

И. П. РУДАКОВА, А. М. ЮРКЕВИЧ, В. А. ЯКОВЛЕВ

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА  
5'-ДЕЗОКСИ-(1, N<sup>6</sup>-ЭТЕНО)-АДЕНОЗИЛКОБАЛАМИНА,  
ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО АНАЛОГА КОБАМИДНОГО  
КОФЕРМЕНТА**

(Представлено академиком И. В. Кнулянецем 23 V 1974)

В механизме каталитических функций ферментов существенная роль принадлежит взаимодействию белков-апоферментов с коферментами. В последнее время для изучения взаимодействия апоферментов с коферментами, содержащими в своем составе аденин, успешно используются флуоресцирующие их производные, содержащие этено-группировку (<sup>1</sup>). Синтез этенопроизводных адениловых нуклеотидов оказался возможным благодаря работам Н. К. Кочеткова и сотрудников (<sup>2</sup>), впервые получивших 9-метил-1, N<sup>6</sup>-этенoadенин и 3, N<sup>4</sup>-этенцитозин реакцией хлорацетальдегида с 9-метиладенином и 1-метилцитозином соответственно. На основе этой реакции были синтезированы флуоресцирующие этенопроизводные аденозина, аденозин-5'-мопо-, ди- и трифосфатов, аденозин-3'-монофосфата, аденозин-3', 5'-циклофосфата, никотинамидадениндинуклеотида, флавинадениндинуклеотида (<sup>1, 3-5</sup>). То обстоятельство, что этенопроизводные сохраняют свои коферментные свойства, позволило использовать их для изучения механизма действия соответствующих ферментов (<sup>6</sup>).

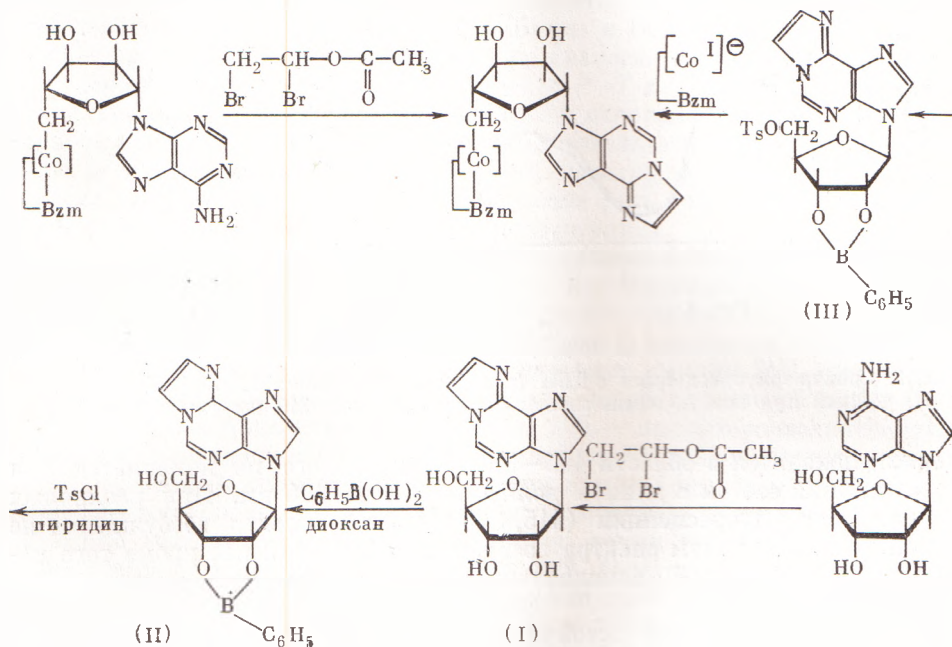
Исследуя механизм действия ферментов, содержащих в качестве кофермента 5'-дезоксаденозилкобаламин (кобамидный кофермент, ДБК), мы встретились с необходимостью синтезировать флуоресцирующее этенопроизводное этого кофермента ( $\epsilon$ -ДБК) и применить его для изучения взаимодействия с апоферментом глицеролдегидратазы (пропантриол-гидролазы).

Эта цель не могла быть достигнута при использовании указанного выше и примененного для синтеза других производных аденозина метода, поскольку хлорацетальдегид расщепляет кобамидный кофермент, как это косвенно следовало из биохимических экспериментов, проведенных с участием хлорацетальдегида, не затрагивая, однако, ядра аденина (<sup>6</sup>).

В связи с этим мы осуществили синтез  $\epsilon$ -ДБК новым методом — реакцией ДБК с  $\alpha, \beta$ -дибромэтилацетатом. Водный раствор ДБК (рН 4,0–4,5) перемешивали с 3-молярным избытком  $\alpha, \beta$ -дибромэтилацетата в течение 7 дней при комнатной температуре в защищенной от света колбе. Реакцию контролировали методом тонкослойной хроматографии на силуфоле в системе ацетон — вода (1 : 1), в которой подвижность  $\epsilon$ -ДБК относительно ДБК ( $R_f$  ДБК) равна 0,7. Выделение  $\epsilon$ -ДБК осуществляли методом колоночной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе в Н<sup>+</sup>-форме,  $\epsilon$ -ДБК элюировали водой, в то время как ДБК оставался на колонке и элюировался 2% раствором уксусной кислоты. Полученный таким образом водный раствор  $\epsilon$ -ДБК, свободный от других примесей — корринов, лиофилизировали. При электрофорезе в нейтральной системе (0,03 M CH<sub>3</sub>COONa, рН 6,7), как и ДБК,  $\epsilon$ -ДБК незаряжен, но в кислой системе (1N CH<sub>3</sub>COOH, рН 2,7) флуоресцирующий аналог имеет электрофоретическую подвижность относительно подвижности кофермента ( $E_{\text{ДБК}}$ ) равную 1,1.

Полученный  $\epsilon$ -ДБК — светочувствительен и при фотолизе в аэробных условиях дает окси-(аква)-кобаламин и два флуоресцирующих в у.-ф. свете этеноаденозильных производных, которые отличаются по подвижности на бумаге FN-II в системе *iso*-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH—NH<sub>4</sub>OH—H<sub>2</sub>O (85 : 1,3 : 15) от аденозина и заведомого образца 1,N<sup>6</sup>-этенoadенозина. По аналогии с фотолизом ДБК (7), мы предполагаем, что эти два соединения, по-видимому, имеют строение 1,N<sup>6</sup>-этенoadенозин-5'-альдегида и 8,5'-цикло-1,N<sup>6</sup>-этенoadенозина. Образование оксикобаламина доказано его идентичностью с заведомым образцом по хроматографической подвижности на бумаге в различных системах растворителей, электрофорезом на бумаге и спектром поглощения в у.-ф. и видимой области.

Структура  $\epsilon$ -ДБК была нами доказана встречным синтезом, осуществленным по схеме:



1,N<sup>6</sup>-Этенoadенозин (I) получали также действием 3 мол.  $\alpha,\beta$ -дибромэтилацетата на 1 моль аденозина в воде при pH 4,0–5,5 (перемешиванием при комнатной температуре в течение 30 час.). Полученное вещество I флуоресцирует в у.-ф. свете, его хроматографическая подвижность на силуфоле в системе *n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH—CH<sub>3</sub>COOH—H<sub>2</sub>O (5 : 3 : 2) совпадает с литературными данными для 1,N<sup>6</sup>-этенoadенозина (8), у.-ф. спектр и спектр флуоресценции соединения I аналогичны описанным в литературе (3).

Синтез 2',3' фенилборного эфира 1,N<sup>6</sup>-этенoadенозина (II) осуществляли методом, разработанным ранее (9), — кипячением эквимольных количеств фенилборной кислоты и нуклеозида (I) в безводном диоксане. Полученный фенилборонат (II) без дополнительной очистки обрабатывали *n*-толуолсульфохлоридом в безводном пиридине (9).

Тозилат (III) по хроматографической подвижности на силуфоле в системе *n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH—CH<sub>3</sub>COOH—H<sub>2</sub>O (5 : 3 : 2) отличался от исходного фенилбороната (II). Его использовали как алкилирующий агент в реакции с Co(I) — кобаламином. Реакцию проводили в атмосфере аргона, в защищенном от света приборе (10). По всем свойствам (хроматографические подвижности на бумаге и силуфоле, электрофоретические свойства в различных системах растворителей, спектральные характеристики) полученный по этой схеме аналог ДБК идентичен образцу  $\epsilon$ -ДБК, который полу-

чали непосредственно из кобамидного кофермента. Спектр поглощения в видимой области водного раствора  $\epsilon$ -ДБК (см. рис. 1) аналогичен спектру ДБК ( $\lambda_{\text{max}}$  332, 375 и 522 нм). Эти полосы поглощения характерны для кобаламинов, содержащих Co—C-связь, однако в у.-ф. части спектра имеются существенные отличия от спектра кофермента, что может быть обусловлено модификацией аденинового кольца нуклеозидного лиганда.

На рис. 2 представлен спектр флуоресценции  $\epsilon$ -ДБК, полученный при возбуждении светом с длиной волны 310 нм. Максимум спектра флуорес-

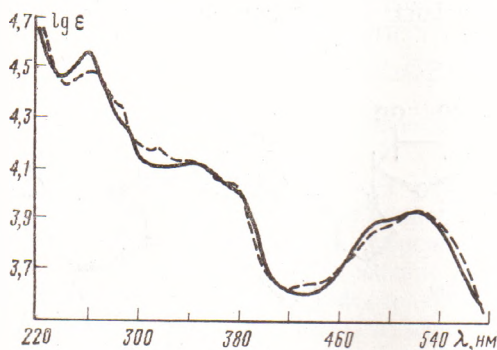


Рис. 1

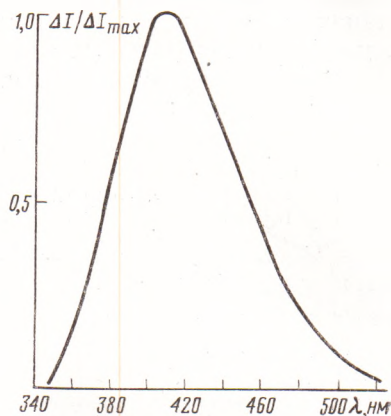


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения (в воде) ДБК (сплошная кривая) и  $\epsilon$ -ДБК (штриховая)

Рис. 2. Спектр флуоресценции  $\epsilon$ -ДБК (в воде; концентрация  $1,5 \cdot 10^{-5} M$ ;  $20^\circ$ ), полученный при возбуждении светом с длиной волны 310 нм (щель 3 нм)

ценции находится в области 405—409 нм. Форма его не изменяется при возбуждении светом с длиной волны от 275 до 320 нм. При различных длинах волн флуоресценции (415, 370 и 460 нм) спектр возбуждения не изменяется. Максимум спектра возбуждения 310—312 нм, кроме того наблюдается небольшой дополнительный максимум при длине волны 275—277 нм.

Оценка кинетической устойчивости Co—C-связи полученного  $\epsilon$ -ДБК в реакции цианирования (<sup>11</sup>) показала, что по реакционной способности Co—C-связь в флуоресцирующем аналоге существенно не отличается от ДБК (для ДБК  $k_2=8,4 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>; для  $\epsilon$ -ДБК  $k_2=10,1 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>). Этено-аналог ДБК обладает заметной коферментной активностью в глицеродегидратазной реакции.

Всесоюзный научно-исследовательский  
витаминовый институт  
Москва

Поступило  
16 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. A. Secrist III, J. R. Barrio et al., *Biochemistry*, v. II, 3499 (1972). <sup>2</sup> N. K. Kochetkov, V. W. Shibaev, A. A. Kost, *Tetrahedron Letters*, 1971, 1993. <sup>3</sup> J. R. Barrio, J. A. Secrist III, N. J. Leonard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 46, 597 (1972). <sup>4</sup> J. R. Barrio, G. L. Tolman et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 70, 941 (1973). <sup>5</sup> Chi-Yu Lee, J. Everse, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 157, 83 (1973). <sup>6</sup> T. H. Finlay, J. Valinsky et al., *J. Biol. Chem.*, v. 247, 4197 (1972). <sup>7</sup> H. P. C. Hogenkamp, J. N. Ladd, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.*, v. 237, 1950 (1962). <sup>8</sup> G. R. Penzer, *Europ. J. Biochem.*, v. 34, 297 (1973). <sup>9</sup> И. И. Колодкина, И. П. Рудакова, А. М. Юркевич, Авт. свид. № 189868; *Бюлл. изобр.* № 1 (1967). <sup>10</sup> А. М. Юркевич, И. П. Рудакова, Т. А. Поспелова, *ЖОХ*, т. 39, 425 (1969). <sup>11</sup> И. П. Рудакова, В. И. Бородулина-Швец и др., *ЖОХ*, т. 43, 2538 (1973).