



УДК 577.164.12.07+577.15.013

НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

XXXV*. СИНТЕЗ И ТАУТОМЕРИЯ
8-ОКСИ (НОР) ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА

Глебова Г. Д., Березовский В. М.

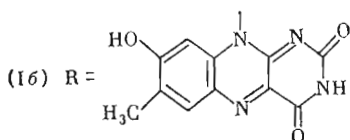
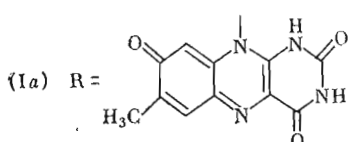
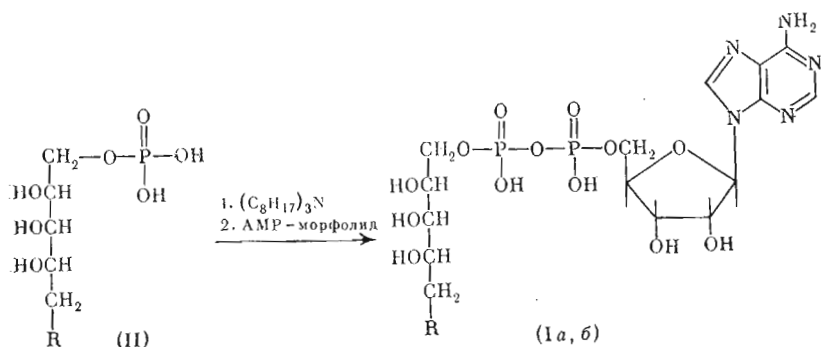
Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Конденсацией 8-окси(нор)флавиномононуклеотида в виде его три-*n*-октиламмониевой соли и 4-морфолин-*N,N'*-дидиклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР впервые синтезирован 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотид, образующий простетическую группу двух флавопротеидов *Peptostreptococcus elsdenii*. Его строение подтверждено данными ИК- и электронного спектров поглощения, спектров флуоресценции и КД. В водном растворе вещество находится в двух таутомерных формах: бензохиноидной 8-оксоформе при pH 6,6 и выше и в фенольной 8-оксиформе при pH 4,0 и ниже.

В настоящем исследовании мы впервые синтезировали 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотид (I), природный флаavin, образующий простетическую группу реакционного центра НАДН-дегидрогеназы (КФ 1.6.99.3) [2] и электронпереносящего флавопротеида [3] *Peptostreptococcus elsdenii*. 8-Окси(нор)-FAD мы получили конденсацией 8-окси(нор)флавиномононуклеотида (II) в виде его три-*n*-октиламмониевой соли с 4-морфолин-*N,N'*-дидиклогексилкарбоксамидиниевой солью морфолида АМР. Строение динуклеотида (I) как 7-метил-8-окси-10-(1'-*D*-рибитил)-5'-(дифосфоадениозин)изоаллоксазина подтверждено данными ИК-спектра (в области 940 см⁻¹ имеется интенсивная полоса, характерная для асимметричных валентных колебаний Р-О-Р-пирофосфатной связи [4]), а также батохромным сдвигом длинноволновой полосы электронного спектра поглощения, возрастанием соотношения коротковолнового и длинноволнового максимумов поглощения по сравнению с мононуклеотидом (II), характерным спектром кругового дихроизма.

8-Окси(нор)-FAD (I) в водных растворах в зависимости от pH существует в двух таутомерных формах — (Ia) и (Iб), аналогично 8-окси(нор)рибофлавиину [5] и флавиномононуклеотиду (II) [6]. Отнесение таутомерных форм 8-окси(нор)-FAD (I) мы сделали аналогично 8-окси(нор)рибофлавиину [5]. Таутомерная форма (Ia) представляет собой «бензохиноидный» 8-оксо(нор)-FAD, который при pH 7,4 характеризуется спектром поглощения с $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 253 (61,6), 265 пл (35,0), 304 (9,8) и 477 (36,0). «Фенольная» 8-оксиформа (Iб) образуется при pH 2–3,5 и имеет полосы с $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 241 (39,0), 261 (45,8),

* Предыдущее сообщение см. [1].



280 нл (18,8) и 445 (26,3). Для динуклеотида (I) при изменении pH от 10 до 2 происходит плавный переход в коротковолновую область всех полос поглощения. При этом наблюдаются четкие изобестические точки при 450, 330, 289 и 243 нм, отражающие таутомерный переход бензохиноидного 8-оксо(нор)-FAD (1a) в фенольную оксиформу (1б).

В разбавленных водных растворах динуклеотид (I) имеет оранжевую окраску и в УФ-свете обладает интенсивной желто-зеленой флуоресценцией, аналогичной флуоресценции FAD. Таутомерные формы имеют различные полосы флуоресценции — $\lambda_{\text{фл}}$ 528 нм для 8-оксоформы (1a) при pH 6,6–7,4 и 506 нм для 8-оксиформы (1б) при pH 3,5. Флуоресценция динуклеотида (I) в воде зависит от концентрации водородных ионов и отражает взаимное таутомерное превращение (1a) \rightleftharpoons (1б), в то время как флуоресценция FAD остается одной и той же в широком диапазоне pH 2–12.

Интенсивность флуоресценции в воде обеих форм динуклеотида (1a) и (1б) составляет ~20% от интенсивности флуоресценции мононуклеотида (II), аналогично тому, как это имеет место для FAD по сравнению с FMN [7, 8]. Она находится в характерной зависимости от pH водного раствора (рис. 1). Наибольшую интенсивность флуоресценции имеет 8-окси(нор)-FAD (1б) при pH 3; интенсивность постепенно уменьшается по мере таутомерного перехода этой формы в 8-оксо(нор)-FAD (1a) и в пределах pH 5–10 остается на одном и том же уровне в отличие от FAD, для которого характерно увеличение тушения флуоресценции при увеличении pH. Данные электронного спектра поглощения динуклеотида (I) коррелируют с данными флуоресценции и однозначно свидетельствуют о том, что в физиологических условиях 8-окси(нор)-FAD (I) находится в 8-оксохиноидной форме (1a).

Спектр КД водных растворов динуклеотида (I) выявляет две таутомерные формы этого соединения (рис. 2). При pH 4,9, т. е. при равном соотношении таутомеров, проявляется суммированное влияние обеих форм (1a) и (1б).

Экспериментальная часть

Хроматографический анализ проводили на бумаге FN-2 и FN-8 (ГДР) в восходящем потоке в системах: пиридин — изобутанол — вода — уксусная кислота, 33 : 33 : 33 : 1 (А); ацетатный буферный раствор, pH 3,5 (Б); фосфатный буферный раствор, pH 8,2 (В). Электронные спектры поглощения сняты на спектрофотометре EPS-3Т фирмы Hitachi, спектры флуо-

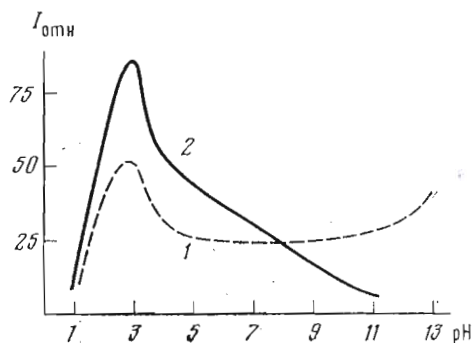


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции флавинов от pH водного раствора: 1 — 8-окси(нор)-FAD; 2 — FAD (с 10 мг/л, $\lambda_{\text{возб}}$ 445 нм)

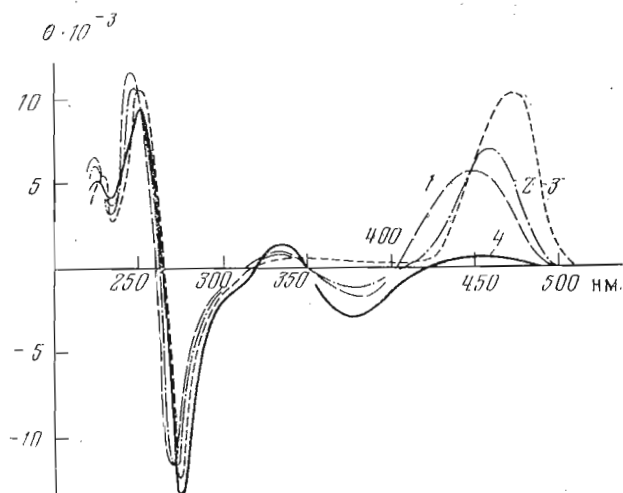


Рис. 2. Спектры КД таутомерных форм 8-окси(нор)-FAD (I) в воде: 1 — pH 3,5 (1б); 2 — pH 4,9; 3 — pH 7,4 (1а); 4 — FAD при pH 7,4

ресценции ($\lambda_{\text{возб}}$ 445 нм) — на спектрофлуориметре MPF-2A фирмы Hitachi. Электрофорез проводили на бумаге FN-2 (ГДР) на приборе ЭМИБ (СССР, Киев) при pH 3,5 (система Б) и pH 8,2 (система В), градиент потенциала 15 В/см, продолжительность электрофореза 2,5 ч. Спектры КД сняты на дихрографе «Jobin-Yvon Dichrograph III» (Франция), чувствительность $5 \cdot 10^{-6}$, концентрация растворов $(0,8-1,0) \cdot 10^{-4}$ М, длина оптического пути 1 см.

*Три-*n*-октил-аммониевая соль 8-окси(нор)флавиномононуклеотида.* Смесь 300 мг 8-окси(нор)-FMN (II) [6], 0,6 мл три-*n*-октиламина и 30 мл абсолютного этилового спирта кипятили 6 ч, осадок непрореагировавшего соединения (II) отфильтровывали и упаривали в вакууме досуха. Выход 300 мг (58%), кристаллический порошок коричневого цвета; R_f 0,25 в системе А.

8-Окси(нор)флавинадениндинуклеотид (I). Смесь 100 мг три-*n*-октил-аммониевой соли соединения (II) и 100 мг 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли морфолида АМР [9] тщательно измельчали и обезвоживали трехкратной обработкой абсолютным пиридином (15 мл) с последующим упариванием в вакууме при 30° С. Остаток растворяли в 4 мл смеси безводных пиридина и диметилформамида (1 : 1) и выдерживали

вали 20 ч при 50°С. Реакционный раствор охлаждали до 10–12°С и добавляли раствор 0,3 г NaClO₄ в 5 мл метилового спирта. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали метиловым спиртом, эфиром, сушили в вакууме над P₂O₅. Выход смеси флавинов 90 мг. Содержание соединения (I) 50%.

На плотную хроматографическую бумагу FN-8, предварительно промытую водой, наносили водный раствор смеси фосфатов с нагрузкой 1–1,5 мг/мм. Хроматографирование вели в восходящем потоке в системе А. Получали несколько полос флавинов: две оранжевые зоны, из которых весьма интенсивная полоса с R_f 0,25 соответствовала непрореагировавшему исходному соединению (II), а полоса с низкой интенсивностью с R_f 0,27, по-видимому, отвечала 8-окси(нор)рибофлавин-4'-фосфату [6]; две полосы желтого цвета, одна из них, с R_f 0,34, отнесена к 8-окси(нор)рибофлавин-4',5'-циклофосфату, а другая, с R_f 0,18, соответствовала динуклеотиду (I). Эту полосу вырезали, вещество элюировали водой, упаривали досуха в вакууме при 35–40°С, а полученный остаток высущивали двукратной обработкой абсолютным этиловым спиртом с последующим упариванием в вакууме. Получали оранжевое вещество с содержанием соединения (I) 60–70%; R_f в системах: А – 0,18; Б – 0,57; В – 0,83. E, см, в системах: Б – +3,0; В – +5,6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Березовский В. М. (1980) Биоорган. химия, 6, 1536–1541.
2. Ghisla S., Mayhew S. G. (1973) J. Biol. Chem., 248, 6568–6570.
3. Ghisla S., Mayhew S. G. (1976) Eur. J. Biochem., 63, 373–390.
4. Беллами Л. (1963) Инфракрасные спектры сложных молекул, с. 461, Изд-во иностр. лит., М.
5. Глебова Г. Д., Кириллова Н. И., Березовский В. М. (1979) Ж. общ. химии, 49, 1884–1898.
6. Глебова Г. Д., Березовский В. М. (1980) Биоорган. химия, 6, 51–61.
7. Cerletti K., Siliprandi N. (1958) Arch. Biochem. and Biophys., 76, 214–217.
8. Miles D. W., Urry D. W. (1968) Biochemistry, 7, 2791–2794.
9. Moffat J., Khorana H. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649–653.

Поступила в редакцию
21.III.1980

После доработки
16.V.1980

NUCLEOSIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXXV. SYNTHESIS AND TAUTOMERISM OF 8-HYDROXY(NOR)FLAVINE ADENINE DINUCLEOTIDE

GLEBOVA G. D., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

8-Hydroxy(nor)flavine adenine dinucleotide, a prosthetic group of two flavoproteins from *Peptostreptococcus elsdenii*, has been synthesized from 8-hydroxy(nor)flavine mononucleotide tri-*n*-octylammonium salt and 4-morpholine-N,N'-dicyclohexylcarboxamidinium adenosine 5'-phosphomorpholidate. The structure of the product obtained was confirmed by CD, IR, UV and visible absorption and fluorescence spectra. In aqueous solution it occurs as two tautomeric forms: «benzoquinoid» 8-oxoform at pH 6,6 and «phenolic» 8-hydroxyform at pH 4,0 and below.