



УДК 615.857.064.16

НОВАЯ НЕФЕРМЕНТАТИВНАЯ РЕАКЦИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ
Co—C-СВЯЗИ КОБАМИДНОГО КОФЕРМЕНТА,
ПРИВОДЯЩАЯ К 5'-ДЕЗОКСИАДЕНОЗИНУ

Рудакова И. П., Чаусер Е. Г., Юркевич А. М.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

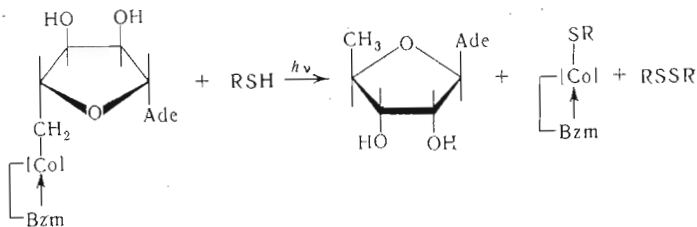
Анаэробный фотолиз кобамидного кофермента (AdoCbl) в присутствии амида дигидролипоевой кислоты (и других SH-соединений) приводит к образованию 5'-дезоксиаденозина. Строение выделенного нуклеозида доказано на основании хроматографической подвижности, УФ- и масс-спектрографии, а также встречными синтезами. Образование 5'-дезоксиаденозина в неферментативной реакции гомолитического расщепления AdoCbl в присутствии SH-соединений, по-видимому, можно рассматривать как одну из стадий, моделирующих механизм превращения AdoCbl в ферментативных реакциях.

В настоящее время предполагают, что 5'-дезоксиаденозин является промежуточным соединением в кобамид-зависимых ферментативных реакциях [1, 2], и недавно доказано, что его образование обратимо в этаноламин-аммиаклиазной реакции [3].

До сих пор не было известно ни одной химической реакции распада α -(5,6-диметилбензимидазол)-Co-5'-дезоксиаденозилкобамида (кобамидного кофермента, AdoCbl*), приводящей к образованию 5'-дезоксиаденозина. Так, если восстановительное расщепление Co—C-связи в метилкобаламине в присутствии платины приводит к образованию витамина B₁₂ и выделению метана, то AdoCbl не может быть восстановлен аналогичным путем, по-видимому, из-за стерической недоступности атома кобальта из-за большого объема 5'-дезоксиаденозильного лиганда [4]. Фотолиз AdoCbl в отсутствие кислорода приводит к образованию Co(II)-кобаламина [5] с количественным выходом, а основным выделенным нуклеозидным компонентом является 8,5'-циклоаденозин [6]. Анаэробный фотолиз AdoCbl в присутствии гомоцистеина дает смесь 8,5'-циклоаденозина и S-аденозилгомоцистеина [7, 8]. Влияние других соединений на скорость расщепления и строение продуктов фотолиза AdoCbl ранее не было изучено.

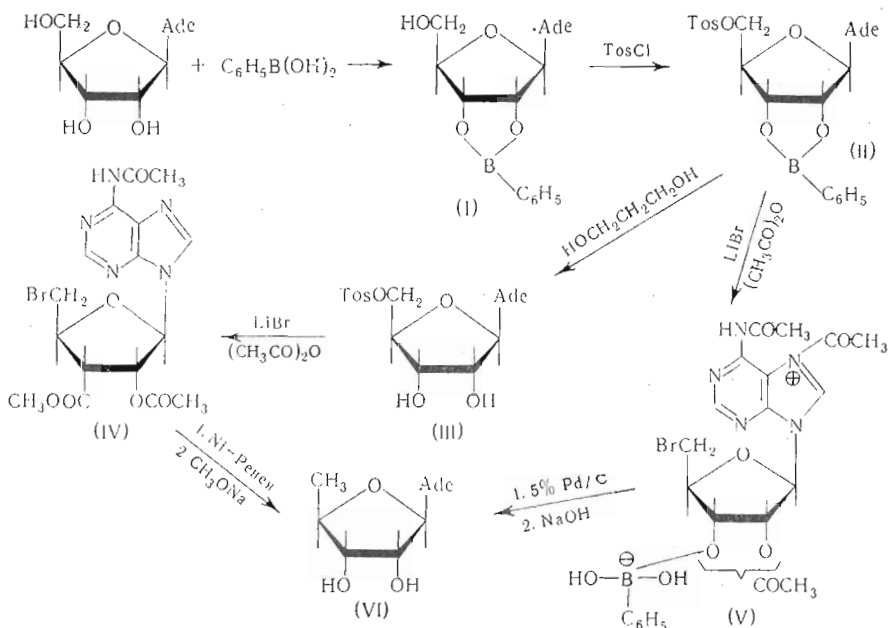
Мы изучили фотолиз кобамидного кофермента (AdoCbl) в атмосфере аргона в присутствии амида дигидролипоевой кислоты, взятых в молярных соотношениях 1 : 20.

* Сокращения в соответствии с рекомендациями 1973 года IUPAC — IUB комиссии по биохимической номенклатуре (Biochemistry, 13, 1555—1560 [1974]).



Bzm — α -(5,6-диметилбензимидазолил)-рибозилфосфат, [] — корриновое кольцо кобаламина (витамина B₁₂).

Из реакционного раствора после облучения было выделено нуклеозидное производное, поглощающее в УФ-свете и по хроматографической подвижности на бумаге отличающееся от заведомого образца 8,5'-циклоаденозина, полученного при анаэробном фотолизе AdoCbl в водном растворе. УФ-спектр выделенного нуклеозида в воде имел максимум поглощения в 0,1 н. NaOH — 259 нм и в 0,1 н. HCl — 256 нм. Кроме того, этот нуклеозид содержал *цис*-гликольную группировку. При БХ в системе А полученный нуклеозид имел большую подвижность, чем аденозин, и значение R_{Ado} 1,44 соответствовало по данным работы [9] подвижности 5'-дезоксаденозина. Масс-спектр выделенного нуклеозида также подтверждал его строение как 5'-дезоксаденозина [10]: в спектре имеется молекулярный ион с m/e 251 и ионы с m/e 178, 164, 148, 135 и 136 и отсутствует ион с m/e 221 ($M - 30$). Окончательно структура выделенного нуклеозида была доказана встречными синтезами, осуществленными по следующей схеме:



В литературе описаны синтезы 5'-дезоксаденозина различными методами: гликозидным синтезом из соответствующего дезоксисахара [11], десульфированием 8,5'-ангидро-8-меркаптоаденозина над никелем Реней [12], дегалоидированием 6-ацетида-9-(2',3'-0-изопропилиден)-5'-иод-5'-дезоксид- β -D-эритропентафуранозилпурина над 5% Pd/C [13]. Основываясь на наших работах [14], мы осуществили модификацию последнего метода и провели синтез 5'-дезоксаденозина из 5'-дезоксид-5'-бром-

производных аденозина (IV) и (V), полученных из 2',3'-фенилборного эфира 5'-0-тозиладенозина (II) [15]. После снятия фенилборной защиты 1,3-пропандиолом полученный 5'-0-тозиладенозин (III) [15] обрабатывали бромистым литием в уксусном ангидриде. Нагревание тозилата (III) с бромистым литием в уксусном ангидриде привело к образованию N⁶-ацетил-2',3'-ди-0-ацетил-5'-дезоксиденозина (IV). Строение полученного бромида (IV) подтверждено данными масс- и ПМР-спектров. В масс-спектре бромида (IV) имеется молекулярный ион с *m/e* 457, отвечающий структуре нуклеозида (IV), а в ПМР-спектре — синглетные сигналы протонов СН₃ ацетильных групп с химическими сдвигами 2,05; 2,3 и 2,57 м. д. и дуплетный сигнал протонов — СН₂Br-группы в области 3,75 м. д. Синтез 5'-дезоксиденозина был осуществлен также и более коротким путем в две стадии: из производного (II) через бромид (V). Ранее [14] было показано, что реакция 2',3'-фенилборного эфира 5'-0-тозиладенозина (II) с бромистым литием в уксусном ангидриде приводит к образованию 2'(3')-фенилборната N⁶-ацетил-3'(2')-0-ацетил-5'-бром-5'-дезоксиденозина. Мы нашли, что результаты этой реакции существенно зависят от наличия следов уксусной кислоты в уксусном ангидриде. Аналогичная реакция в среде свежеперегнанного уксусного ангидрида привела к получению замещенного нуклеозида (V), имеющего в УФ-спектре два максимума поглощения в области 270 и 308 нм. На основании изучения масс-, ПМР-, ИК- и УФ-спектров для соединения (V) была предложена структура 2'(3')-фенилборната-N⁶,N⁷-диацетил-3'(2')-0-ацетил-5'-бром-5'-дезоксиденозина. При действии бромистого лития в среде уксусного ангидрида не наблюдалось снятия фенилборной защиты, а происходило, по-видимому, лишь расщепление одной В—О-связи. В литературе отмечено образование диацетиладенина при ацелировании аденина в аналогичных условиях и сделано предположение, что более лабильная ацетильная группа находится, вероятно, при N⁷-атоме аденина [16]. В УФ-спектрах соединения (V), снятых в кислой и щелочной среде (см. «Экспериментальную часть») длинноволновый максимум поглощения исчезал, что, по-видимому, было связано с гидролизом лабильной ацетильной группы при N⁷. Лабильность фенилборной защиты в условиях термоллиза и электронного удара у бромида (V) не позволила получить в масс-спектре молекулярный ион, соответствующий структуре (V), и молекулярный ион с *m/e* 457 отвечал структуре с отщепленной фенилборной группировкой. Соединение, полученное из бромида (V) действием 1,3-пропандиола, приводящего в мягких условиях к снятию фенилборной защиты, также имело молекулярный ион с *m/e* 457, который соответствовал структуре с дополнительной ацетильной группой. Наличие фенилборной защиты в соединении (V), кроме того, было доказано качественной реакцией с дифенилкарбазоном [17] и данными ИК-спектра: имелись полосы валентных колебаний В—О—(1340 см⁻¹), В—С₆H₅ (1440 и 1100 см⁻¹), —ОСОСН₃ (1745 см⁻¹) группировок. Изучение ПМР-спектров нуклеозида (V) в дейтеропиридине и дейтерохлороформе показало, что положения Н-(2) и Н-(8) аденина не замещены, о чем свидетельствует наличие сигналов в области химических сдвигов 8,63 и 8,87 м. д. (С₂H); 8,18 и 8,80 м. д. (С₈H). В спектре имелись также синглетные сигналы метильных протонов ацетильных групп: 2,10 и 2,02 м. д.; 2,25 и 2,06 м. д.; 2,70 и 2,60 м. д. Дуплет в области 4,0 и 3,6 м. д. соответствовал двум протонам СН₂Br-группы, а мультиплет в области 7,4—8,2 м. д. — фенильным протонам. Таким образом, на основании анализа имеющихся данных мы предполагаем, что дополнительная ацетильная группа вступает в 7-положение аденина.

Дегалоидирование бромидов (IV) и (V) проводили действием никеля Ренея или 5% Pd/C в этиловом спирте. Снятие О- и N-ацильных защит с нуклеозидов, полученных после дегалоидирования, осуществляли обработкой метанольным раствором метилата натрия или едкого натрия при охлаждении. Полученный встречным синтезом 5'-дезоксиденозин по

хроматографической подвижности в различных системах растворителей, УФ-спектру, масс-спектру был аналогичен образцу нуклеозида, выделенному из реакционной смеси после фотолиза AdoCbl в присутствии амида дигидролипоевой кислоты.

Напротив, взаимодействие AdoCbl с амидом дигидролипоевой кислоты, взятых в молярных соотношениях 1 : 100, в отсутствие света в атмосфере аргона при pH 7—8 не привело к образованию 5'-дезоксаденозина. Найдено, что в этих условиях не наблюдалось заметных спектральных изменений и спектр поглощения реакционного раствора в УФ- и видимой области через 2 сут. был аналогичен спектру AdoCbl. При взаимодействии AdoCbl с амидом дигидролипоевой кислоты, взятых в молярных соотношениях 1 : 100, в тех же условиях наблюдался гипсохромный сдвиг максимума в области 520 нм ($520 \rightarrow 478$ нм), что, по-видимому, связано с частичной декоординацией 5,6-диметилбензимидазольного «нижнего» лиганда. Подобный эффект наблюдали Лоу и Вуд [18] при координации восстановленного глутатиона с AdoCbl, однако при этом молярная концентрация глутатиона в 6000 раз превышала концентрацию AdoCbl. Нам не удалось достичь таких больших концентраций амида дигидролипоевой кислоты ввиду его малой растворимости. Следует отметить, что, по данным работы [18], Co—C-связь в комплексе AdoCbl с восстановленным глутатионом лабилизирована к действию света, при анаэробном фотолизе относительная скорость фотолиза комплекса была в 4,6 раза больше, чем AdoCbl (к сожалению, авторы не сообщают, наблюдали ли они образование 5'-дезоксаденозина в этом случае). Образование 5'-дезоксаденозина мы наблюдали также в реакциях фотолиза AdoCbl с цистеином, восстановленным глутатионом и боргидридом натрия в анаэробных условиях при тех же молярных соотношениях, как и в случае амида дигидролипоевой кислоты. В случаях фотолиза AdoCbl в присутствии цистеина и восстановленного глутатиона мы фиксировали одновременное образование в этих условиях цистина и окисленного глутатиона (хроматография и электрофорез на бумаге с заведомыми образцами).

Таким образом, из полученных нами экспериментальных данных следует, что при гомолитическом расщеплении Co—C-связи в AdoCbl в присутствии восстановителя (SH-соединения) наблюдалось образование 5'-дезоксаденозина.

Механизм действия большинства V_{12} -зависимых ферментов, включая диолдегидратазу, этаноламиндезаминазу, глутаматмутазу и т. д., как было показано ранее [19], включает перенос водорода от субстрата к $C_{(5')}$ -атому кофермента. Было найдено [20], что мигрирующий водород становится одним из трех эквивалентных водородов в процессе изомеризации субстрата. Данные ЭПР [20] предполагают гомолитическое расщепление Co—C-связи кобамидного кофермента (в ходе катализа) с образованием Co(II)-кобаламина (витамина V_{12r}) и 5'-дезоксаденозина. Недавно было показано, что образование 5'-дезоксаденозина в этаноламинаммиаклазной реакции не связано с инактивацией фермента и является обратимым [3].

Выделение 5'-дезоксаденозина из продуктов неферментативной реакции гомолитического расщепления AdoCbl в присутствии SH-соединений, по-видимому, можно рассматривать как одну из стадий, моделирующих механизм превращения AdoCbl в ферментативных реакциях.

Экспериментальная часть

Спектры поглощения в УФ- и видимой области записывали на регистрирующем спектрофотометре «Unicam SP-800» (Англия). ИК-спектры снимали на приборе UR-10 в таблетке с KBr, ПМР-спектры — на приборе «Hitachi» R-20A (Япония) при 60 мГц в дейтеропиридине и дейтерохлороформе с внутренним стандартом — гексаметилдисулоксаном. Масс-спек-

тры получены на приборе «JMS-01-S6-2» (Япония), температура ионизационной камеры 130°, ионизирующее напряжение 75 эВ. Хроматографию проводили на бумаге FN-11 восходящим методом в системах: А — изо-пропиловый спирт — 25%-ный водный аммиак — вода (85 : 1,3 : 15), Б — *n*-бутиловый спирт — вода — 25%-ный водный аммиак (40 : 50 : 5), В — *n*-бутиловый спирт — вода (86 : 14); ТСХ — на силуфоле марки «UV₂₅₄» (Чехословакия) в системах: Г — этиловый спирт — вода (4 : 1), Д — ацетон — вода (2 : 1). Электрофорез на бумаге проводили в приборе «УЭФ-1» в триэтиламмонийбикарбонатном буфере (рН 7,5) при градиенте потенциала 15,2 В/см.

Фотолиз растворов *AdoCbl* осуществляли светом вольфрамовой лампы (200 Вт) на расстоянии 20 см до изменения окраски растворов из оранжевой в краснокоричневую (~30 мин) в атмосфере аргона.

Фотолиз AdoCdl в присутствии амида дигидролипоевой кислоты *. Растворяли *AdoCbl* (0,08 г) в 10 мл 0,05 М калийфосфатного буфера (рН 7,4) и пропускали ток аргона в течение 30 мин, затем прибавляли в токе аргона раствор амида дигидролипоевой кислоты (0,24 г в 25 мл 0,05 М калийфосфатного буфера с добавкой этилового спирта), предварительно продутый аргоном. После этого реакционный раствор облучали светом вольфрамовой лампы. Раствор наносили на колонку (20 × 3,5 см) с СМ-целлюлозой (H⁺), элюировали сначала водой, (15 мл — фракция I), затем 0,2%-ной уксусной кислотой (15 мл — фракция II; 15 мл — фракция III). Во фракциях (II) и (III) идентифицировали 5'-дезоксаденозин. УФ-спектр (вода), λ_{макс} 259 нм, λ_{мин} 230 нм; R_{Ado} 1,42 (А), 1,55 (Б), 0,96 (Д).

2' 3'-Ди-0-ацетил-6-экзо-N-ацетил-5'-дезоксид-5'-бромаденозин (IV). Смесь 0,84 г 5'-0-тозиладенозина (III) и 0,62 г безводного LiBr в 50 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида нагревали 1 ч при 110°. К охлажденному светло-желтому раствору добавляли 50 мл хлороформа и полученный раствор промывали насыщенным раствором сульфита натрия, водой и сушили над безводным сульфатом магния. Раствор отфильтровывали, упаривали в вакууме досуха, маслообразный остаток растворяли в 3 мл бензола и выливали при перемешивании в *n*-гексан. Выход 0,63 г (69%); R_{Ado} 2,45 (А); УФ-спектр (этанол), λ_{макс} 270 нм, λ_{мин} 233 нм. Найдено, %: Br 17,58; 17,67. C₁₆H₁₈O₆N₅Br. Вычислено, %: Br 17,50.

2',(3')-Фенилборонат-(3'),2'-0-ацетил-N⁶,N⁷-диацетил-5'-дезоксид-5'-бромаденозин (V). Растворяли 1 г 2',3'-фенилборного эфира 5'-0-тозиладенозина (II) в 40 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида, добавляли 0,74 г безводного бромистого лития и нагревали 1 ч при 110°. Охлажденный раствор смешивали с 40 мл хлороформа и промывали один раз насыщенным раствором сульфита натрия и затем 2 раза дистиллированной водой. Выделяли аналогично бромиду (V). Выход 0,6 г (58%). R_{Ado} 2,70 (Б); 3,84 (В); 1,13 (Г); 1,20 (Д), УФ-спектр (растворитель) λ_{макс}, нм: (этанол) 271, 308; (CHCl₃) 271, 308; (0,05 н. HCl) 277; (0,1 н. КОН) 291. Найдено, %: C 45,63; H 4,55; Br 13,30; N 12,93. C₂₂H₂₄O₈BrN₅. Вычислено, %: C 45,76; H 4,19; Br 13,84; N 12,14.

5'-Дезоксиаденозин (VI). Растворяли 0,43 г бромид (IV) в 50 мл этилового спирта и вносили 0,5 г свежеприготовленного никеля Ренея. Кипятили реакционный раствор 6 ч, горячий раствор отфильтровывали от катализатора, промывали катализатор на фильтре горячим этиловым спиртом и объединенный маточный раствор упаривали в вакууме досуха. Из остатка, представляющего собой стекловидную массу светло-желтого цвета, осаждением из хлороформенного раствора *n*-гексаном выделяли 0,17 г (50%) 2',3'-ди-0-ацетил-6-экзо-N-ацетил-5'-дезоксаденозина, который затем без дополнительной очистки растворяли в 20 мл метилового спирта

* Амид дигидролипоевой кислоты синтезирован Л. Г. Чеботаревой (Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт) и любезно предоставлен нам, за что авторы выражают благодарность.

и добавляли 1 мл свежеприготовленного метанольного раствора метилата натрия, полученного из 0,1 г металлического натрия и 5 мл метилового спирта, и реакционный раствор оставляли в холодильнике на ночь. Затем раствор упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 30 мл 50%-ного этилового спирта и нейтрализовали перемешиванием с амберлитом IRC-50 (H⁺). Отфильтровывали смолу, маточный раствор упаривали в вакууме досуха и остаток перекристаллизовывали из этилового спирта. Получено 0,05 г. Проба на *цис*-гликольную группировку (с бензидином) положительная. УФ-спектр (вода) $\lambda_{\text{макс}}$ 259 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 228 нм; $R_{\text{Адо}}$ 1,40 (А), 1,56 (Б), 1,76 (В), 0,94 (Г), 1,02 (Д). К раствору 0,6 г бромида (V) в 50 мл этилового спирта, содержащего 5 мл 1 н. едкого натрия, добавляли 0,5 г 5% Pd/C и смесь восстанавливали водородом при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 сут. Затем катализатор отфильтровывали через слой целита 545 и фильтрат упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 10 мл смеси метилового спирта и воды (7 : 3) и наносили на колонку (1,5 × 23 см) с дауэксом 1 × 2 (200/400 меш) в (ОН⁻) в том же растворителе. Элюировали той же смесью, собирая фракции по 50 мл. Основное вещество (VI) элюировали в II и III фракциях, оно имело четкий максимум поглощения в области 259 нм. Элюаты упаривали в вакууме, в остатке — белое кристаллическое вещество, которое перекристаллизовывали из этилового спирта. Проба на *цис*-гликольную группировку (с бензидином) положительная; $R_{\text{Адо}}$ 1,41 (А), 1,57 (Б), 1,76 (В), 0,95 (Г), 1,02 (Д).

ЛИТЕРАТУРА

1. Babior B. M. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6125—6133.
2. Eagar R. G., Baltimore B. G., Herbst M. M., Barker H. A., Richards J. H. (1972) *Biochemistry*, **11**, 253—264.
3. Babior B. M., Carthy T. J., Abeles R. H. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1689—1695.
4. Dolphin D., Johnson A. W., Rodrigo R., Shaw N. (1963) *Pure and Appl. Chem.*, **7**, 539—549.
5. Bernhauer K., Müller O. (1961) *Biochem. Z.*, **334**, 199—202.
6. Hogenkamp H. P. C. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 477—480.
7. Johnson A. W., Shaw N., Wagner F. (1963) *Biochem. et biophys. acta*, **72**, 107—110.
8. Юркевич А. М., Амагава А. А., Рудакова И. П. (1968) *Ж. общ. химии*, **38**, 1650.
9. Yamada R., Tamao Y., Blakley R. L. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3959—3968.
10. Shaw S. J., Desiderio D. M., Tsuboyama K., McCloskey J. A. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 2510—2522.
11. Bissman H. M., Baker B. R. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5534—5540.
12. Kobayashi M., Kaneko M., Sagai M. (1970) *Tetrahedron* **26**, 5757—5763.
13. McCarthy J. R., Robins R. K., Robins M. J. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4993—4999.
14. Амагава А. А., Юркевич А. М., Рудакова И. П., Христенко Л. В., Кустанович Н. М., Преображенский Н. А. (1968) *Химия природн. соедин.*, 304—307.
15. Юркевич А. М., Рудакова И. П., Преображенский Н. А. (1967) *Химия природн. соедин.*, 48—51.
16. Reddy C. S., Mandell L., Goldstein J. H. (1963) *J. Chem. Soc.*, 1414—1421.
17. Welcher F. J. (1947) *Organ. Anal. Reagents*, **3**, 456—461.
18. Law P. Y., Wood J. M. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 914—919.
19. Barker H. A. (1972) *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 55—90.
20. Babior B. M., Mess. Th. H., Gould D. C. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4389—4392.

Поступила в редакцию
18. IX. 1974

A NOVEL NON-ENZYMATIC REACTION OF SPLITTING Co-C BOND IN COBAMIDE COENZYME RESULTING IN 5'-DEOXYADENOSINE FORMATION

RUDAKOVA I. P., CHAUSER E. G., YURKEVICH A. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

In the presence of reducing agents (SH-compound), the homolytic splitting of the Co-C bond in cobamide coenzyme was found to produce 5'-deoxyadenosine. The conversion of the adenosyl moiety into 5'-deoxyadenosine might represent a model reaction for one of the stages in enzymic transformation of DBCC.