



УДК 577.152.621'1'133

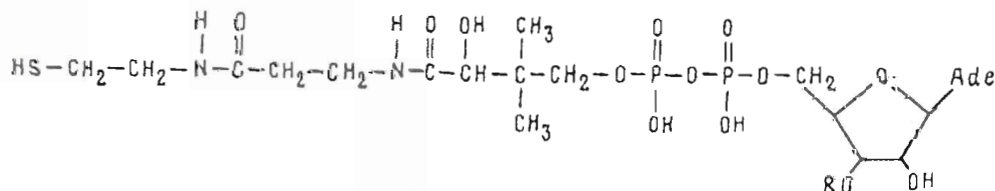
© 1993 А. И. Бирюков, Ю. Н. Жуков,
В. М. Копелевич,
Л. Н. Буланова*, В. И. Гунар*

АНАЛОГИ 3'-ДЕФОСФО-СОASH С ФОСФОДИЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ КАК СУБСТРАТЫ РЕАКЦИИ S-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АЦЕТИЛ-СОА-СИНТЕТАЗОЙ МИОКАРДА КРОЛИКА

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва;
* Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

Синтезирован ряд неизвестных ранее аналогов 3'-дефосфо-СоASH, у которых пирофосфатный участок замещен фосфодиэфирной или сложноэфирной связью. Изучено взаимодействие полученных соединений с ацетил-СоА-синтетазой миокарда кролика в реакции S-ацетилирования. Отмечено понижение сродства и более низкие параметры $V_{\max}$ у аналогов с фосфодиэфирной связью, в частности у аналога (Ia), по сравнению с 3'-дефосфо-СоASH. Замена аденинового основания в соединении (Ia) на остаток гуанина или гипоксантина, но не цитозина приводила к потере субстратных свойств. Равным образом аналоги со сложноэфирной связью не способны акцептировать ацетат в условиях эксперимента и слабо ингибировали этот процесс.

Кофермент А (СоASH) играет важнейшую роль как переносчик ацильных групп в синтезе и окислении жирных кислот, окислении пирувата и различных реакциях ацетилирования. Непосредственное участие в этих процессах принимает тиоловая группа [1]. Для выяснения значения других функциональных групп СоASH в проявлении коферментной активности синтезирован ряд аналогов, модифицированных как по пантотеновой, так и по нуклеозидной частям молекулы СоASH, и исследовано их взаимодействие с СоА-зависимыми ферментами [2, 3]. Вместе с тем в этих исследованиях не была изучена роль пирофосфатной связи, которая, вероятно, оказывает существенное влияние на коферментную активность.



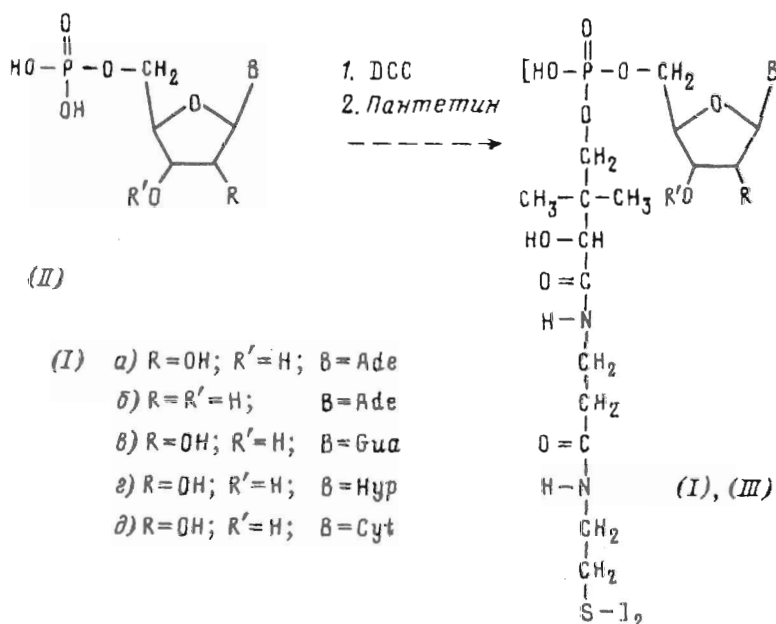
Кофермент А: $\text{R} = \text{P}(\text{OH})_2\text{O}$; 3'-дефосфо-СоASH: $\text{R} = \text{H}$

Мы синтезировали неизвестные ранее аналоги 3'-дефосфо-СоASH, у которых пирофосфатный участок замещен фосфодиэфирной или сложноэфирной связью и изучили их взаимодействие с ацетил-СоА-синтетазой (КФ 6.2.1.1) из миокарда

кролика, катализирующей реакцию образования ацетил-CoA (CoASAc) из ацетата и CoASH при участии АТФ.

Наиболее удобный, с нашей точки зрения, метод получения фосфодиэфирного аналога, Р-(D-пантетин-4'')-Р-(аденозин,-5')-монофосфата (Ia, схема 1), состоит в конденсации защищенного по всем реакционноспособным группам, кроме фосфатной, АМР с D-пантетином в присутствии активирующих агентов. Для реализации этой схемы мы получили N⁶, 2', 3'-триацетиладенозин-5'-фосфат (IIa) ацелированием АМР избытком уксусного ангидрида в пиридине, конденсация которого с D-пантетином в присутствии DCC в течение 40—48 ч приводит к N⁶, 2', 3'-три-O-Ac-производному (IIIa). Полученный защищенный аналог (IIIa) очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе или с помощью экстракции органическими растворителями из воды, что оказалось возможным благодаря наличию липофильных защитных Ac-групп в аденозиновом фрагменте и относительно высокой липофильности остатка пантетина. В случае использования в качестве конденсирующего агента 2, 4, 6-триизопропилбензолсульфохлорида выход соединения (IIIa) увеличивался с 38 до 50%. После удаления в нем Ac-групп обработкой смесью аммиак — пиридин (2 : 1) мы получили аналог (Ia) с выходом 94%.

Схема 1



- (I) а) R=OH; R'=H; B=Ade
 б) R=R'=H; B=Ade
 в) R=OH; R'=H; B=Gua
 г) R=OH; R'=H; B=Hyp
 д) R=OH; R'=H; B=Cyt

(II) и (III) а) R=OAc; R'=Ac; B=6AcAde

б) R=H; R'=Ac; B=6AcAde

в) R=OAc; R'=Ac; B=2AcGua

г) R=OAc; R'=Ac; B=Hyp

д) R=OAc; R'=Ac; B=4AcCyt

В ИК-спектре полученного соединения обнаруживаются интенсивные полосы поглощения при 1650 и 1560 см⁻¹ (амид I и II соответственно), подтверждающие наличие остатка пантетина в молекуле, а присутствие сильных полос при 1230 и 1070 см⁻¹ (P=O, P—O—C) доказывает наличие фосфоэфирной связи. Обнаружение в УФ-спектре соединения (Ia) поглощения при 260 нм и в ПМР-спектре

Данные ПМР-спектров соединений (Ia), (VI) и (VII) в CDCl_3 (δ , м. д.)

Протоны	Соединения		
	(Ia)	(VI)	(VII)*
H-8	8,25с	8,31с	8,31с
H-2	8,01с	8,11с	8,13с
H-1'	5,96д	5,64д	6,23д
H-2'	4,98д	5,48д	5,46д
H-3'	5,09м	5,32м	5,06м
H-4'	4,41д	4,51д	4,60д
H-5'	3,5—3,7м		
$\text{C}(\text{CH}_3)_2$ пантетина	0,95с	0,95с	0,95с

* В соединении (VII) δ для $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$ аденозина 1,67с.

Таблица 2

Физико-химические данные аналогов

Соединение	Выход, %	Найдено (вычислено), %				Брутто-формула
		C	H	N	S	
(Ia)	94,4	41,88 (41,58)	5,47 (5,48)	16,02 (16,16)	5,11 (5,29)	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_{14}\text{O}_{20}\text{P}_2\text{S}_2$
(Iб)	93,4	42,39 (42,71)	5,30 (5,63)	16,26 (16,60)	5,44 (5,43)	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_{14}\text{O}_{18}\text{P}_2\text{S}_2$
(Iв)	79,2	40,24 (40,51)	5,48 (5,34)	16,02 (15,75)	5,42 (5,15)	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_{14}\text{O}_{22}\text{P}_2\text{S}_2$
(Iг)	38,0	41,86 (41,51)	5,12 (5,31)	13,66 (13,83)	5,64 (5,28)	$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{22}\text{P}_2\text{S}_2$
(Iд)	81,3	41,42 (41,23)	6,05 (5,71)	11,82 (12,02)	5,78 (5,50)	$\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_{10}\text{O}_{22}\text{P}_2\text{S}_2$
(VI)	25	47,01 (46,61)	5,32 (5,62)	18,44 (18,12)	5,46 (5,93)	$\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_{14}\text{O}_{16}\text{S}_2$
(VII)	38	49,08	5,61	16,48	5,86	$\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{16}\text{S}_2$

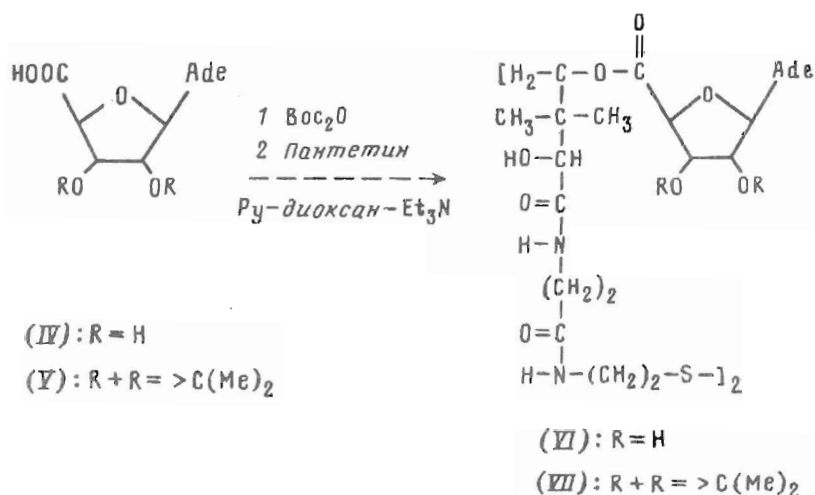
сигналов протонов с δ 8,01 и 8,25 м. д. доказывает наличие аденинового кольца в молекуле (Ia); в ПМР-спектре аналога (Ia) имеются сигналы от протонов как нуклеозидной, так и алифатической части молекулы (табл. 1).

Аналогичным образом, исходя из dAMP, GMP и IMP, мы получили аналоги (Iб—г), модифицированные соответственно по рибозной и пуриновой функциям. Для изучения влияния природы гетероциклического основания на взаимодействие с ферментом представляло интерес синтезировать аналог с замещением аденина на цитозин. Синтез такого аналога (Iд) мы осуществили по схеме 1 из CMP. Соединения (Iа—д) были получены в виде аморфных порошков и имели удовлетворительные характеристики по элементарному (табл. 2) и спектральному анализам.

Полезную информацию о роли фосфатных групп CoASH в связывании с ферментами могли бы дать аналоги, в которых отсутствует пиррофосфатный фрагмент, а остатки пантетина и аденозина связаны между собой карбоксэфирной или карбоксаимидной связью. Для синтеза таких аналогов необходимо было пре-

вратить оксиметильную группу аденозина или пантетеина в карбоксильную группу. Аденозин-5'-карбоновая кислота (IV) была выбрана в качестве исходного соединения. Удобный ее синтез мы осуществляли путем окисления 2', 3'-О-изопропилиденаденозина (V) с последующим деблокированием [4]. Первоначальная попытка получить пантетиниловый эфир 2', 3'-О-изопропилиденаденозин-5'-карбоновой кислоты по методике [4], описанной для синтеза алкиловых эфиров через хлорангидрид, была неудачной. В этой связи для активации карбоксильных групп соединений (IV) и (V) использовали систему Vos_2O — пиридин по методу [5], разработанному для получения эфиров N-защищенных аминокислот (схема 2). Поскольку ранее была отмечена возможность подбора условий [5], в которых Vos_2O не реагирует с первичными и вторичными спиртами, в синтезе мы использовали незащищенное соединение (IV). Конденсацию его с пантетинном в присутствии Vos_2O проводили в смеси диоксан — пиридин — триэтиламин, однако получить гомогенную реакционную смесь из-за низкой растворимости соединения (IV) в органических растворителях не удалось и выход пантетинилового эфира бис(аденозин-5'-карбоновой кислоты) (VI) составил ~25%. Реакция соединения (V) с пантетинном проходила в гомогенной среде и приводила к получению 38% 2', 3'-О-изопропилиденового производного (VII). Присутствие в молекуле соединений (VI) и (VII) сложноэфирной и амидной функций установлено с помощью ИК-спектров, содержащих полосы поглощения при 1745 (COOR), 1660 (амид I) и 1535 cm^{-1} (амид II); в УФ-спектрах имеется характерный для производных аденозина максимум при 260 нм.

Схема 2



Следует отметить, что соединения (Ia—д), (VI) и (VII) весьма лабильны в водных растворах, что требует особых мер предосторожности при их выделении и хранении. Кроме того, лабильность соединения (VI) создавала дополнительную проблему при удалении изопропилиденовой защиты. Кислотный гидролиз в присутствии муравьиной, уксусной, трихлоруксусной и соляной кислот приводил к разрушению продукта с образованием соединения (IV) и ряда неидентифицированных веществ. Необычная лабильность синтезированных соединений объясняется, по-видимому, взаимодействием свободной HO -группы пантетеина с фосфатной или сложноэфирной группировками.

Субстратные свойства аналогов 3'-дефосфо- CoASH по отношению к ацетил- CoA -синтетазе миокарда кролика мы исследовали в условиях, описанных в «Экспериментальной части». 3'-Дефосфо- CoASH , несмотря на отсутствие фос-

Взаимодействие ацетил-CoA-синтетазы миокарда кролика с 3'-дефосфо-CoASH и его аналогами*

Соединение	каж. K_m , мМ	V_{max} , отн. ед.	Концентрация ингибитора, мМ	Торможение, %
CoASH	0,125	1,0		
3'-Дефосфо-CoASH	0,2	0,94		
(Ia)	1,0	0,7		
(Iб)	2,5	0,08		
(Iв)			1	< 5
(Iг)			1	< 5
(Iд)	0,7	0,8		
(VI)			1	< 5
(VII)			1	< 5

* Приведенные в таблице величины являются средними арифметическими 3—5 измерений. Ошибка в определении величин K_m и V_{max} составляет <10%.

фатной группы в 3'-положении рибозы, обладал сравнимым с CoASH сродством к ферменту (табл. 3). Величины его кажущейся K_m и V_{max} незначительно отличались от кинетических параметров CoASH. Эти результаты согласуются с литературными данными относительно взаимодействия 3'-дефосфо-CoASH с ферментом из печени крыс [6].

Укорочение фосфопантотеинового фрагмента молекулы 3'-дефосфо-CoASH на фосфатную группу, т. е. при замене пиродифосфатной связи на фосфодиэфирную (соединение Ia), снижало сродство и уменьшало V_{max} при сравнении с 3'-дефосфо-CoASH. Падение сродства значительно усиливалось при удалении HO-группы в 2'-положении рибозы (соединение Iб). При замене в аналогах аденинового основания на остатки гуанина или гипоксантина (соединения Iв, Iг) соответственно, но не цитозина (соединение Iд) наблюдалась полная потеря субстратных свойств. Указанные соединения слабо ингибировали реакцию S-ацетилирования в миллимолярной концентрации. Отсутствие субстратных свойств и слабое ингибирование наблюдалось и у соединений (VI) и (VII).

Полученные данные позволяют предположить, что CoASH-связывающий участок активного центра синтетазы содержит по крайней мере три основных локуса: гидрофобную область связывания аденинового ядра и два катионных локуса, связывающих пиродифосфатный участок и гидроксил в 2'-положении рибозы. 6'-NH₂-Группа аденина выполняет «якорную» функцию при связывании переносчика.

Экспериментальная часть

В работе использовали AMP, ATP, 2'-dAMP и GMP (Reanal, Венгрия), IMP и CMP (Sigma, США), CoASH и 3'-дефосфо-CoASH (PL Biochem., США). В опытах применялись трис, дитиотреит. Для БХ, ЖХ и ТСХ использовали бумагу Ватман 3ММ (Whatman, Англия), DEAE-целлюлозу DE-32 и DE-52 и пластинки Silufol UV₂₅₄ (Cavalier, Чехо-Словакия).

Системы для ТСХ: ацетон — диоксан — 25% водн. аммиак, 9 : 9 : 2 (А); ацетон — метанол — 25% водн. аммиак, 9 : 9 : 2 (Б); на бумаге: насыщенный водой эфир — HCOOH, 7 : 1 (В).

Удельная активность [C]AcOH («Изотоп») составляла 360 МБк/мкмоль. Радиоактивность измеряли на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). Определение белка проводили по методике [7].

УФ-спектры измеряли на спектрофотометре модели 180 Perkin — Elmer, спектры ПМР — на приборе WP-80 (Bruker, ФРГ) в CDCl_3 с тетраметилхлорсиланом в качестве внутреннего стандарта (значения даны в м. д., условные обозначения: с — синглет, д — дублет, м — мультиплет).

P-(D-пантетин-4'')-P-(аденозин-5')-фосфат (Ia). Высушенный АМР (0,77 г) трехкратной отгонкой с безводным пиридином (по 20 мл) растворяли в 50 мл безводного пиридина и 30 мл уксусного ангидрида, смесь перемешивали 48 ч при 20° С, охлаждали до 0° С, прибавляли порциями 50 мл метанола, упаривали в вакууме до половины объема, прибавляли 15 мл воды, упаривали досуха и многократно упаривали с водой и затем с метанолом. Остаток растворяли в 2 мл метанола, осаждали 30 мл эфира, растворитель декантировали, маслообразный остаток сушили трехкратной отгонкой с пиридином, растворяли в 20 мл безводного пиридина, прибавляли 0,92 г *D*-пантетина, высушенного отгонкой с пиридином (3 × 20 мл), и 1,84 г ДСС. Смесь перемешивали 40 ч при 20° С, прибавляли 25 мл смеси вода — пиридин (1 : 4), перемешивали 3 ч при 0° С, осадок отделяли, растворитель удаляли в вакууме, осадок обрабатывали петролевым эфиром, остаток после декантирования растворяли в 30 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл), объединенные экстракты сушили сернокислым натрием и упаривали. Получали 0,94 г (38%) маслообразного триацетильного производного соединения (Ia), которое растворяли в 15 мл смеси 25% аммиак — пиридин (2 : 1), перемешивали 12 ч при 20° С, упаривали в вакууме, прибавляли 30 мл метанола и упаривали. Получали 0,74 г (94,4%) соединения (Ia), R_f 0,36 (А), 0,7 (Б). УФ-спектр: λ_{max} 259 нм (ϵ 8310). ИК-спектр (вазелиновое масло, ν , см^{-1}): 3380 (ОН, NH), 1650 (амид I), 1560 (амид II), 1230 (P=O), 1100, 1080 (P—O—C).

Соединения (Iб—д) получены по аналогичной методике (см. табл. 1).

Бис[4,4'-пантетинил(9-β-D-рибофуранозиладенин)уронат] (VI). Раствор 55 мг *D*-пантетина в смеси 6 мл диоксана прибавляли к суспензии 56 мг аденозин-5'-карбоновой кислоты [4] в 4 мл пиридина и 0,5 мл триэтиламина. К полученной смеси прибавляли 0,86 г Wos_2O , перемешивали 96 ч при 20° С, отфильтровывали непрореагировавшую аденозин-5'-карбоновую кислоту, фильтрат упаривали в вакууме, к остатку прибавляли 8 мл хлороформа и 8 мл 5% водного раствора Na_2CO_3 , хлороформный слой отделяли, водный слой экстрагировали хлороформом (2 × 15 мл), объединенные хлороформные растворы сушили сернокислым натрием, упаривали и получали 31 мг (25%) соединения (VI), R_f 0,81 (А), 0,89 (Б). УФ-спектр: λ_{max} 258 (ϵ 8400). ИК-спектр (тонкая пленка, ν , см^{-1}): 3320, 3190, 3090 (NH, NH_2 , ОН), 1745 (C=O), 1660 (амид I), 1600, 1580 (C=N, C=C), 1535 (амид II), 1335, 1100 (C—O).

Бис[4,4'-пантетинил(9-2',3'-O-изопропилиден-β-D-рибофуранозиладенин)уронат] (VII) получали аналогично из 2',3'-O-изопропилиденаденозин-5'-карбоновой кислоты.

Препарат фермента и определение его активности. Выделение ацетил-CoA-синтетазы осуществляли из цитозоля сердечной мышцы кролика описанным ранее методом [8]. Активность фермента по прямому включению [^{14}C]AcOH и CoASH, 3'-дефосфо-CoASH или его аналоги определяли аналогично указанному в работе [8]. В связи с тем что синтезированные соединения получены в виде симметричных дисульфидов (см. схемы 1, 2), для ферментативных испытаний их подвергали обработке избытком дитиотреита. При изучении субстратных или ингибиторных свойств аналогов 3'-дефосфо-CoASH их концентрацию варьировали в ходе эксперимента от 10^{-2} до 10^{-5} М.

Авторы принесят благодарность чл.-кор. РАН Р. М. Хомутову за ценные замечания и интерес к работе.

1. Jaenicke L., Lynen F.//The Enzymes. V. 3/Eds Boyer P. D. Lardy H., Myrback K.N.Y.: Acad. Press, 1960. Part B. P. 3—101.
2. Mautner H. G.//Meth. Enzymol. 1970. V. 18. Part A. P. 338—350.
3. Копелевич В. М., Гунар В. И.//Химия природ. соединений. 1988. № 4. С. 477—492.
4. Prasad R. N., Fung A., Tietje K., Stein H. H., Brondyk H. D.//J. Med. Chem. 1976. V. 19. № 10. P. 1180—1186.
5. Позднеев В. Ф.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 912—914.
6. Banns H., Hebb C., Mann S. P.//J. Neurochem. 1978. V. 30. P. 915—916.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 2. P. 265—275.
8. Бирюков А. И., Тарусова Н. Б., Амонтов С. В., Осипова Т. И., Горяченкова Е. В., Рабинков А. Г.//Биоорган. химия, 1985. Т. 11. № 5. С. 598—604.

Поступила в редакцию
30.X.1992

После доработки
8.IV.1993

A. I. Biryukov, Yu. N. Zhukov, V. M. Kopelevich*,
L. N. Bulanova*, V. I. Gunar*

3'-DEPHOSPHO-COENZYME AN ANALOGUES WITH A PHOSPHODIESTER BOND AS SUBSTRATES OF S-ACETYLTATION REACTION CATALYSED BY ACETYL-CoA SYNTHETASE FROM RABBIT MYOCARDIUM

W. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow;
* Research-Industrial Association «Vitaminy», Moscow

A number of earlier unknown 3'-dephospho-CoASH analogues with the pyrophosphate fragment replaced by an ester or phosphodiester bond were synthesized and tested in S-acetylation reaction, catalyzed by acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1) from rabbit myocardium. 3'-Dephospho-CoASH analogues with a phosphodiester bond, e. g. (Ia), had a lower affinity and diminished kinetic parameters than 3'-dephospho-CoASH ($K_m = 1$ and 0.2 mM, respectively). The adenine substitution in (Ia) by guanine or hypoxanthine (but not cytosine) residue resulted in a loss of substrate properties. 3'-Dephospho-CoASH with an ester bond were not capable of accepting acetate under conditions used and only slightly inhibited the enzymic activity.