



УДК 577.164.12.07 + 577.15.013

## НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

## XXXII. СИНТЕЗ 8-ДИМЕТИЛАМИНО(НОР)ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА

*Литвак Ж. И., Березовский В. М.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

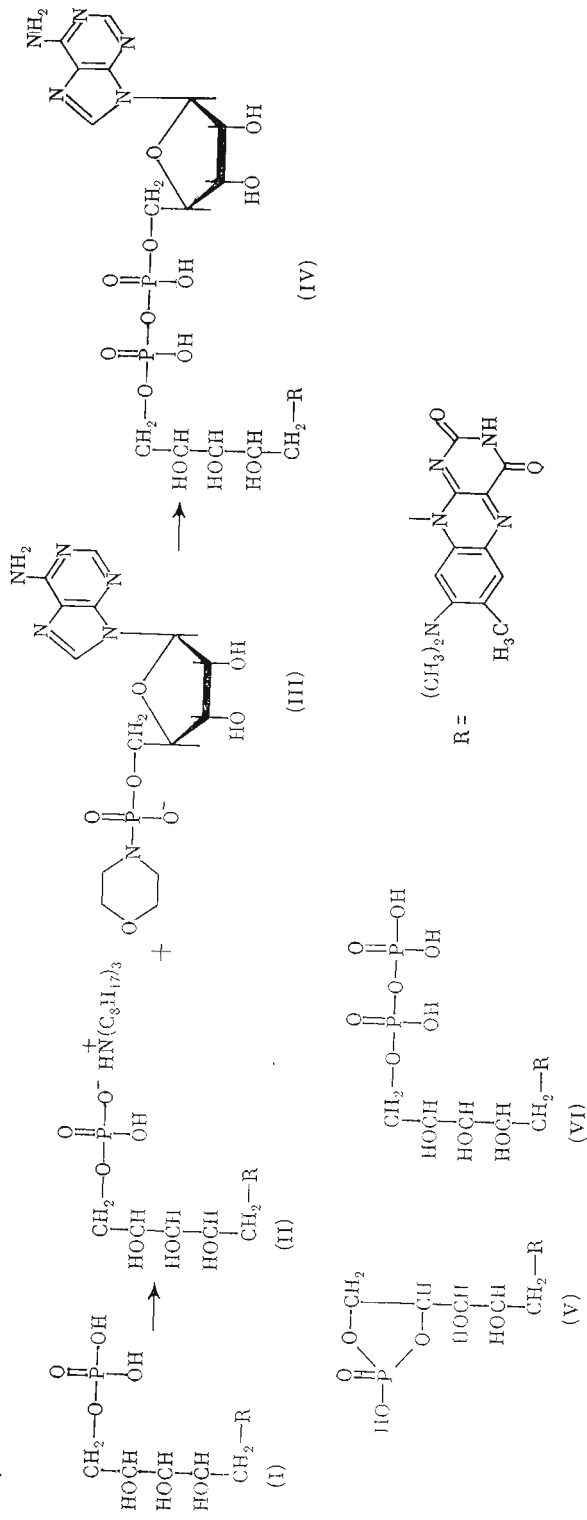
Конденсацией три-*n*-октиламмониевой соли 8-диметиламино(нор)флавиномононуклеотида и 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР синтезирован 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид. Структура его доказана ИК-, УФ- и видимым спектрами поглощения и кругового дихроизма, хроматографической и электрофоретической подвижностью, а также результатами гидролиза в кислой среде. При фотоактивировании рассеянным светом водного раствора динуклеотида происходит отщепление одной метильной группы от третичного амина, а затем разрыв пирофосфатной связи.

Ранее мы сообщали о получении аналога флавиномононуклеотида — 8-диметиламино(нор)рибофлавин-5'-фосфата (I) [1]. Его биосинтез осуществлен инкубацией 8-диметиламино(нор)рибофлавина с флавокиназой печени крысы в присутствии  $Zn^{2+}$  и АТР [2]. 8-Диметиламино(нор)рибофлавин — природный биологически активный флавин — недавно обнаружен в штамме *Streptomyces davawensis*, выделенном из филиппинской почвы [3]. Этот флавин идентифицирован и синтезирован [4], он способен к обратимому переносу электрона [3, 4]. Выявлено репрессирующее влияние 8-диметиламино(нор)рибофлавина на синтез 6,7-диметил-8-*D*-рибтиллумазина в биосинтезе рибофлавина и на активность рибофлавинсинтетазы у *Bacillus subtilis* с различным состоянием рибофлавинового оперона [5].

В настоящей работе мы впервые получили 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV) синтезом из три-*n*-октиламмониевой соли 8-диметиламино(нор)флавиномононуклеотида (II) и 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР (III) (см. схему).

8-Диметиламино(нор)рибофлавин-5'-фосфат (I) обработкой три-*n*-октиламином в кипящем безводном спирте был превращен в три-*n*-октиламмониевую соль (II). Конденсация последней с солью морфолида аденозин-5'-монофосфата (III) в среде безводного пиридина и диметилформамида при 50° в течение 20 ч приводит к смеси флавинов, содержащей 52% динуклеотида (IV) и 35% исходного фосфата (I). Кроме того, в условиях реакции в присутствии дициклогексилкарбодимиды происходит внутримолекулярная дегидратация флавина (I) в 8-диметиламино(нор)рибофлавин-4':5'-циклофосфат (V), содержание которого в смеси флавинов составляет 13%.

Обработка реакционной смеси флавинов раствором  $NaClO_4$  в метиловом спирте позволила выделить соединение (IV) в виде натриевой соли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 или G-25 (мелкий) по методу [6], а также препаративной хроматографией на бумаге. Динуклеотид (IV)



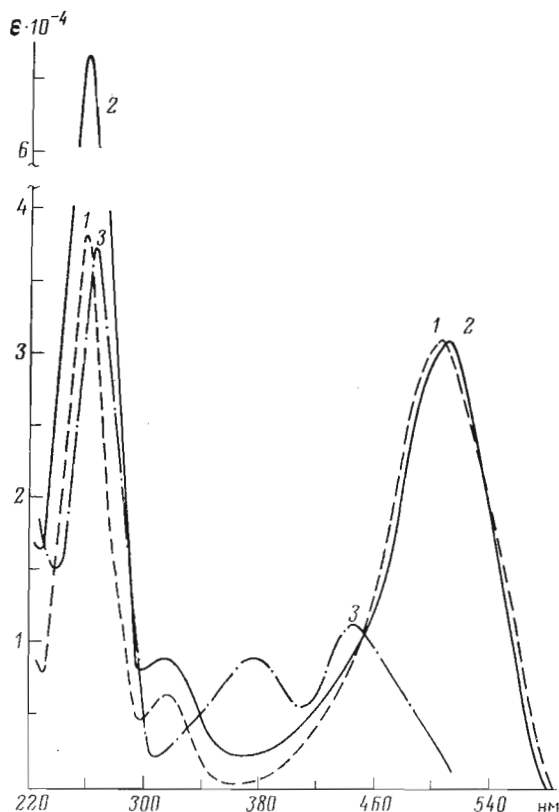


Рис. 1. Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях в воде: 1 — 8-диметиламино(нор)флавинмононуклеотид (I); 2 — 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV); 3 — FAD

получен в виде темно-красного кристаллического порошка с выходом 45—48% и чистотой 63—68%. Его строение доказано гидролизом в кислой среде, а также данными спектров поглощения в УФ- и видимой области, кругового дихроизма, ИК, хроматографической и электрофоретической подвижности.

8-Диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV), так же как и FAD, легко расщепляется в кислой среде: после нагревания 20 мин в 0,1 М соляной кислоте при 60° в гидролизате с помощью хроматографии на бумаге FN-2 в присутствии свидетелей были идентифицированы 8-диметиламинофлавинмононуклеотид (I) и аденозин. После 3 ч нагревания при 80° в гидролизате методом спектрофотометрии количественно определено содержание флавина (I), а также по реакции с орцином [7] содержание рибозы, образующейся в результате расщепления AMP. Найденное соотношение 8-диметиламино(нор)флавинмононуклеотида (I) к AMP составляет 0,95 : 1,15 (теоретически 1 : 1), что подтверждает структуру динуклеотида.

В ИК-спектре динуклеотида (IV) наблюдается интенсивная полоса в области 940  $\text{см}^{-1}$ , отвечающая асимметричным валентным колебаниям P—O—P-пирофосфатной связи динуклеотида [8].

Спектр поглощения 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида (IV) в УФ- и видимой области в воде имеет три полосы поглощения (рис. 1). Длинноволновый максимум поглощения по сравнению с FAD имеет резкий батохромный сдвиг на 61 нм, обусловленный наличием в положении 8 изоаллоксазинового цикла сильной электронодонорной ауксохромной третичной аминогруппы. Интенсивность длинноволновой полосы возрастает в

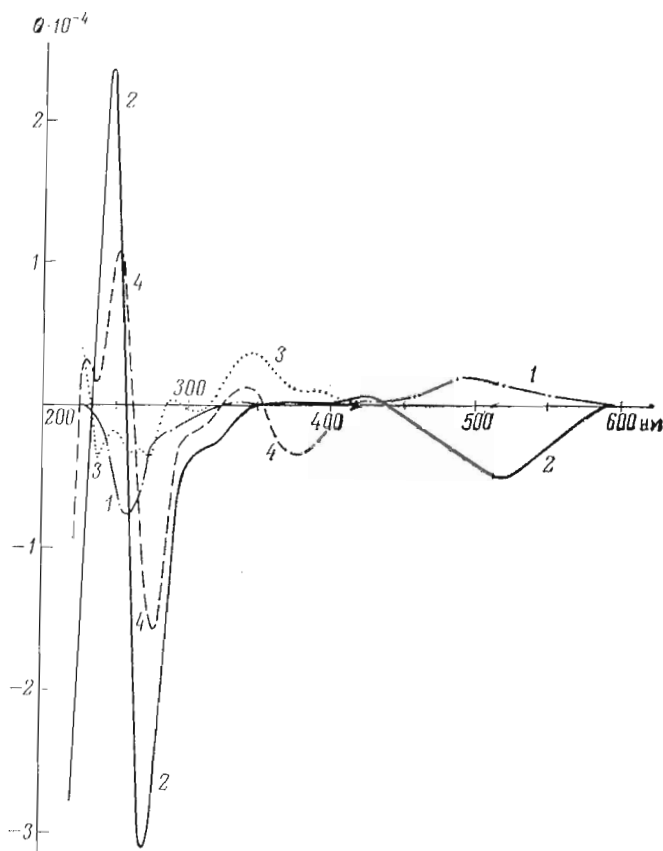


Рис. 2. Спектры КД в воде: 1 — мононуклеотид (I); 2 — динуклеотид (IV); 3 — FMN; 4 — FAD

2,8 раза по сравнению с поглощением FAD. Для спектра поглощения флавина (IV) характерно отсутствие полосы с  $\lambda_{\text{макс}}$  375 нм, имеющейся в спектре FAD, и появление новой малоинтенсивной полосы с  $\lambda_{\text{макс}}$  315 нм. Для динуклеотидного строения молекулы FAD ( $\lambda_{\text{макс}}$  450 нм) свойствен сдвиг полосы поглощения на 5 нм по сравнению с рибофлавином и FMN ( $\lambda_{\text{макс}}$  445 нм). Такое же батохромное смещение на 6 нм длинноволнового максимума наблюдается для динуклеотида (IV) по сравнению с 8-диметиламино(нор)рибофлавином и его мононуклеотидом (I) ( $\lambda_{\text{макс}}$  505 нм).

В спектре поглощения динуклеотида (IV) в водном растворе из-за наложения входящих в его молекулу полос поглощения АМР и мононуклеотида (I) в области 260 нм происходит значительное увеличение соотношения оптических плотностей коротковолнового и длинноволнового максимумов поглощения по сравнению с такими же максимумами для 8-диметиламино(нор)рибофлавина [3] и его мононуклеотида (I) [1]. Так, для флавина (IV) соотношение  $\epsilon_{259}/\epsilon_{511}$  составляет 2,13, в то время как для мононуклеотида (I)  $\epsilon_{259}/\epsilon_{505}$  равно 1,29. Для FAD и FMN аналогичное соотношение составляет 3,34 и 2,58 соответственно.

Структура динуклеотида для соединения (IV) следует также из рассмотрения спектра кругового дихроизма в нейтральном водном растворе. При сравнении спектров КД мононуклеотида (I) и динуклеотида (IV) (рис. 2, 1, 2) наблюдаются принципиальные различия. В спектре КД мононуклеотида (I) имеются экстремумы с максимумами при 255 и 495 нм, соответствующие и почти совпадающие с полосами поглощения флавинового хромофора с  $\lambda_{\text{макс}}$  259 и 505 нм, а также полосы низкой интенсивности с

**Хроматографическая и электрофоретическая подвижность  
аналогов FAD**

Соединение	$R_f$ в системах			$E_f$ , см
	А	Б	В	
8-Диметиламино(нор)рибофлавин	0,49	0,32	0,21	-0,5
Рибофлавин	0,58	0,40	0,35	-0,5
8-Диметиламино(нор)рибофла- вин-5'-монофосфат (I)	0,30	0,12	0,48	3,3
Рибофлавин-5'-монофосфат	0,29	0,13	0,60	4,0
8-Диметиламино(нор)рибофла- вин-5'-дифосфат (VI)	0,14	0,04	0,73	9,6
Рибофлавин-5'-дифосфат	0,16	0,05	0,82	9,7
8-Диметиламино(нор)рибофла- вин-4':5'-циклофосфат (V)	0,36	0,18	0,27	3,6
Рибофлавин-4':5'-циклофосфат	0,40	0,20	0,32	
8-Диметиламино(нор)флауин- адениндинуклеотид (IV)	0,19	0,00	0,29	4,7
FAD	0,20	0,00	0,38	4,7

$\lambda_{\text{макс}}$  290 и 340 нм, зависящие, по-видимому, от слабых  $n \rightarrow \pi^*$ -переходов электронов неподеленных пар в имино- и кетогруппах молекулы изоаллоксазина [9].

В отличие от этих данных спектр КД FMN (рис. 2, 3) имеет больший эффект Коттона полосы с положительным максимумом при 340 нм, а также явно выраженный положительный максимум при 290 нм; полоса в наиболее коротковолновой области флавина (I) с отрицательным эффектом Коттона и с максимумом при 259 нм у FMN имеет вложенный вид с несколькими экстремумами. Следует отметить, что положительный эффект Коттона для соединения (I) и FMN наблюдается для переходов в длинноволновой области, а отрицательный — в коротковолновой ультрафиолетовой области.

В спектре КД 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида (IV) имеются интенсивные полосы с положительным максимумом при 247 нм и противоположным ему знаком при 270 нм и полоса с относительно большим отрицательным эффектом Коттона при 520 нм, связанные, по-видимому, по данным спектра поглощения, с взаимодействием  $\pi \rightarrow \pi^*$ -электронных переходов флавинового хромофора при  $\lambda_{\text{макс}}$  259 и 511 нм и аденинового хромофора при 260 нм. Кроме того, в спектре КД флавина (IV) наблюдаются слабые эффекты Коттона отрицательного знака при 307 нм и положительного при 420 нм, которые, очевидно, могут быть отнесены к  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу в хромофоре изоаллоксазинового цикла.

В отличие от спектров КД FMN и FAD, где электронные переходы при 445—450 нм оптически не активны, интенсивное длинноволновое поглощение 8-диметиламиноаналогов (I) и (IV) при 505—511 нм связано со значительным эффектом Коттона в их спектрах КД при 495 и 520 нм соответственно.

В спектре КД флавинов (I) и (IV) нет полосы, аналогичной эффекту Коттона FMN и FAD с максимумом при 375 нм, отражающей соответствующее поглощение в электронном спектре.

Как известно, резкие различия в спектре КД FMN и FAD (рис. 2, 3, 4) связаны с тем, что в нейтральных водных растворах FAD может находиться в сложенной «стэкинг-конформации» [9]; в частности, полосы в спектре КД FAD с отрицательным эффектом Коттона при 375 и 277 нм и положительным при 254 и 228 нм обусловлены взаимодействием между электронными переходами в изоаллоксазиновом хромофоре при 375, 268 и 225 нм и адениновом хромофоре при 260 нм; величина эллиптичности

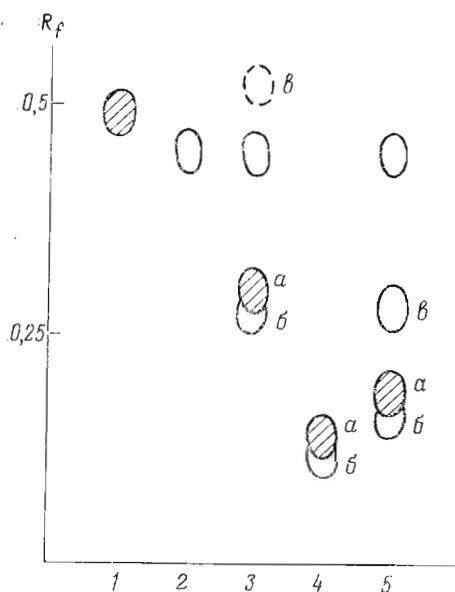


Рис. 3

Рис. 3. Хроматограмма продуктов фотолиза водных растворов: 1 — 8-диметиламино(нор)рибофлавин, 2 — 8-метиламино(нор)рибофлавин (свидетели); 3 — соединение (I) *a* — до фотолиза, *б* — 8-метиламино(нор)флавиномононуклеотид, *в* — 8-метиламино(нор)люмифлавин; 4 — 8-диметиламино(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (VI), *a* — до фотолиза, *б* — 8-метиламино(нор)рибофлавин-5'-дифосфат; 5 — соединение (IV), *a* — до фотолиза, *б* — 8-метиламино(нор)флавинадениндинуклеотид, *в* — 8-метиламино(нор)флавиномононуклеотид. Нефлуоресцирующие вещества заштрихованы

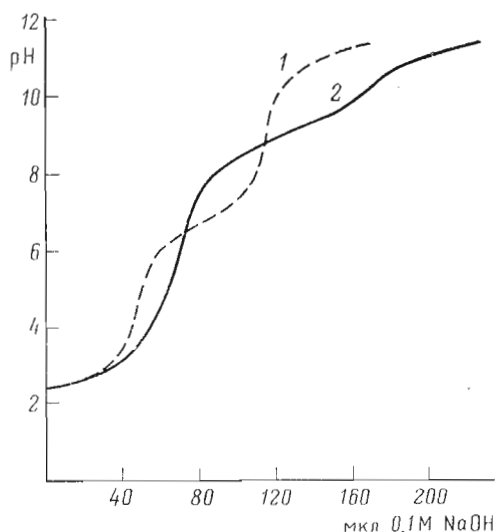


Рис. 4

Рис. 4. Кривые потенциметрического титрования 0,1 M NaOH: 1 — флавиномононуклеотид (I); 2 — динуклеотид (IV)

этих полос уменьшается при нарушении взаимодействия и переходе молекулы в открытую форму (влияние температуры, pH, использование неводных растворителей, изменение длины фосфатной цепи) [9, 10]. Величина эллиптичности при 247 и 270 нм для 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида (IV) в водном растворе значительно больше, чем для соответствующих полос FAD (рис. 2, 2, 4), так что, вероятно, при наличии диметиламиногруппы в положении 8 изоаллоксазинового цикла динуклеотид (IV) также имеет структуру внутримолекулярного комплекса благодаря сближению флавинового и аденинового хромофоров.

Хроматографическая и электрофоретическая подвижности рибофлавина, 8-диметиламино(нор)рибофлавина и их фосфорных эфиров (таблица) связаны с их ионным состоянием.

8-Диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV) подобно 8-диметиламино(нор)рибофлавиону и его мононуклеотиду (I) не флуоресцирует в водном растворе при возбуждении УФ- или видимым светом, чем существенно отличается от FAD, FMN, рибофлавина и его 8-амино- и 8-моноалкиламиноаналогов, для которых характерна интенсивная желто-зеленая флуоресценция ( $\lambda_{\text{макс}}$  520—526 нм).

Фотолиз нефлуоресцирующих нейтральных водных растворов фосфатов 8-диметиламиноизоаллоксазина (I), (IV) и (VI) первоначально протекает с отщеплением одной метильной группы от третичного амина с образованием флуоресцирующих 8-монометиламинопроизводных, которые по спектру поглощения и значению  $R_f$  хроматографии на бумаге отвечают метиламинопроизводным FMN, FAD или рибофлавин-5'-дифосфата. Так,

при фотоллизе рассеянным светом водного нейтрального раствора аналога FAD (IV) в первую очередь происходит отрыв одной N-метильной группы, а при продолжении фотоллиза расщепляется пирофосфатная связь, получается флавиномононуклеотид и затем 8-метиламино(нор)рибофлавин (рис. 3). Фотоллиз 8-диметиламино(нор)флавиномононуклеотида (I) проходит аналогично и приводит также к образованию 8-метиламино(нор)рибофлавина. Кроме того, в небольшом количестве, вероятно, происходит расщепление рибитильной цепи до 8-метиламино(нор)люмифлавина (рис. 3). 8-Диметиламино(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (VI) в результате фотоллиза дает 8-монометиламино(нор)рибофлавин-5'-дифосфат, который при длительном фотоактивировании рассеянным светом практически не изменяется (рис. 3). В процессе фотоллиза происходит постепенное гипсохромное смещение всех максимумов поглощения, особенно длинноволнового, и спектр становится подобным спектру 8-моноалкиламинозамещенным изоаллоксазином ( $\lambda_{\text{макс}}$  255, 306 и 478 нм [5]).

Скорость фотолитического отщепления N-метильной группы различна для моно- и динуклеотидов 8-диметиламино(нор)рибофлавина и убывает в ряду соединений: (VI) > (I) > (IV). 8-Диметиламино(нор)рибофлавин в условиях фотоактивирования рассеянным светом стабилен. Отщепление второй N-метильной группы с образованием изоаллоксазинов с первичной аминогруппой, как по нашим наблюдениям, так и по данным работы [4], не происходит.

8-Диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV) является двухосновой кислотой, однако более слабой, чем 8-диметиламино(нор)флавиномононуклеотид (I); на кривой потенциометрического титрования флавина (IV) (рис. 4) обнаруживаются два перегиба, отвечающие  $pK_a$  5,84 и 10,35.

### Экспериментальная часть

Спектры КД сняты на дихрографе Jobin-Yvon Dichrograph III (Франция) с использованием 1-см кюветы, чувствительность  $5 \cdot 10^{-6}$ . УФ- и видимые спектры сняты на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония); ИК-спектр (суспензия в вазелиновом масле) получен на спектрофотометре Perkin-Elmer 180 (США). Электрофорез проводили на бумаге FN-2 (ГДР) на приборе ЭМИБ (СССР, Киев) при градиенте потенциала 14 В/см, продолжительность электрофореза 3—4 ч. Хроматографию проводили на бумаге FN-2 и FN-8 (ГДР) в восходящем потоке в системах: А — пиридин — изобутиловый спирт — вода — уксусная кислота, 33 : 33 : 33 : 1; Б — *n*-бутиловый спирт — вода — уксусная кислота, 4 : 5 : 1; В — 5% динатрийфосфат в воде. Для электрофореза применяли 0,05 М аммиачно-форматный буфер, рН 5.

8-Диметиламино(нор)флавиномононуклеотид (I) синтезировали по методике [1] и выделяли в чистом виде гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 или G-25 (мелкий); подвижная фаза — вода, скорость потока 1,5 мл/мин; диаметр колонки 5 см; при этом флавины вымывались в последовательности: 8-диметиламино(нор)рибофлавин-5'-дифосфат (VI) — 15%, 5'-монофосфат (I) — 58%, 4'-монофосфат — 7%, 4' : 5'-циклофосфат (V) — 4%, 8-диметиламино(нор)рибофлавин — 6%.

Три-*n*-октиламмониевая соль 8-диметиламино(нор)флавиномононуклеотида (II). Смесь 200 мг мононуклеотида (I), 0,4 мл три-*n*-октиламина и 20 мл безводного этилового спирта кипятили 6 ч, спиртовой раствор отфильтровывали, упаривали в вакууме досуха. Выход соединения (II) 210 мг (61%), темно-красный кристаллический порошок,  $R_f$  0,30 в системе А.

8-Диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (IV). Смесь 210 мг соединения (II) и 210 мг 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиновой соли морфолида АМР (III) [11] тщательно измельчали и обезвоживали трехкратной обработкой абсолютным пиридином (20 мл) с после-

дующим упариванием в вакууме при 30°. Остаток растворяли в 7 мл смеси безводных пиридина и диметилформамида (1 : 1) и выдерживали 20 ч при 50°, охлаждали, упаривали при 30° в вакууме и добавляли раствор 0,5 г NaClO<sub>4</sub> в 10 мл безводного метилового спирта. Через 20 ч при 2—5° выпавший осадок фильтровали, промывали абсолютным метанолом (3 × 20 мл), эфиром, сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход смеси 200 мг, содержащей 52% соединения (IV). На колонку высотой 115 см и диаметром 5 см, наполненную сефадексом G-25, наносили раствор 450 мг этой смеси в 10 мл воды и проводили элюцию водой со скоростью 1,5 мл/мин; первым с колонки вымывалось соединение (IV), затем соединения (I) и (V). Собирали фракции по 30 мл, хроматографировали их на бумаге FN-2 в системе А; объединяли фракции, содержащие только одно пятно с R<sub>f</sub> 0,19, упаривали их в вакууме при 35—40°, остаток растирали с абс. спиртом, центрифугировали, промывали эфиром (3 × 10 мл), сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 110 мг темно-красного кристаллического порошка, содержащего 63—68% 8-диметиламино(нор)флавиадепиндинуклеотида (IV). Смешанные фракции подвергали повторному разделению на сефадексе, в результате чего общий выход соединения (IV) достигал 45%.

На плотную хроматографическую бумагу FN-8, предварительно промытую водой, наносили водный раствор смеси, содержащей соединение (IV), с нагрузкой 1 мг/см. При хроматографировании этой смеси в системе А наблюдаются три зоны красного цвета с R<sub>f</sub> 0,28; 0,38 и 0,46, соответствующие соединениям (IV), (I) и (V). Соотношение компонентов определялось спектрофотометрически после элюции водой, при этом величину экстинкции длинноволнового максимума поглощения принимали равной 3,11·10<sup>4</sup> [4]. Полосу с R<sub>f</sub> 0,28 элюировали водой, упаривали досуха в вакууме при 35—40°, обрабатывали безводным спиртом, эфиром, сушили. Выход соединения (IV) 48%.

*8-Диметиламино(нор)рибофлавин-4' : 5'-циклофосфат (V)*. К 25 мг соединения (I) в 0,2 мл воды и 10 мл пиридина прибавляли 0,5 г дициклогексилкарбодиимида в 5 мл пиридина, перемешивали 24 ч при 20—22°, прибавляли 5 мл воды, фильтровали; маточный раствор экстрагировали эфиром (3 × 2 мл), упаривали досуха, обрабатывали абс. спиртом (1,5 мл), центрифугировали и промывали эфиром (3 × 3 мл). Выход соединения (V) 15 мг, темно-красный кристаллический порошок, R<sub>f</sub> 0,36 в системе А.

Раствор 2 мг соединения (V) в 2 мл 1 М соляной кислоты упаривали досуха при 30°, растворяли в воде, нейтрализовали разбавленным водным аммиаком до pH 6,5; при хроматографировании в системе А обнаруживали два пятна с R<sub>f</sub> 0,30 и 0,33, соответствующие 5'- и 4'-монофосфату (ср. [12]).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фетисова Т. П., Березовский В. М. (1977) Биоорг. химия, 3, 402—404.
2. Otani S., Note Y., Nishina Y., Matsumura Y. (1978) Sixth Inter. Sympos. on Flavins and Flavoproteins, Abstr., 13M2 march 13—17, Osaka, Japan.
3. Otani S., Takatsu M., Nakano M., Kasai S., Miura R., Matsui K. (1975) J. Antibiot., 27, 88—89.
4. Kasai S., Miura R., Matsui K. (1975) Bull. Chem. Soc. Japan, 48, 2877—2880.
5. Березовский В. М., Степанов А. И., Полякова Н. А., Тульчинская Л. С., Куконова А. Я. (1977) Биоорг. химия, 3, 521—528.
6. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Мезенцева М. В., Березовский В. М. (1967) Хим.-фармацевт. ж., 1, 11—15.
7. Kegg S. E. (1945) J. Biol. Chem., 159, 211—213.
8. Беллами Л. (1963) Инфракрасные спектры сложных молекул, с. 461, Изд-во иностр. лит., М.
9. Miles D. W., Urry D. W. (1968) Biochemistry, 7, 2794—2794.
10. Мищенко В. В., Шапиро Т. А., Рубчинская Ю. М., Христианович Д. С., Хомутова Е. Д., Березовский В. М. (1973) Ж. общ. химии, 48, 2547—2551.
11. Moffatt J., Khorana H. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649—653.
12. Scola-Nagelschneider G., Hemmerich P. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 567—577.

Поступила в редакцию  
15.VI.1978



NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXXII. SYNTHESIS  
OF 8-DIMETHYLAMINO(NOR)FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE

LITVAK Z. I., BEREZOVSKII V. M.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow*

8-Dimethylamino(nor)flavin adenine dinucleotide, a FAD analog, has been synthesized from 8-dimethylamino(nor)-FMN tri-*n*-octylammonium salt and 4-morpholine-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium adenosine-5'phosphomorpholidate. The structure of the product obtained was substantiated by CD, IR, UV and visible absorption spectra, by the analysis of chromatographic and electrophoretic properties, as well as of the data on acid hydrolyses. Upon photoactivation of the dinucleotide aqueous solution with scattered light, the elimination of one methyl group from a tertiary amine takes place followed by a cleavage of the pyrophosphate bond.†

---