



УДК 577.112.4

## ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ — СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ АМР, АДР И АТР С МЕЗИТИЛЕНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

*Третьякова С.С., Соколова Н.И., Шабарова З.А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Изучена гидролитическая устойчивость смешанных ангидридов АМР, АДР и АТР с мезитиленкарбонической кислотой  $(\text{MsCO})_{p_{1-3}}\text{A}$  и их реакции с нуклеофильными реагентами в органической и водной средах. В  $(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$  и  $(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$  обнаружена повышенная по сравнению с АДР и АТР электрофильность не только концевых, но и внутренних фосфатных групп. Полученные данные важны при интерпретации аффинной модификации ферментов с помощью  $(\text{MsCO})_{p_{2,3}}\text{A}$ .

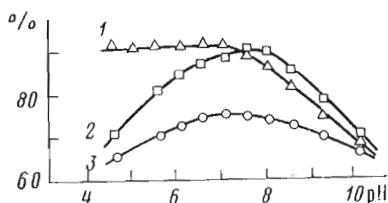
Смешанные ангидриды АМР, АДР и АТР с мезитиленкарбонической кислотой  $(\text{MsCO})_{p_{1-3}}\text{A}$  используются в качестве аффинных реагентов АТР-зависимых ферментов [1–3]. Ранее нами было показано [4], что эти производные аденозин-5'-моно- и полифосфатов весьма устойчивы в водных растворах при значениях pH, близких к нейтральным, а в реакциях с нуклеофильными агентами являются исключительно фосфорилирующими агентами, т. е. способны переносить остаток нуклеотида на различные амины, спирты или меркаптаны с одновременным освобождением в результате реакции мезитиленкарбонической кислоты. На основании этих модельных экспериментов можно предположить, что вызванное смешанными ангидридами необратимое ингибирование ферментов [1–3] обусловлено фосфорилированием нуклеофильных групп в их активных центрах. Это предположение подтверждается данными по включению радиоактивной метки в митохондриальную АТР-азу [5] или триптофанил-тРНК-синтетазу [6] при необратимом ингибировании этих ферментов с помощью меченных по аденозину  $(\text{MsCO})_{p_2}[^3\text{H}]\text{A}$  или  $(\text{MsCO})_{p_1}[^{14}\text{C}]\text{A}$  соответственно.

Следует отметить, что фосфорилирующая способность  $(\text{MsCO})_{p_{1-3}}\text{A}$ , весьма умеренная в водных средах [4], резко повышается при контакте с АТР-зависимыми ферментами, что, вероятно, объясняется эффектом пространственного сближения реагирующих группировок при образовании фермент-ингибиторных комплексов. По сравнению с другими аффинными реагентами нуклеотидной природы важным преимуществом  $(\text{MsCO})_{p_{1-3}}\text{A}$  является их способность реагировать с нуклеофильными группами ферментов активированными фосфатными остатками АМР, АДР или АТР, т. е. непосредственно группами субстратов.

Сочетание указанных выше качеств позволяет считать  $(\text{MsCO})_{p_{1-3}}\text{A}$  весьма перспективными аффинными реагентами, что, в свою очередь, вызывает необходимость детального изучения их химических свойств.

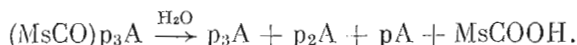
Для понимания механизма ингибирования ферментов, вызванного ковалентным закреплением нуклеотидов в активных центрах при использовании  $(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$  и  $(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$ , прежде всего необходимо оценить электрофильные свойства фосфатных групп, входящих в их состав. Присоединение  $\text{MsCO}$ -группировки к концевым фосфатам АДР и АТР изменяет распределение электронной плотности всей полифосфатной цепи. Для выявления этого эффекта был изучен гидролиз  $(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$  и  $(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$  в буферных растворах (pH 4,5–10,1), 1 н. HCl и 1 н. NaOH, а также проведены реакции в органической и водной средах с различными нуклеофильными реагентами, содержащими функциональные группы, часто

Содержание  $(MsCO)p_A$  (1),  $(MsCO)p_2A$  (2) и  $(MsCO)p_3A$  (3) в гидролизатах при pH 4–10,1 через 15 сут (37° С)



встречающиеся в активных центрах ферментов. Для сравнения аналогичные реакции были проведены с  $(MsCO)p_A$ . Реакционные смеси анализировали методом хроматографии на бумаге после отбора проб через определенные промежутки времени.

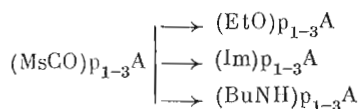
При выдерживании  $10^{-2}$  М растворов  $(MsCO)p_{1-3}A$  в буферах с pH от 4,5 до 10,1 наблюдался гидролиз не только смешанно-ангидридных, но и пирофосфатных связей  $(MsCO)p_2A$  и  $(MsCO)p_3A$ . Например, схему гидролиза  $(MsCO)p_3A$  можно представить так:



Из кривых гидролиза  $(MsCO)p_{1-3}A$ , приведенных на рис. 1, следует, что устойчивость  $(MsCO)p_A$  уменьшается по мере возрастания pH.  $(MsCO)p_2A$  и  $(MsCO)p_3A$  наиболее устойчивы в нейтральной и близких к нейтральной средах и в большей степени (по сравнению с  $(MsCO)p_A$ ) гидролизуются в кислых и щелочных средах. Наименее устойчивым в интервале pH 4,5–10,1 из трех смешанных ангидридов оказался  $(MsCO)p_3A$ . При  $4,5 < pH < 7$  наиболее устойчив  $(MsCO)p_A$ , а при  $7 < pH < 10,1$  —  $(MsCO)p_2A$ .

В 1 н. HCl при 37° С  $(MsCO)p_A$  гидролизался полностью за 10 ч,  $(MsCO)p_2A$  — за 7 ч,  $(MsCO)p_3A$  — за 5 ч. В этих условиях смешанно-ангидридные связи в  $(MsCO)p_2A$  и  $(MsCO)p_3A$  гидролизуются также в большей степени, чем пирофосфатные связи. Кроме того, в 1 н. HCl наблюдается апуринизация  $(MsCO)p_{1-3}A$ , которая за 1 сут достигает 16–20%.

При гидролизе  $(MsCO)p_{1-3}A$  в 1 н. NaOH наряду с аденозин-5'-моно- и полифосфатами были обнаружены новые соединения, которым была приписана структура 2'(3')-О-мезитоилированных производных AMP, ADP и ATP. В 1 н. NaOH (pH > 12), когда гидроксильные группы рибозы в значительной степени диссоциированы, представляется вполне вероятным внутримолекулярный перенос MsCO-групп с фосфата на рибозу. Хроматографические и электрофоретические характеристики образовавшихся в щелочных гидролизатах продуктов совпали с характеристиками 2'(3')-О-мезитоил-AMP и 2'(3')-О-мезитоил-ATP, полученных встречным синтезом из AMP и ATP соответственно по методу [7]. Следует отметить, что количество 2'(3')-О-мезитоилированных производных AMP, ADP и ATP в щелочных гидролизатах постепенно возрастает, через 4 ч достигают максимальной величины — 24, 30 и 50% соответственно, а затем уменьшаются. Это, очевидно, объясняется тем, что параллельно с переносом ацильной группы и образованием 2'(3')-О-мезитоильных производных AMP, ADP и ATP начинается гидролиз этих соединений, которые, как и другие 2'(3')-О-ацилнуклеотиды [7], неустойчивы в щелочной среде и расщепляются по сложноэфирной связи. Через 1 сут в гидролизатах обнаруживается только AMP и незначительные количества ADP и ATP. В абсолютном диметилформамиде реакции нуклеофильного замещения с этиловым спиртом, бутиламинол, имидазолом протекали с высокими выходами только по активированным концевым фосфатным группам  $(MsCO)p_2A$  и  $(MsCO)p_3A$ :



Эти реакции проводили при 37° С, используя 100-кратные избытки аминов и 800-кратный избыток этилового спирта.

Таблица 1

Состав реакционных смесей после взаимодействия  $(\text{MsCO})_{p_2,3}\text{A}$  с аминами (100-кратные избытки) в воде в течение 3 ч при  $37^\circ\text{C}$

Реагирующие компоненты	Образовавшиеся фосфоамины (содержание, %)	Продукты гидролиза (содержание, %)
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A} + \text{BuNH}_2$	$(\text{BuNH})_{p_2}\text{A}$ (35)	ADP (52)
	$(\text{BuNH})_{p_1}\text{A}$ (13)	AMP
	$(\text{BuNH})_{p_3}\text{A}$ (41)	ATP
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A} + \text{BuNH}_2$	$(\text{BuNH})_{p_2}\text{A}$ (12)	ADP (44)
	$(\text{BuNH})_{p_1}\text{A}$ (3)	AMP
	$(\text{Im})_{p_2}\text{A}$ (69)	ADP (21)
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A} + \text{Im}$	$(\text{Im})_{p_1}\text{A}$ (10)	ADP (21)
	$(\text{Im})_{p_3}\text{A}$ (70)	
	$(\text{Im})_{p_2}\text{A}$ (8)	ATP (18)
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A} + \text{Im}$	$(\text{Im})_{p_2}\text{A}$ (8)	ATP (18)
	$(\text{Im})_{p_1}\text{A}$ (4)	

Таблица 2

Константы скоростей реакций  $(\text{MsCO})_{p_1-3}\text{A}$  с различными нуклеофилами

Смешанный ангидрид	Нуклеофил	Растворитель	$k \cdot 10^7, \text{c}^{-1}$	$t_{1/2}, \text{ч}$
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	$\text{BuNH}_2$	DMF	1190	1,6
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	1380	1,4
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	1780	1,1
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	Im	«	1040	1,9
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	1240	1,5
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	1580	1,2
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	EtOH	«	7,5	257
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	12,2	158
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	16,7	115
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	$\text{H}_2\text{O}$	pH 4,5 *	1,0	1925
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	3,7	520
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	5,2	370
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	«	pH 7,0 *	1,1	1750
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	1,5	1283
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	4,3	447
$(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$	OH	pH 10,1 *	3,9	494
$(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$	«	«	3,8	506
$(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$	«	«	4,9	392

\* Фосфатный буфер.

В водной среде  $(\text{MsCO})_{p_1-3}\text{A}$  не реагируют с этиловым спиртом, а с бутиламино и имидазолом  $(\text{MsCO})_{p_2,3}\text{A}$  реагируют не только концевыми, но и внутренними фосфатными группами. Параллельно с синтезом фосфоамидов наблюдается гидролиз  $(\text{MsCO})_{p_2,3}\text{A}$  с образованием аденозин-5'-моно- и полифосфатов. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что по реакционной способности фосфатные группы, входящие в состав  $(\text{MsCO})_{p_2,3}\text{A}$ , можно расположить следующим образом:  $p^b \gg p^a$ ;  $p^c > p^b > p^a$ . Для сравнения степеней активации концевых фосфатных групп AMP, ADP и ATP в составе их смешанных ангидридов с мезитиленкарбоновой кислотой были определены константы гидролиза  $(\text{MsCO})_{p_1-3}\text{A}$ , а также реакций этих смешанных ангидридов с бутиламино, имидазолом и этиловым спиртом в диметилформамиде. Согласно табл. 2, по реакционной способности концевых фосфатов смешанные ангидриды располагаются в следующий ряд:



Эта закономерность не соблюдается только для одного случая — гидролиза при pH 10,1, так как при этом в качестве нуклеофила выступает отрицательно заряженный гидроксильный ион; с ним  $(\text{MsCO})_{p_1}\text{A}$  реагирует несколько быстрее, чем с  $(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$ , видимо, вследствие большего электростатического отталкивания последнего.

Обнаруженная способность  $(\text{MsCO})_{p_2}\text{A}$  и  $(\text{MsCO})_{p_3}\text{A}$  реагировать с

ампинами в водной среде не только концевыми, но и внутренними фосфатными группами указывает на определенную степень активации этих фосфатов. По-видимому, в активных центрах ферментов  $(MsCO)_{p_{2,3}A}$  могут реагировать как концевыми, так и внутренними фосфатными группами, причем эффективность взаимодействия последних благодаря пространственной близости реагирующих группировок будет неизмеримо выше, чем в растворе. Какая из фосфатных групп  $(MsCO)_{p_{2,3}A}$  обеспечит ковалентное закрепление нуклеотида в активном центре фермента, будет определяться стерическими факторами — расположением функционально значимой нуклеофильной группы фермента относительно полифосфатной цепи  $(MsCO)_{p_{2,3}A}$ , используемого в качестве аффинного реагента.

### Экспериментальная часть

В работе использованы АМР, АДР и АТР фирмы Serva (ФРГ). БХ проводили на бумаге FN-1 в системе этанол — 1 М ацетат аммония (7:3). Вертикальный электрофорез проводили в 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (рН 7,5) в течение 1,5 ч при напряжении 35–40 В/см на приборе Labor (Венгрия).

УФ-поглощение растворов определяли на спектрофотометре Spereord UV-VIS (ГДР). Константы скоростей реакций рассчитывали по работе [8].  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  синтезировали по методике [9].

*Определение гидролитической устойчивости*  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  проводили в 0,1 М фосфатных буферах (рН 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,3; 10,1). Раствор 4 мкмоль ( $42 O_{E_{260}}$ ) вещества в 0,6 мл буфера инкубировали в термостате при 37° С, через 1, 2, 5, 8 и 15 сут отбирали аликвоты по 0,12 мл и хроматографировали их с соответствующими заводскими образцами. Аналогично проводили гидролиз  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  1 н. HCl, отбирая пробы для анализа через 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 18 и 24 ч. Через 3 ч в гидролизатах всех трех соединений обнаруживали небольшие количества аденина ( $R_f$  0,75,  $U_{pA}=0$ ). Через 1 сут количество аденина достигало 20%.

*Щелочной гидролиз*  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  проводили 1 н. NaOH по аналогичной методике. В гидролизате  $(MsCO)_{pA}$  обнаружили 2'(3')-О-мезитоил-АМР ( $R_f$  0,54), а в гидролизатах  $(MsCO)_{p_2A}$  и  $(MsCO)_{p_3A}$  — 2'(3')-О-мезитоил-АДР ( $R_f$  0,35) и 2'(3')-О-мезитоил-АТР ( $R_f$  0,28), количества которых через 2 ч составляли 18, 25, 39%, через 4 ч — 24, 30 и 56%, через 8 ч — 12, 15 и 37% соответственно. Через 24 ч эти соединения в гидролизатах не обнаружены.

При микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl (0–0,18 М) в 7 М мочеvine выделения из щелочного гидролизата 2'(3')-О-мезитоил-АМР и 2'(3')-О-мезитоил-АТР элюировались при концентрации NaCl 0,08 и 0,14 М, что соответствует АМР и АТР.

Электрофоретические подвижности 2'(3')-О-мезитоил-АМР и 2'(3')-О-мезитоил-АТР равны подвижностям АМР и АТР соответственно.

*Реакции*  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  с бутиламином проводили, прибавляя к 5 мкмоль ( $65 O_{E_{260}}$ ) смешанных ангидридов, тщательно высушенных многократным упариванием с абсолютным бензолом, по 50 мкмоль ( $48 \text{ мкл}$ )  $BuNH_2$  в 450 мкл абс. DMF. Смеси инкубировали при 37° С, через 0,5; 1, 2, 3 и 5 ч отбирали пробы и анализировали их хроматографией на бумаге и микроколоночной хроматографией.  $R_f$  для  $(BuNH)pA$  0,63, для  $(BuNH)p_2A$  0,49, для  $(BuNH)p_3A$  0,36. После кислотного гидролиза  $(BuNH)_{p_{1-3}A}$  (0,1 н. HCl, 1 ч, 37° С) в гидролизатах обнаруживали АМР, АДР и АТР соответственно.

*Реакции*  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  с имидазолом в абс. DMF проводили аналогично.  $R_f$  для  $(Im)pA$  0,55, для  $(Im)p_2A$  0,35, для  $(Im)p_3A$  0,22. Полученные  $(Im)_{p_{1-3}A}$  гидролизались до АМР, АДР и АТР соответственно при рН 3,5 (0,1 М фосфатный буфер) за 3 ч при 37° С.

*Реакции*  $(MsCO)_{p_{1-3}A}$  с этанолом проводили, прибавляя к 5 мкмоль ( $65 O_{E_{260}}$ ) высушенных смешанных ангидридов по 500 мкл 50% раствора абсолютного этанола в абс. DMF. Смеси инкубировали при 37° С и через 1, 2, 3, 4 и 6 сут отбирали пробы и анализировали, как описано выше. Фос-

фосфоэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) в стандартных условиях [10] расщепляет  $(C_2H_5O)_{p_{1-3}}A$  до АМР.

Реакции  $(MsCO)_{p_{1-3}}A$  с водными растворами бутиламина и имидазола проводили аналогично. Результаты анализа реакционных смесей через 3 ч приведены в табл. 1.

Синтез 2'(3')-О-мезитоил-АМР [7]. К раствору 4 мг (0,02 ммоль)  $MsCOOH$  в 0,1 мл абс. DMF добавили 16 мг (0,1 ммоль)  $Im_2CO$ . Через 10 мин этот раствор прибавили к раствору 7 мг (0,02 ммоль) АМР в 0,15 мл смеси DMF вода (2:1). Реакционную смесь выдержали 2 ч при 20°С и хроматографировали на бумаге. Выход 2'(3')-О-мезитоил-АМР 10%,  $R_f$  0,54;  $U_{ра}$  0,95. Аналогично получили 2'(3')-О-мезитоил-АТР ( $R_f$  0,28).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов И. А., Шаламберидзе М. В., Новикова Н. Ю., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1704–1710.
2. Ковалева Г. К., Иванюк Л. Л., Мадаян Н. А., Фаворова О. О., Северин Е. С., Гуляев Н. Н., Баранова Л. А., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Киселев Л. Л. Биохимия, 1978, т. 43, № 3, с. 525–533.
3. Петушкова Е. В., Русник В. М., Соколова Н. И., Третьякова С. С., Шабарова З. А. Биохимия, 1980, т. 45, № 4, с. 726–731.
4. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 4, p. 903–916.
5. Drutza V. L., Kozlov I. A., Milgrom Y. M., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Biochem. J., 1979, v. 182, № 2, p. 617–619.
6. Favorova O. O., Madoyan I. A., Drutza V. L. FEBS Lett., 1981, v. 123, № 2, p. 161–164.
7. Готлих Б. П., Краевский А. А., Пурьгин И. П., Пилевич Т. Л., Белова З. С., Рудзитс Л. Н. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1967, № 11, с. 2571–2573.
8. Еремин Е. Н. Основы химической кинетики. М.: Высшая школа, 1976, с. 13–20.
9. Третьякова С. С., Друца В. Л., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 254–259.
10. McCuichan T. F., Gilham P. T. Biochemistry, 1973, v. 12, № 24, p. 4840–4848.

Поступила в редакцию  
14.IV.1983

#### CHEMICAL PROPERTIES OF NEW AFFINITY REAGENTS — MIXED ANHYDRIDES OF AMP, ADP AND ATP WITH MESITYLENECARBOXYLIC ACID

TRETYAKOVA S. S., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The hydrolytic stability of the mixed anhydrides of AMP, ADP and ATP with mesitylenecarboxylic acid  $(McCO)_{p_{1-3}}A$  and their reactions with nucleophilic reagents in organic and aqueous media have been studied.  $(MsCO)_{p_2}A$  and  $(MsCO)_{p_3}A$  have displayed a higher, compared to ADP and ATP, electrophilicity not only of the terminal but also of the internal phosphate groups. The data obtained are important for interpretation of the affinity modification of enzymes by  $(MsCO)_{p_{2,3}}A$ .