



УДК 547.963.3.04

СИНТЕЗ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ АНАЛОГОВ
ФЕНИЛАЛАНИНИЛАДЕНИЛАТА И ИССЛЕДОВАНИЕ
ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК — СИНТЕТАЗОЙ
ИЗ *E. coli* MRE-600

Моор Н. А.

Новосибирский государственный университет

Невинский Г. А., Анжилова В. Н., Лаврик О. И.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Получены два химически активных аналога фенилаланиниладенилата: фенилаланинил-8-азидоаденилат (I) и N-бромацетилфенилаланиниладенилат (II). Исследовано взаимодействие этих соединений с фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600. Оба аналога являются конкурентными ингибиторами в реакции аминоацилирования тРНК по отношению к фенилаланину и АТР. Исследована модификация фермента с помощью полученных соединений. Облучение фенилаланил-тРНК-синтетазы в присутствии аналога (I) не приводит к инактивации фермента. Аналог (II) является аффинным реагентом для фермента, однако наряду с аффинной наблюдается неспецифическая модификация как результат невысокого сродства аналога к ферменту. Проведена модификация субъединиц синтетазы аналогом (II) в присутствии различных лигандов.

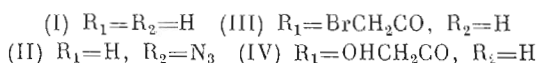
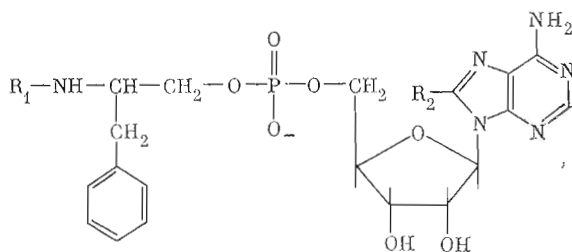
В настоящее время для исследования топографии активных центров многоцентровых ферментов применяется метод аффинной модификации. Для ковалентного блокирования активных центров аминоацил-тРНК-синтетаз ранее были использованы реакционноспособные аналоги аминокислот, АТР и тРНК [1]. Получение аффинных реагентов на основе аминокислот и АТР не всегда оказывается успешным из-за значительного уменьшения сродства при введении реакционноспособных групп в молекуле субстратов. Более перспективными для получения аффинных реагентов могут оказаться аминоалкиладенилаты. Эти соединения, сохраняющие в основных чертах структуру промежуточных соединений в реакциях, катализируемых аминоацил-тРНК-синтетазами, являются эффективными ингибиторами этих ферментов (величины K_i 1 мкМ — 1 нМ) [2, 3]. Представляет интерес использование таких соединений для локализации участков, связывающих аминоациладенилат, на субъединицах аминоацил-тРНК-синтетаз со сложным субъединичным строением для понимания роли олигомерной структуры в организации активного центра.

До сих пор в литературе известен единственный пример получения реакционноспособного аналога аминоалкиладенилата — метионил-8-азидоаденилата [4]. Показано ковалентное присоединение 5–15% аналога к метионил-тРНК-синтетазе из *E. coli* при облучении эквимольной смеси УФ-светом. Однако доказательства специфичности модификации фермента и дальнейшие исследования отсутствуют.

Ранее нами были синтезированы аналоги фенилаланиниладенилата, содержащие заместители в различных положениях молекулы: по α -аминогруппе, рибозе и 8-му положению пуринового кольца [5]. Было показано, что все аденилаты сохраняют сродство к фенилаланил-тРНК-синтетазе, являясь конкурентными ингибиторами реакции аминоацилирования тРНК, что позволяет вводить химически активные группы по указанным положениям. Исследована модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью окисленного по рибозе фенилаланиниладенилата [6]. При

этом не наблюдалось инактивации фермента ни в реакции обмена, ни в реакции аминокцилирования. Полученные данные в совокупности с результатами химической модификации фермента с помощью реагентов, специфичных к ϵ -NH₂-группе лизина, свидетельствуют об отсутствии остатков лизина, важных для формирования аминокциладезилата.

В настоящей работе получены фотоактивное и алкилирующее производные фенилаланиниладенилата: фенилаланинил-8-азидоаденилат (II) и N-бромацетилфенилаланиниладенилат (III). Структура соединений приведена на схеме:



Фенилаланинил-8-азидоаденилат (II) получали из фенилаланинил-8-бромаденилата по аналогии с синтезом 8-N₃-AMP [7]. Синтез N-бромацетилфенилаланиниладенилата проводили обработкой фенилаланиниладенилата (I) N-оксисукцинимидным эфиром бромуксусной кислоты аналогично синтезу бромацетильных производных аминокцил-тРНК [8].

Для соединений (II) и (III) было исследовано ингибирующее действие в реакции аминокцилирования тРНК^{Phe}, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600. Оба аналога являются конкурентными ингибиторами по отношению к фенилаланину и АТФ. Величины K₁ приведены в табл. 1. Фенилаланинил-8-азидоаденилат (II) является эффективным ингибитором, что согласуется с ранее полученными результатами для фенилаланинил-8-бромаденилата [5]. Аналог (III) обладает гораздо меньшим сродством к ферменту. Такое значительное уменьшение сродства — результат модификации α-NH₂-группы [5]. Более низкое сродство N-бромацетилфенилаланиниладенилата (III) по сравнению с N-формилфенилаланиниладенилатом связано, по-видимому, с большими размерами вводимой группы. Использование аналога (III) в качестве обратимого ингибитора в данном случае не должно вносить большой ошибки в определение величины K₁, поскольку время, необходимое для определения величины K₁ (15–20 мин), существенно меньше времени гидролиза соединения (III) (величина кажущейся константы скорости гидролиза при 37° С составляет ~0,008 ч⁻¹). Из сравнения величин K₁ для соединений (III) и (IV) видно, что сродство броманалога (III) не превышает сродства оксианалога (IV).

При облучении фенилаланил-тРНК-синтетазы в присутствии фенилаланинил-8-азидоаденилата (условия модификации см. в «Экспериментальной части») не наблюдается инактивации фермента. Степень ковалентного присоединения к ферменту составляет при этом ~5%. Соединение (II) в условиях реакции является фотолитически активным.

В литературе имеются данные о том, что производные 8-азидо-АМР являются аффинными реагентами ряда нуклеотидзависимых ферментов [7, 9–12]. Исследования модификации аминокцил-тРНК-синтетаз с помощью 8-азидо-АТФ, являющегося ингибитором для ряда синтетаз [13], не проводились. В случае же метионил-тРНК-синтетазы [4] нет данных об изменении активности фермента в результате ковалентного присоединения метионил-8-азидоаденилата. Отсутствие инактивации фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью фенилаланинил-8-азидоаденилата скорее всего связано с отсутствием акцептора в участке локализации азидо-

Ингибирование реакции аминиацелирования тРНК^{Phe}, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой, аналогами фенилаланиниладенилата
Тип ингибирования конкурентный

Соединение	Субстрат *	K_i , мкМ	Соединение	Субстрат *	K_i , мкМ
I	АТР	0,1	(III)	АТР	140
(I)	Phe	0,1	(III)	Phe	220
(II)	АТР	1,4	(IV)	»	100
(II)	Phe	1,2			

* K_m для АТР 0,13 мМ, для фенилаланина 4 мкМ.

Влияние лигандов на модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью N-бромацетилфенилаланиниладенилата

Условия модификации		[Лиганд], мМ				Остаточная активность * в реакции аминиацелирования, отн. ед.	Уровень ** присоединения аналога к ферменту, моль/моль фермента
[аналог], мМ	время реакции, ч	Phe	АТР	фенилаланинол	фенилаланиниладенилат		
0,56	6,5					0,61	0,9
0,56		0,8				0,74	0,8
0,56				3,3		0,75	0,73
0,56		0,8	3,3			0,95	0,5
0,2	11				0,4	0,86	0,72
0,2		0,8	3,3			0,71	0,68
0,2					0,4	0,97	0,39
0,2		0,8				0,9	0,55
0,8	9			1,8		0,45	1,6
0,8						0,52	1,55
0,8			9			0,7	1,15
0,8			9	1,8		0,74	1,1

* Среднее отклонение значения активности 2—4%.

** Среднее отклонение величины 5%.

группы в активном центре фермента. Таким образом, фотоактивное производное аденилата не может быть использовано для аффинной модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600.

Для модификации синтетазы использовали алкилирующее производное, обладающее более низким сродством к ферменту. При инкубации фенилаланил-тРНК-синтетазы с N-бромацетилфенилаланиниладенилатом (III) наблюдается инактивация фермента (рис. 1а). Зависимость остаточной активности фермента от времени реакции в полулогарифмических координатах (рис. 1б) является линейной на начальном участке, что указывает на псевдопервый порядок реакции модификации фермента аналогом. Глубина инактивации синтетазы зависит от концентрации соединения (III). Зависимость кажущейся константы скорости инактивации от концентрации аналога свидетельствует об аффинной модификации (рис. 2а). С помощью линейной апаморфозы в обратных координатах (рис. 2б) была оценена константа диссоциации комплекса фермента с аналогом (III). Полученное значение (0,6 мМ) коррелирует с величиной K_i (см. табл. 1).

На аффинный характер модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью N-бромацетилфенилаланиниладенилата указывает защитное влияние различных лигандов (табл. 2). Фенилаланин и АТР не полностью защищают фермент от инактивации. Эффективное защитное влияние проявляет фенилаланиниладенилат, обладающий более высоким сродством к синтетазе, чем фенилаланин и АТР (см. табл. 1). При совместном присутствии фенилаланина и АТР наблюдается практически полная защита фермента от инактивации, причем видно, что такое влияние не является суммарным действием аминокислоты и АТР. Эффектив-

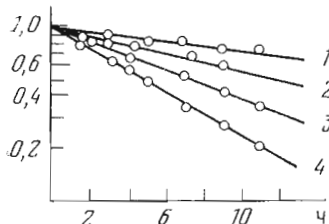
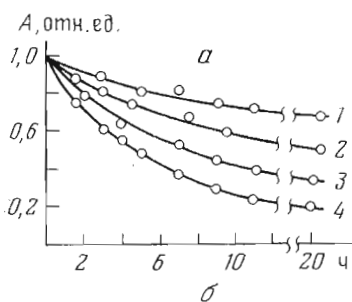


Рис. 1

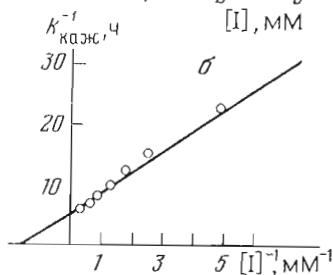
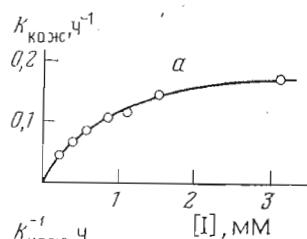


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые инактивации (а) фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью 0,2 (1), 0,4 (2), 0,8 (3) и 1,5 мМ (4) N-бромацетилфенилаланиниладенилата и те же зависимости, представленные в полулогарифмических координатах (б). Условия модификации см. в «Экспер. части»

Рис. 2. Зависимость величин $k_{\text{наб}}$ реакции инактивации фенилаланил-тРНК-синтетазы аналогом аденилата (III) от его концентрации (а) и та же зависимость, представленная в обратных координатах (б)

ная защита в данном случае обусловлена, по-видимому, образованием аминокциладенилата. В пользу этого свидетельствует также отсутствие подобного уровня защиты при формировании тройного комплекса фенилаланил-тРНК-синтетазы с фенилаланинолом и АТР. Известно, что в таком комплексе наблюдается синергическое взаимодействие лигандов с ферментом [14], что, однако, не вызывает увеличения защиты по сравнению с влиянием отдельно взятых лигандов.

Таким образом, ковалентное присоединение N-бромацетилфенилаланиниладенилата (III) к фенилаланил-тРНК-синтетазе приводит, по-видимому, к блокированию участков, связывающих аминокциладенилат. Об этом свидетельствует также снижение стехиометрии образования фенилаланиниладенилата в результате модификации фермента (табл. 3), измеренное по расходу γ -[^{32}P]АТР. Наблюдается хорошее соответствие между остаточной активностью фермента в реакции аминокцилирования тРНК и стехиометрией образования комплекса функционального димера с аминокциладенилатом.

Таблица 3

Сравнение активности нативной и модифицированной с помощью N-бромацетилфенилаланиниладенилата фенилаланил-тРНК-синтетазы в реакциях аминокцилирования тРНК^{phe} и формирования аминокциладенилата

Фермент	Активность в реакции аминокцилирования тРНК, отн. ед.	Стехиометрия * образования аденилата по расходу γ -[^{32}P]АТР, моль/моль фермента
Нативный	1	2
Модифицированный	0,6	1,2
»	0,5	1,1
»	0,4	0,83

* Среднее отклонение величины $\sim 5\%$.

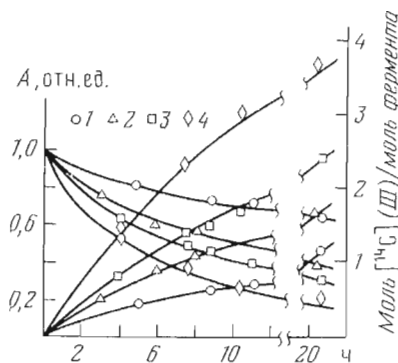


Рис. 3

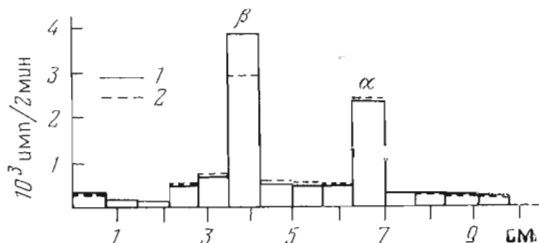


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика модификации фермента с помощью 0,2 (1), 0,56 (2), 0,8 (3) и 1,5 мМ (4) N-бромацетилфенилаланинил- ^{14}C аденилата (III). Условия реакции см. в «Экспер. части»

Рис. 4. Распределение радиоактивности по субъединицам фермента, модифицированного N-бромацетилфенилаланинил- ^{14}C аденилатом (III) (0,95 мМ, 6 ч): 1 — модификация нативного фермента; 2 — модификация фермента, предынкубированного с бромуксусной кислотой (3 мМ, 13 ч, 37° С). На гель нанесено 35 мкг белка

Для определения уровня ковалентного присоединения аналога (III) к фенилаланил-тРНК-синтетазе использовали N-бромацетилфенилаланинил- ^{14}C аденилат. Из рис. 3 видно, что уровень присоединения аналога к синтетазе несколько превышает уровень инактивации фермента. Такое несоответствие становится особенно заметным при высоких концентрациях реагента, что, по-видимому, связано с неспецифической модификацией белка. Неспецифическая модификация фермента аналогом (III) имеет место и в присутствии различных лигандов, следствием чего является отсутствие полного соответствия между уровнем защиты фермента от инактивации и уровнем ковалентного присоединения (см. табл. 2).

Для снижения уровня неспецифической модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы N-бромацетилфенилаланиниладенилатом проводили предварительную модификацию фермента с помощью бромуксусной кислоты. При инкубации синтетазы с бромуксусной кислотой в концентрациях, сопоставимых с концентрациями аналога (III) (0,5–3 мМ), в течение 15 ч не наблюдается инактивации фермента. При последующей модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы, предынкубированной с бромуксусной кислотой (3 мМ, 13 ч, 37° С), аналогом аденилата (III) в условиях заметной неспецифической реакции (0,9 мМ, 6 ч, 37° С) уровень ковалентного присоединения аналога к ферменту снижается по сравнению с уровнем модификации нативной синтетазы (1,44 моль/моль нативного фермента и 1,2 моль/моль фермента, модифицированного бромуксусной кислотой). Степень инактивации при этом сохраняется и составляет 45%. Таким образом, уровень неспецифической модификации снижается наполовину. Данные свидетельствуют о том, что неспецифическая модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы аналогом (III) связана отчасти с модификацией несущественных для активности фермента групп, которые могут алкилироваться бромуксусной кислотой.

Исследование модификации субъединиц синтетазы с помощью аналога аденилата (III) показывает, что происходит мечение как α -, так и β -субъединиц белка, причем уровень мечения β -субъединиц выше, чем α -субъединиц (табл. 4). В присутствии фенилаланина снижается модификация α -субъединиц (табл. 4). Фенилаланиниладенилат, а также фенилаланин и АТР в совокупности защищают как α -, так и β -субъединицы синтетазы. Однако в обоих случаях, как видно из соотношения мечения субъединиц, наблюдается преимущественная защита α -субъединиц, что указывает на специфический характер их модификации. В пользу этого свидетельствуют также результаты распределения неспецифической метки по субъединицам

Влияние лигандов на модификацию субъединиц фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью N-бромацетилфенилаланиниладенилата (III)

[III], мМ	Лиганд	[Лиганд], мМ	Остаточная активность в реакции аминоацили- рования, отн. ед.	Уровень присоедине- ния аналога к ферменту, моль/моль фермента	Модификация субъединиц, имп/мин		
					α	β	β/α
0,56	Фенилаланин	0,8	0,58	1,1	1600	2700	1,7
0,56			0,72	0,95	950	2750	2,9
0,74			0,55	1,2	2500	4400	1,8
0,74	Фенилаланин + АТР	0,8	0,92	0,75	1150	3150	2,7
0,74	Фенилаланиниладенилат	0,4	0,83	0,9	1300	3900	3
0,56	тРНК ^{Phe}	0,012	0,65	0,97	1650	2150	1,3
0,56	N-Ацетилфенилаланил-тРНК ^{Phe}	0,012	0,73	0,8	1300	1850	1,4

фермента. Предварительная модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы бромуксусной кислотой (см. выше) снижает уровень присоединения аналога (III) к β -субъединицам белка (рис. 4).

Таким образом, можно предположить, что центр связывания остатка аминокислоты в составе фенилаланиниладенилата размещается на α -субъединицах фенилаланил-тРНК-синтетазы, как и центр связывания свободного фенилаланина [15]. Однако из сопоставления инактивации фермента и уровня меченя (см. табл. 4) видно, что неспецифическая модификация составляет $\sim 1/4$ часть от общего уровня модификации, в то время как большая часть метки связана с β -субъединицами фермента. Следовательно, ковалентное присоединение аналога (III) к β -субъединицам также вносит вклад в инактивацию синтетазы, т. е. является «специфическим». В пользу такого заключения свидетельствует также снижение уровня модификации β -субъединиц в присутствии фенилаланиниладенилата и АТР совместно с фенилаланином (см. табл. 4). Взаимодействие промежуточного соединения реакции активации аминокислоты как с α -, так и с β -субъединицами было показано для фенилаланил-тРНК-синтетазы из дрожжей методом фотоприсоединения субстратов [16].

Ранее было показано, что центры связывания фенилаланина и фенилаланил-тРНК^{Phe} размещаются на различных субъединицах фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 [15], на основании чего сделан вывод о возможности переноса аминокислотного остатка с α - на β -субъединицу фермента при аминоацелировании тРНК^{Phe}. Возможно, что активный центр реакции аминоацелирования расположен в области контакта α - и β -субъединиц фенилаланил-тРНК-синтетазы. В этой области происходит, по-видимому, формирование аминокислотного остатка с последующим переносом аминокислотного остатка на тРНК. Такое предположение может объяснить специфическое взаимодействие реакционноспособного аналога фенилаланиниладенилата с обеими субъединицами фермента.

Так как аминокислотный остаток в составе аминокислот-тРНК размещается на β -субъединицах вблизи области контакта с α -субъединицами [15], представляло интерес оценить влияние аминокислот-тРНК на модификацию фермента аналогом аденилата. Результаты представлены в табл. 4. Видно, что N-ацетилфенилаланил-тРНК^{Phe} (устойчивый аналог аминокислот-тРНК) частично защищает фенилаланил-тРНК-синтетазу от модификации N-бромацетилфенилаланиниладенилатом (III). Из распределения метки по субъединицам видно, что снижается преимущественно уровень меченя β - и в некоторой степени α -субъединиц. В то же время тРНК защищает от модификации только β -субъединицу, причем менее эффективно. Результаты могут быть объяснены наличием перекрывания центров связывания аденилата и аминокислот-тРНК.

Нельзя исключить, однако, возможность модификации β -субъединиц фермента как результат отсутствия эффективного взаимодействия аналога аденилата (III) с фенилаланинсвязывающим центром на α -субъединицах. Введение реакционноспособной группы по α -аминогруппе аденилата приводит к уменьшению сродства аденилата к синтетазе. Величина K_1 соединения (III) (см. табл. 1) сопоставима с величиной вклада АМР-фрагмента аминокислотаденилатов в их взаимодействие с аминокислот-тРНК — синтетазами ($\sim 0,8$ мМ) [3]. По-видимому, значительное взаимодействие N-бром-ацетилфенилаланиниладенилата с ферментом осуществляется за счет аденилатной части с АТР-связывающим центром фермента. В пользу размещения последнего в области контакта α - и β -субъединиц свидетельствует модификация обеих субъединиц с помощью аналога АТР — аденозин-5'-триметафосфата [17].

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что формирование фенилаланиладенилата происходит при участии α - и β -субъединиц фенилаланил-тРНК-синтетазы. Аденилатная часть аминокислотаденилата расположена вблизи области контакта субъединиц, а аминокислотный остаток взаимодействует в основном с α -субъединицами, где размещается центр связывания свободного фенилаланина. Не исключено, однако, что в составе аденилата ослабляются контакты аминокислотного остатка с центром, узнающим аминокислоту, что облегчает его перенос на концевой аденозин тРНК. Следствием этого может быть наблюдаемая конкуренция аналога аминокислот-тРНК и аминокислотаденилата. Предполагаемый механизм переноса аминокислотного остатка сопровождается, по-видимому, конформационными изменениями фермента. Существование конформационных перестроек, являющихся лимитирующей стадией реакции аминокислотирования, было показано для фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью методов быстрой кинетики [18].

Экспериментальная часть

Фенилаланил-тРНК-синтетазу из *E. coli* MRE-600 (КФ 6.1.1.20, $\alpha_2\beta_2$) получали согласно [19] с некоторыми изменениями. Препарат фермента был 97% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Суммарная тРНК из *E. coli* MRE-600 была выделена согласно работе [20]. Содержание тРНК^{Phe} в полученном препарате составляло 1,7% по акцепторной активности. Неорганическая пирофосфатаза из дрожжей любезно предоставлена С. Х. Дегтяревым (ВНИИ МБ, Новосибирск).

В работе использовали АТР (Reanal, ВНР), L-фенилаланин (Reanal, ВНР), L-[¹⁴C] фенилаланин (360 Ки/моль, UVVVR, ЧССР), N,N'-дициклогексилкарбодимид (Sigma, США), азид натрия (Sigma, США); N-оксисукцинимид любезно предоставлен А. А. Галль (НИОХ, Новосибирск); γ -[³²P] АТР (>1000 Ки/ммоль) отечественного производства; L-фенилаланинол, L-фенилаланиниладенилат и L-фенилаланинил-8-бромаденилат синтезировали как описано ранее [5]. Для синтеза фенилаланинил-[¹⁴C] аденилата использовали [¹⁴C] АМР (46,5 Ки/моль, «Изотоп», Ленинград). Все остальные реактивы были аналитической чистоты.

В работе использовали смолы: дауэкс 50×2 (Serva, ФРГ), DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), сефадекс G-100, тонкий и сверхтонкий (Pharmacia, Швеция). Нитроцеллюлозные фильтры Synpor 2 производства Chemapol (ЧССР).

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

ТСХ проводили на стандартных пластинках силуфол UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР), БХ — на Whatman 3ММ (Whatman, ФРГ) в системах этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 7:3 (А); n-бутанол — уксусная кислота — вода, 7:2:5 (Б); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 17:2:1:5 (В); изопропанол — конц. аммиак — вода, 7:1:2 (Г); ацетон — вода, 7:3 (Д).

N-Оксисукцинимидный эфир бромуксусной кислоты синтезировали аналогично работе [8]. Т. пл. 113—115° С. Количество ковалентно связанного брома в эфире составляло не менее 99%.

N-Бромацетилфенилаланиниладенилат (III) синтезировали обработкой фенилаланиниладенилата (I) N-оксисукцинимидным эфиром бромуксусной кислоты. Соединение (I) (5 мкмоль) в 0,3 мл 0,1 М триэтиламмоний-бикарбонатного буфера (pH 8) смешивали с раствором эфира (0,3 ммоль) в диоксане (1,4 мл). Реакционную смесь выдерживали, перемешивая в течение 6–8 ч при 18°С. К смеси добавляли этиловый эфир (20 мл) и центрифугированием (4500 об/мин, 30 мин) отделяли образовавшийся маслообразный осадок. Остаток переосаждали из метанола (0,1 мл) в эфир 4 раза для удаления избытка N-оксисукцинимидного эфира. Осадок высушивали в вакууме. Продукт (III) гомогенен по данным ТСХ (по поглощению в УФ-свете). R_f 0,70 (А), 0,41 (Б), 0,63 (В). УФ-спектр (pH 7; 9): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм (ϵ 14 600 $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), $\lambda_{\text{мин}}$ 240 нм. Примесь оксианалога (IV) в соединении (III) не превышает 3% (по радиоактивности в случае N-бромацетилфенилаланинил- ^{14}C аденилата). Содержание ковалентно связанного брома в соединении (III) составляет 97%.

Абсолютное количество ковалентно связанного брома в бромуксусной кислоте, N-оксисукцинимидном эфире бромуксусной кислоты и N-бромацетилфенилаланиниладенилате (III) определяли потенциометрически титрованием 0,02 н. AgNO_3 . Гидролиз соединений проводили в 0,1 н. NaOH при 80°С в течение 2 ч. В титруемый раствор добавляли 25% раствор конц. HNO_3 в метаноле (1/3 часть по объему).

N-Оксиацетилфенилаланиниладенилат (IV) получали обработкой соединения (III) 0,1 н. водным аммиаком при 37°С в течение 20 ч. Продукты гидролиза разделяли хроматографией на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (HCO_3^- -форма) в градиенте концентрации бикарбоната триэтиламмония как описано ранее [5]. Соединение (IV) является гомогенным по данным ТСХ: R_f 0,50 (А), 0,36 (Б), 0,63 (В). УФ-спектр (pH 7; 9): $\lambda_{\text{макс}}$ 261,5 нм (ϵ 14 900 $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), $\lambda_{\text{мин}}$ 233 нм.

L-Фенилаланинил-8-азидоаденилат (II) синтезировали из фенилаланинил-8-бромаденилата (6 мкмоль) обработкой азидом натрия (200 мкмоль) аналогично синтезу 8-азидо-AMP [7]. Реакцию проводили в сухом диметилформамиде (1,5 мл) при 75°С в течение 10–12 ч. Реакционную смесь отфильтровывали от избытка соли (охлаждая до 4°С), растворяли в воде (100 мл) и хроматографировали на колонке (1,2×35 см) с DEAE-сефадексом (HCO_3^- -форма). После отмывки колонки водой (100 мл) элюцию проводили градиентом бикарбоната триэтиламмония (pH 7,5) от 0 до 0,2 М (1 л). Скорость элюции 40 мл/ч, объем фракции 9 мл. За выходом продуктов следили по поглощению при 265 нм. Выход основного продукта составил 50%. Соединение (II) гомогенно по данным ТСХ (R_f 0,61 (Г), 0,49 (Д)) и БХ (R_f 0,65 (А)). УФ-спектр (pH 7,5): $\lambda_{\text{макс}}$ 285 нм (ϵ 14 300 $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), $\lambda_{\text{мин}}$ 250 нм. В ИК-спектре соединения (II) присутствует сильный сигнал 2160 см^{-1} , соответствующий колебаниям N_3 -группы. Содержание азидогруппы в соединении (II) определяли по фотолитической активности аналогично [7]. Соединение (II) наносили на бумагу Whatman 3ММ, облучали УФ-светом (длиной волны выше 300 нм, 1 ч), затем хроматографировали в системе (А). Пятна, поглощающие в УФ-свете, элюировали водой. При фотоллизе сохраняется 15% материала, соответствующего исходному (R_f 0,65).

При определении величин молярных коэффициентов поглощения соединений (II)–(IV) концентрацию этих соединений паходили с помощью колориметрического метода по образованию молибденовой сини [21, 22] после гидролиза соединений в смеси азотной и серной кислот [21], а также по радиоактивности в случае меченых соединений, используя величину удельной радиоактивности [^{14}C]AMP.

Модификацию фенилаланил-tРНК-синтетазы с помощью N-бромацетилфенилаланиниладенилата (III) проводили при 37°С. Инкубируемая смесь (0,05–0,15 мл) содержала 0,05 М трис- HCl -буфер (pH 8), 5–10 мМ MgCl_2 , 3 мкМ фермент, 0,1–3 мМ аналог (III). В опытах по исследованию защитного влияния различных лигандов смесь содержала соответствующие лиганды в концентрациях, указанных в табл. 2 и 4. Из реакционной смеси

отбирали аликвоты объемом 20—40 мкл через определенные промежутки времени и измеряли активность фермента в реакции аминокислотирования тРНК^{Phe}. Для определения уровня ковалентного присоединения метки к белку модифицированный фермент отделяли от низкомолекулярных лигандов гель-фильтрацией на колонке (0,3×10 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий) в присутствии 0,3 М КСl. Материал пика, соответствующего белку, наносили на нитроцеллюлозные фильтры и просчитывали радиоактивность на счетчике Delta-300 (Searle, США) в толуоловом сцинтиляторе.

Модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью бромуксусной кислоты проводили в условиях, аналогичных вышеописанным. Реакционная смесь содержала 0,5—4 мМ бромуксусную кислоту.

Гидролиз N-бромацетилфенилаланинил-¹⁴C аденилата проводили в условиях модификации фермента в отсутствие последнего. Реакционную смесь анализировали на содержание соединений (III) и (IV) методом ТСХ в различных системах. Накопление продукта гидролиза (IV) определяли по количеству радиоактивности.

Модификацию фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью фенилаланинил-8-азидоаденилата (II) проводили как описано ранее [23]. Реакционная смесь (0,15 мл) содержала 0,05 М трис-НСl-буфер (рН 7,5), 1 мМ MgCl₂, 3 мкМ фермент, 10—100 мкМ аналог.

Степень ковалентного присоединения аналога к ферменту оценивали по включению ³H-метки в белок, облученный с аналогом (II) (70 мкМ) в течение 2 ч. После гель-фильтрации на сефадексе G-100 (тонкий) фермент обрабатывали периодатом натрия (35—40-кратный избыток, 2 ч) в натрий-ацетатном буфере (рН 6), диализовали против буфера трис-НСl (рН 8). Затем проводили восстановление NaB³H₄ (100-кратный избыток, 6 ч) в боратном буфере (рН 9). Степень присоединения аналога (II) рассчитывали по разности включения ³H-метки в нативный и облученный с аналогом белок.

Реакцию аминокислотирования тРНК^{Phe} проводили как описано в работе [23]. При исследовании ингибирующего действия аналогов (II)–(IV) смесь для аминокислотирования содержала 2—4 мкМ аналог (II), 0,2—0,5 мМ аналог (III) и 0,1—0,3 мМ аналог (IV). Характер ингибирования по отношению к субстратам определяли графическим способом в координатах Лайнуивера—Бэрка. Значения констант ингибирования уточняли с помощью метода наименьших квадратов.

Стехиометрию образования комплекса фенилаланил-тРНК-синтетазы с фенилаланиладенилатом определяли по методу Фершта [24].

Препаративное аминокислотирование тРНК фенилаланином проводили согласно методу [25]. Содержание тРНК^{Phe} в используемом препарате тРНК составляло 11% по акцепторной активности. N-Ацетилфенилаланил-тРНК^{Phe} получали обработкой фенилаланил-тРНК^{Phe} уксусным ангидридом аналогично [26]. Степень N-ацелирования составляла почти 100%.

Разделение субъединиц фенилаланил-тРНК-синтетазы проводили как описано в работе [15].

Авторы глубоко признательны проф. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и ценные замечания при написании статьи и С. Н. Ходыревой за помощь в проведении ряда экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Theory and practice in affinity techniques. London — New York — San Francisco: Acad. Press, 1978, p. 169—189.
2. Cassio D., Lemoine F., Waller J. P., Sandrin E., Boissonnas R. A. Biochemistry, 1967, v. 6, № 3, p. 827—835.
3. Flossdorf J., Marutsky R., Messer K., Kula M.-R. Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 3, p. 673—683.
4. Wetzel R., Söll D. Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1681—1694.
5. Лаврик О. И., Моор Н. А., Невинский Г. А. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1480—1487.
6. Горшкова И. И., Даций И. И., Лаврик О. И., Невинский Г. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 4, с. 699—707.

7. *Haley B. E., Hoffman J. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3367–3371.
8. *Santi D. V., Marchant W.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 51, № 2, p. 370–375.
9. *Haley B. E.* In: Methods in Enzymology, 1977, v. 46, № 339–346.
10. *Marcus F., Haley B. E. J.* Biol. Chem., 1979, v. 254, № 2, p. 259–261.
11. *Lau E. P., Haley B. E., Barden R. E.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, № 3, p. 843–849.
12. *Schafer H.-J., Scheurich P., Rathgeber G., Dose K., Mayer A., Klingenberg M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 2, p. 562–568.
13. *Freist W., Sternbach H., Von Der Haar F., Cramer F.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 84, № 2, p. 499–502.
14. *Holler E., Hammer-Raber B., Hanke T., Bartmann P.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2496–2503.
15. *Lavrik O. I., Moor N. A., Khodyreva S. N.* Mol. Biol. Rep., 1982, v. 8, p. 123–126.
16. *Baltzinger M., Fasiolo F., Remy P.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 97, № 2, p. 481–494.
17. *Ходырева С. Н., Анкилова В. Н., Лаврик О. И.* Тез. докл. IV Всес. конф. Рига, 1982, ч. 1, с. 99–100.
18. *Baltzinger M., Holler E.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 10, p. 2460–2476.
19. *Stulberg M. P. J.* Biol. Chem., 1967, v. 242, № 5, p. 1060–1064.
20. *Сандахчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чуцаев В. М.* Молекулярн. биология, 1967, т. 1, вып. 4, с. 463–466.
21. *Губен-Вейль.* Методы органической химии. М.: Химия, 1967, т. 2, с. 31.
22. *Grindey G. B., Nichol Ch. A.* Anal. Biochem., 1970, v. 33, № 1, p. 114–119.
23. *Лаврик О. И., Невинский Г. А., Ходырева С. Н., Мур Н. А.* Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 884–893.
24. *Fersht A. R., Ashfold J. S., Bruton Ch. J., Jakes R., Koch G. L. E., Hartley B. S.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 1–4.
25. *Анкилова В. Н., Горшкова И. И., Кононова Т. А., Лаврик О. И., Ходырева С. Н.* Молекулярн. биология, 1978, т. 12, вып. 5, с. 1085–1095.
26. *Безнедельная Н. И., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Ходырева С. Н.* Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 876–883.

Поступила в редакцию
28.VII.1982
После доработки
12.XI.1982

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

MOOR N. A., NEVINSKY G. A., ANKILOVA V. N., LAVRIK O. I.

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

Two reactive analogs of phenylalaninyladenylate: phenylalaninyl-8-azido-adenylate (1) and N^5 -bromoacetylphenylalaninyladenylate (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 ATP and phenylalanine in the aminoacylation of tRNA. Modification of the enzyme by these analogs was investigated. No inactivation of phenylalanyl-tRNA synthetase took place under UV-irradiation in the presence of analog (1). Analog (2) was shown to be an affinity reagent for the enzyme, however some nonspecific modification also occurred. For localization of the aminoacyladenylate binding site, modification of the enzyme subunits by analog (2) was carried out. The conclusion was reached that both α - and β -subunits might be implicated in the active site formation for the aminoacylation reaction intermediate.