



УДК 577.164.12.07+577.15.013

## НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

XXXIV \*. СИНТЕЗ 8 $\alpha$ -ОКСИФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА*Литвак Ж. И., Жулина Т. А., Березовский В. М.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

Конденсацией три-*n*-октиламмониевой соли 8 $\alpha$ -оксифлавиномононуклеотида и 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР синтезирован 8 $\alpha$ -оксифлавинадениндинуклеотид. Структура его доказана ИК-, УФ- и видимыми спектрами поглощения, спектрами флуоресценции и КД, хроматографической и электрофоретической подвижностью, а также результатами гидролитического расщепления на мононуклеотиды.

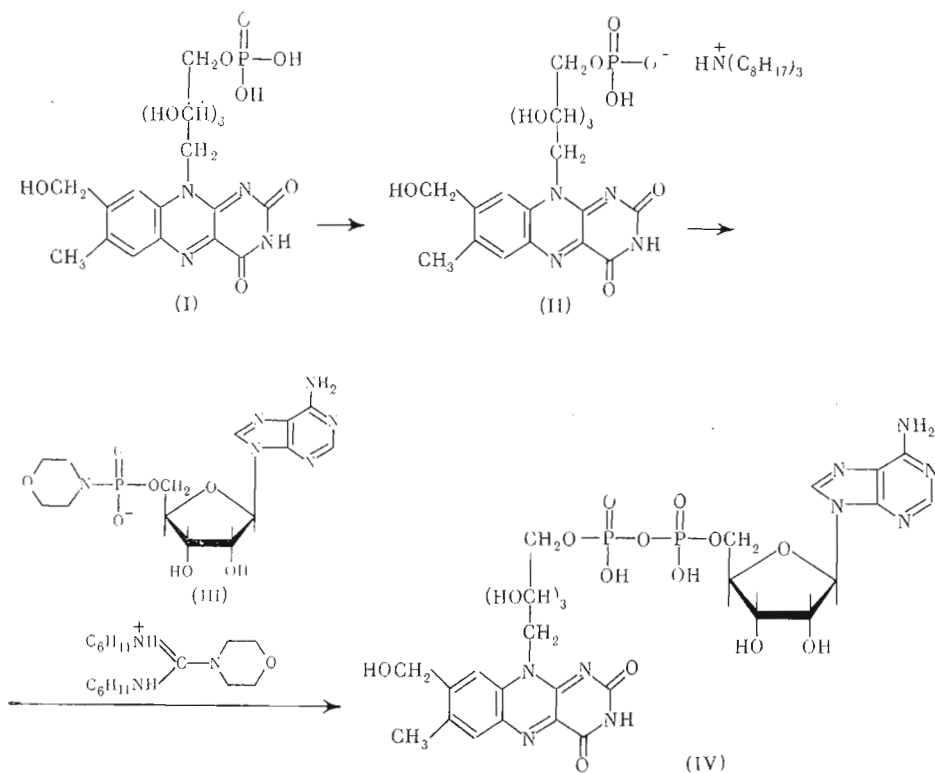
Биосинтез 8 $\alpha$ -замещенных флавинов, выполняющих функции простетической группы типа FAD в сукцинатдегидрогеназе, возможно, происходит в результате конденсации 8 $\alpha$ -окси-FAD с близко расположенным к нему остатком гистидина, входящим в полностью сформированный апофермент [2].

Ранее мы сообщили о синтезе 8 $\alpha$ -оксирибофлавина [3] и 8 $\alpha$ -оксифлавиномононуклеотида [4, 5]. В настоящей работе мы впервые получили 8 $\alpha$ -оксифлавинадениндинуклеотид (IV) синтезом из три-*n*-октиламмониевой соли 8 $\alpha$ -окси-FMN (II) и 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР (III) (см. схему).

8 $\alpha$ -Оксирибофлавин-5'-монофосфат (I) предварительно перевели в H<sup>+</sup>-форму на сильноокислом катионите КУ-2, а затем при взаимодействии с три-*n*-октиламином в кипящем безводном спирте превратили в три-*n*-октиламмониевую соль (II). Последнюю конденсировали с 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой солью морфолида аденозин-5'-монофосфата (III) в среде безводных диметилформамида и пиридина при 50° С в течение 20 ч, в результате чего получили смесь флавинов, содержащую, по данным хроматографии на бумаге, 54% 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) и 27% исходного 5'-монофосфата (I). Одновременно в условиях реакции в присутствии дициклогексилкарбодимида образуются 8 $\alpha$ -оксирибофлавин-4':5'-циклофосфат (~14%) и предположительно эфир «бензохиноидного» бис-8 $\alpha$ -рибофлавин-5'-фосфата (~5%).

Динуклеотид (IV) выделяли из смеси флавинов в виде натриевой соли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 по методу [6], а также препаративной хроматографией на бумаге [7]. Полученные таким образом образцы хроматографически чистого динуклеотида (IV) не содержат флуоресцирующих примесей флавинов и производных аденозина, однако не свободны от неорганических примесей. Содержание 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) не ниже 45%, что определено спектрофотометрически по величине эк-

\* Предыдущее сообщение см. [1].



стинкции длинноволнового максимума поглощения при 450 нм, которую принимали равной экстинкции FAD при этой длине волны ( $1,13 \cdot 10^4$ ).

8 $\alpha$ -Окси-FAD (IV) и его натриевая соль — вещества оранжевого цвета, в водных растворах обладающие интенсивной желто-зеленой флуоресценцией. Строение динуклеотида (IV) доказано его расщеплением на исходные соединения качественным и количественным гидролизом в кислой среде, а также данными электронного спектра поглощения, спектров флуоресценции и КД, ИК-спектра, хроматографической и электрофоретической подвижности.

8 $\alpha$ -Окси-FAD (IV) легко расщепляется в кислой среде: в 0,1 н. соляной кислоте при 20° С через 20 мин с помощью хроматографии на бумаге в присутствии свидетелей идентифицированы 8 $\alpha$ -окси-FMN (I) и аденозин, а после нагревания при 80° С в течение 3 ч в гидролизате количественно определены спектрофотометрическим методом 8 $\alpha$ -оксирибофлавин-5'-фосфат (I) и по реакции с орцином [8] — *D*-рибоза, образующаяся в результате расщепления AMP. Найденное соотношение 8 $\alpha$ -окси-FMN (I) к AMP составляет 1:0,93 (теоретически 1:1), что подтверждает структуру динуклеотида.

В ИК-спектре 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) наблюдается интенсивная полоса 943 см<sup>-1</sup>, отвечающая асимметричным валентным колебаниям P—O—P-пирофосфатной связи динуклеотида [9].

Спектр поглощения в УФ- и видимой области 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) в воде имеет  $\lambda_{\text{макс}}$  ( $\epsilon \cdot 10^{-4}$ ) 263 (5,38), 367 (1,23), 450 (1,13) и подобен спектру FAD. Вследствие введения в молекулу дополнительного хромофора в спектре соединения (IV) происходит bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения на 5 нм по сравнению с 8 $\alpha$ -окси-FMN (I). Кроме того, за счет взаимодействия полос поглощения флавинового и аденинового хромофоров имеет место увеличение экстинкции коротковолновой полосы поглощения в ~1,2 раза по сравнению с мононуклеотидом (I), так же как это наблюдается при сравнении спектров FAD и FMN. С другой стороны,

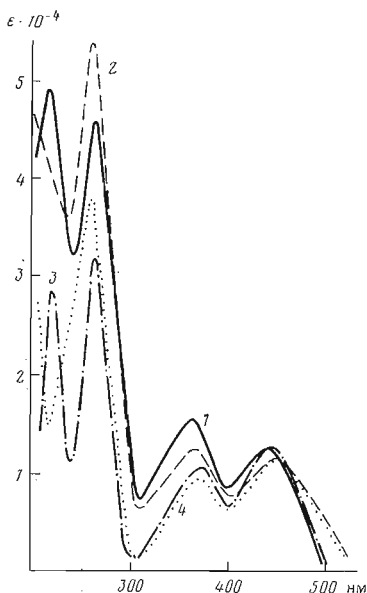


Рис. 1

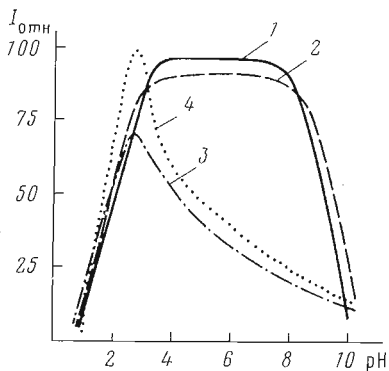


Рис. 3

наличие заместителя в  $8\alpha$ -положении молекулы FAD приводит к характерным изменениям спектра в УФ-области (рис. 1). В спектре поглощения  $8\alpha$ -окси-FAD (IV) наблюдается гипсохромный сдвиг второй полосы поглощения ( $\lambda_{\text{макс}}$  375 нм) по сравнению со спектром FAD на 8 нм (до 367 нм), что типично для  $8\alpha$ -замещенных флавинов. Кроме того, возрастает соотношение оптической плотности коротковолновых максимумов поглощения к длинноволновому. Так, для флавина (IV) соотношение  $\epsilon_{263}/\epsilon_{450}=4,88$  и  $\epsilon_{367}/\epsilon_{450}=1,21$ , в то время как для FAD аналогичные соотношения составляют 3,34 и 0,82 соответственно. Такие же изменения соотношений спектральных полос отмечались и при сравнении спектров  $8\alpha$ -окси-FMN (I) и FMN [3].

Спектр кругового дихроизма  $8\alpha$ -окси-FAD (IV) в воде близок спектру FAD и отличается от спектра  $8\alpha$ -окси-FMN (I) и FMN (рис. 2). Спектр КД исходного  $8\alpha$ -окси-FMN (I) в воде содержит полосы с отрицательным эффектом Коттона при 233 ( $\theta -3800$ ), 268 ( $\theta -5400$ ) и 440 нм ( $\theta -800$ ), а также полосу с положительным эффектом Коттона при 338 нм ( $\theta +3800$ ), отвечающие электронным переходам в изоаллоксазинновом хромофоре при 218, 266, 365 и 445 нм. Кроме того, наблюдаются низкоинтенсивные полосы при 290–310 и 380–400 нм. Такой же спектр имеет и  $8\alpha$ -оксирибофлавин – 235 нм ( $\theta -5800$ ), 270 нм ( $\theta -7900$ ), 338 нм

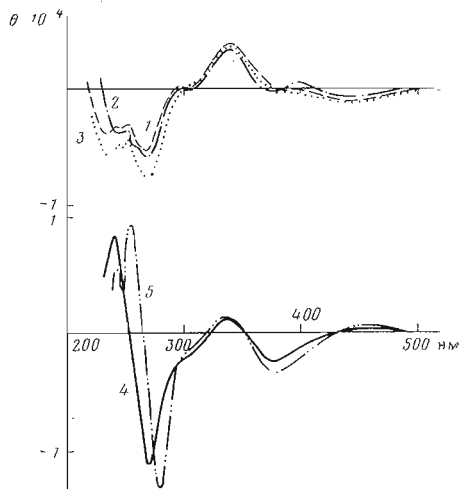


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях в воде: 1 –  $8\alpha$ -оксифлавиномононуклеотид (I); 2 –  $8\alpha$ -оксифлавинадениндинуклеотид (IV); 3 – FMN; 4 – FAD

Рис. 2. Спектры КД в воде: 1 –  $8\alpha$ -оксифлавиномононуклеотид (I); 2 – FMN; 3 –  $8\alpha$ -оксирибофлавин; 4 –  $8\alpha$ -оксифлавинадениндинуклеотид (IV); 5 – FAD

Рис. 3. Зависимость флуоресценции флавинов от pH (с 0,01 г/л,  $\lambda_{\text{возб}}$  445 нм, данные некорректированы): 1 –  $8\alpha$ -оксифлавиномононуклеотид (I); 2 – FMN; 3 –  $8\alpha$ -оксифлавинадениндинуклеотид (IV); 4 – FAD

## Хроматографическая и электрофоретическая подвижность аналогов FMN и FAD

Соединение	$R_f$ в системах		$E_f$ , см	Соединение	$R_f$ в системах		$E_f$ , см
	А	Б			А	Б	
8 $\alpha$ -Окси-FMN	0,30	0,62	4,0	8 $\alpha$ -Окси-FAD	0,21	0,40	4,7
FMN	0,29	0,60	4,0	FAD	0,20	0,38	4,7

( $\theta +3300$ ) и 440 нм ( $\theta -1000$ ). Эти спектры близки спектру КД FMN и отличаются лишь коротковолновым сдвигом в ближней УФ-области на 10–15 нм.

Спектр КД динуклеотида (IV) состоит из интенсивной пары полос противоположного знака (положительной при 242 нм ( $\theta +8100$ ) и отрицательной при 268 нм ( $\theta -11400$ ) с плечом при 307 нм ( $\theta -2500$ )), полос средней интенсивности (положительной при 338 нм ( $\theta +1350$ ) и отрицательной при 375 нм ( $\theta -2600$ )) и очень слабой полосы при 460 нм ( $\theta +300$ ). Наличие экстремумов при 242, 268 и 375 нм, связанных, вероятно, с взаимодействием между электронными переходами в изоаллоксазиновом хромофоре при 263 и 367 нм и адениновым хромофором при 260 нм, дает основание полагать, что в нейтральных водных растворах 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) может находиться в «стэкинг»-конформации и иметь структуру внутримолекулярного комплекса, аналогичного FAD [10]. Низкоинтенсивные полосы в спектре КД 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) при 307, 338 и 460 нм, по-видимому, связаны с  $n \rightarrow \pi'$ -переходами электронов неподеленных пар в кето- и иминогруппах.

Коротковолновый сдвиг экстремумов FAD в области 260–280 нм на  $\sim 10$  нм в спектре КД 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) наблюдается также и в спектрах 8 $\alpha$ -окси-FMN (I) и 8 $\alpha$ -оксирибофлавина по сравнению с FMN и, вероятно, связан с наличием гидроксила в 8 $\alpha$ -положении флавина.

Динуклеотид (IV) в нейтральном водном растворе обладает желто-зеленой флуоресценцией с  $\lambda_{\text{макс}}$  523 нм, однако интенсивность флуоресценции составляет  $\sim 25\%$  интенсивности флуоресценции 8 $\alpha$ -окси-FMN. Аналогичное тушение флуоресценции известно и для FAD по сравнению с FMN и рибофлавином [11]. В то время как флуоресценция 8 $\alpha$ -окси-FMN (I) и FMN постоянна в интервале pH 3–8, интенсивность флуоресценции 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) и FAD достигает максимального значения при pH 2,9 и резко падает при повышении pH (рис. 3). Эти данные также подтверждают предположение, что в нейтральных водных растворах 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV), так же как и FAD, существует в виде внутримолекулярного комплекса, причем при понижении pH равновесие сдвигается в сторону открытой формы [12].

По своей хроматографической и электрофоретической подвижности 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV) очень близок к FAD, причем хроматографическая подвижность динуклеотидов в применяемых системах существенно меньше, а электрофоретическая подвижность несколько больше, чем у FMN и его 8 $\alpha$ -оксипроизводного соответственно (таблица).

В качестве побочного продукта в синтезе 8 $\alpha$ -окси-FAD кроме описанного нами ранее 8 $\alpha$ -оксирибофлавин-4' : 5'-циклофосфата [3] получается до 5% соединения красного цвета, хроматографически и электрофоретически неподвижного, имеющего в спектре поглощения в УФ- и видимой области две полосы с  $\lambda_{\text{макс}}$  264 и 484 нм. Подобные хроматографические и спектральные свойства присущи димерам флавинов, образующимся в безводных условиях по 8 $\alpha$ -положению — бензохиноидному бисрибофлавиину [13] и бензохиноидному бисрибофлавин-5'-дифосфату [14] ( $\lambda_{\text{макс}}$  262 и 490 нм). Эти данные позволяют предполагать, что полученное нами соединение имеет структуру эфира «бензохиноидного» бис-8 $\alpha$ -рибофлавин-5'-фосфата. В его спектре КД имеются полосы с отрицательным эффектом

Коттона при 232 ( $\theta -4000$ ), 255 ( $\theta -5000$ ) и 490 нм ( $\theta -700$ ) и положительным при 340 нм ( $\theta +550$ ), что свидетельствует о том, что это соединение является производным FMN, а не FAD.

### Экспериментальная часть

УФ- и видимые спектры поглощения сняты на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония). ИК-спектр (суспензия в вазелиновом масле) получен на спектрофотометре Perkin-Elmer 180 (США). Спектры флуоресценции сняты на приборе Hitachi MPF-2A; концентрация 0,01 г/л, длина волны возбуждения 445 нм; использовали следующие буферные растворы: глицин — 0,2 М HCl (pH 1,4–3,6), 0,2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  — 0,2 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 4–5,6), 0,1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 6–8), 1 М  $\text{NaHCO}_3$  — 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 8–10). Спектры КД сняты на дихрографе Jobin-Yvon Dichrograph III (Франция) в кюветах с длиной оптического пути 1 см, чувствительность  $2 \cdot 10^{-6}$ . Электрофорез проводили на бумаге FN-2 (ГДР) на приборе ЭМИБ (СССР, Киев), градиент потенциала на бумаге 14 В/см, продолжительность электрофореза 3–4 ч. Для электрофореза применяли 0,05 М аммиачно-форминатный буфер, pH 5. Хроматографию проводили на бумаге FN-2 и FN-8 (ГДР) в восходящем потоке в системах растворителей: А — пиридин — изобутиловый спирт — вода — уксусная кислота, 33 : 33 : 33 : 1; Б — 5% динатрийфосфат (в воде).

*Три-*n*-октиламмониевая соль 8 $\alpha$ -оксифлавиномаонуклеотида (II)*. Смесь 460 мг 8 $\alpha$ -оксифлавиномаонуклеотида (I) [4], предварительно переведенного в  $\text{H}^+$ -форму на смоле КУ-2Х8, 0,8 мл три-*n*-октиламина и 40 мл безводного этилового спирта кипятили 6 ч, затем раствор отфильтровывали, упаривали в вакууме (40°С) досуха. Выход соединения (II) 400 мг (49,8%), оранжевый кристаллический порошок,  $R_f$  0,30 в системе А.

*8 $\alpha$ -Оксифлавинадениндинуклеотид (IV)*. Смесь 400 мг соединения (II) и 400 мг 4-морфолин- $\text{N},\text{N}'$ -дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида AMP (III) [15] тщательно измельчали и для обезвоживания обрабатывали абс. пиридином (3×30 мл) с последующим упариванием в вакууме при 30°С. Остаток растворяли в 3 мл смеси безводных пиридина и диметилформамида (1 : 1) и выдерживали 20 ч при 50°С, охлаждали, упаривали в вакууме при 30°С и добавляли раствор 0,7 г хлорнокислого натрия в 10 мл безводного метилового спирта. Выпавший осадок оставляли на 20 ч при 2–5°С, отфильтровывали, промывали безводным метиловым спиртом (3×30 мл), эфиром, сушили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получили 400 мг осадка желтого цвета, в котором при хроматографировании на бумаге FN-2 в системе А обнаружены желтые флуоресцирующие пятна с  $R_f$  0,21; 0,30 и 0,40, соответствующие 8 $\alpha$ -окси-FAD (IV), 8 $\alpha$ -окси-FMN (I) и 8 $\alpha$ -оксирибофлавин-4' : 5'-циклофосфату, а также пятно красного цвета на старте, предположительно отвечающее продукту конденсации двух молекул 8 $\alpha$ -окси-FMN по гидроксилам 8 $\alpha$ -положения. Спектрофотометрическим методом после элюции определено соотношение компонентов 54 : 27 : 14 : 5 соответственно. На плотную хроматографическую бумагу FN-8, предварительно промытую водой, наносили водный раствор полученной смеси флавинов, содержащей соединение (IV), с нагрузкой 1 мг/см. После хроматографирования в системе А полосу с  $R_f$  0,28 элюировали водой, упаривали досуха в вакууме при 40°С, обрабатывали безводным спиртом, эфиром, сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Получили соединение (IV) — оранжевый кристаллический порошок, выход 52%. Гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 (мелкий) соединение (IV) выделяли с выходом 45–50% (подвижная фаза — вода, скорость потока 1,5 мл/мин; диаметр колонки 5 см, высота 115 см); первым с колонки вымывалось соединение (IV), затем (I). Фракции, которые при хроматографировании на бумаге FN-2 в системе А имели одно пятно с  $R_f$  0,21, упаривали в вакууме при 40°С, растирали с безводным спиртом, промывали эфиром, сушили. Смешанные

фракции, содержащие смесь соединений (IV) и (I), подвергали повторному разделению.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глебова Г. Д., Березовский В. М. (1980) Биоорг. химия, 6, 51–61.
2. Kearney E. B., Kenney W. C. (1974) Horiz. Biochem. and Biophys., 1, 62–96.
3. Жилина Т. А., Шейман Б. М., Мельникова Л. М., Березовский В. М. (1976) Биоорг. химия, 2, 1103–1106.
4. Жилина Т. А., Березовский В. М. (1977) Биоорг. химия, 3, 516–520.
5. Zhilina T. A., Berezovskii V. M. (1977) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 23, 265–271.
6. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Мезенцева М. В., Березовский В. М. (1967) Хим.-фармацевт. ж., 1, 11–15.
7. Литвак Ж. И., Березовский В. М. (1979) Биоорг. химия, 5, 47–55.
8. Kerr S. E. (1945) J. Biol. Chem., 159, 211–213.
9. Беллами Л. (1963) в кн.: Инфракрасные спектры сложных молекул, с. 461, Изд-во иностр. лит., М.
10. Miles D. W., Urry D. W. (1968) Biochemistry, 7, 2791–2794.
11. Cerletti K., Siliprandi N. (1958) Arch. Biochem. and Biophys., 76, 214–217.
12. Weber G. (1950) Biochem. J., 47, 114–119.
13. Hemmerich P., Prijs B., Erlenmeyer H. (1959) Helv. chim. acta, 42, 2164–2177.
14. Березовский В. М., Адаева Р. В., Григорьева Н. Д. (1968) Ж. общ. химии, 38, 1704–1715.
15. Moffat J., Khorana H. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649–653.

Поступила в редакцию  
21.XII.1979

После доработки  
14.II.1980

#### NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXXIV. SYNTHESIS OF 8 $\alpha$ -HYDROXYFLAVINE ADENINE DINUCLEOTIDE

LITVAK Z. I., ZHILINA T. A., BEREZOVSKII V. M.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow*

8 $\alpha$ -Hydroxyflavine adenine dinucleotide has been synthesized from 8 $\alpha$ -hydroxy-FMN tri-*n*-octylammonium salt and 4-morpholine-N,N'-dicyclohexylcarboxamidinium adenosine 5'-phosphomorpholidate. The structure of the product obtained was proved by CD, IR, UV and visible absorption and fluorescence spectra, by the analysis of chromatographic and electrophoretic properties, as well as of the data on acid hydrolysis.