

УДК 547.963.3

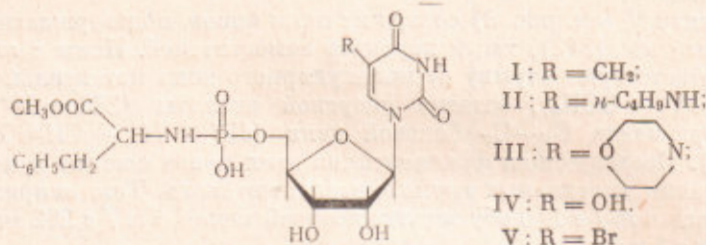
ХИМИЯ

Р. К. ЛЕДНЕВА, Н. Н. ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ, Н. Г. ШИНСКИЙ, З. А. ШАБАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

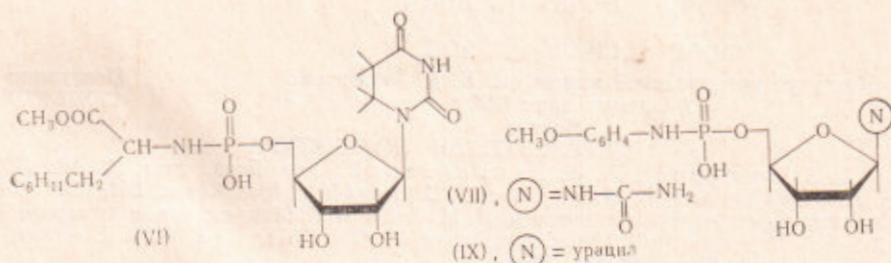
**АНАЛОГИ УРИДИН-5'-ФОСФОАМИДОВ И ИХ ГИДРОЛИЗ  
РИБОНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФОАМИДАЗОЙ**

Нами было показано <sup>(1)</sup>, что субстратами рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы являются амиды пуриновых и пиримидиновых 5'-нуклеотидов. С целью выяснения роли основания в механизме действия этого фермента мы изучили ферментативный гидролиз ряда аналогов уридин-5'-фосфоамидов, модифицированных по агликону.

Обнаруженная ранее <sup>(1)</sup> устойчивость 5'-фосфоамидов дезокситимидина к действию рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы могла быть связана как с отсутствием 2'-гидроксильной группы в сахаре, так и с наличием 5-метильной группы в основании. В связи с этим мы исследовали ферментативный гидролиз метилового эфира 5-метилуридиллил-(5' → N)-фенилаланина (I), а также ряда других 5-замещенных уридиллил-(5' → N)-фенилаланинов (II—V), синтез и химический гидролиз которых описаны в предыдущем сообщении <sup>(2)</sup>.



Кроме того, для выяснения вкладов, вносимых в образование фермент-субстратного комплекса гидрофобными и π-взаимодействиями и водородными связями, мы синтезировали и исследовали гидролиз амидов 5,6-дигидроуридин-5'-фосфата (VI) и карбамидорибозид-5'-фосфата (VII). Соединение VI получали гидрированием метилового эфира уридиллил-(5' → N)-фенилаланина (VIII) водородом в присутствии родия на окиси алюминия. При этом происходило восстановление не только гетероцикла, но и остатка фенилаланина до β-циклогексил-α-аланина. Амид карбамидорибозид-5'-фосфата (VII) был синтезирован действием 7 M гидроксилamina при pH 10 на *n*-анизидид УМФ (IX) <sup>(4)</sup>. При этом мы исхолили из *n*-анизидида, а не из фенилаланинового производного, чтобы избежать сопутствующей реакции гидроксилamina со сложноэфирной группировкой аминокомпонента в VIII



Ранее на основании изучения кислотного гидролиза фосфоамидов I — III и VIII<sup>(2)</sup> было высказано предположение о существовании между гетероциклическим основанием и аминокислотным нековалентных взаимодействий, стабилизирующих P—N-связь. Стабилизирующее влияние гетероциклического основания было отмечено также для эфиров нуклеотидов при сравнении гидролиза 2,4-динитрофениловых эфиров дезокситимидин-3'- и 5'-фосфата<sup>(5)</sup>, однако причины такого влияния не обсуждались.

Изучение кислотного гидролиза соединений VI и VII подтверждает существование нековалентных взаимодействий между основанием нуклеотида и аминокислотным компонентом. В нуклеотидамидах VI и VII, где нарушена ароматичность агликона, такого рода взаимодействия затруднены и, по-видимому, вследствие этого P—N-связь в них несколько более лабильна, чем в соответствующих амидах УМФ (в 0,05 N HCl при 37° полупериод реакции гидролиза  $\tau$  для VI равен 16,5 мин., а для VIII 22 мин.; для VII  $\tau$  41, а для IX 58 мин.).

5-Замещенные уридин-5'-фосфоамиды I — IV расщепляются рибонуклеозид-5'-фосфоамидазой в примерно равной степени, хотя несколько меньшей, чем степень гидролиза соответствующего амида незамещенного УМФ (VIII) (см. табл. 1). В сочетании с устойчивостью к действию этого фермента дезокситимидил-(5' → N)-фенилаланина эти данные свидетельствуют о том, что более существенная роль во взаимодействии субстрата с ферментом принадлежит сахару, а не основанию. Некоторое понижение степени гидролиза P—N-связи с введением заместителя в положение 5 может быть связано либо непосредственно со стерическими затруднениями для взаимодействия субстрата и фермента, либо со стабилизацией в результате нековалентных взаимодействий (которые обнаруживаются, как показано выше, и при кислотном гидролизе) какой-то специфической конформации молекулы субстрата, неблагоприятной для взаимодействия с ферментом.

Таблица 1

Соединение	I	II	III	IV	V	VI	VII*	VIII	IX
Ферментативный гидролиз, $\mu$ мол.	0,44	0,39	0,65	0,45	0,00	0,93	—	1,00	0,2

\* Гидролизуется, но количественная оценка гидролиза не проводилась.

Особое место среди 5-замещенных уридил-(5' → N)-фенилаланинов занимает 5-бромпроизводное (V), не расщепляющееся ферментом. Имеющиеся данные не позволяют с достаточной определенностью судить о причинах такой аномалии. Однако можно предположить, что она заключается в электроноакцепторном влиянии брома, который, как известно, изменяет способность гетероцикла к образованию водородных связей<sup>(6)</sup> и может тем самым препятствовать правильному взаимодействию субстрата с ферментом.

5,6-Дигидроуридил-(5' → N)- $\beta$ -циклогексил- $\alpha$ -аланин (VI) гидролизуется ферментом почти в такой же степени, как и уридил-(5' → N)-фенилаланин (VIII). Этот результат, а также чувствительность к ферментативному гидролизу карбамидорибозид-5-фосфо-*n*-анизидида (VII) показывают, что ароматическая система гетероциклического основания, по-видимому, не обязательна для взаимодействия с ферментом (см. табл. 1).

Таким образом, структурные требования, предъявляемые рибонуклеозид-5'-фосфоамидазой к гетероциклическому основанию в молекуле субстрата, не являются жесткими. Хотя, возможно, в образование фермент-субстратного комплекса вносят вклад как водородные связи, так и гидрофобные и  $\pi$ -взаимодействия, одновременное участие обоих типов взаимодействий не представляется необходимым.

### Экспериментальная часть

5,6-Дигидроуридилл - (5' → N) - β - циклогексил - α - аланин, метиловый эфир (VI) получали гидрированием водного раствора соединения VIII водородом в присутствии 5% родия на окиси алюминия в течение 3 час. до полного исчезновения поглощения при 260 мμ (в воде).  $R_f$  0,88 и 0,13 при хроматографии на бумаге в системах этиловый спирт — 1 M ацетат аммония pH 7,5 (7:3) и *n*-бутиловый спирт — вода (86:14), соответственно.  $U_{отн}$  умф-5', 0,08 при электрофорезе на бумаге в 0,03 M фосфатном буфере pH 6,6 (3,5 часа, 350 в). Вещество дает положительные качественные реакции на аминокислоту (7) и дигидроурацил (8). Соотношение фосфор (9) : рибоза (10) : нуклеозид (8) 1 : 0,95 : 0,92. У.-ф. спектр: в воде характеристическое поглощение в области 210—310 мμ отсутствует; в 0,1 N KOH —  $\lambda_{max}$  232,  $\lambda_{min}$  219 мμ.

Карбамидорибозид-5'-фосфо-*n*-анизидид (VII) получали обработкой соединения IX (11) 7 M гидроксиламином, предварительно доведенным до pH 10 добавлением 2 N HCl, в течение 50 час. при 0°. Реакционную смесь разделяли на колонке с Сефадексом Г-10, отбирали фракции с  $\lambda_{max}$  235 мμ (в воде), упаривали и соединение VII выделяли препаративным электрофорезом на бумаге при pH 8,3 (900 в, 1 час, 0,05 M бикарбонат триэтиламмония). Для окончательной очистки от примеси непрореагировавшего соединения IX вещество обрабатывали избытком рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы (ацетатный буфер pH 5,0, 37°, 30 мин.) и выделяли хроматографией на бумаге в системе изопропиловый спирт — конц. NH<sub>3</sub> — вода (7:1:2),  $R_f$  0,36. В системе этиловый спирт — 1 M ацетат аммония pH 7,5 (7:3),  $R_f$  0,48.  $U_{отн}$  умф-5', 0,36 при электрофорезе на бумаге в 0,05 M бикарбонате триэтиламмония pH 8,3 (3,5 часа, 350 в). Вещество дает положительные качественные реакции на дис-гликольную группировку (12) и на амин с *n*-диметиламинобензальдегидом (13), отрицательную на гидроксиламин (14). Соотношение фосфор (9) : рибоза (10) 1 : 0,96. У.-ф. спектр (в воде):  $\lambda_{max}$  233, 295,  $\lambda_{min}$  215, 265 мμ.

Кислотный гидролиз соединений VI — IX проводили в 0,05 N HCl при 37°, используя описанную ранее методику (15) с некоторыми модификациями: степень гидролиза P—N-связи в пробах определяли не хроматографически, а по количеству неорганического фосфата, отщепляемого (после нейтрализации гидролизатов) фосфомоноэстеразой из простаты (0,01 M ацетатный буфер pH 5,0, 0,001 M MgCl<sub>2</sub>, 37°, 15 мин.). Определение фосфора проводили по методу Самнера (16).

Ферментативный гидролиз соединений I — V, VIII и IX проводили по методике, описанной ранее (4). Состав пробы: 5 μмол. субстрата, 15 μмол. ацетатного буфера pH 5,0, 37 μг фермента (уд. активность 32 ед.) в общем объеме 0,15 мл. Реакцию проводили в течение 10 мин. при 37°. Для соединений VI и VII гидролиз рибонуклеозид-5'-фосфоамидазой проводили в присутствии фосфомоноэстеразы и степень гидролиза определяли, как описано выше для кислотного гидролиза.

Московский государственный университет

им. М. В. Ломоносова

Поступило

29 I 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Р. К. Леднева, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, 172, 977 (1967). <sup>2</sup> Н. Г. Шинский, Н. Н. Преображенская и др., ЖОХ, 40, 1132 (1970). <sup>3</sup> M. Green, S. S. Cohen, J. Biol. Chem., 225, 397 (1957). <sup>4</sup> Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский и др., ДАН, 152, 1005 (1963). <sup>5</sup> R. G. von Tigerstrom, M. Smith, Biochemistry, 8, 3087 (1969). <sup>6</sup> K. Hoogsteen, In: Molecular Associations in Biology, N. Y., 1968, p. 21. <sup>7</sup> Г. Н. Зайцева, Н. П. Тюленева, Лаб. дело, 3, 24 (1958). <sup>8</sup> R. Fink, C. McGanghey et al., J. Biol. Chem., 218, 1 (1956). <sup>9</sup> H. Weil-Malherbe, R. H. Green, Biochem. J., 49, 286 (1951). <sup>10</sup> Z. Dische, K. Schwarz, Mikrochim. acta, 2, 13 (1937). <sup>11</sup> J. C. Moffatt, H. G. Khourana, J. Am. Chem. Soc., 83, 649 (1961). <sup>12</sup> J. G. Buchanan, C. A. Dekker, A. J. Long, J. Chem. Soc., 1950, 3162. <sup>13</sup> Хроматография на бумаге, под ред. И. Хайса и К. Мацека, ИЛ, 1962, стр. 738. <sup>14</sup> D. E. Frear, K. C. Burrell, Anal. Chem., 27, 1664 (1955). <sup>15</sup> А. Б. Соловьева, Н. Н. Преображенская и др., ЖОХ, 37, 431 (1967). <sup>16</sup> J. B. Samner, Science, 100, 413 (1944).