



УДК 615.857.064.16

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ (9-АДЕНИЛИЛ)АЛКИЛКОБАЛАМИНОВ
КАК АНАЛОГОВ КОБАМИДНОГО КОФЕРМЕНТА*Поспелова Т. А., Рудакова И. П., Юркевич А. М.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

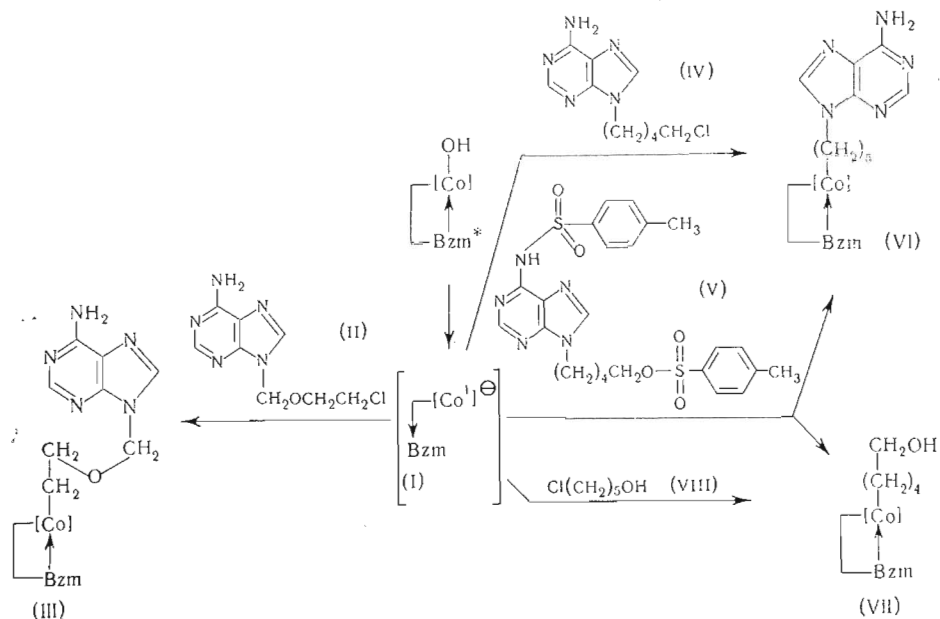
Синтезированы и изучены свойства β -[(9-аденилил)метокси]этил-кобаламина и ω -(9-аденилил)пентилкобаламина — аналогов кобамидного кофермента. Выявленная различная кинетическая устойчивость их Со—С-связи в реакции цианидного расщепления свидетельствует о важной роли кислорода рибозного кольца 5'-дезоксн-5'-аденозильного лиганда в передаче влияния замещения в аденине на реакционную способность Со—С-связи.

Кобамидный кофермент — α -(5,6-диметилбензимидазолнл)-Со-5'-дезоксн-5'-аденозилькобамид (ДБК) — участвует во многих ферментативных реакциях [1—4], однако механизм его действия еще не ясен. В связи с этим нам представлялось интересным осуществить синтез и изучить свойства аналогов кобамидного кофермента, в которых 5'-дезоксн-5'-аденозильный лиганд заменен алкиладениновым и β -этилоксиметиленадениновым остатками. При изучении этих соединений мы попытались выяснить возможный механизм влияния удаленного от атома кобальта и несопряженного с ним агликона на реакционную способность Со—С-связи, которая была выявлена нами при исследовании реакции цианирования аналогов ДБК, модифицированных в агликоне нуклеозидного лиганда, и при изучении их коферментных свойств в глицеролдегидратазной реакции [5, 6].

В β -[(9-аденилил)метокси]этилкобаламине и ω -(9-аденилил)пентилкобаламине группировки, связывающие адениновый остаток с атомом кобальта, являются фрагментами структуры сахара в 5'-дезоксн-5'-аденозильном лиганде. По данным рентгеноструктурного анализа [7], плоскость аденина нуклеозидного остатка кобамидного кофермента расположена над кольцом С корринового макроцикла и почти параллельна ему. Алкиладениновый и β -этилоксиметиленадениновый фрагменты, как это следует из рассмотрения моделей Драйдинга, позволяют адениновому гетероциклу геометрически занимать такое же положение, как в кобамидном коферменте, и не исключают возможности его взаимодействия с корриновым макроциклом.

В настоящей работе описан синтез и изучены свойства алкиладенинового и β -этилоксиметиленаденинового аналогов ДБК. (Синтез и свойства веществ, используемых в настоящем сообщении в качестве алкилирующих агентов, см. в этом же номере журнала стр. 787—792.) β -[(9-Аденилил)-метокси]этилкобаламин (III) получен реакцией (см. схему) Со(I)-кобал-

амин (I) с 9-(1'-метиленокси-2'-хлорэтил)аденином (II)



Синтез второго аналога — ω -(9-аденилил)пентилкобаламина (VI) — осуществлен с использованием в качестве алкилирующих агентов 9-(ω -хлорпентил)аденина (IV) и 6-*экзо*-N-тозил-9-(ω -O-тозилпентил)аденина (V). В последнем случае, помимо органокобаламина (VI), в качестве основного продукта было выделено соединение (VII), не содержащее аденинового фрагмента и по своим свойствам напоминающее алкилкобаламины. Отсутствие аденинового фрагмента было доказано сравнением продуктов, образовавшихся при фотолизе кобаламинов (VII) и (VI) в аэробных условиях. Реакционная смесь после фотолиза соединения (VII) не содержала (данные хроматографии и электрофореза) пуринового производного, образующегося при фотолизе соединения (VI). Учитывая неустойчивость 6-*экзо*-N-тозил-9-(ω -O-тозилпентил)аденина (V) в щелочных условиях, мы предположили, что соединение (VII) является ω -оксипентилкобаламином. Структура соединения (VII) была доказана встречным синтезом ω -оксипентилкобаламина с использованием в качестве алкилирующего агента 5-хлорпентанола-1 (VIII).

Синтезированные аналоги ДБК индивидуальны при хроматографии в различных системах растворителей и электрофорезе при нейтральном и кислом значениях pH. Соединения (VI) и (III), неподвижные при электрофорезе в нейтральной системе растворителей, приобретали два положительных заряда в кислой среде, что подтверждало наличие в молекулах, помимо способного к протонизации нижнего бензимидазольного лиганда, также и аденинового фрагмента. Соединение (VII), образующееся как побочный продукт при синтезе ω -9-(аденилил)пентилкобаламина (VI) при электрофорезе в различных системах растворителей, проявляло свойства алкилкобаламинов, а при БХ имело подвижность меньшую, чем алкилкобаламины, вероятно, в результате наличия в нем гидроксильной группы.

Спектр поглощения соединения (III) в УФ и видимой области подобен спектру кобамидного кофермента (рис. 1, б). Напротив, в спектре аналога (VI) (рис. 2, б) в видимой области наблюдали только один максимум при

* Bzm — 5,6-диметилбензимидазолилрибонуклеотид.

510 нм. В отличие от органокобаламина (III), спектр поглощения аналога (VI) напоминает спектр алкилкобаламинов и отличается от последних только интенсивным максимумом в области 263 нм, обусловленным, вероятно, вкладом аденинового хромофора. Такой же вывод можно сделать и из рассмотрения спектров поглощения этих аналогов, снятых в растворах кислот (рН 1) (рис. 3).

Спектр КД соединения (III) (рис. 1, а) в видимой области аналогичен спектру ДБК, однако в УФ-области он характеризуется появлением по-

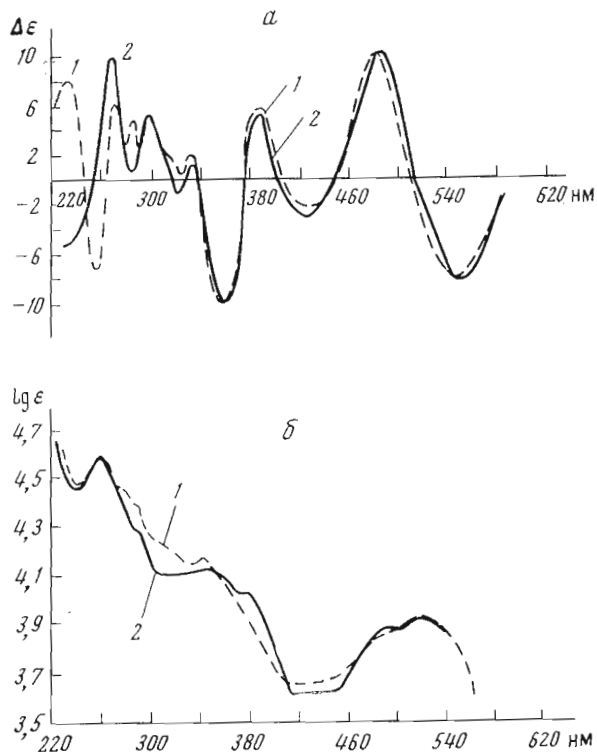


Рис. 1. Спектры КД (а) и поглощения (б) в воде 5'-дезокси-5'-аденозилкобаламина (1) и β -[(9-аденилил)метокси]этилкобаламина (2)

вого положительного максимума в области 285 нм с $\Delta\epsilon + 4,74$ и отрицательного максимума в области 254 нм с $\Delta\epsilon - 7,33$, а также уменьшением интенсивности максимума в области 270 нм ($\Delta\epsilon + 6,04$).

В спектре КД соединения (VI) (рис. 2, а) наблюдается bathochromное смещение двух максимумов, по сравнению со спектром ДБК, в области 498 нм ($\Delta\epsilon + 10,61$) и 435 нм ($\Delta\epsilon - 6,79$). В УФ-области спектра, наряду со смещением максимума в области 273 нм, уменьшается также его интенсивность ($\Delta\epsilon + 6,96$) и появляется новый отрицательный максимум в области 255 нм ($\Delta\epsilon - 6,62$), как и в случае соединения (III). Поскольку спектры КД наиболее чувствительны к конформационным изменениям, то отмеченные отличия полученных аналогов свидетельствуют, по-видимому, о некоторых конформационных изменениях корринового хромофора, связанных с введением алкиладениновой и эфирной цепочек вместо более жесткого сахарного фрагмента аденозильного лиганда кобамидного кофермента.

Оба полученных аналога ДБК (VI) и (III) фотолabileны, что также является дополнительным доказательством наличия в них Co—C-связи. Изучение фотолитического расщепления кобамидного кофермента и его аналогов [8—13] показало, что во всех случаях реакционный механизм за-

ключается в образовании витамина B_{12} и свободного радикала путем гомолитического расщепления $Co-C$ -связи. Измеренные константы скорости гомолитического расщепления $Co-C$ -связи аналогов (VI) и (III) при

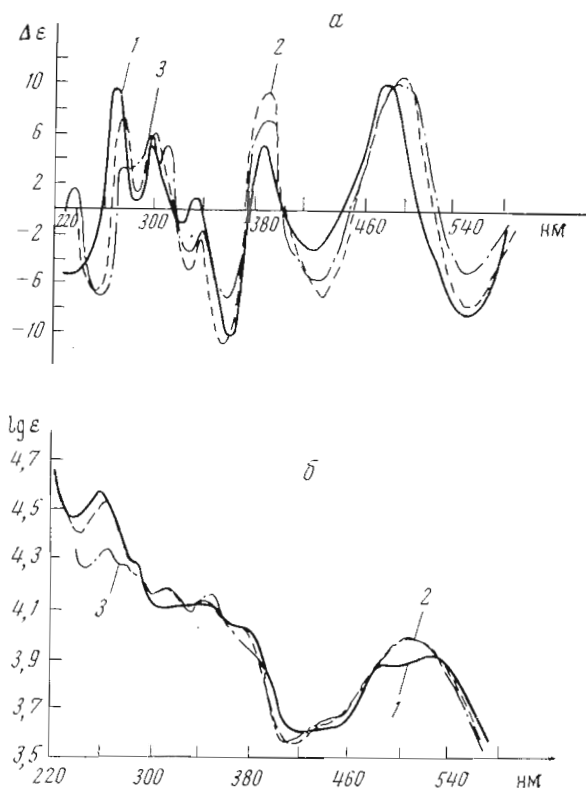


Рис. 2. Спектры КД (а) и поглощения (б) в воде 5'-дезоксиг-5'-аденозилкобаламина (1), ω -(9-аденил)пентилкобаламина (2) и ω -оксипентилкобаламина (3)

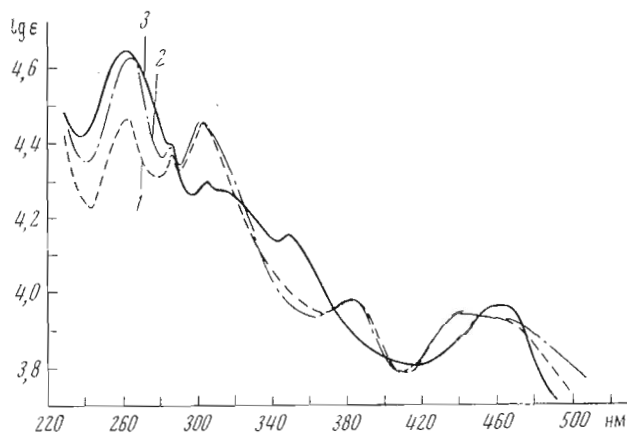


Рис. 3. Спектры поглощения в 0, 1 н. НСl ω -оксипентилкобаламина (1), ω -(9-аденил)пентилкобаламина (2), β -[(9-аденил)метокси]этилкобаламин (3)

облучении их водных растворов светом оказались близкими между собой и по своим значениям (см. таблицу) находятся между величинами констант скорости фотолитического расщепления $Co-C$ -связи кобамидного кофермента и алкилкобаламинов. Однако в кислых растворах (рН 1) устойчи-

Константы скорости цианирования и фотолиза органокобаламинов

Органокобаламины	Константы скорости гетеролитического расщепления Co—C-связи $^{\circ}$, $k \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$	Константа скорости фотолиза ** , $k \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$
β -[(9-Аденилил)метокси]этилкобаламин (III)	1,19	3,4 (1,2 при pH 1)
ω -(9-Аденилил)пентилкобаламин (VI)	0,046	3,4 (2,1 при pH 1)
ω -Оксиэтилкобаламин (VII)	0,032	4,8
Бутилкобаламин	—	5,3
5'-Дезокси-5'-аденозилкобаламин	8,4	1,9
5'-Дезокси-5'-аденозилкобаламид	130	0,45

* Константы скорости псевдопервого порядка.

** Константы скорости первого порядка. Каждая кювета содержала 3 мл водного раствора (D_{351} 0,7—0,8). Скорость образования оксикобаламина измеряли по увеличению поглощения при 351 нм. Облучение проводили светом вольфрамовой лампы 60 Вт на расстоянии 20 см.

вость Co—C-связи, особенно в соединении (III), возрастает; величина константы скорости фоторасщепления его Co—C-связи является промежуточной между величинами констант скорости расщепления ДБК и коферментной формы фактора В, у которого отсутствует координационная Co—N_{Взм}-связь.

Известно, что в реакции некоторых органокобаламинов с CN⁻-ионами происходит гетеролитическое расщепление Co—C-связи. При определении константы скорости расщепления Co—C-связи синтезированных кобаламинов спектрофотометрическим методом [5] нами было найдено, что если в гомолитической реакции фотолиза устойчивость Co—C-связи в аналогах (VI) и (III) одинакова, то в реакции цианирования, сопровождающейся гетеролитическим раскрытием Co—C-связи эти аналоги ведут себя различно. Так, в соединении (VI) Co—C-связь намного устойчивее к действию CN⁻-ионов, чем в соединении (III) (см. таблицу). Как сейчас считают, при расщеплении Co—C-связи под действием CN⁻-ионов одновременно происходит разрыв N-гликозидной связи кобамидного кофермента [15]. Передача электронного влияния аденинового ядра через пентаметиленовую цепочку в соединении (VI), вероятно, затруднена, и Co—C-связь в в этом соединении устойчива к действию CN⁻-ионов. Такой же эффект наблюдал Хогенкамп и соавт. [12] при исследовании соединений, имеющих более короткую алкильную цепочку [γ -(9-аденилил)пропилкобаламин и δ -(9-аденилил)бутилкобаламин]. Таким образом, алкиладенилилкобаламины ведут себя в реакции цианирования как простые алкилкобаламины. Не является исключением и карбоциклический аналог ДБК [16], в котором кислород рибозного кольца заменен метиленовой группой и который тоже не подвергается цианированию. По-видимому, способность к расщеплению Co—C-связи в реакции цианирования β -[(9-аденилил)метокси]этилкобаламина (III) можно объяснить возможностью передачи влияния удаленного от атома кобальта агликона через эфирный кислород.

Кислороду рибозного кольца адениновой части молекулы ДБК приписывается большое значение в реакциях гетеролитического расщепления Co—C-связи при кислотном гидролизе. По механизму, предложенному Хогенкампом и Оикава [17], скорость гидролиза Co—C-связи в кобаламинах определяется лабильностью гликозидной связи к кислотному гидролизу, которая зависит, в свою очередь, от легкости протонизации кислорода рибозного кольца. Так, скорость кислотного гидролиза аналогов ДБК, модифицированных в сахарном кольце (2',5'-дидезокси-5'-аденозилкобаламина [17] и 3',5'-дидезокси-5'-аденозилкобаламина [18]), намного превышала скорость кислотного гидролиза ДБК, вероятно, в результате отсутствия гидроксильных групп, индуктивный эффект которых затрудняет протонирование циклического кислорода. При изучении ряда

алкилкобаламинов было показано [14], что только оксиметил- и метоксиэтилкобаламины, которые протонируются в кислых условиях гидролизывались с расщеплением Co—C-связи. Однако эти алкилкобаламины, как и все остальные, были устойчивы к действию CN[⊖]-ионов. Лабилизация Co—C-связи аналога β-[(9-аденилил)метокси]этилкобаламина (III) при действии CN[⊖]-ионов представляет еще более интересный факт по сравнению с уже известным — устойчивостью к цианированию аналогичного соединения, не содержащего аденинового фрагмента [14].

Таким образом, выявленное нами различие в кинетической устойчивости Co—C-связи кобаламинов (III) и (VI) в реакции цианирования свидетельствует в пользу ранее выдвинутого нами предположения о важной роли кислорода рибозного кольца аденозильного лиганда в передаче влияния замещения в аденине на реакционную способность Co—C-связи.

Экспериментальная часть

Спектры в ультрафиолетовой и видимой области снимали в регистрирующем спектрофотометре «Pye Unicam SP-800» (Англия) в воде и в 0,1 н. HCl. Хроматографию проводили на бумаге FN-11 в системах: *n*-бутиловый спирт — изопропиловый спирт — уксусная кислота — вода, 100 : 70 : 1 : 100 (А); *втор*-бутиловый спирт, насыщенный водой (Б); *n*-бутиловый спирт — изопропиловый спирт — вода — следы KCN, 100 : 70 : 100 (В). Электрофорез на бумаге FN-11 проводили в приборе «УЭФ» при градиенте потенциала 16,0 В/см в 1 н. уксусной кислоте рН 2,4 (Г) или в 0,03 М растворе уксуснокислого натрия, рН 6,7 (Д).

Спектры КД снимали в приборе «Jasco ORD (UV)CD-5» (Япония) в 0,2 М К-фосфатном буфере (рН 8,0). При регистрации спектров КД использовали растворы, содержащие 25—60 мкмоль аналогов ДБК и кюветы с длиной пути 0,5—2,0 см. Ошибка измерения не превышала 5% в области 350—600 нм и 10% — в области 220—350 нм.

Для изучения кинетики цианидного расщепления синтезированных аналогов ДБК в кварцевую кювету (*d* = 1 см) вносили 2,8 мл раствора, содержащего 20—30 мкмоль кобаламинов (III), (VI), (VII) в 0,1 М Na бикарбонатном буфере (рН 10,5), и реакцию начинали добавлением 0,2 мл свежеприготовленного 1,5 М раствора KCN при 25°. Константу скорости расщепления Co—C-связи в реакции цианирования рассчитывали по методике работы [5].

ω-(9-Аденилил)пентилкобаламин (VI). Оксикобаламин (0,150 г) растворяли в 5 мл 50%-ного этилового спирта и через систему пропускали ток аргона в течение 30 мин для полного вытеснения воздуха. Затем прибавляли в тех же условиях 0,110 г NaBH₄ в 8 мл абсолютного этилового спирта. Раствор перемешивали 40 мин до изменения окраски из красно-коричневой в серо-зеленую. К образовавшемуся Co(I)-кобаламину (I) прибавляли 0,04 г 9-(ω-хлорпентил)аденина (IV) в деоксигенированном 75% спирте (8 мл). После перемешивания в течение 1 ч при 20° в токе аргона окраска раствора постепенно изменялась до красной; раствор упаривали в вакууме досуха при 30°, остаток растворяли в 20 мл воды и раствор после добавления 0,2 мл ледяной уксусной кислоты (до рН 4,5—5,0) экстрагировали смесью фенола и хлороформа (1 : 1). К объединенным экстрактам добавляли 10 объемов этилового эфира и вновь многократно экстрагировали их водой; водные экстракты промывали эфиром, остатки которого удаляли в вакууме. Раствор наносили на колонку с CM-целлюлозой (H⁺-форма); 0,2%-ной уксусной кислотой элюировали сначала небольшие количества непрореагировавшего оксикобаламина, а затем соединение (VI). Из элюата соединение (VI) вновь экстрагировали смесью фенола с хлороформом (1 : 1) и затем экстрагировали водой, добавив к органической фазе 10 объемов эфира. После лиофилизации получали 0,138 г соединения (VI). При БХ в системах А, Б и В *R*_{ДБК} соответственно равны 2,12; 2,62 и 2,0. При

электрофорезе в растворе $\Gamma E_{\text{ДВК}}$ равно 1,04; в растворе Δ соединение (VI) не заряжено. Спектр поглощения в воде: $\lambda_{\text{макс}}$ 263, 287—290 (плечо), 315, 345, 510 нм; $\lg \epsilon$ 4,51; 4,24; 4,16; 4,11; 3,97; в 0,1 н. соляной кислоте: $\lambda_{\text{макс}}$ 263, 285, 302, 382, 435—460 нм; $\lg \epsilon$ 4,62; 4,38; 4,45; 3,98; 3,93.

Взаимодействие Со(I)-кобаламина с 6-экто-N-тозил-9-(ω -O-тозилпентил)-аденином (V). К раствору, содержащему 0,105 г оксикобаламина в 5 мл водного этилового спирта прибавляли 0,087 г NaBH_4 и после образования Со(I)-кобаламина (I) вносили 0,077 г 6-экто-N-тозил-9-(ω -O-тозилпентил)-аденина (V), растворенного в 12 мл 80%-ного этилового спирта. Раствор перемешивали в течение 1 ч при 20° и обрабатывали, как описано выше. ω -(Оксипентил)кобаламин (VII) элюировали с СМ-целлюлозы водой и выделяли из элюата лиофилизацией; затем 0,2%-ной уксусной кислотой элюировали непрореагировавший оксикобаламин и ω -(9-аденилил)пентилкобаламин (VI). После лиофилизации получали 0,06 г аналога (VII) и 0,03 г аналога (VI). При БХ аналога (VII) в системах А, Б и В $R_{\text{ДВК}}$ соответственно равны 2,3; 3,6 и 2,22; при электрофорезе в растворе $\Gamma E_{\text{ДВК}} = 0,66$; в растворе Δ соединение (VII) не заряжено. Спектр поглощения в воде: $\lambda_{\text{макс}}$ 266, 277—279, 289, 315, 346, 504—512 нм; $\lg \epsilon$ 4,36; 4,31; 4,29; 4,24; 4,16; 3,98. При БХ аналога (VI) в системах А, Б и В $R_{\text{ДВК}}$ соответственно равны 2,0; 2,5 и 1,9; при электрофорезе в растворе $\Gamma E_{\text{ДВК}} = 1,04$; в растворе Δ соединение (VI) не заряжено. Спектр поглощения в воде: $\lambda_{\text{макс}}$ 263, 287—290, 315, 345, 509 нм; $\lg \epsilon$ 4,63; 4,31; 4,19; 4,15; 3,99.

β -(9-Аденилил)метоксиэтилкобаламин (III). К раствору, содержащему 0,145 г оксикобаламина в 5 мл водного этилового спирта, прибавляли 0,110 г NaBH_4 ; после образования Со(I)-кобаламина (I) к раствору добавляли 0,065 г 9-(1'-метиленокси-2'-хлорэтил)аденина (II), растворенного в 10 мл водного этилового спирта. Смесь перемешивали 1 ч при 20°. Аналог (III) выделяли из раствора, как описано выше. Соединение (III) элюировали с СМ-целлюлозы водой, лиофилизировали и получали 0,08 г кобаламина (III). При БХ кобаламина (III) в системах А, Б и В $R_{\text{ДВК}}$ соответственно равны 1,52; 1,37 и 1,44. При электрофорезе в растворе $\Gamma E_{\text{ДВК}} = 0,79$; в растворе Δ — соединение (III) не заряжено. Спектр поглощения в воде: $\lambda_{\text{макс}}$ 261, 286—290, 340, 490, 516—526 нм; $\lg \epsilon$ 4,57; 4,37; 4,15; 3,84; 3,93; в 0,1 н. соляной кислоте: $\lambda_{\text{макс}}$ 263, 283—284, 303, 310—315, 348, 454—466 нм; $\lg \epsilon$ 4,64; 4,39; 4,29; 4,27; 4,14; 3,96.

ω -(Оксипентил)кобаламин (VII). К раствору, содержащему 0,157 г оксикобаламина в 6 мл водного этилового спирта, прибавляли 0,130 г NaBH_4 ; после образования Со (I)-кобаламина (I) к смеси добавляли 3 мл 5-хлоропентанола-1, растворенного в 5 мл этилового спирта. Смесь перемешивали 1 ч при 20°. После стандартной обработки раствора кобаламин (VII) элюировали с СМ-целлюлозы водой, лиофилизировали и получали 0,119 г соединения (VII). При БХ кобаламина (VII) в системах А, Б и В $R_{\text{ДВК}}$ соответственно равны 2,3; 3,6 и 2,22. При электрофорезе в растворе $\Gamma E_{\text{ДВК}} = 0,64$; в растворе Δ аналог (VII) не заряжен. Спектр поглощения в воде: $\lambda_{\text{макс}}$ 266, 277—279, 289, 315, 346, 504—510 нм; $\lg \epsilon$ 4,33; 4,28; 4,26; 4,17; 4,15; 3,97; в 0,1 н. соляной кислоте: $\lambda_{\text{макс}}$ 263, 286, 303, 381, 437—468 нм; $\lg \epsilon$ 4,46; 4,36; 4,46; 3,92; 9,34.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hogenkamp H. P. C. (1968) Annual Rev. Biochem., 37, 225—248.
2. Stadtman T. C. (1971) Science, 171, 859—867.
3. Abeles R. H. (1971) Advances Chem. Ser., 100, 346—364.
4. Barker H. A. (1972) Annual Rev. Biochem., 41, 55—90.
5. Rudakova I. P., Pospelova T. A., Borodulina-Shvets V. I., Kurganov B. I., Yurkevich A. M. (1973) J. Organomet. Chem., 61, 389—400.
6. Яковлев В. А., Познанская А. А., Просветова Н. К., Рудакова И. П., Поспелова Т. А., Юркевич А. М. (1971) Докл. АН СССР, 197, 230—233.
7. Lenhart R. G. (1968) Proc. Roy. Soc. Ser. A, 303, 45—84.

8. Hogenkamp H. P. C., Lodd J. N., Barker H. A. (1962) J. Biol. Chem., **237**, 1950—1952.
9. Johnson A. W., Shaw N. (1961) Proc. Chem. Soc., 447—448.
10. Hogenkamp H. P. C. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 477—480.
11. Yamada Ryo-Hei, Kato T., Shimisu S., Fukui S. (1965) Biochim. et biophys. acta, **97**, 353—355.
12. Hogenkamp H. P. C., Pailes W. H., Brownson C. (1971) Methods in Enzymology, **18c**, 57—65.
13. Wagner F., Bernhauer K. (1964) in Ann. N. Y. Acad. Sci. (Whipple H. E., Perlman D., eds.) vol. 112, p. 580—589.
14. Hogenkamp H. P. C., Rush J. B., Suenson C. A. (1965) J. Biol. Chem., **240**, 3641—3644.
15. Johnson A. W., Shaw N. (1962) J. Chem. Soc., **11**, 4608—4614.
16. Kerwas S. S., Smith T. A., Abeles R. H. (1970) J. Biol. Chem., **245**, 1169—1174.
17. Hogenkamp H. P. C., Oikawa T. G. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 1911—1916.
18. Zagalak B., Pawelkiewicz J. (1965) Acta biochim. pol., **12**, 219—228.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

**(9-ADENYLYL)ALKYLCOBALAMINS
AS COBAMIDE COENZYME ANALOGS**

POSPELOVA T. A., RUDAKOVA I. P., YURKEVICH A. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

β -[(9-Adenylyl) methoxy]ethylcobalamin and ω -(9-adenylyl)-pentylcobalamin, analogs of cobamic coenzyme (AdoCbl), were prepared from Co(I)-cobalamin (vitamin B_{12s}) and 9-(1'-methoxy-2'-chloroethyl)-adenine or 9-(ω -chloropentyl)-adenine. ω -(9-Adenylyl)-pentylcobalamin was obtained as a result of vitamin B_{12s} reaction with 6-exo-N-tosyl-9-(ω -O-tosylpentyl)-adenine. The kinetic parameters for cyanide cleavage of Co-C-bond in this analog were investigated. The difference in the stability of Co-C-bond in cobalamins testifies to the important role of riboside oxygen in transmission of the substitution effect in adenine to the reactivity of this bond.

* Стагья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 24.IX.1974 г.