

Г. Т. БАБКИНА, В. Л. КНОРРЕ,  
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, О. И. ЛАВРИК

# ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ $\gamma$ -АНИЛИДА АТФ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ АМИНОКИСЛОТА : тРНК-ЛИГАЗАМИ И ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

Нуклеозидтрифосфаты, в особенности АТФ, являются субстратами разнообразных ферментативных реакций, в том числе катализируемых важнейшими ферментами биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. В связи с этим представляет значительный интерес использование производных нуклеозидтрифосфатов для осуществления аффинной модификации этих ферментов. Удобным способом присоединения реакционноспособных остатков к молекулам нуклеозидтрифосфатов может быть получение амидов по  $\gamma$ -фосфатному остатку, так как это в наименьшей мере должно нарушать способность молекул к специфичным взаимодействиям, поскольку не затрагивается ни углеводная часть молекулы, ни основание и лишь на единицу изменяется заряд на фосфатной группе. Методы получения фосфамидных производных нуклеотидов, в том числе содержащих активные алкилирующие группы (<sup>1,2</sup>), достаточно хорошо разработаны. Описано также образование амидов АДФ (<sup>3</sup>).

Для решения вопроса о пригодности  $\gamma$ -амидов нуклеозидтрифосфатов в качестве реагентов для аффинной модификации необходимо убедиться, что образование  $\gamma$ -амидной связи не лишает их способности взаимодействовать с соответствующими ферментами. В настоящей работе с этой целью исследовано действие  $\gamma$ -анилида АТФ как ингибитора двух важных реакций синтеза биополимеров: образования фенилаланил-тРНК, катализируемого фенилаланин:тРНК-лигазой из *Escherichia coli* MRE-600 (К.Ф.6.1.1) и синтеза РНК на матрице ДНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli* (К.Ф.2.7.7.6).

Фосфамидные производные нуклеотидов получают действием соответствующих аминов на активные производные нуклеотидов, которые образуются при реакции последних с дифенилхлорфосфатом или карбодиимидами (<sup>4</sup>). В настоящей работе мы использовали для получения анилида АТФ активное производное, получающееся при действии на АТФ *n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*- $\beta$ -(4-метилморфолиний)-этилкарбодиимида. Образование этого активного производного зарегистрировано в нашей предыдущей работе (<sup>5</sup>). Детали синтеза будут описаны отдельно.

$\gamma$ -Анилид АТФ достаточно стабилен в условиях исследуемых ферментативных реакций. При pH 7 и 40° гидролизует до АТФ около 15% анилида за 20 час. С увеличением pH реакция существенно замедляется (1,5% гидролиза за 30 час. при pH 9).

В работе была использована тРНК из *E. coli* MRE-600, полученная согласно (<sup>6</sup>), РНК-полимераза из *E. coli* MRE-600, полученная согласно модифицированному методу (<sup>7</sup>) (удельная активность 400–500 единиц активности на 1 мг в единицах Гурвица (<sup>8</sup>)), и препарат фенилаланин: тРНК-лигазы из *E. coli*, полученный согласно методу (<sup>9</sup>). Аминоацилирование тРНК <sup>14</sup>C-фенилаланином проводилось в реакционной смеси, содержащей 0,05 *M* трис-HCl, pH 7,5, 0,008 *M* MgSO<sub>4</sub>, 2,8·10<sup>-6</sup> *M* <sup>14</sup>C-фенилаланин (220 мС/ммоль), 2·10<sup>-5</sup> *M* тРНК, 2·10<sup>-8</sup> *M* фермент, АТФ (от 4·10<sup>-5</sup> до 3·10<sup>-3</sup> *M*) и  $\gamma$ -анилид АТФ (от 8·10<sup>-3</sup> до 2·10<sup>-1</sup> *M*). Коли-

чество образовавшейся  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК определяли по радиоактивности после сорбции па дисках бумаги FN-16 ( $^{10}$ ).

Было показано, что в отсутствие АТФ  $\gamma$ -анилид АТФ не катализирует реакцию синтеза  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК, но является эффективным ингибитором этой реакции. Зависимость скорости образования  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК от концентрации АТФ при различных концентрациях  $\gamma$ -анилида АТФ показана в обратных величинах на рис. 1. Видно, что  $\gamma$ -анилид

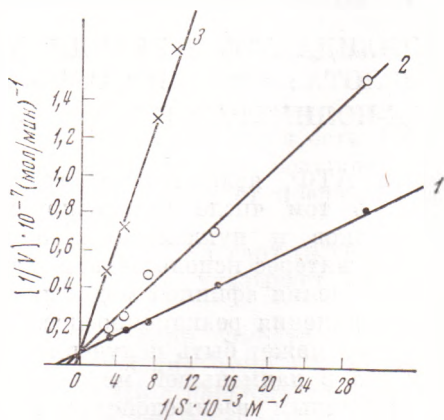


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости образования  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК от концентрации АТФ без  $\gamma$ -анилида АТФ (1), в присутствии  $\gamma$ -анилида АТФ  $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (2),  $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (3)

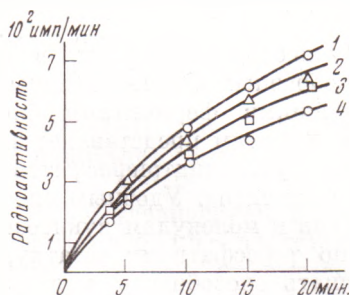


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые образования РНК, катализируемого ДНК-зависимой РНК-полимеразой в присутствии различных концентраций  $\gamma$ -анилида АТФ. 1 — без анилида; 2 —  $0,0004 \text{ M}$ ; 3 —  $0,002 \text{ M}$ ; 4 —  $0,004 \text{ M}$

АТФ является конкурентным ингибитором АТФ в этой реакции. Величина  $K_i$  для  $\gamma$ -анилида АТФ была рассчитана из данных рис. 1, а также из данных по зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора при постоянных концентрациях АТФ ( $^{11}$ ). Оба эти метода дали одинаковый результат. Величина  $K_i$  для  $\gamma$ -анилида АТФ оказалась равной  $1 \cdot 10^{-3}$  моля. Величина константы Михаэлиса  $K_m$  для АТФ в той же реакции оказалась равной  $5 \cdot 10^{-4}$  моля. Считая величину для АТФ близкой константе сродства субстрата к ферменту, можно сделать вывод о незначительном влиянии заместителя по  $\gamma$ -фосфату на взаимодействие аналога с ферментом.

Реакционная смесь для определения ферментативной активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы содержала в объеме 0,5 мл  $0,08 \text{ M}$  трис-НСI pH 7,9,  $0,002 \text{ M}$   $\text{MnCl}_2$ ,  $0,008 \text{ M}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,005 \text{ M}$   $\beta$ -меркаптоэтанол,  $0,0004 \text{ M}$   $^{14}\text{C}$ -АТФ (с удельной активностью  $0,07 \text{ мкС/мкмоль}$ ) по  $0,0004 \text{ M}$  ГТФ, ЦТФ, УТФ, 29 мкг РНК-полимеразы, 50 мкг ДНК из молок сельди и различные концентрации анилида АТФ. За скоростью реакции следили по включению остатков  $^{14}\text{C}$ -АМФ в кислотонерастворимую фракцию РНК.

На рис. 2 представлена зависимость скорости накопления РНК, катализируемого РНК-полимеразой, в присутствии различных концентраций анилида. Видно, что  $\gamma$ -анилид АТФ при соотношении ингибитора к субстрату, изменяющемся в интервале от 1 до 10, ингибирует реакцию, катализируемую РНК-полимеразой. Наблюдаемый эффект ингибирования, по-видимому, не может быть результатом изотопного разбавления АТФ за счет гидролиза анилида, так как даже при pH 7 количество образующейся за 20 мин. АТФ не превышает 0,25% от содержания АТФ при соотношении АТФ:  $\gamma$ -анилид 1:10.

Ингибирующее действие  $\gamma$ -амилида АТФ в реакциях, катализируемых фенилаланин: тРНК-лигазой и РНК-полимеразой свидетельствует о возможности использования аналогов такого типа для изучения структуры активных центров этих ферментов. Подобные аналоги, содержащие алкилирующую группу, могут быть использованы для аффинной модификации соответствующих ферментов.

Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило  
7 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. И. Гринева, Т. С. Ломакина, Г. В. Шишкин, ЖОХ, т. 39, 668 (1969). <sup>2</sup> В. С. Богачев, А. Г. Веняминова и др., Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, № 14, в. 6, 110 (1970). <sup>3</sup> В. Г. Шестаков, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Биохимия, т. 29, 300 (1964). <sup>4</sup> А. М. Микельсон, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, М., 1966. <sup>5</sup> Г. Т. Бабкина, Д. Г. Кнорре, Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, № 14, в. 6, 74 (1973). <sup>6</sup> Л. С. Сандахчиев, В. К. Старостина и др., Мол. биол., т. 1, 463 (1967). <sup>7</sup> C. Babinet, Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 26, 639 (1967). <sup>8</sup> I. I. Furth, I. Hurwitz, M. Anders, J. Biol. Chem., v. 237, 2611 (1962). <sup>9</sup> M. P. Stulberg, J. Biol. Chem., v. 242, 1060 (1967). <sup>10</sup> K. Muench, P. Berg, Procedures in Nucleic Acid Research, N. Y.—London, 1966, p. 375. <sup>11</sup> M. Dixon, Biochem. J., v. 55, 170 (1953).