.