# COMPREHENSIVE ORGANIC CHEMISTRY

*The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*

CHAIRMAN AND DEPUTY CHAIRMAN OF THE EDITORIAL BOARD
SIR DEREK BARTON, F.R.S.
AND
W. DAVID OLLIS, F.R.S.

**Volume 5 Biological Compounds**

*Edited by* E. HASLAM
UNIVERSITY OF SHEFFIELD

PERGAMON PRESS
OXFORD · NEW YORK · TORONTO · SYDNEY · PARIS FRANKFURT

# ОБЩАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ТОМ 10

## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ

Перевод с английского
канд-ов хим. наук
В. И. БЕТАНЕЛИ, А. А. КОСТА, С. Н. КОЧЕТКОВА

Под редакцией академика
Н. К. КОЧЕТКОВА
и канд. хим. наук М. А. ЧЛЕНОВА

МОСКВА
«ХИМИЯ» 1986

УДК 547

**Общая** органическая химия/Под ред. Д. Бартона и У. Д. Оллиса. Т. 10. Нуклеиновые кислоты, аминокислоты, пептиды, белки/Под ред. Е. Хаслама.— Пер. с англ./Под ред. Н. К. Кочеткова и М. А. Членова. — М.: Химия, 1986 — 704 с., ил.

Десятый том перевода настоящего многотомного издания посвящен важнейшим классам природных соединений — нуклеиновым кислотам и их компонентам, аминокислотам, пептидам, белкам.

Издание предназначено для научных работников, инженеров-химиков, работающих на предприятиях химической, нефтехимической и других отраслей промышленности, для преподавателей и аспирантов химических и химико-технологических вузов, для биохимиков и биологов.

704 с., 33 табл., 72 рис., 1556 литературных ссылок.

**О** $\frac{1803000000\text{-}141}{050(01)\text{-}86}$ **свод. пл. подписных изд. 1986 г.**

©1979 Pergamon Press Ltd.

© Перевод на русский язык. Издательство «Химия», 1986 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

**Предисловие к тому 5** 11

ЧАСТЬ 21. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ВВЕДЕНИЕ. *Е. Хаслем* 13

21.1. Вступление 13
21.2. Синтезы по биогенетическому образцу 16
21.3. Стереоспецифичность ферментативных реакций 24
*Литература* 30

ЧАСТЬ 22. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ 32

**22.1. Введение** *Г. М. Блэкборн* 32

22.1.1. Ранние структурные исследования нуклеиновых кислот 33
22.1.2. Структура ДНК 35
22.1.2.1. Выделение и характеристика ДНК 35
22.1.2.2. Первичная структура ДНК 36
22.1.2.3. Вторичная структура ДНК 42
22.1.2.4. Третичная структура ДНК 47
22.1.3. Структура РНК 53
22.1.3.1. Выделение и характеристика РНК 53
22.1.3.2. Первичная структура РНК 55
22.1.3.3. Вторичная структура РНК 60
22.1.3.4. Третичная структура РНК 63
*Литература* 66

**22.2. Нуклеозиды.** *Р. Т. Уокер* 68

22.2.1. Распространение, выделение и разделение нуклеозидов 70
22.2.1.1. Бумажная и тонкослойная хроматография 72
22.2.1.2. Ионообменная хроматография 73
22.2.1.3. Электрофорез 74
22.2.1.4. Гель-фильтрация 74
22.2.1.5. Газожидкостная хроматография 74
22.2.1.6. Жидкостная хроматография высокого давления 75
22.2.2. Физико-химические свойства 76
22.2.3. Химический синтез нуклеозидов 76
22.2.3.1. Реакции конденсации 77
22.2.3.2. Трансгликозилирование и другие реакции 86
22.2.3.3. Создание гетероциклического основания после гликозилирования 89
22.2.3.4. Взаимопревращения природных нуклеозидов 95
22.2.3.5. Циклонуклеозиды 98
22.2.3.6. С-Нуклеозиды 101
22.2.3.7. Нуклеозиды с разветвленными углеводными остатками 104
22.2.3.8. Нуклеозиды с ненасыщенными и эпоксиуглеводными остатками 106
22.2.3.9. Нуклеозиды с ациклическими углеводными остатками и *L*-нуклеозиды 108
22.2.4. Химические реакции нуклеозидов 110
22.2.4.1. Гидролиз гликозидной связи 110
22.2.4.2. Окисление 111
22.2.4.3. Ацилирование 114
22.2.4.4. Алкилирование 116
22.2.4.5. Образование ацеталей 117
22.2.4.6. Синтез и свойства некоторых пиримидиновых (в частности, 5-замещенных) нуклеозидов 119
*Литература* 125

**22.3. Нуклеотиды и родственные органические фосфаты.** *Д. В. Хатчинсон* 131

22.3.1. Общие свойства природных фосфатов 131
22.3.2. Нуклеофильные реакции фосфорных эфиров и ангидридов 140
22.3.3. Получение фосфорных кислот, амидов, ангидридов и эфиров 153
22.3.4. Биосинтез нуклеотидов 171
*Литература* 174

**22.4. Нуклеиновые кислоты: структура, определение и синтез.** *Г. М. Блекборн* 177

22.4.1. Химический синтез дезоксирибоолигонуклеотидов 177
22.4.1.1. Синтез через фосфодиэфиры 177
22.4.1.2. Синтез через фосфотриэфиры 182
22.4.1.3. Синтез с использованием твердофазной подложки 183
22.4.2. Химический синтез рибоолигонуклеотидов 184
22.4.2.1. Синтез через фосфодиэфиры 185
22.4.2.2. Синтез через фосфотриэфиры 185
22.4.2.3. Синтез с использованием ферментативно-катализируемого фосфорилирования 187
22.4.3. Определение последовательности ДНК 188
22.4.4. Определение последовательности РНК 193
*Литература* 196

**22.5. Нуклеиновые кислоты: структура и функция.** *Г. М. Блекборн* 197

22.5.1. Репликация нуклеиновых кислот 198
22.5.1.1. Репликация двутяжевых ДНК 198
22.5.1.2. Репликация вирусных нуклеиновых кислот 200
22.5.2. Транскрипция ДНК в РНК 201
22.5.2.1. Биосинтез мРНК: транскрипция 201
22.5.2.2. Контроль транскрипции 203
22.5.3. Трансляция мРНК в белок 206
22.5.3.1. Функция транспортной РНК и генетический код 206
22.5.3.2. Роль рибосомы 208
22.5.3.3. Генетический код в работе 210
22.5.4. Генная инженерия 213
*Литература* 215

ЧАСТЬ 23. БЕЛКИ: АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ 216

**23.1. Введение.** *Е. Хаслем* 216

23.1.1. Природа белков 216
23.1.2. Классификация, функция и структура 220
*Литература* 224

**23.2. Аминокислоты, найденные в белках.** *П. М. Харди* 225

23.2.1. Структурные данные 225
23.2.1.1. Генетически кодируемые аминокислоты 225
23.2.1.2. Другие аминокислоты, найденные в кислотных гидролизатах белков 227
23.2.2. Гидролиз белков и пептидов до аминокислот 231
23.2.3. Общие методы синтеза рацемических *C*-алкил-α-аминокислот 233
23.2.3.1. Аминирование карбоксильных компонент 233
23.2.3.2. *C*-алкилирование производных α-аминокислот 234
23.2.3.3. Карбоксилирование аминокомпонент 237
23.2.3.4. Методы, основанные на перегруппировках 239
23.2.4. Получение энантиомеров *C*-алкил-α-аминокислот 240
23.2.4.1. Асимметрический синтез 240
23.2.4.2. Разделение рацематов 244
23.2.5. Аминокислоты, меченные изотопами 247
23.2.5.1. Изотопы водорода 247
23.2.5.2. Изотопы углерода и азота 250
*Литература* 253

**23.3. Пептиды и первичная структура белков.** *Д. Т. Элмор* 256

23.3.1. Общая стратегия определения первичной структуры белков 256
23.3.2. Аминокислотный анализ белков 259
23.3.3. Расщепление дисульфидных связей 262
23.3.4. Определение концевых групп 264
23.3.4.1. Определение *N*-концевых групп 264
23.3.4.2. Определение *C*-коицевых групп 272
23.3.5. Селективные химические методы расщепления пептидных связей 273
23.3.6. Ферментативные методы расщепления пептидных связей 274
23.3.7. Определение аминокислотной последовательности с помощью масс-спектрометрии 278
23.3.8. Локализация дисульфидных связей 279
23.3.9. Первичная структура и эволюция белков 280
23.3.10. Корреляция между структурой и биологической активностью белков 282
*Литература* 284

**23.4. Низкомолекулярные пептиды, встречающиеся в природе.** *Б. В. Бикрофт* 285

23.4.1. Низкомолекулярные пептиды с типично белковой структурой 286
23.4.1.1. Пептидные гормоны 288
23.4.1.2. Вазоактивные пептиды 293
23.4.1.3. Пептиды, действующие на нервную систему 294
23.4.2. Низкомолекулярные пептиды с нетипичными для белков структурными особенностями 295
23.4.2.1. Небольшие линейные пептиды 298
23.4.2.2. 2,5-Диоксопиперазины (циклические дипептиды) 304
23.4.2.3. Циклические гомодетные пептиды 312
23.4.2.4. Циклические гетеродетные пептиды (депсипептиды) 321
23.4.2.5. Циклопептидные алкалоиды 328
23.4.2.6. Крупные модифицированные пептиды 329
*Литература* 332

**23.5. Антибиотики с β-лактамной группировкой.** *Г. Лоу* 336

23.5.1. Введение 336
23.5.2. Биосинтез пенициллинов и цефалоспорина С 337
23.5.3. Характер действия пенициллинов и цефалоспоринов 339
23.5.4. Полусинтетические пенициллины 342
23.5.5. Полусинтетические цефалоспорины 344
23.5.5.1. Модификации цефалоспоринов по *C*-7 344
23.5.5.2. Модификации цефалоспорина по *C*-3 346
23.5.6. Синтез пенициллинов 348
23.5.7. Синтез цефалоспоринов 350
23.5.8. Превращение пенициллинов в цефалоспорины 353
23.5.9. Аналоги пенициллинов и цефалоспоринов по структуре циклов 358
23.5.10. Новые антибиотики с β-лактамной группировкой 363
*Литература* 366

**23.6. Пептидный синтез.** *Р. С. Шепард* 368

23.6.1. Введение 368
23.6.2. Защитные группы 371
23.6.2.1. Защита аминогруппы 371
23.6.2.2. Защита карбоксильной группы 380
23.6.2.3. Защитные группы для боковых радикалов 382
23.6.3. Образование пептидной связи 389
23.6.3.1. Использование карбодиимидов 391

23.6.3.2. Использование активированных сложных эфиров 395
23.6.3.3. Использование смешанных и симметричных ангидридов 397
23.6.3.4. Использование азидов кислот 401
23.6.3.5. Другие методы получения пептидной связи 402
23.6.4. Твердофазный пептидный синтез 405
23.6.5. Стратегия и тактика пептидного синтеза 408
23.6.5.1. Последовательное наращивание и конденсация фрагментов 408
23.6.5.2. Выбор защитных групп и способов активации 410
*Литература* 417

**23.7. Конформации полипептидов.** *Дж. С. Баррет* 422

23.7.1. Введение и номенклатура 422
23.7.1.1. Введение 422
23.7.1.2. Первичные структуры и номенклатура 423
23.7.1.3. Обозначение атомов и торзионных углов 423
23.7.2. Упорядоченные конформации полипептидов 425
23.7.2.1. Общие конформационные свойства полипептидов 425
23.7.2.2. Регулярные конформации полипептидов с длинной цепью. Иллюстрирующие примеры 428
23.7.2.3. Полипептиды, включающие иминокислоты 429
23.7.2.4. Полипептиды, включающие трифункциональные остатки 429
23.7.2.5. Влияние длины цепи олигопептида на принятие упорядоченной конформации 430
23.7.2.6. Конформации диастереомерных пептидов 431
23.7.2.7. Конформационные взаимопревращения. Денатурация 431
23.7.2.8. Влияние дисульфидных мостиков на конформации полипептидов 433
23.7.3. Физические методы определения конформаций полипептидов 434
23.7.3.1. Общие замечания 434
23.7.3.2. Инфракрасные спектры 435
23.7.3.3. Оптическое вращение и круговой дихроизм 435
23.7.3.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса 438
23.7.3.5. Флуоресцентная спектроскопия 441
23.7.3.6. Конформационные зонды: флуоресцентная спектроскопия и электронный парамагнитный резонанс 442
23.7.3.7. Комплексное использование спектроскопических методов при исследовании конформаций пептидов 443
23.7.3.8. Другие (неспектральные) методы 443
23.7.4. Конформационные расчеты пептидов 444
23.7.4.1. Общие принципы 444
23.7.4.2. Энергетические карты 444
23.7.4.3. Объекты конформационных расчетов 445
*Литература* 446

ЧАСТЬ 24. БЕЛКИ: ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ 449

**24.1. Ферментативный катализ.** *А. Дж. Кирби* 449

24.1.1. Основные черты ферментативного катализа 449
24.1.1.1. Ферменты как белки 450
24.1.1.2. Ферменты как катализаторы 452
24.1.1.3. Кинетика ферментативных процессов 453
24.1.2. Катализ в водном растворе 456
24.1.2.1. Каталитические группы ферментов 456
24.1.2.2. Каталитические механизмы действия ферментов 458
24.1.2.3. Внутримолекулярный катализ 465
24.1.2.4. Бифункциональный катализ 471
24.1.2.5. Катализ металлами 474
24.1.3. Каталитические механизмы, используемые ферментами 477





24.1.3.1. Идентификация каталитических групп 477
24.1.3.2. Активный центр химотрипсина 482
24.1.3.3. Данные рентгеноструктурного анализа 485
24.1.3.4. Каталитический механизм действия сериновых протеиназ 490
24.1.3.5. Механизмы действия других протеолитических ферментов 498
24.1.4. Механизмы связывания 503
24.1.4.1. Силы, действующие в водном растворе 504
24.1.4.2. Катализ как результат ассоциации 505
24.1.4.3. Связывание специфических субстратов ферментами 510
24.1.4.4. Теория индуцированного соответствия 515
24.1.5. Источники каталитической активности ферментов 519
24.1.5.1. Энтропийные факторы 522
24.1.5.2. Напряжения 524
24.1.5.3. Связывание специфических субстратов лизоцимом 528
24.1.6. Регуляция и контроль ферментов 534
24.1.6.1. Регуляция концентрации ферментов 535
24.1.6.2. Регуляция активности ферментов 536
*Литература* 539

**24.2. Химия других белков.** *Д. Т. Илмор* 543

24.2.1. Посттрансляционные модификации белков 543
24.2.1.1. Модификация белков без деградации 543
24.2.1.2. Модификация белков с деградацией 551
24.2.2. Белки, взаимодействующие с малыми молекулами 556
24.2.3. Белки, взаимодействующие с другими белками 562
24.2.4. Белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами 567
24.2.5. Токсичные белки 570
24.2.6. Структурные и сократительные белки 572
24.2.7. Заключение 579
*Литература* 579

**24.3. Коферменты.** *Г. К. С. Вуд* 580

24.3.1. Введение 580
24.3.2. Коферменты, участвующие преимущественно в окислительно-восстановительных процессах 581
24.3.2.1. Пиридиннуклеотидные коферменты 581
24.3.2.2. Флавиновые коферменты 588
24.3.2.3. Убихиноны 596
24.3.2.4. Дигидробиоптерин 599
24.3.3. Коферменты, участвующие преимущественно в трансферазных реакциях 602
24.3.3.1. Фолиевые коферменты 603
24.3.3.2. Кофермент А 610
24.3.3.3. Биотин 615
24.3.3.4. Аденозиндифосфат и -трифосфат 622
24.3.4. Коферменты, участвующие преимущественно в стабилизации карбанионов 626
24.3.4.1. Тиаминдифосфат 627
24.3.4.2. Пиридоксальфосфат 634
24.3.5. Коферменты как специфические лиганды в афинной хроматографии 642
*Литература* 644

**24.4. Витамин $B_{12}$.** *Б. Т. Голдинг* 648

24.4.1. Введение 648
24.4.1.1. Номенклатура 648
24.4.1.2. Выделение и определение структуры природных корриноидов 650
24.4.1.3. Спектроскопия корриноидов 654
24.4.1.4. Модельные соединения 657
24.4.2. Синтез корриноидов 658

24.4.3. Биосинтез корриноидов 663
24.4.3.1. Корриноидная система (кобириновая кислота) 663
24.4.3.2. (*R*)-1-Аминопропанол-2 664
24.4.3.3. 5,6-Диметилбензимидазол 665
24.4.4. Реакции корриноидов и модельных соединений 665
24.4.4.1. Термическая стабильность 665
24.4.4.2. Протонирование и обмен лигандов 666
24.4.4.3. Гидролиз амидных функций 666
24.4.4.4. Гидролиз фосфатной группировки 667
24.4.4.5. Электрофильное замещение в корриновом хромофоре 667
24.4.4.6. Окисление метильных групп при С-5 и С-15 669
24.4.4.7. Эпимеризации у С-13 и С-8 669
24.4.4.8. $CbI^{II}$, $CbI^{I}$, H-CbI (гидридокобаламин) и близкие модельные соединения 670
24.4.4.9. Электрофильная атака связей Co—C 672
24.4.4.10. π-комплексы кобаламинов и кобалоксимов 674
24.4.4.11. Фотохимия алкилкорриноидов и модельных соединений 674
24.4.5. Корриноид-зависимые ферментативные реакции 675
24.4.5.1. $N^5$-метилтетрагидрофолат: гомоцистеинметилтрансфераза 677
24.4.5.2. Метилмалонил-CoA-мутаза 679
24.4.5.3. Диолдегидраза 683
24.4.5.4. Рибонуклеотидредуктазы 688
24.4.5.5. Внутренний фактор и транскобаламины 689
24.4.5.6. Кобаламины в питании 690

*Литература* 690

Предметный указатель 695


# ПРЕДИСЛОВИЕ К ТОМУ 5

Цепь открытий последних двух столетий — лимонная кислота (фон Шееле, 1784), хинная кислота (Гофманн, 1790), морфин (Сетернер, 1805), глицин (Браконнет, 1820), гераниол (Якобсен, 1871), пельтогинол (Робинсон, 1935), цефалоспорин С (Абрахам, 1955) и мевалонолактон (Фолкерс, 1956) — это блестящая демонстрация развития органической химии как самостоятельной научной дисциплины. Исследования по химии природных соединений продиктованы желанием человека разгадать тайны живого мира, одновременно они послужили важнейшим стимулом обогащения и обновления самого содержания органической химии, вызывая возникновение новых идей и новых разделов этой науки. Сила органической химии лежит в ее широком разнообразии. Тем, кого эта наука привлекает главным образом перспективами ее использования, наиболее важным представляется возможность раздвинуть ее границы. Многих это стремление приводит в область биологии, где множество явлений и проблем ожидают объяснения и описания на молекулярном уровне. Все это полностью объясняет, почему том, посвященный органической химии биологически активных соединений, должен быть включен в серию томов «Общей органической химии».

Вопреки общему названию всей серии, назначение этого тома (томов 10, 11 русского перевода) не в том, чтобы он был всеобъемлющим и содержал данные о структуре и химических свойствах всех известных природных соединений. Его назначение скорее в том, чтобы дать достаточную основную информацию, обрисовать перспективы и обсудить наиболее интересные и важные моменты современной биоорганической химии, помочь читателю немного почувствовать особенность новейших достижений в этой области исследований. Понятно, что за последние два десятилетия обозначались новые горизонты в изучении природных объектов, которые подчеркнули достоинства органической химии и углубили представления о ее родстве с биологической химией. При этом

основной акцент сделан преимущественно на связях, которые существуют между структурой соединений — краеугольным камнем органической химии и их биологическими функциями.

Представленный материал отражает именно эти корреляции. Если мы преуспели в осуществлении этой задачи, то редактор должен быть всецело благодарен многим авторам не только за те главы, которые они создали, но также за их полезные идеи и предложения по улучшению построения и содержания этого тома.

Редактор выражает благодарность всем членам редакционного совета за их комментарии и критические замечания, а также д-ру Колину Драйтону (Пергамон Пресс) за значительную помощь и советы в ходе издания этого материала.

Шеффилд *Е. Хаслем*



ЧАСТЬ 21

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ВВЕДЕНИЕ

*Е. Хаслем (University of Sheffield)*

## 21.1. ВСТУПЛЕНИЕ

Процесс изменения значений слов происходит непрерывно, неизбежно и незаметно. Когда в начале 19 века Берцелиус впервые использовал прилагательное «*органическая*» для определения специфической области химии, оно совершенно очевидно подчеркивало изучение соединений, существующих в природе как составная часть живой материи. К концу века термин «органический», используемый в химическом контексте, давно перестал обозначать вещества, которые образуются только в живых системах, и когда возник вопрос об определении понятия «органическая химия» Роско (1871 г.) определил ее как «химия углеродных соединений», а Шорлеммер (1894 г.) — как «химия углеводородов и их производных» — определения, применимые сегодня, как и тогда, когда они были впервые сформулированы. Это изменение отразило огромные достижения, происшедшие в течение 19 века в нашем понимании химии такого элемента как углерод. Кроме того, это было признанием явно неограниченной широты предмета. С тех пор изменение содержания, вкладываемого в выражение «природный продукт», иллюстрировало изменение взглядов химиков на роль изучения таких веществ в развитии органической химии. Эти исследования продолжались несмотря ни на что, с неослабевающей энергией как в прошлом веке, так и в первой половине этого. Для большинства, если не для всех, они являются основной частью всего предмета и подчеркивают внутреннюю взаимосвязь органической химии и биологии.

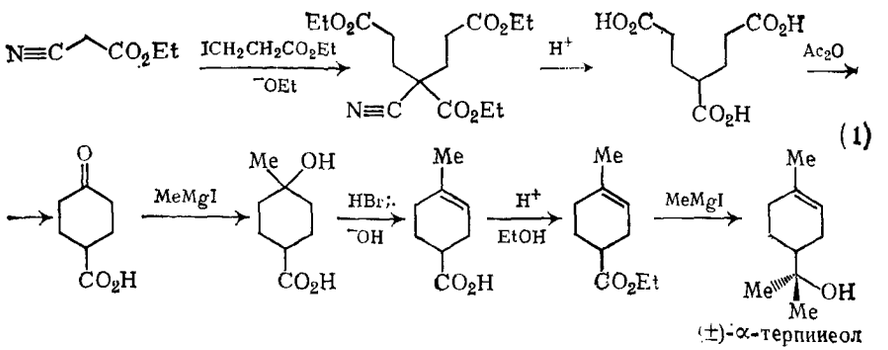
Возросший за последние 150 лет объем исследований в области органической химии позволил накопить обширную информацию, и для того, кто стремится быть на уровне всех этих открытий, существует постоянная проблема, заключающаяся в том, чтобы рассмотреть отдельные открытия в соответствующем контексте и перспективе и правильно оценить их реальную значимость для всего предмета в целом. Поэтому при составлении этого тома мы

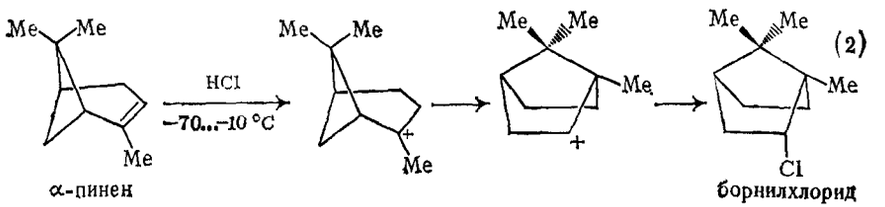
стремились не к тому, чтобы его содержание было всеобъемлющим, а к тому, чтобы доходчиво отразить то, что действительно является важными вехами современного состояния биологической органической химии. Для химика очень важно знание структуры вещества. Опыт показал, что только знание структуры является надежным фундаментом, на котором могут строиться достижения биологической химии. В соответствии с этим положением, особо важное значение уделялось структуре, синтезу и реакционной способности органических соединений, характерных для всех живых систем — *«первичных метаболитов»*, таких как углеводы, липиды, аминокислоты, пептиды и белки, нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты. Однако изучение структуры не должно быть самоцелью и важность привлечения химиков к дальнейшим исследованиям в этих областях еще более возрастает, а использование этой химической информации должно являться исходной позицией для изучения проблем, лежащих глубоко в сфере биологии. Так, например, значительный расцвет молекулярной биологии в шестидесятых годах 20-го века заключается в том, что многие феноменологические проблемы биологии в настоящее время стали более ясно определяться как проблемы для исследователей поведенческой науки и молекулярных исследований. Типичным случаем являются ферменты. Можно изучать эти соединения просто как биологическую субстанцию с точки зрения выяснения их влияния на процессы, в которых они служат промежуточным звеном. Однако в этой книге развивается гораздо более глубокий химический подход с тем, чтобы проиллюстрировать уровень современных знаний в отношении представлений о механизме каталитического действия ферментов. Аналогичный подход использован и при рассмотрении других примеров.

Одной из наиболее богатых загадками для химика-органика областей исследования традиционно была химия так называемых *«вторичных метаболитов»*, таких как фенолы, хиноны, терпены, алкалоиды и различные пигменты, которые продуцируются организмами, в частности растениями и микроорганизмами, но четкие биологические функции которых не идентифицированы. Изучение химии терпенов, например, послужило толчком для раннего развития синтетических методов {схема (1), синтез Перкиным (±)-α-терпинеола, 1904 г.} и открытия одной из наиболее часто встречающихся молекулярных перегруппировок в органической химии {схема (2), перегруппировка Вагнера-Меервейна}.

Принципы конформационного анализа, сформулированные в 1950 г. Бартоном [1], которые изменили все основы подхода к стереохимическому анализу углеродных соединений, были основаны на идеях химической физики. Нет необходимости напоминать серьезным людям, изучающим предмет, что автор выбрал примеры для иллюстрации этих новых концепций в их наиболее ключевых местах из химии терпенов и стероидов, не озаглавливая при этом раздел — «конформация стероидного ядра»!






Остается, однако, фундаментальная и так и не решенная до сих пор проблема, касающаяся этих широко распространенных вторичных метаболитов. Попросту говоря, каковы их биологические функции? В связи с этим некоторые исследователи полагают, что эти вещества являются отходами метаболизма, хотя многие из них токсичны для организма, который продуцирует их до тех пор, пока они не выбрасываются в окружающую среду (например, летучие монотерпены, образуемые многими растениями) или не превращаются в безвредные вещества в самом организме. Другие исследователи считают вторичные метаболиты и в особенности те, которые обнаруживаются в растениях, важными факторами совместной эволюции растений, животных и насекомых. Эта точка зрения заключается в том, что выборочное стремление некоторых животных и насекомых к опустошению фауны определяется качеством производимой растениями химической продукции. Это, в свою очередь, приводит к выработке растениями таких соединений, которые отталкивают животных и других травоядных и тем самым смягчают процесс истребления растений. В настоящий момент взгляды биологов по вопросу о том, какая из этих двух гипотез верна, четко разделяются, и первым шагом на пути к пониманию функции вторичных метаболитов в организме является выяснение их биологического происхождения. Химики-органики достигли существенного прогресса в этой области за последние два десятилетия, и в результате сейчас четко вырисовываются пути, по которым происходит биосинтез многих вторичных метаболитов. Эти исследования, обобщенные в конце тома 11 русского издания (в заключительных главах тома 5 английского издания),

обеспечивают прочную основу для дальнейших исследований затронутой проблемы.

Исторически органическая химия берет свое начало с изучения веществ, полученных из живой материи. Что же касается ее взаимоотношений с биологией в настоящее время, то можно сказать, что колесо истории совершило почти полный оборот. Явная очевидность путей, по которым в настоящее время развиваются исследования фундаментальных проблем биологии, которых мы здесь кратко коснулись, не оставляет ни малейших сомнений в том, что влияние такой отрасли науки, как органическая химия, на биологию в будущем будет только возрастать, но не ослабевать. Органическая химия таким образом, будет питать и обогащать ту почву, на которой она сама возникла.

## 21.2. СИНТЕЗЫ ПО БИОГЕНЕТИЧЕСКОМУ ОБРАЗЦУ

Подавляющая часть исследований, проводимых в настоящее время во всех областях органической химии, связана с синтезом, поэтому здесь уместно кратко остановиться на том влиянии, которое оказывает на синтез химия природных соединений. В особенности заслуживает дальнейшего развития концепция синтеза по биогенетическому типу или синтеза по биогенетическому образцу. Для химика-органика, если за начало отсчета в этой области взять работы Робинсона по синтезу тропинона [2] в качестве чистой идеи, то последующий период «созревания», если можно так выразиться, был сравнительно долгим и небогатым событиями, поскольку идеи ранних лет лишь сравнительно недавно стали приносить ожидаемые плоды.

Когда Перкин [3] в 1904 г. описал синтез (∓)-α-терпинеола, он объяснил причины проведения синтеза так: «это исследование было предпринято с такими веществами как терпин, терпинеол и дипентен не только из интереса, который всегда возникает к синтезам такого рода, но также в надежде устранить сомнения по поводу строения этих важных веществ». В этом высказывании Перкин сформулировал то, что является одной из принципиальных основ синтеза в химии природных соединений — а именно, доказательство структуры.

Можно с уверенностью сказать, что после 1930 г. интерес к полному синтезу природных соединений как к методу доказательства структуры постепенно уменьшался [4] по ряду причин. Справедливо также и то, что по мере того как усложнялись новые природные соединения, все возрастали требования к мастерству и изобретательности химика-синтетика. Поэтому синтез заведомо сложных природных соединений все чаще и чаще предпринимался не столько с целью доказательства их структуры, сколько для проверки основ новых методов и новых идей. За последнюю четверть века достижения в области синтеза природных соединений, если их рассматривать именно с этой точки зрения, выглядят наиболее впечатляющими. Особую значимость приобрели исследования, вводившие в органический синтез стереоселективность и внесшие в арсенал химика множество совершенно новых реагентов и методов. Многие типичные примеры могут быть найдены в таких синтезах, как синтез стрихнина, антибиотиков β-лактамного типа, хлорофилла, витамина $B_{12}$ и простагландинов.

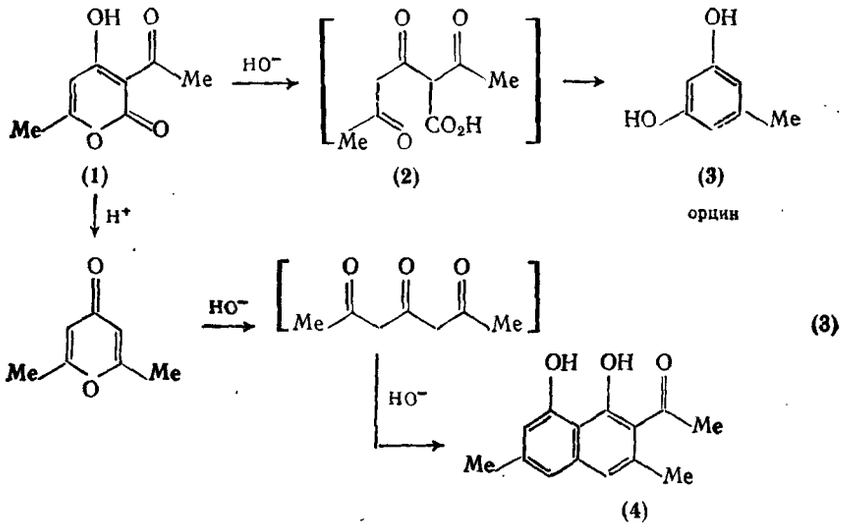
Колли, один из пионеров биосинтетических исследований и синтезов природных соединений по биогенетическому образцу, писал в 1893 г. ... «попытка искусственно получить существующее в природе вещество и имитировать в лаборатории отдельные из множества процессов, беспрестанно происходящих вокруг нас в природе, была всегда одной из важнейших целей химика-органика». Тем не менее примерно 70 лет спустя Ван Тамелен был вынужден отметить практически полное отсутствие сходства между синтетическими процедурами, используемыми химиками-органиками при синтезе сложных природных молекул, и методами и путями, которые предположительно реализуются в природе при создании тех же соединений. Знаменитый теперь синтез тропинона, осуществленный Робинсоном, в противоположность очень длинному обычному синтезу этого же вещества, описанному Вильштеттером, явился первым примером, продемонстрировавшим внутреннее изящество синтетических методов, основанных на идеологии построения природных молекул в мягких условиях из компонентов, которые являются реальными или предполагаемыми аналогами соединений, реально используемых в природе. Богатые возможности, заложенные в этой идее, использовались пока лишь в незначительной степени и сравнительно скромные успехи, достигнутые в этом направлении, были обобщены Ван Тамеленом в 1961 г. [6]. Однако с 1950 г. была накоплена значительная информация о путях биосинтеза, что логично привело к возрастанию активности исследователей в этой области. Некоторые из последних примеров применения этих идей в планировании и осуществлении органических синтезов обсуждаются ниже.

Под синтезом природных соединений по биогенетическому типу или под синтезом по биогенетической схеме обычно понимают синтез, в котором используются, по крайней мере в своих принципиальных аспектах, схемы и реакции, моделирующие те, которые используются в природе для биосинтеза тех же самых молекул. Обычно это сравнение не распространяется на реагенты и условия реакции. В этом смысле такие синтезы, как синтез тропинона Робинсоном, который может быть осуществлен в условиях, близких к физиологическим, вероятно, можно наилучшим образом охарактеризовать как синтез и по биогенетическому, и по физиологическому образцу.

Ранние исследования Колли, которые привели в конечном счете к появлению поликетидной гипотезы, были частично основаны [5, 7] на реакциях дегидроацетовой кислоты (1). Наиболее важными

были ее превращения под действием щелочи, вероятно через интермедиат (2), в известное природное соединение (3) (орцин) и ее превращение под действием кислоты, а затем щелочи в нафтол (4) {схема (3)}. Последующие исследования синтезов биогенетического типа в ряду метаболитов класса поликетидов были затруднены относительной недоступностью и существенной лабильностью соответствующих поли-β-карбонильных предшественников в большей степени, чем трудностями их последующего превращения в ароматические продукты, типичные для метаболитов класса поликетидов.

Были опубликованы многочисленные синтезы моноциклических ароматических соединений, в которых в качестве предшественников были использованы свободные или частично защищенные β-тетракарбонильные соединения

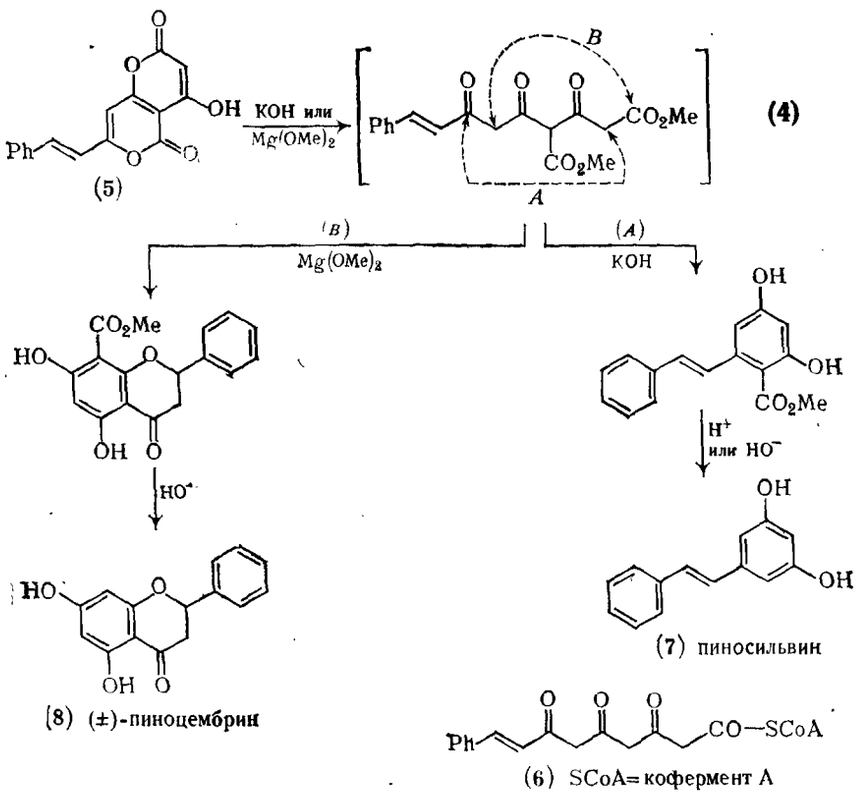



(3)

Скотт и Маней с сотр. [8], например, использовали оригинальную идею Колли и более позднюю идею Бэрча защищать лабильные β-кетосоединения путем создания пиронового цикла. Используя дипирон (5), потенциально тождественный биологическому предшественнику (6), им удалось превратить его с помощью различных щелочных обработок в природный стильбен пиносильвин (7) и флавон (∓)-пиноцембрин (8) {схема (4), поликетидный синтез биогенетического типа}.

Отличительная черта большей части этой работы заключалась в том, что под действием ионов магния наблюдалось протекание реакций циклизации по различным направлениям. Большую часть этих эффектов Кромби [9] удалось объяснить, использовав представления о селективных хелатирующих эффектах ионов магния с поли-β-кето-предшественниками.

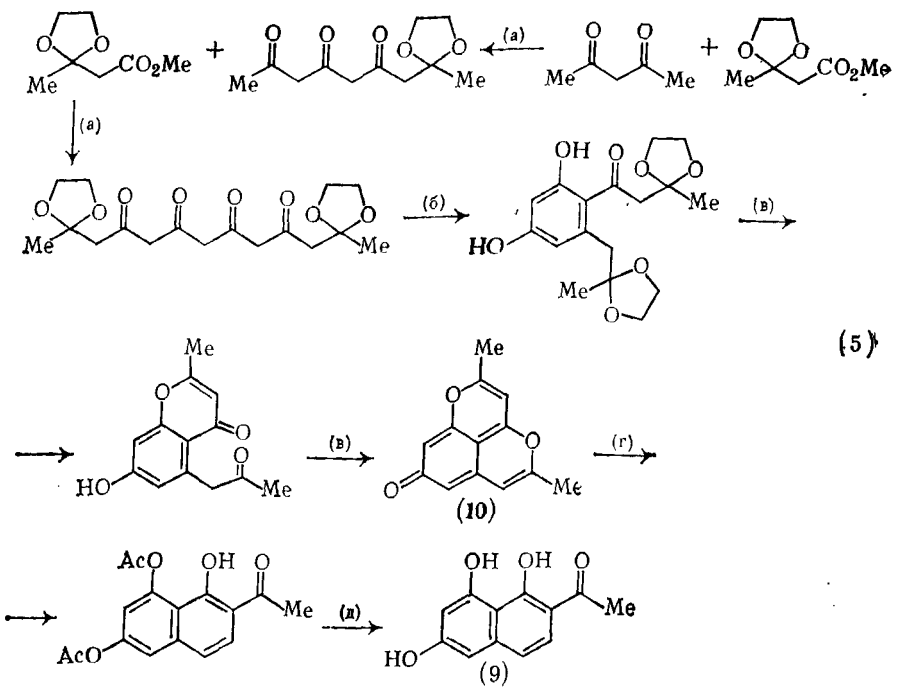





До сравнительно недавнего времени соответствующее использование высших поли-β-карбонильных соединений и их производных в синтезах по биогенетическому образцу не приводило к сколь-либо удовлетворительному синтезу поликетидных природных соединений нафталинового или антраценового типа. Однако сравнительно недавно Харрис с сотрудниками [10, 11] сообщили о синтезе по биогенетическому образцу полициклических поликетидных метаболитов, исходя из частично защищенных β-гекса- и β-гепта-кетонов. Этой группе исследователей удалось осуществить синтезы 6-гидроксимузицина (9) и баракола (10) {схема (5)}, а также — элеутеринола (11) {схема (6)}.

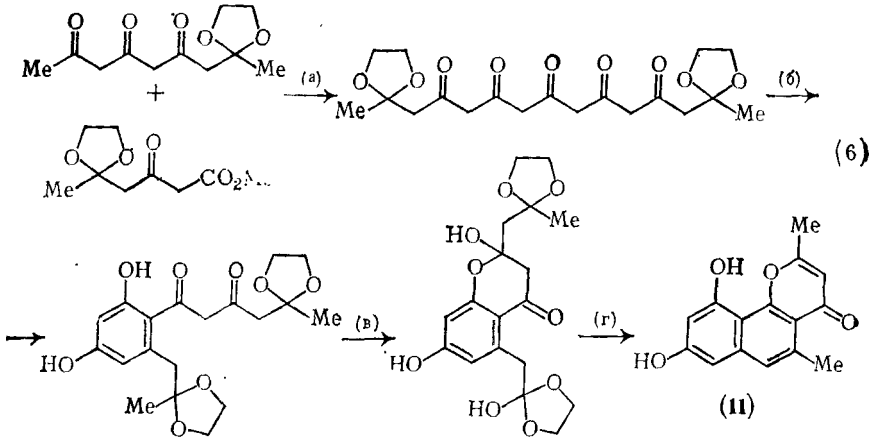
Следует отметить, что пример синтеза элеутеринола (11) представляет собой прежде всего очень эффектную демонстрацию действенности поликетидной теории биогенеза, когда применение теоретических представлений привело к убедительному пересмотру структуры [12].

Контроль за процессом циклизации, необходимый для получения желаемого продукта реакции, в случае высших поли-β-карбонильных соединений превращается в трудноразрешимую задачу.



(5)

(а) $LiN(CHMe_2)_2$; (б) $(Me_2CH)_2NH$; (в) $H^+$; (г) $Ac_2O$, пиридин; $H^+$; (д) $HO^-$



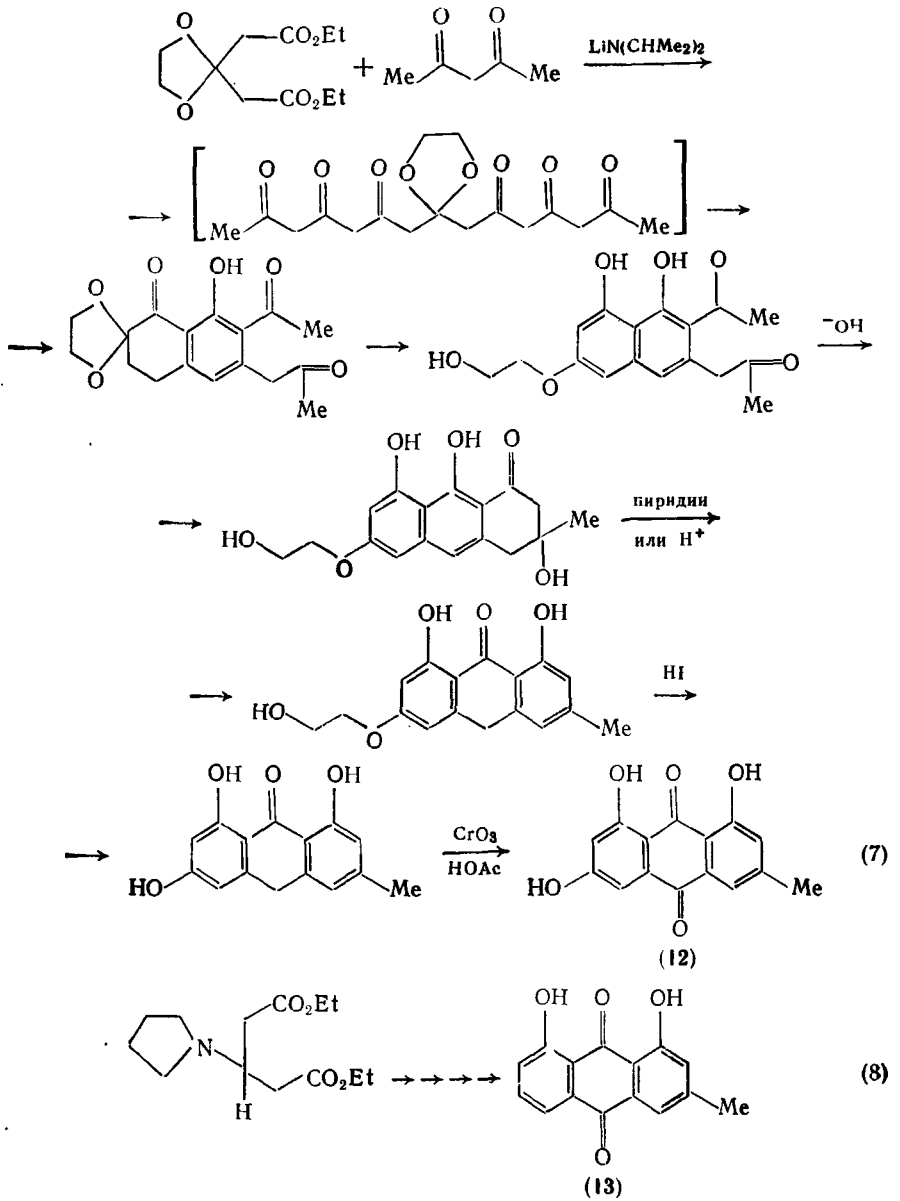
(6)

(а) $LiN(CHMe_2)_2$; (б) $Et_3N$; (в) спонтанно; (г) $H_3O^+$, $(Me_2CH)_2NH$, $CF_3CO_2H$

Однако Харрис с сотр. успешно преодолели эту проблему в синтезах по биогенетическому образцу природных антрахинонов — эмодина (12) и хризофанола (13) {схемы (7), (8)}. Оба эти синтеза



протекают очень сходным образом после осуществления первой стадии конденсации.



(7)

(8)

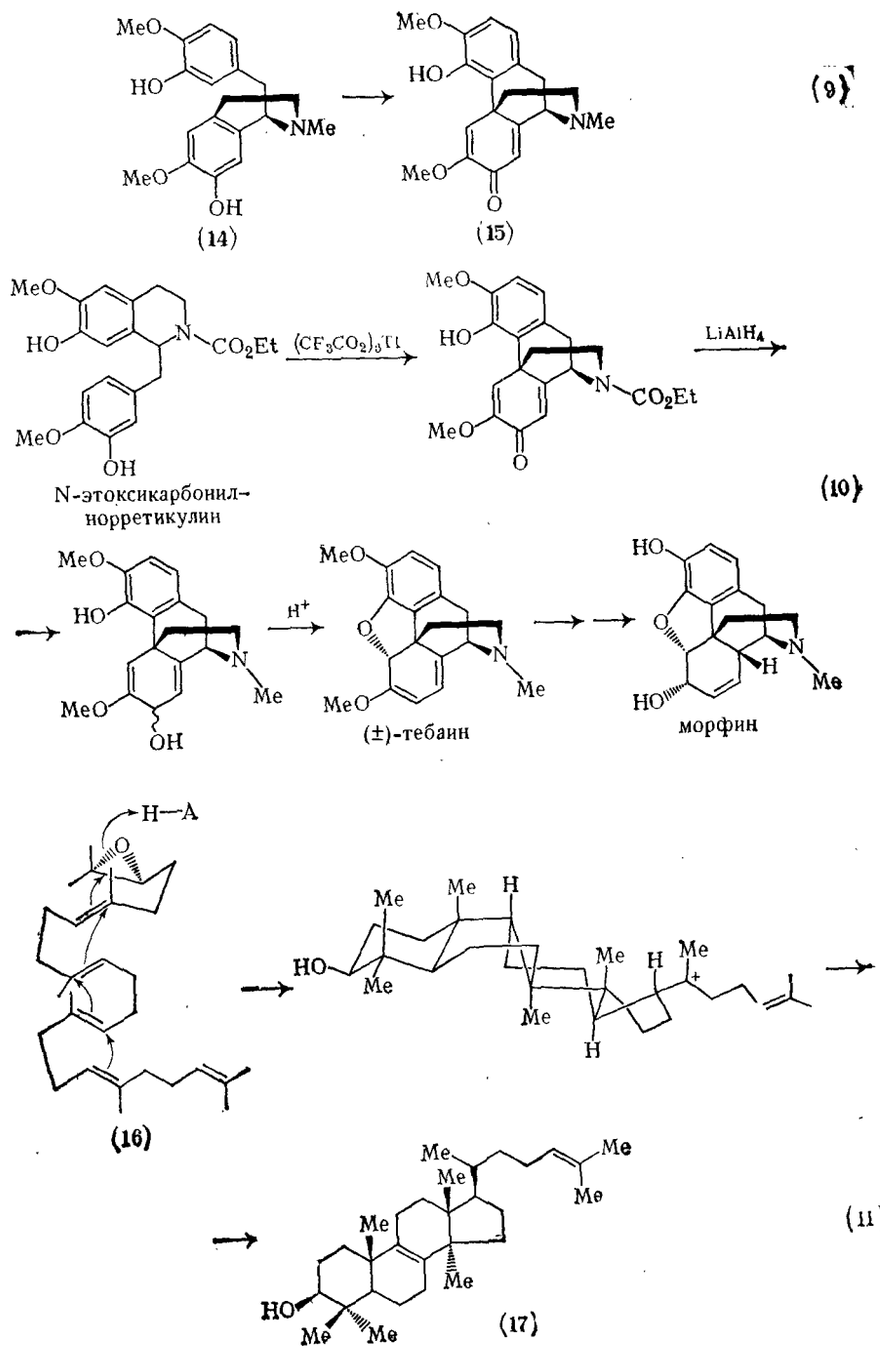
Хотя Робинсон однажды заметил [13], что «мы не должны позволять биосинтетическому хвосту управлять химической собакой», многие из его идей в области биосинтеза были весьма

плодотворны. В особенности его идея о том, что стероидный скелет может создаваться в результате структурной перестройки углеводорода сквалена, а также идея о том, что морфиновые алкалоиды могут образовываться в растениях в результате окислительного сочетания фенольного бензилтетрагидроизохинолинового предшественника. Со времени первоначальной концепции и ее последующей разработки [14] было затрачено много усилий на выяснение истинных путей биосинтеза морфина для того, чтобы в конечном итоге использовать эти знания для осуществления синтеза по биогенетическому образцу. Биосинтетический путь был очерчен блистательной экспериментальной работой нескольких исследователей, в особенности работами Баттерсби и Бартона. Решающей стадией в этом метаболическом пути является *пара-орто*-окислительное замыкание ретикулина (**14**), приводящее к образованию диенона салутаридина (**15**) {схема (9)}. Многочисленные предшествующие попытки осуществить это замыкание, за единственным исключением работ Бартона и сотр., обычно приводили к синтезу *пара-пара*-продукта ($\leqslant 4\,\%$) или *орто-пара*-продукта ($\leqslant 53\,\%$). Бартон и его группа сообщили о получении с выходом 0,03 % (±)-салутаридина в результате окисления феррицианидом (±)-ретикулина. Шварц и Мами [15] осуществили в настоящее время это столь важное окислительное сочетание с выходом порядка 11—23 % действием трифторацетата таллия на *N*-трифторацетильное или *N*-этоксикарбонильное производное (±)-*N*-норретикулина. С осуществлением этой стадии реакции в сочетании с разработанными ранее стадиями был успешно завершен синтез морфиновых алкалоидов по биогенетическому образцу {схема (10)} (все формулы показывают рацемические модификации).

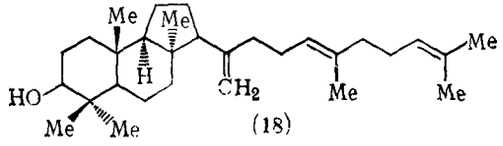
Одним из (интеллектуально) наиболее значимых достижений в области биогенеза было выяснение пути, по которому происходит метаболизм холестерина из ацетилкофермента А. В ходе дискуссий, касавшихся доказательства строения холестерина, Робинсон первым предположил [16], что углеродный скелет холестерина можно отождествить со скелетом углеводорода сквалена без трех углеродных атомов. Впоследствии из всей стадий биогенеза холестерина химиков-органиков более всего интересовала лишь одна частная стадия, а именно циклизация сквалена через промежуточно образующийся эпоксид (**16**) в ланостерин (**17**) {схема (11)}.

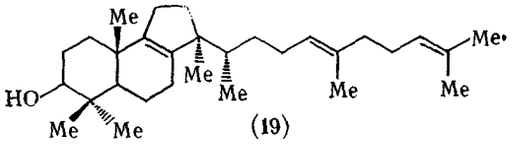
Процесс протекает с высокой стереоселективностью, поскольку в результате реакции образуется лишь один единственный изомер из 128 возможных изомерных форм продукта. С начала 1950-ых годов химики-органики предпринимали попытки осуществить аналогичные стереоселективные циклизации сквалена и родственных ему олефинов химическими методами. При этом главным вопросом, занимавшим умы химиков, был вопрос о значимости в этой реакции фермента. Связывает ли он, например, такой субстрат как эпоксид сквалена (**16**) в ходе реакции в одной жестко фиксированной конформации или же существуют значительные стереоэлек-





тронные основания для того, чтобы предположить, что полностью *транс*-сквален и сходные с ним углеводороды имеют «внутреннюю чувствительность» к циклизации, приводящую к образованию продуктов с природной относительной конфигурацией — идея, выдвинутая независимо Сторком и Эшенмозером [17, 18]. Вслед за обсуждением в литературе этой гипотезы последовал незначительный поток публикаций [19], в которых был успешно осуществлен ряд синтезов терпенов и стероидов по биогенетическому образцу. Эти синтезы основывались на установленной в модельных экспериментах стереоселективности, присущей многим полиолефиновым циклизациям. Хотя при кислотной обработке ($SnCl_4$ в бензоле) сам 2,3-эпоксисквален (**16**) дает [18] две нестероидные трициклические системы (**18**) и (**19**), катализируемая кислотой циклизация (пикриновая кислота в нитрометане) эпоксидиола (**20**), получаемого из сквалена, приводит к природному тритерпену (±)-маларикандиолу (**21**) с выходом 7 % [20] {схема (12)}.



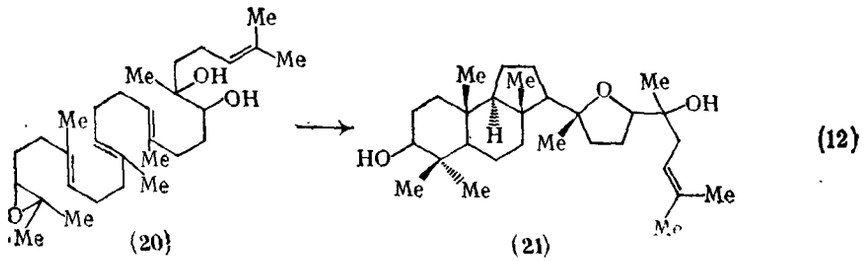




Аналогичным образом Джонсон [21, 22] изобретательно использовал этот принцип в успешном осуществлении синтеза *D*-гомостероида (**22**) и (∓)-16,17-дегидропрогестерона (**23**) {схемы (13), (14)}.

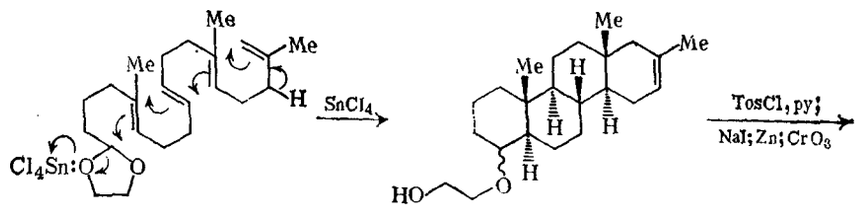
## 21.3. СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

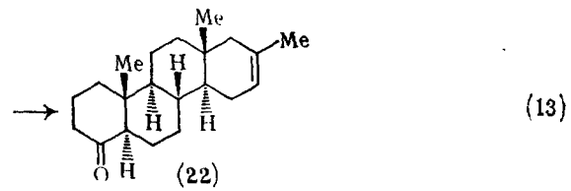
Ферменты являются катализаторами биологических реакций. Их каталитическая эффективность часто совершенно удивительна и в сочетании со специфичностью к субстрату позволяет организму выбрать для данной конкретной молекулы только один единственный путь метаболизма из многочисленных возможных химических реакций, в которые может вступать эта молекула и продукты ее превращений. Специфичность фермента к определенному субстрату может иметь структурную или стереохимическую природу. Структурная специфичность может быть либо достаточно отчетливо выраженной, либо, напротив, она может быть относительно широкой как, например, это показано для гидролитических ферментов пищеварительной системы. Стереоспецифичность является характерной особенностью ферментативно катализируемых реакций, в ко-



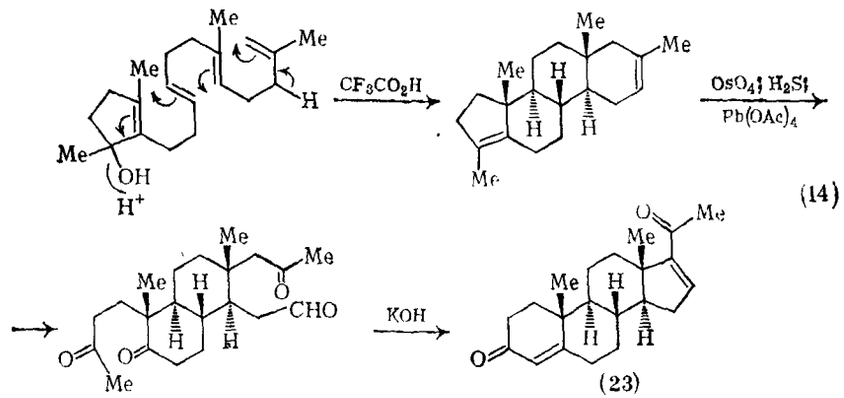



(12)




(13)

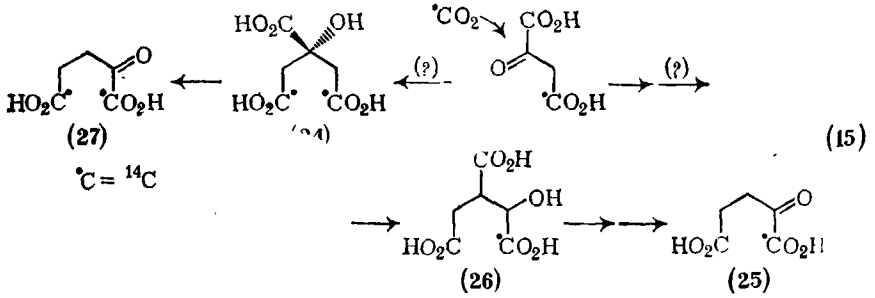



(14)

торых участвуют энантиомеры. Впервые явление стереоселективности отмечали еще около века тому назад, но лишь в последние 30 лет развилась очень обширная область исследований, изучающая гораздо более тонкие стереохимические характеристики ферментативных реакций. Эта область исследований зародилась в 1940-ых годах и развилась из ряда совершенно несвязанных между собой наблюдений из области биохимии, в частности из

интересной полемики, возникшей в связи с выяснением роли лимонной кислоты (24), как промежуточного звена в цикле Кребса (цикл трикарбоновых кислот).

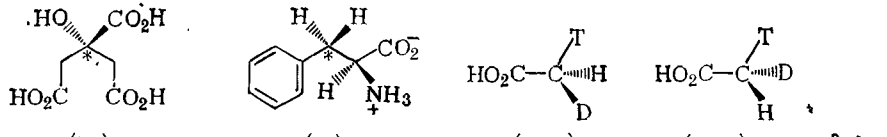
В ранних исследованиях цикла Кребса, проведенных с использованием меченого диоксида углерода [23], было показано, что меченый атом углерода, входящий в метаболит α-кетоглутарат (25), локализуется в карбоксильной группе, отмеченной на схеме (15) жирной точкой и соседней с карбонильной группой. Первоначально, основываясь на положении метки, предположили, что последовательность реакций цикла Кребса, минует цитрат и включает превращение изоцитрата (26) в α-кетоглутарат. Было предложено, что симметричная молекула цитрата обязана вести себя так, что изотопная метка будет распределяться равномерно по двум эквивалентным карбоксильным группам, в результате чего образующийся α-кетоглутарат (27) также оказался бы равномерно меченым по обеим карбоксильным группам {схема (15)}.




Однако Огстон [24] первым показал, что асимметричный реагент, такой как фермент, может реагировать с симметричным соединением, таким как лимонная кислота, различая его идентичные группы. Лимонная кислота (24) принадлежит к классу молекул типа *Caabc, для которых отмеченный звездочкой атом углерода является прохиральным центром. В молекуле лимонной кислоты группы a (—$CH_2CO_2H$) являются энантиотопными и по отношению к плоскости, проходящей через HOOC—*C—OH, представляют собой объекты зеркального отражения. В *L*-фенилаланине (28) две группы a являются протонами, а прохиральным центром является атом углерода C-3. Два протона в соединении (28) диастереотопно взаимосвязаны благодаря хиральности атома углерода C-2, содержащего α-аминогруппу. В принципе, диастереотопные группы можно различить физическими методами и как энантиотопные, так и диастереотопные группы различаются в хиральном окружении, что и делает фермент. Многочисленные экспериментальные наблюдения в области химии ферментов полностью подтвердили эти заключения. Это как раз та область исследований, где химики-органики были на передовом рубеже и внесли впечатляющий и значимый вклад практически в каждый аспект этой работы.

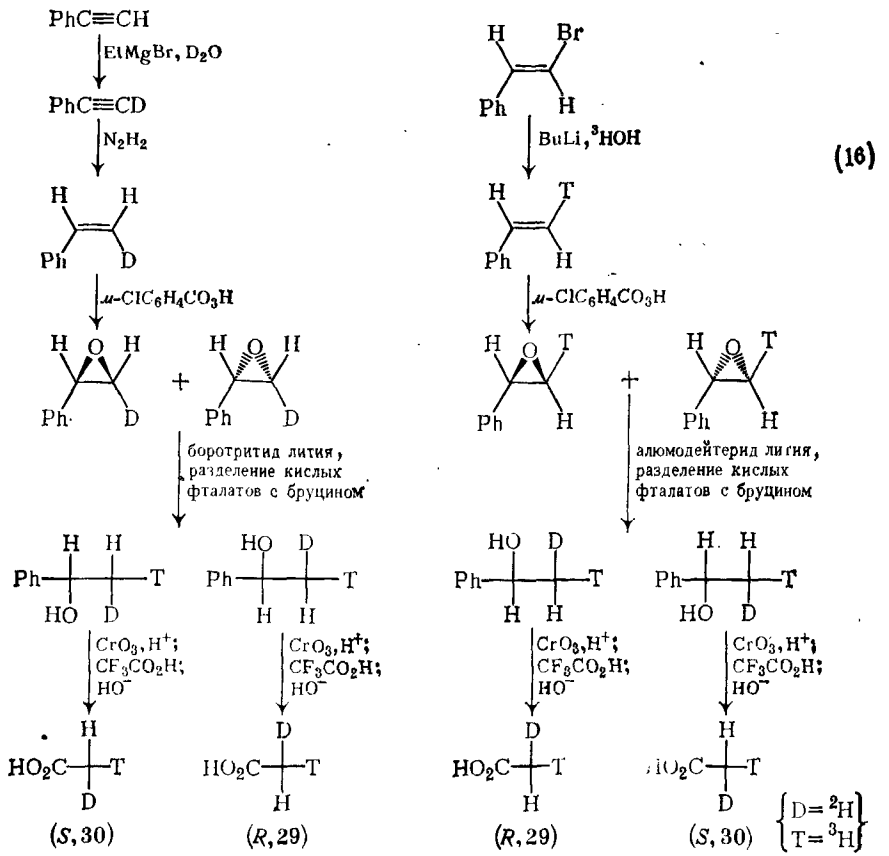


Несомненно, одним из выдающихся исследований в этой области и органической химии в целом было изучение стереохимического протекания ферментативно катализируемых реакций, включающих интерконверсию метильной и метиленовой групп [25]. Две группы исследователей независимо друг от друга избрали очень сходные подходы для решения этих очень тонких стереохимических проблем [26, 27]. Были получены образцы уксусной кислоты, метильные группы которых в результате изотопного замещения ($^1H$, $^2H$, $^3H$) имели либо *R* (29), либо *S* (30) конфигурацию. Хотя почти все метильные группы в таких образцах содержат $^1H$ и $^2H$, лишь одна метильная группа примерно на $10^6$ молекул содержит атом трития ($^3H$) и, следовательно, является хиральной. При определении хиральности метильной группы в таком образце уксусной кислоты применяемая аналитическая процедура должна различать ту очень малую фракцию, которая содержит все три изотопа водорода. Поэтому аналитическая методика основана главным образом на определении изотопа трития.




Аригони и Рети [27] использовали полуферментативный синтез для получения двух хиральных форм уксусной кислоты. Напротив, Корнфорс и Эггерер [26] получили хиральные метильные группы в результате серии чисто химических превращений {схема (16)}. В последнем случае использован принцип разделения двух хиральных метильных групп, основанный на встраивании их в рацемические диастереомеры. Этот рацемат разделяют на стадии получения спиртов с последующей трансформацией углеродного атома карбинола в карбоксильную группу уксусной кислоты. В более поздней работе {схема (17)} Аригони [28] осуществил интересный химический синтез обеих форм хиральной уксусной кислоты, в которых знак хиральности метильной группы определяется абсолютной стереохимической конфигурацией интермедиата (31) и строгими геометрическими требованиями, налагаемыми на два переходных состояния, приводящих к его образованию.

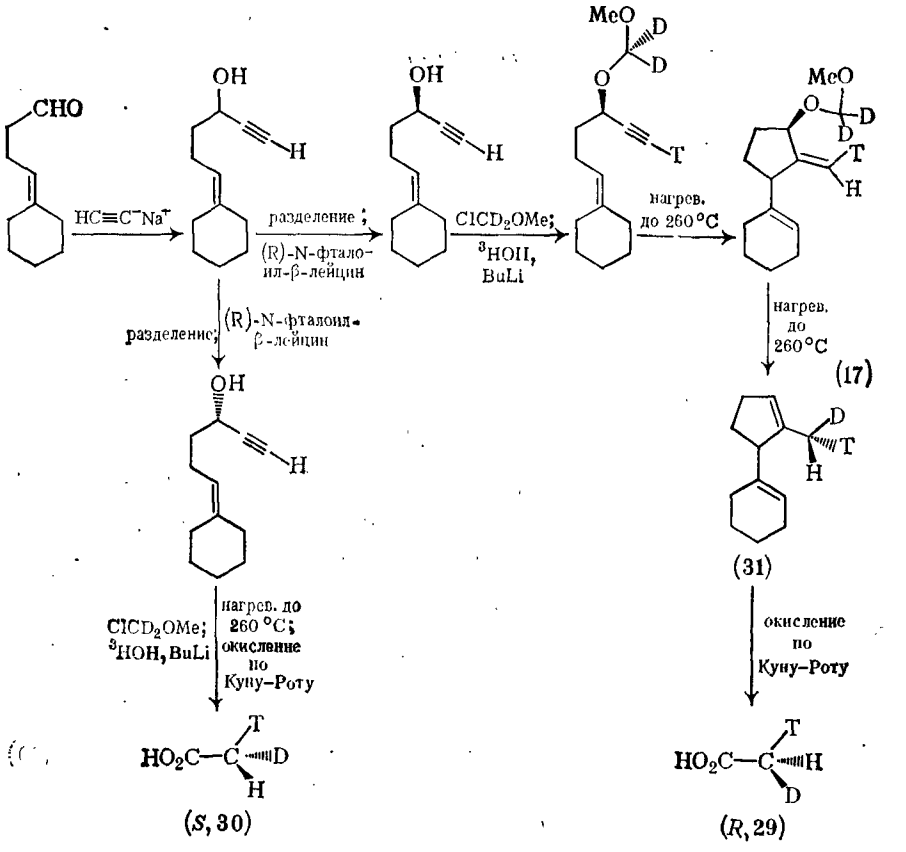
Ограниченность места позволяет дать здесь лишь очень краткое описание сущности экспериментального метода и аргументированности данных анализа, установившего хиральность метильных групп в уксусной кислоте. Анализ был осуществлен с применением малатсинтетазной реакции {схема (18)}, в результате которой метильная группа ацетата превращается в метиленовую группу малата. При этом прослеживается судьба изотопа трития. Как *R*, так и *S* форма уксусной кислоты (29) и (30) были введены в реак-



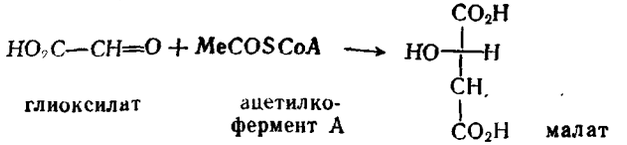

(16)

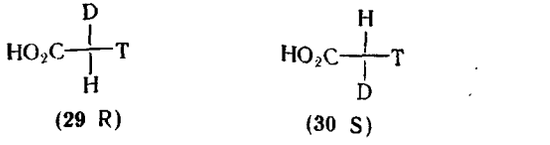
цию конденсации в виде соответствующих ацетильных производных кофермента А с глиоксиловой кислотой, в результате которой были получены образцы малата.

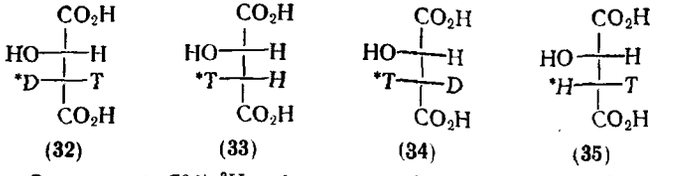
Предложено, что для замещения водорода в метильной группе ацетилкофермента А характерен первичный кинетический изотопный эффект и было сделано заключение, что для малатсинтетазной реакции $^1H/^3H$-изотопный эффект составляет 8—10, а $^2H/^3H$-изотопный эффект — около 4—5. В принципе, малатсинтетазная реакция может протекать с сохранением или обращением конфигурации углеродного атома метильной группы ацетилкофермента А. Если предположить, что обращение конфигурации происходит и что в ацетилкофермента А $^1H$ замещается быстрее, чем $^2H$, то образующаяся в конечном итоге яблочная кислота, содержащая тритий из *R*-уксусной кислоты (29), будет содержать гораздо больше соединения структуры (32), чем (33). Соответственно в конечном продукте превращения *S*-уксусной кислоты (30) будет содержаться больше соединения (34), чем (35) {схема (19), звездочкой отмечен лабильный водород, обмениваемый фумаразой}. Преобладающая локализация трития в двух образцах малата — (32) + + (33) и (34) + (35) определена методом ферментативного равновесия с фумаразой, т. е. с помощью процесса, который приводит к обмену про-*R* протона при С-3 в молекулах малата. С помощью этой процедуры показано, что две группы различаются по потере трития от яблочной кислоты при хорошем общем соответствии результатов. Так, яблочная кислота, полученная из *R*-уксусной кислоты (32) + (33) теряла от 10 до 33% трития, тогда как для образца, полученного из *S*-уксусной кислоты (34) + (35) потери трития составляли от 69 до 90%. Таким образом, эти результаты подтвердили, что превращение метильной группы ацетилкофермента А в метиленовую группу яблочной кислоты происходит с обращением конфигурации, и примененный метод технически позволяет определить хиральность образцов уксусной кислоты неизвестной асимметрии.




(17)

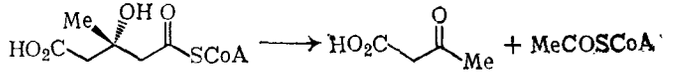



Остается > 70% $^3H$ — фумараза — Теряется > 50% $^3H$

Использованные в этих исследованиях принципы применены ко многим аналогичным ферментативным реакциям. Типичным примером является исследование стереохимии действия 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-лиазы [29] {схема (20)}.




(SCoA=кофермент А)

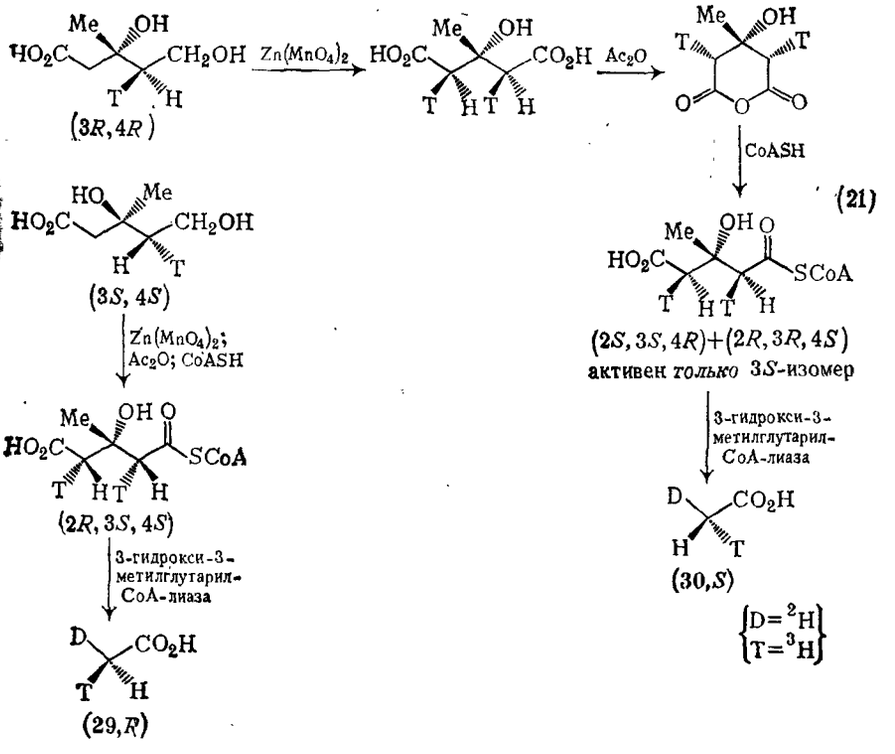
Образцы 2*S*, 3*S* (с 2*R*, 3*R*) и 2*R*, 3*R* (с 2*S*, 3*R*) 3-гидрокси-3-метил[2-$^3H_1$]глутарил-CoA были приготовлены из соответствующим образом тритиированных мевалоновых кислот {схема (21)}. Только 3*S*-изомер оказался активным в реакции ферментативного расщепления; хиральность метильной группы в ацетильном остатке ацетилкофермента А, возникающая в результате реакции с лиазой, выявлена с помощью малатсинтетазного метода.

Эти результаты показали, что уксусная кислота, полученная из субстрата с 2*S*, 3*S*-конфигурацией, имела *S* конфигурацию; *R*-уксусная кислота была получена из субстрата с альтернативной 2*R*, 3*S*-конфигурацией. Из этих данных сделан вывод, что лиазная реакция стереоспецифична и идет с обращением конфигурации.

## *ЛИТЕРАТУРА*


1. *D. H. R. Barton*, Experentia, 1950, **6**, 316.
2. *R. Robinson*, J. Chem. Soc., 1917, 762.
3. *W. H. Perkin*, J. Chem. Soc., 1904, 654.
4. *R. Robinson*, J. Chem. Soc., 1936, 1079.
5. *J. N. Collie and W. S. Meyers*, J. Chem. Soc., 1893, 63, 122, 329.
6. *E. E. van Tamelen*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1961, 19, 242.





7. *J. N. Collie*, J. Chem. Soc., 1907, **91**, 1806.
8. *T. Money*, Chem. Rev., 1970, **70**, 553
9. *L. Crombie, D. E. Games, and M. H. Knight*, Chem. Comm., 1966, 355.
10. *T. M. Harris and P. J. Wittek*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3270.
11. *T. M. Harris, e a.*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 6065.
12. *A. J. Birch and F. W. Donovan*, Austral. J. Chem., 1953, **6**, 360.
13. *R. Robinson*, Chem. and Ind. (London), 1934, 12, 1062.
14. *D. H. R. Barton and T. Cohen*, Fetschr. a. Stoll, 1957, 117.
15. *M. A. Schwartz and I. S. Mami*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 1239.
16. *R. Robinson*, Nature, 1932, **130**, 540.
17. *W. S. Johnson*, Accounts Chem. Res., 1968, **1**, 1.
18. *E. E. van Tamelen*, Accounts Chem. Res., 1968, **1**, 111.
19. *T. Money*, in: «Progress in Organic Chemistry», ed. J. K. Sutherland and W. Carruthers, Butterworths, London, 1973, v. 8, p. 29.
20. *K. B. Sharpless*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 6999.
21. *W. S. Johnson, e. a.*, J. Amer Chem. Soc., 1974, **96**, 3979.
22. *W. S. Johnson, e. a.*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 2994.
23. *H. G. Wood and C. H. Werkman*, Adv. Enzymol., 1942, **2**, 135.
24. *A. G. Ogston*, Nature, 1948, **162**, 963.
25. *J. W. Cornforth*, Chem. in Britain, 1970, **6**, 431.
26. *J. W. Cornforth, e. a.*, Nature, 1969, **221**, 1212; European J. Biochem., 1970, 14, 1.
27. *J. Lüthy, J. Rétey, and D. Arigoni*, Nature, 1969, 221, 1213.
28. *C. A. Townsend, T. Scholl, and D. Arigony*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 921.
29. *B. Massner, e. a.*, European J. Biochem., 1975, **53**, 255

ЧАСТЬ 22

# НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

## 22.1. ВВЕДЕНИЕ

*Блекборн Г. М. (University of Sheffield)*

«Очень видный химик-органик задолго до смерти сказал мне в конце 1880-ых годов: «Химия живого? Это химия протоплазмы, это суперхимия. Поищите, мой юный друг, другую область для удовлетворения своего тщеславия»

Ф. Г. ХОПКИНС, 1933 г. [1]

«Дорогой Коллега, бросьте идею о больших молекулах. Органические молекулы с молекулярным весом более 5000 не существуют. Почистите Ваш продукт... тогда он закристаллизуется, и окажется, что это низкомолекулярное соединение»

Г. ВИЛАНД, Г. ШТАУДИНГЕРУ, 1929 г. [2]

Наставления профессора анатомии и физиологии в Базеле своему племяннику — Фридриху Мишеру побудили молодого человека начать исследования химического состава гнойных клеток. В 1868 г. они были выделены промыванием использованных бинтов, полученных из местной хирургической клиники. Началось изучение химии нуклеиновых кислот!

Мишер выделил фосфорсодержащее вещество, которое не подвергалось перевариванию протеолитическим ферментом — пепсином и назвал его «нуклеин» [3]. Вслед за этим он исследовал химический состав спермы рейнского лосося. При этом он обнаружил солеподобную комбинацию богатых азотом органических оснований — «протамин», и богатый фосфором материал, который «играл роль кислоты». Мишер приписал этому последнему материалу эмпирическую формулу $C_{29}H_{49}N_9O_{22}P_3$ и также назвал его нуклеином [4].

В некотором отношении работу Мишера следует считать преждевременной. Основные определяющие критерии, доступные ему в то время для характеристики химической чистоты и идентичности, необходимые для установления хотя бы номинального соответствия друг другу этих двух веществ, были таковы, что привели к спорам и противоречивым ситуациям, потребовавшим многие годы для своего разрешения.



Независимо от этих исследований был достигнут прогресс в двух других родственных областях знаний. В 1847 г. Либих выделил субстанцию из экстрактов мышц быка [5], которую он назвал «инозиновой кислотой». Позднее было показано, что это вещество содержит фосфор в виде остатка фосфорной кислоты и — через 60 лет после его открытия — сахар с пятью углеродными атомами, являющийся пентозой. Левин и Жакоб первоначально назвали этот сахар «карнозой»; впоследствии его идентифицировали как ранее неизвестное вещество — *D*-рибозу [6]. Это позволило установить полную структуру инозиновой кислоты как гипоксантинрибозид-5′-фосфат (**1**).

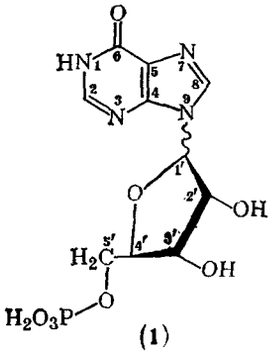
Происходившее в то время бурное развитие химии анилиновых красителей, последовавшее за открытием Вильямом Перкиным мовеина в 1856 г., стимулировало систематическое исследование окрашивания биологических образцов. В общем, было установлено, что ядра клеток глубоко прокрашиваются красителями основного характера. Это свойство привело Флеминга к введению термина «хроматин» для обозначения вещества ядер клеток, из которого был получен нуклеин [7]. Эта работа привела к открытию похожих на палочки сегментов хроматина, наблюдаемых только в критических состояниях процесса деления клетки. Было выдвинуто предположение, что эти сегменты являются носителями наследственного материала и для них было принято название «хромосомы» [8]. Прямая связь между этой цитологической работой и исследованиями Мишера была понята Вильсоном [9]: «В настоящее время известно, что хроматин близко подобен, если не идентичен субстанции, известной как нуклеин ($C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$, в соответствии с данными Мишера), анализы которого показывают достаточную точность химического соединения нуклеиновой кислоты и альбумина. И таким образом, мы подошли к замечательному выводу о том, что наследственность может, вероятно, реализовываться в результате физической передачи особого соединения от родителя к потомку».

Увы, начиная с этого момента, химическое исследование нуклеиновых кислот начинает играть вторую скрипку по отношению к изучению белков в течение примерно 50 лет.

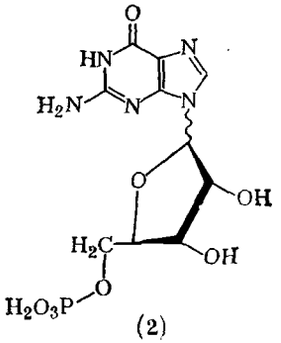
### 22.1.1. РАННИЕ СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В продолжение своих работ по изучению инозиновой кислоты Левин и Жакоб показали, что гуаниловая кислота, которая была выделена в результате щелочной обработки панкреатического нуклеопротеида, имеет родственную структуру гуанинрибозофосфата (**2**). Мягким гидролизом она была дефосфорилирована до гуанозина. Это соединение и родственный ему инозин, получающийся в результате аналогичного гидролиза соединения (**1**), были названы «нуклеозидами», в то время как их фосфорные эфиры (**1**) и (**2**) получили название «нуклеотидов».

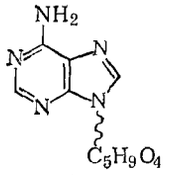
В тот период химическому изучению подвергали нуклеиновые кислоты, полученные либо из дрожжей, либо из тимуса теленка. Частичный щелочной гидролиз нуклеиновой кислоты из дрожжей растворами аммиака приводил к четырем нуклеозидам — аденозину (3), гуанозину (4), цитидину (5) и уридину (6).



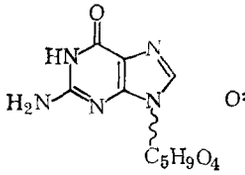
(1)



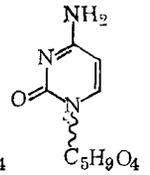
(2)



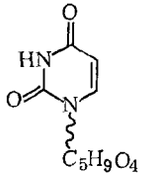
(3)



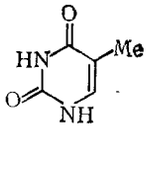
(4)



(5)



(6)



(7)

Нуклеиновая кислота из тимуса оказалась устойчивой к щелочному гидролизу и структура нуклеозидов, получающихся из нее, была проанализирована, поэтому на 20 лет позднее. В то время Левин [10] определил входящий в их состав сахар как 2-дезокси-*D*-рибозу и в результате этого объяснил ее необычное свойство восстанавливать окраску реагента Шиффа. Тимусная нуклеиновая кислота также дает четыре гетероциклических основания: аденин, гуанин, цитозин и вместо урацила — тимин (7). Эти две отличительные черты (различие в природе сахарного остатка и замена урацила тимином) определяют различие между ДНК *, которая, как полагали в то время, аналогично тимусной нуклеиновой кислоте, присуща животным, и РНК, которая, как полагали, является характерным компонентом растительных тканей.

Вера в их сходство была сильнее, чем осведомленность об их различиях. Случайное присутствие примерно равных количеств аденозина и гуанозина в нуклеиновой кислоте, полученной из дрожжей или из зародышей пшеницы, в сочетании с ошибочным определением молекулярного веса, ввело Левина в заблуждение

* Сокращение ДНК для дезоксирибонуклеиновых кислот и РНК — для рибонуклеиновых кислот стало общепринятым в 1950-ых годах.



и привело к тому, что он выдвинул общую концепцию о тетрануклеотидной структуре как ДНК, так и РНК. Она была сформулирована [11] как структура (А).

фосфат — сахар — основание
|
фосфат — сахар — основание (А)
|
фосфат — сахар — основание

Если это заключение кажется странным сегодня, когда известно, что молекулы нуклеиновых кислот содержат от 80 до более 1 миллиона нуклеотидных остатков, то полезно напомнить, что в конце 1920-ых годов Герман Штаудингер был занят борьбой с голым критицизмом со стороны химиков его радикально новых представлений о существовании полимерных структур [2]. Органическая химия того времени не была готова к анализу макромолекулярных структур, к которым относятся нуклеиновые кислоты.

## 22.1.2. СТРУКТУРА ДНК

### 22.1.2.1. Выделение и характеристика ДНК

Нуклеиновые кислоты являются очень трудным для работы материалом. Они чувствительны к расщеплению ферментами (рибонуклеаза, например, может быть обнаружена даже на кончиках пальцев исследователя). Они не терпят экстремальных значений pH и температуры и даже действия механических разрывающих сил. Длина молекулы ДНК, полученной из распространенной бактерии *E. coli*, составляет примерно 1 мм, в то время как ее диаметр — около 2 нм. Таким образом, простое перемешивание или даже неосторожное взятие пипеткой раствора ДНК обычно приводит к существенному уменьшению ее молекулярной массы. Естественно, что наиболее ранние препараты ДНК представляли собой фрагментированный материал с низкой молекулярной массой.

Один из широкоиспользуемых методов получения препаратов ДНК, не содержащих белков, заключается в деструкции клеточных стенок или мембран с последующим применением анионного детергента типа додецилсульфата натрия и отделением белков в виде осадка, при сохранении нуклеиновой кислоты в растворе. Далее ДНК обычно выделяют осторожным добавлением этанола к солевому раствору нуклеиновой кислоты. Образующийся гелевидный осадок можно собрать либо намотав клубком на стеклянную палочку, либо вытянув в виде нитей [12].

ДНК, полученная в результате описанной процедуры из тимуса теленка, как было установлено данными по светорассеянию, диффузии, седиментации и вискозиметрическими измерениями [13], имеет молекулярную массу от 5 до 10 миллионов. С одной

стороны, такой материал значительно превосходит тот, на котором проводились работы по установлению первичной структуры ДНК. С другой стороны, этот материал полностью непригоден для изучения структуры хромосом.

### 22.1.2.2. Первичная структура ДНК

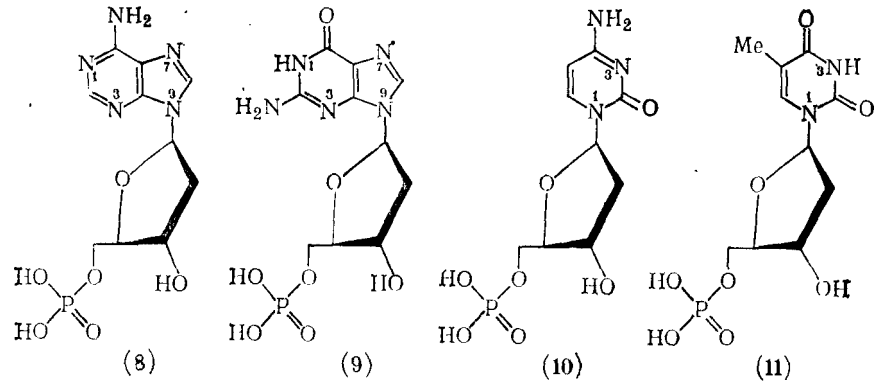
Химические исследования первичной структуры ДНК исторически тесно переплетались с аналогичными исследованиями РНК, однако часто отставали от последних по времени. Эти исследования рассматриваются здесь в первую очередь для сохранения единства обсуждения первичной, вторичной и третичной структур ДНК, из которых доминирующее значение имеет вторичная структура.

Сложности структурных исследований ДНК на ранних этапах заключались в ее устойчивости к избирательному гидролизу. Кислотный гидролиз ДНК приводит к более быстрому расщеплению связи между пуриновыми основаниями и дезоксирибозой, чем к расщеплению фосфодиэфирных связей. Кроме того, такие диэфиры устойчивы к щелочному гидролизу. (Соучастие соседней с гликозидной связью 2′-гидроксильной группы является существенной особенностью щелочного гидролиза РНК, см. гл. 22.3.) Таким образом, использование в 1935 г. Клейном и Танхаузером [14] ингибируемого арсенатом фермента фосфатазы для фрагментирования ДНК явилось важным достижением. Это дало возможность получить четыре дезоксирибонуклеотида в кристаллическом состоянии. Каждый из дезоксирибонуклеотидов — дезоксиадениловая кислота (**8**), дезоксигуаниловая кислота (**9**), дезоксицитидиловая кислота (**10**) и дезокситимидиловая * кислота (**11**) — может быть гидролизован до соответствующего дезоксирибонуклеозида действием фермента, специфичного к 5′-фосфоэфирам. Эти и многие другие факты свидетельствовали о том, что соединениям (**8**)—(**11**) приписаны правильные структуры. Строгое доказательство их корректности было получено позднее в результате синтетических исследований кембриджской школы под руководством Александра Тодда.

В случае 2′-дезоксирибонуклеозидов синтетические работы оказались гораздо сложнее, чем для их рибо-аналогов из-за малой доступности 2-дезоксирибозы, так и из-за относительной нестабильности ее производных, необходимых для синтеза гликозидной связи. В результате первым синтетическим достижением в этой области было прямое превращение рибонуклеозидов в соответствующие дезоксирибонуклеозиды, иллюстрируемое на примере трансформации риботимидина в дезоксириботимидин (**12**) {схема (1) [15], см. также разд. 22.2.3.4}.

* До открытия риботимидина в составе транспортной РНК (см. гл. 22.2) дезокситимидин обычно называли тимидином. Таким образом, соединение (**11**) первоначально называли тимидиловой кислотой.

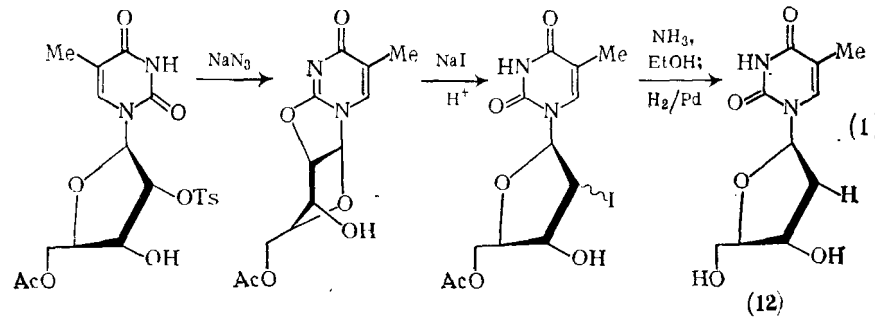




(**8**) (**9**) (**10**) (**11**)

Место присоединения сахара к гетероциклическому ядру было установлено однозначным синтезом в рибо-ряду (см. разд. 22.1.3.2). В дезоксирибонуклеозидах оно было идентифицировано как атом азота N-1 для пиримидинов * (на основании данных прямого химического превращения) и как атом N-9 для пуринов (на основании сравнения данных УФ-спектроскопии 9-метиладенина и 9-метилгуанина со спектральными данными соответствующих дезоксирибонуклеозидов) [16, 17].

Конфигурация гликозидного центра, образующегося в результате присоединения гетероциклического основания к аномерному атому углерода дезоксирибозы, была элегантно установлена образованием циклонуклеозида (**14**) при нагревании 3′-*O*-ацетил-5′-*O*-тозилдезоксиаденозина (**13**) в ацетоне [18] {схема (2)}.

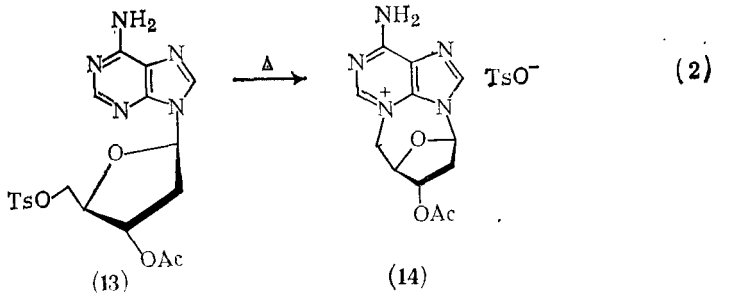


(**12**)

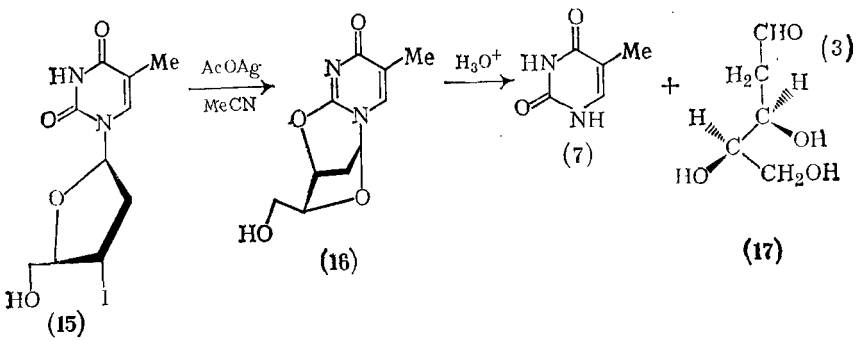
Такой внутримолекулярный процесс не возможен в случае α-гликозида. В ряду пиримидинов аналогичное доказательство β-гликозидной конфигурации было получено превращением 3′-иод-2′,3′-дидезоксириботимидина (**15**) в циклодезокситимидин (**16**).

* Применяемая в настоящее время система нумерации атомов в пиримидиновом цикле использует обозначения для атомов N-1 и N-3, отличные от применявшихся ранее. В итоге в старой литературе указывается, что в образовании гликозидной связи пиримидиновых нуклеозидов участвует атом азота N-3.

При кислотном гидролизе это соединение дает тимин (7) и 2-дезокси-*D*-ксилозу (17) [19] {схема (3)}.



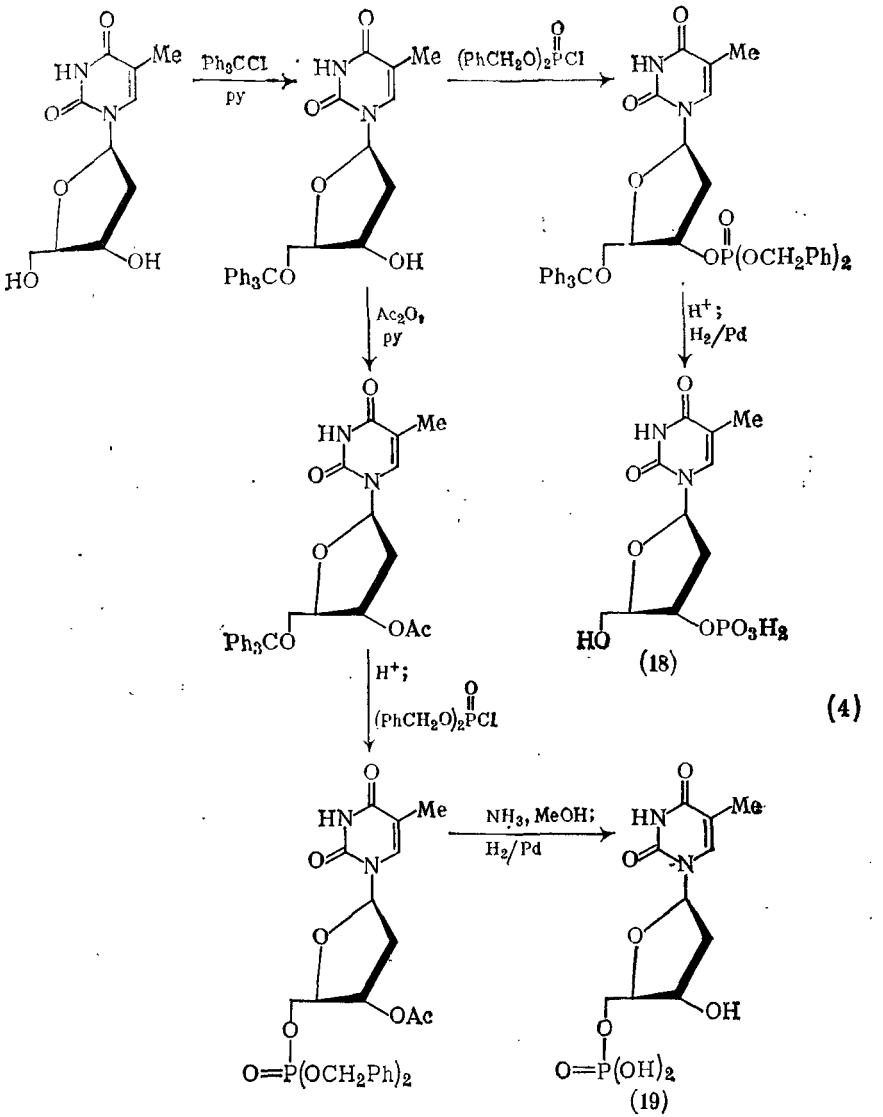

(13) (14) (2)




Ключевым моментом в идентификации места фосфорилирования в дезоксирибонуклеотидах было использование региоселективности реакции трифенилметилхлорида (тритилхлорида) с первичными (в большей степени, чем со вторичными) гидроксильными группами. Этот факт был положен в основу специального синтеза дезокситимидин-3′-фосфата (18) и -5′-фосфата (19) из дезокситимидина {схема (4)} [20]. Было подтверждено, что 5′-фосфат (19) идентичен мононуклеотиду, полученному Танхаузером [14].

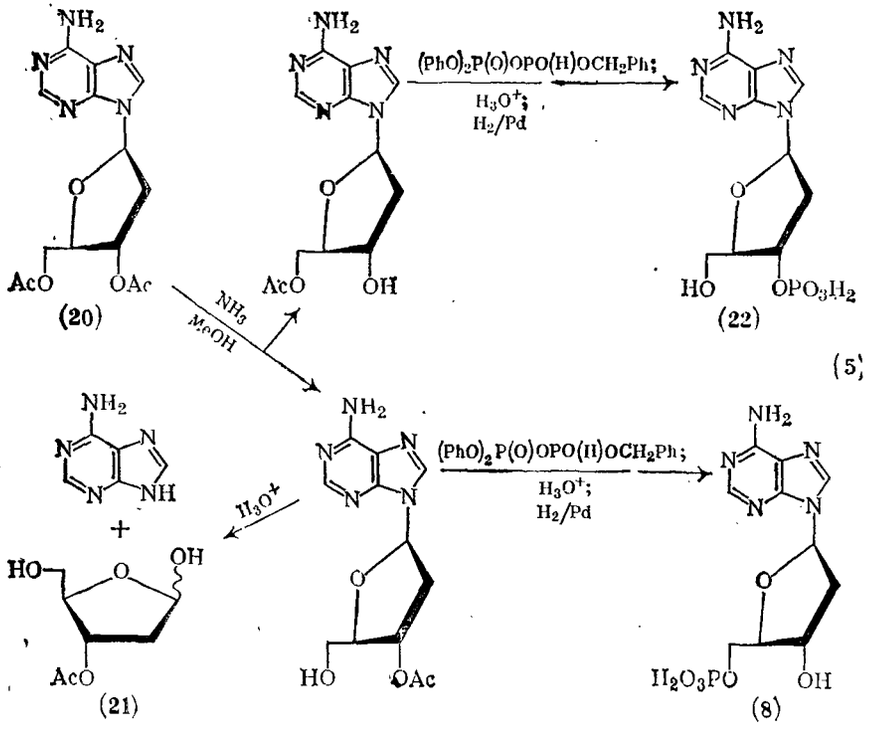
В то время как дезоксицитидин-3′- и -5′-фосфаты могут быть получены аналогичным образом [21], хорошо известная лабильность гликозидной связи пуринов при кислотном гидролизе создает сложности при синтезе пуриновых нуклеотидов. Они были преодолены тщательным разделением смеси 3′- и 5′-моноацетатов дезоксиаденозина, полученной в результате частичного дезацетилирования 3′,5′-ди-*O*-ацетилдезоксиаденозина (20) [20]. Структура этих моноацетатов была подтверждена тем, что в результате мягкого кислотного гидролиза первого из них образуется известная 3-*O*-ацетилдезоксирибоза (21). Изомерные моноацетаты были раздельно подвергнуты фосфорилированию, и после удаления защитных групп получены дезоксиаденозин-3′-фосфат (22) и -5′-фосфат (8) {схема (5)}. Аналогичная процедура была использована для синтеза дезоксигуанозин-3′-фосфата и -5′-фосфата (9) [22].






(4)

Эти синтетические достижения обеспечили возможность прямой идентификации 5′-дезоксинуклеотидов, образующихся в результате ферментативного гидролиза ДНК, который стал возможен в результате работ Клейна и Танхаузера [14]. Эти же исследователи определили структуры 3′-дезоксинуклеотидов, полученных из ДНК при ферментативном переваривании ДНК нуклеазой микрококков [23]. Были синтезированы также 3′,5′-дифосфаты дезоксицитидина и дезокситимидина [24] и использованы для доказательства



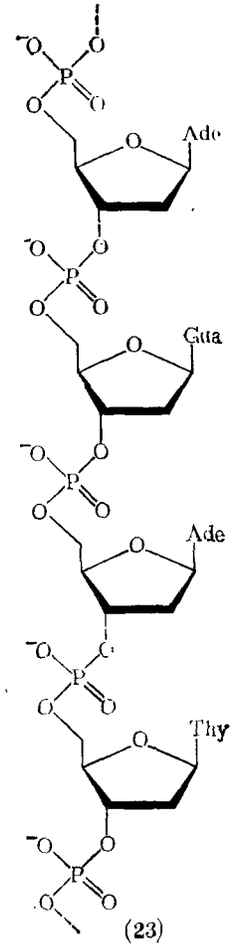

структуры дифосфатов, обнаруженных в качестве минорных компонентов среди продуктов кислотного гидролиза ДНК.

Основы первичной структуры ДНК оказались, таким образом, достаточно ясными. Было выяснено, что каждый мономер обладает двумя гидроксильными группами на молекулу нуклеозида; стабильность ДНК к гидролизу оказалась в точности такой же, как и для простых фосфодиэфиров (время полупревращения — 116 дней при 20 °C и pH 7); кроме того, было известно, что молекула ДНК представляет собой полимер с высокой молекулярной массой. За время, прошедшее с работ Левина, Штаудингер доказал существование макромолекулярных структур, и оценки молекулярной массы ДНК поднялись до величин, значительно превышающих 1 миллион (в связи со значительным улучшением методов ее получения в чистом виде).

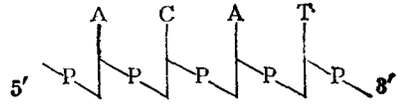
Таким образом, подавляющее большинство данных, доступных к началу 1950-ых годов, показывало, что ДНК представляет собой линейный полинуклеотид, в котором один нуклеозид соединен посредством своей 5′-гидроксильной группы через фосфодиэфирный остаток с 3′-гидроксильной группой одного соседа, а своей 3′-гидроксильной группой, также через фосфатную связь, с другим соседом, как это показано на структурной формуле (23). Полное структурное изображение (23) очень громоздко и оно было быстро



сокращено в более простую форму записи (24), напоминающую Фишеровскую проекцию для сахаров, которая, в свою очередь, уступила место сжатой форме (25) *. По общепринятому соглашению [25] при использовании записи типа (25) буква «р», используемая как префикс, означает 5′-фосфатную группу, а используемая как суффикс — обозначает 3′-фосфатную группу. Начальная буква «d» обозначает цепь дезоксирибонуклеотидов, в то время как буква «r», используемая в качестве префикса, служит для обозначения рибонуклеотидов.




(23)




(24)

**5′ ... dpApGpApTp ... 3′**
**(25)**

* Принято писать цепь ДНК с 3′ → 5′-фосфодиэфирной связью слева направо. При этом на левом конце цепи сохраняется свободная 5′-гидроксильная группа, а на правом — 3′-гидроксильная группа. (При написании длинных последовательностей буква «р» между обозначениями мономерных звеньев часто вообще опускается. — *Прим. пер.*)

Химики, занимавшиеся установлением структуры, долгое время сохраняли большую осторожность в суждении о наличии в ДНК исключительно 3′→5′-фосфатной связи. Они допускали, что химические методы могут потерпеть фиаско в определении небольшого числа, например, 5′→5′- или 3′→3′-связей или даже присутствия случайных пирофосфатных групп. Эта осторожность, как оказалось, была излишней. В настоящее время нет оснований предполагать наличие в ДНК какой-либо иной межнуклеотидной связи, отличной от 3′→5′-фосфодиэфирной.

В принципе, исследование первичной структуры ДНК логически сводится, как это имеет место в пептидной химии, к анализу последовательности четырех мономеров в цепи ДНК. На практике же решение этой задачи растянулось более чем на 20 лет, до тех пор пока не стали доступны чистые образцы ДНК. В то же время, все будущее биологии изменилось в результате взрывообразного импульса открытия вторичной структуры ДНК.

### 22.1.2.3. Вторичная структура ДНК

Тетрануклеотидная гипотеза строения ДНК расцвела в 1920-ых годах, начала чахнуть в 30-ых и умерла в 40-ых. Исследования, проводившиеся в трех различных направлениях, привели к накоплению данных, потребовавших создания новой концепции о вторичной структуре ДНК.

Во-первых, при исследовании полимерной структуры ДНК были выяснены такие подробности, которые не могли быть объяснены гелеобразной агрегацией тетрануклеотидов. Ее физические свойства соответствовали свойствам, которые можно ожидать для палочкообразной молекулы, чья длина превышает толщину на фактор, значение которого возрастало от 300 до 700 по мере улучшения качества препаратов ДНК [26]. Гуланд обнаружил, что разнообразие биологической специфичности, проявляемой ДНК, требует большей вариабельности структуры нуклеиновой кислоты, чем та, которую можно обеспечить повторением тетрануклеотидного звена при варьировании только длины молекулы.

Во-вторых, Астбюри, оставив работы по изучению структуры белков, изучил дифракцию рентгеновских лучей на вытянутых нитях ДНК. Он сделал заключение, что «регулярные периоды в 0,334 нм, наблюдаемые вдоль оси нити, соответствуют плоским или уплощенным основаниям нуклеотидов при их плотной упаковке перпендикулярно длинной оси молекулы с образованием относительно жесткой структуры» [27]. Он также предположил, что истинный период повторения (виток спирали) вдоль оси ДНК должен быть как минимум в 17 раз больше толщины нуклеотида. Его данные также противоречили тетрануклеотидной гипотезе, которая предполагает повторение через 1,3 нм ($=0{,}334 \times 4$).

В-третьих, и это главное, Чаргафф применил бумажную хроматографию для количественного анализа соотношения оснований нуклеиновых кислот (табл. 22.1.1), использовав один из первых коммерчески доступных ультрафиолетовых спектрофотометров, пригодных для анализа. Точность, которой он достиг, была сопоставима с точностью анализа содержания аминокислот в белках и была более чем достаточна для отклонения тетрануклеотидной гипотезы.

*Таблица 22.1.1. Соотношение оснований нуклеиновых кислот, полученное Чаргаффом в 1949 г. [27а]*

| Источник ДНК | Аденин | Тимин | Гуанин | Цитозин |
|---|---|---|---|---|
| Тимус теленка | 1,7 | 1,6 | 1,2 | 1,0 |
| Селезенка быка | 1,6 | 1,5 | 1,3 | 1,0 |
| Дрожжи | 1,8 | 1,9 | 1,0 | 1,0 |
| Бациллы туберкулеза | 1,1 | 1,0 | 2,6 | 2,4 |

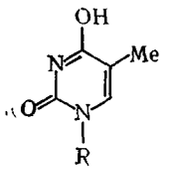
Из этих и более обширных анализов соотношения оснований нуклеиновых кислот были сделаны три заключения. Во-первых, количество пуринов всегда равно количеству пиримидинов. Во-вторых, соотношение аденин : тимин и соотношение гуанин : цитозин всегда близко к единице. В-третьих, соотношение (A+T)/(G+C) широко варьирует для ДНК из различных образцов, но остается постоянным для ДНК взятых из различных органов одного и того же биологического источника. Тетрануклеотидная гипотеза, предполагающая равные соотношения всех четырех оснований, была таким образом полностью дискредитирована.

Знакомство с обстоятельствами, которые свели вместе Уотсона и Крика в решении проблемы вторичной структуры ДНК, представляет собой увлекательное чтение [28, 29]. Сила их содружества лежит как в разнообразии их научного опыта, так и в искреннем, почти грубом взаимном критицизме, который давал возможность двум партнерам отбрасывать одну за другой модели структур ДНК до тех пор, пока они не создали одну единственную модель, соответствующую всем имевшимся данным.

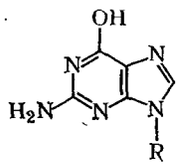
В процессе создания этой модели были использованы многочисленные результаты работ различных исследовательских коллективов. Данные по диффракции рентгеновских лучей, полученные Уилкинсом и Франклин показывали, что нити ДНК обладают высокой степенью кристалличности и могут быть охарактеризованы как А-форма при 70%-ной относительной влажности образца и как В-форма при влажности около 90% [30]. Данные о В-форме свидетельствовали о том, что ДНК является спиралью с расстоянием в 0,34 нм между основаниями нуклеотидов и повторением спиральной конформации (период идентичности) через 3,4 нм. Уотсон заключил, что количество нуклеотидов на единицу кристаллографической ячейки находится в лучшем соответствии с двунитевой,

а не с трехнитевой спиралью. Из того факта, что А-форма обладает моноклинической $C^2$-сингонией, Крик заключил, что спиральные цепи должны располагаться антипараллельно, образуя диадные оси, перпендикулярные оси спирали. В то время как Лайнус Полинг предположил спираль с основаниями снаружи углеводофосфатного остова, Уотсон и Крик установили, что гетероциклические основания спрятаны внутрь спирали, образуемой углеводофосфатным скелетом.

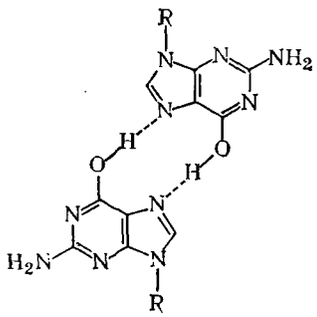
Исследования кислотнощелочного титрования ДНК четко показали, что между основаниями существуют водородные связи. Более того, рентгеноструктурные исследования гидрохлоридов аденина и гуанина показали множественность таких водородных связей. Уотсон первоначально предложил модель спаривания оснований по принципу — «подобное с подобным». В таких парах тимин (**26**) и гуанин (**27**) изображались в енольных таутомерных формах, как они и были представлены в стандартных учебниках того времени [31]. {Такое гомо-спаривание (**28**) не могло реализоваться для оснований в их правильной кето-таутомерной форме}. Как только Уотсон осознал необходимость использования гетероциклических оснований в их правильных кетоформах, у него в руках оказалась удачная возможность объяснить второе правило Чаргаффа спариванием аденина с тимином (**29**) и гуанина с цитозином (**30**). Эти структуры неизбежно приводят к такому же симметричному расположению гликозидных связей в каждой паре. Обе они имеют диадные оси в плоскости оснований, перпендикулярные оси спирали ДНК [32]. Основа вторичной структуры ДНК была установлена!



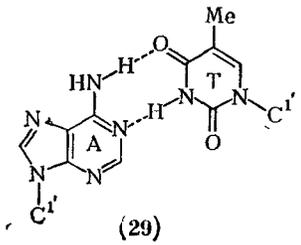
(26)



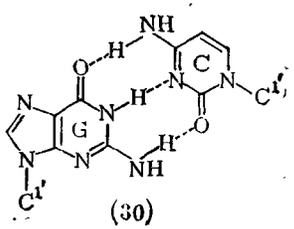
(27)



(28)



(29)



(30)



Исходная модель Уотсона-Крика для паракристаллической *B*-формы ДНК была уточнена Уилкинсом [30] (рис. 22.1.1). Ее принципиальные особенности заключаются в том, что это закрученная правосторонняя двойная спираль, имеющая 10 остатков на период в 3,4 нм. Пары оснований фактически перпендикулярны оси спирали, а углеводные кольца практически планарны (предполагается, что они находятся преимущественно в *C2-эндо*-конформации и под прямыми углами к основаниям). Фосфатные остатки расположены как бы на цилиндрической поверхности с радиусом примерно в 0,9 нм, считая от оси спирали, которая лежит между водородными связями, соединяющими пары оснований.

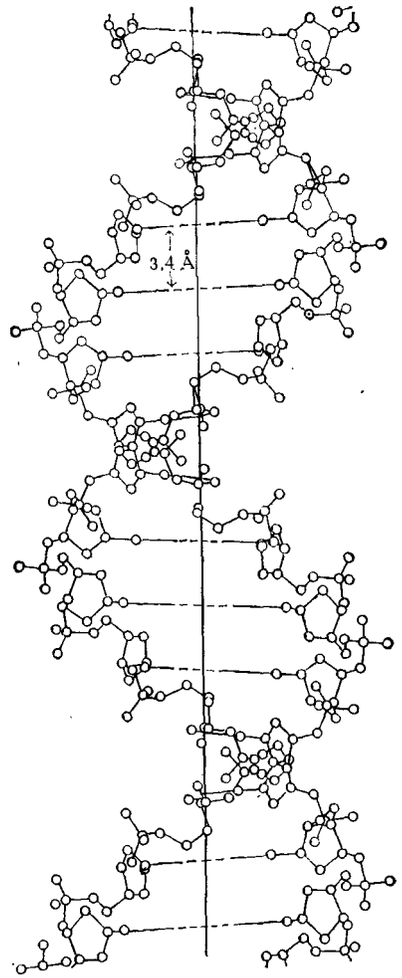


Рис. 22.1.1. Проекция молекулы ДНК в *B*-конформации [30].

Для более высококристаллической *A*-конформации ДНК пары оснований повернуты на 20° от плоскости, перпендикулярной к оси спирали; на один оборот спирали в 2,8 нм приходится 11 нуклеотидов; ширина двойной правосторонней спирали составляет 2,2 нм (рис. 22.1.2).

Многочисленные дебаты относительно корректности этой структуры касались преимущественно модели водородных связей между комплиментарными парами оснований, аденин-тимин и гуанин-цитозин. Кристаллографические исследования бинарных комплексов подходящих производных этих оснований выявили возможность существования водородных связей, альтернативных использованным Уотсоном и Криком в структурах (**29**) и (**30**). Действительно, до 1973 г. обнаружение уотсон-криковских структур было скорее исключением, чем правилом. В 1973 г. Рич и его коллеги получили кристаллы динатриевой соли динуклеозидфосфата rApU. Эта самокомплиментарная молекула существует в кристалле как сегмент правовращающей антипараллельной двойной спирали, содержащей уотсон-криковские водородные связи (см. разд. 22.1.3.4).

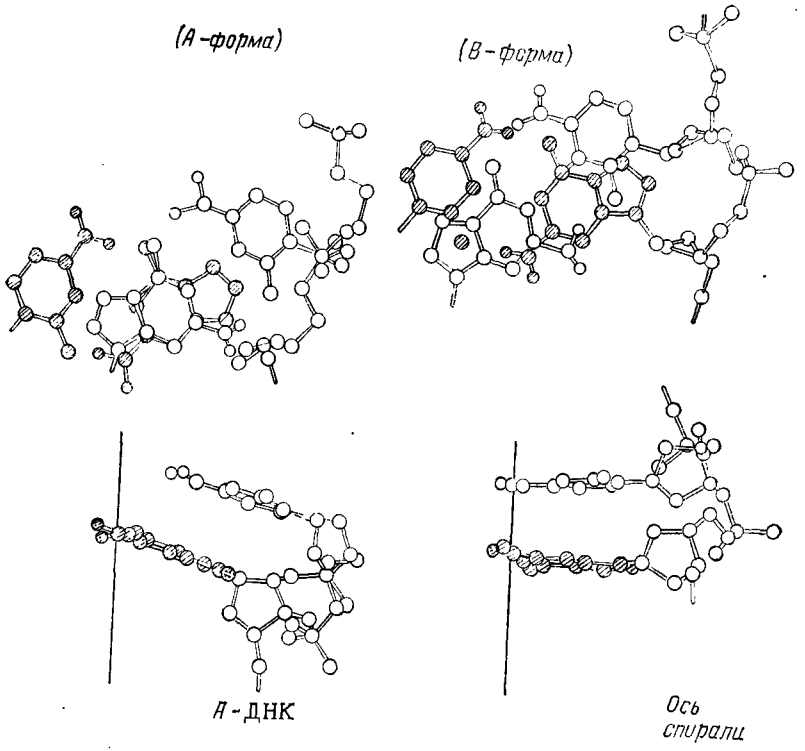



Рис. 22.1.2. Фрагмент молекулярной структуры *A*- и *B*-форм ДНК в проекции вниз по оси нити (сверху) и вдоль диадной оси молекулы (внизу) [33].

С точки зрения фундаментальной структуры и биологической правильности спаривание A с T и G с C не вызывает сомнений. Эта комплиментарность лежит в основе корреляции между структурой и функцией нуклеиновых кислот (см. гл. 22.5). Она является также основной особенностью предложенной недавно альтернативной вторичной структуры ДНК, где сделана попытка решить одну проблему, на которую не дает ответа модель Уотсона-Крика. Это ни что иное как серьезные топологические затруднения, возникающие при разделении цепей полностью заплетенной двойной спирали ДНК в процессе биологической репликации (см. разд. 22.5.1.1).

Эта структурная модель (рис. 22.1.3), получившая в зарубежной литературе название side by side [34], представляет собой как бы колеблющуюся полосу. Она свернута в правовращающую двойную спираль на протяжении 1,7 нм, а затем двойная спираль закручивается в левостороннем направлении на следующие 1,7 нм. Таким образом, эта модель сохраняет основные особенности *B*-формы ДНК (!): период в 3,4 нм на 10 нуклеотидных оснований; уотсон-криковские пары оснований в плоскости, перпендикулярной к оси спирали. Однако эта модель предполагает ряд изменений в конформации углеводного кольца, в частности связи C-4′, C-5′ и фосфодиэфирных связей, необходимых для реализации левосторонней спирали, а также при резких изменениях направления спиральности молекулы «справа-налево» и «слева-направо». Автор этой модели утверждает, что она приемлема в стерическом отношении и при исследовании методом диффракции рентгеновских лучей ее рентгенограмма не будет отличаться от *B*-формы ДНК.

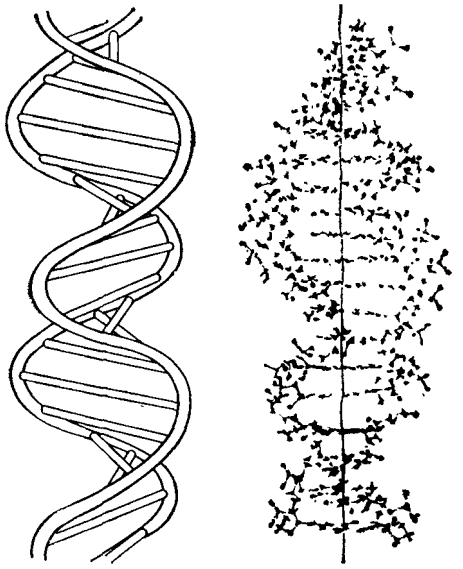


Рис. 22.1.3. Упрощенное изображение модели «side-by-side» вторичной структуры ДНК (слева) и изображение детальной модели (справа) [34].

Кажется, что эта модель обладает двумя структурными преимуществами. Она должна быть способна к разделению на две одиночные цепи по типу «расстегивания застежки молнии» без каких-либо топологических препятствий, которыми сопровождаются эти процессы в *полностью заплетенных* двойных спиралях. Она также в большей степени способна к изгибам, чем тугая, похожая по поведению на палочку двойная спираль Уотсона-Крика. В связи с этим она может давать «спираль с изломами», которая была предложена [35], как возможная особенность структуры хроматина.

Следуя историческому развитию темы, надо сказать, что в дальнейшем основной упор был сделан на изучение водородных связей между основаниями. Несмотря на то, что они несомненно ответственны за комплиментарность оснований во многих различных ситуациях, одни лишь водородные связи *не способны* удерживать вместе две цепи спирали. Распространенное в настоящее время единодушное мнение заключается в том, что определяющим фактором образования спирали является стэкинг планарных квазиароматических оснований, расположенных одно над другим и что возникающие в результате этого гидрофобные силы являются основной опорой двойной спирали.

### 22.1.2.4. Третичная структура ДНК

Представления о ДНК, данные в предыдущем разделе, требуют значительного развития для их приближения к реальной ДНК, существующей в живой клетке. К примеру, бактерия *E. coli* имеет

в длину 2 мкм, а заключает в себе хромосомную ДНК длиной 1,1 мм. Аналогично, ДНК, выделяемая из фаговых частиц, распрямляется в водном растворе и занимает объем, в 15 раз превышающий емкость головки бактериофага [36]. Та же проблема возникает при рассмотрении ДНК в хромосомах клеток высших организмов, и она сложным образом связана с природой ДНК-белковых взаимодействий.

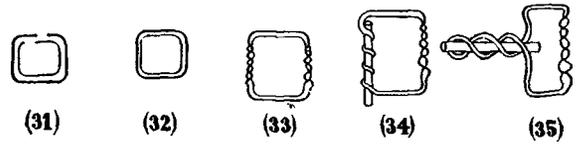
Поскольку эти проблемы лежат уже практически за гранью химической структуры, рассмотрим два более простых типа третичной структуры, которые можно описать с определенной точностью. В некоторых вирусах и бактериях ДНК несомненно существует в форме замкнутого цикла, что связано с новыми типами топологической структуры. Заметим, что эти топологические особенности имеют некоторую связь с развиваемыми представлениями о структуре хромосомы.

### *(1). Кольцевые ДНК*

Условия, необходимые для превращения линейной ДНК в кольцевую, заключаются в наличие у нее пары «липких концов». Каждый из этих концов должен иметь нить той же полярности (например, оба 5′-конца) длиннее, чем другой полярности (3′-концы) с одинаковым числом избыточных оснований (от четырех до десяти) и в обратной комплиментарности (см. рис. 22.5.7). Такие однонитиевые участки могут затем, аннелируясь, образовывать область дуплекса, давая кольцевую форму молекулы ДНК. Такая кольцевая ДНК имеет по одному разрыву в обеих цепях (**31**). Если превратить эти разрывы в нормальные межнуклеотидные связи действием подходящего репарирующего фермента (лигазы), она превратится в замкнутую кольцевую ДНК (**32**), в которой обе цепи топологически связаны [37]. Многие бактериофаги (т. е. вирусы, паразитирующие на бактериях) обладают такими липкими концами, которые аннелируются, образуя «циклы Герши». Замкнутая кольцевая ДНК обнаружена в нативном состоянии во многих вирусах, бактериях и митохондриях, где эта форма ДНК является биологически активной [38], и может быть получена контролируемым химическим синтезом (см. гл. 22.4).

Из такой топологической связи вытекают две принципиальные особенности третичной структуры ДНК: цепи ДНК не могут быть разделены без разрывов одной или обеих цепей; ненапряженный замкнутый цикл укладывается инвариантно на плоскость, когда одна кольцевая нить определенное число раз обвивается вокруг другой. Это число называют топологическим числом витков $\alpha$. Второй параметр $\beta$, известный как число витков дуплекса, представляет собой отношение числа пар оснований в замкнутом цикле ($n$), к числу пар оснований, приходящихся на один оборот ненапряженной спирали ($m$). Если $m$ изменяется в результате изменения pH, ионной силы или температуры раствора, то меняется и значение $\beta$. Такие изменения создают конформационные напряжения, которые могут быть уменьшены путем создания скрученной или сверхспирализованной формы как топологической особенности третичной структуры.

Число таких сверхспиралей (суперспиралей) характеризуют числом сверхспиральных витков $\tau$, и оно связано с количеством топологических витков простым соотношением: $\tau = \alpha - \beta$. Характер этого соотношения иллюстрируется следующим примером. В замкнутом цикле (**32**) величины $\alpha$, $\beta$ и $\tau$ все равны нулю [39]. При закручивании на 3 оборота вправо и на 3 оборота влево в дуплекс (**33**) не происходит суммарного изменения величины $\beta$ ($+3 - 3 = 0$). Когда три левосторонние оборота превращаются в три сверхспиральных левосторонних оборота (**34**), образуется ненапряженный цикл, в котором теперь $\beta = +3$ и $\tau = -3$. Альтернативная трансформация молекулы заключается в том, что три левосторонние оборота в (**33**) могут измениться на три правосторонние внутризакрученные сверхспиральные витка, которые не вращаются друг вокруг друга (**35**). При этом $\alpha$ опять остается равным нулю. Если теперь одна цепь в структуре (**35**) имеет возможность совершить три оборота дуплекса не закручиваясь, а затем перекрутиться, то $\beta$ изменяется от $+3$ до 0, при этом $\alpha$ изменяется от 0 до $-3$. Когда эту новую топологическую конформацию вынуждают расположиться в плоскости, происходит топологическая трансформация ее трех внутривитковых сверхспиральных оборотов в три левосторонних дуплексных оборота.




Такая сверхспиральная ДНК реально наблюдается при электронной микроскопии. Полагают, что замкнутая кольцевая ДНК из природных источников имеет один сверхспиральный оборот примерно на 300 пар оснований.

Количество сверхспиралей изменяется при щелочном титровании ДНК или при интеркалировании в нее водорастворимых ароматических красителей. Оба эти процесса раскручивают двуспиральную ДНК [39—41] и таким образом уменьшают значение $\beta$. Это изменение можно легко обнаружить по изменению скорости седиментации [37] кольцевой ДНК или непосредственно при электронной микроскопии. Прекрасный образец последней (рис. 22.1.4) показывает изменения между препаратом кольцевой ДНК из раствора с низким содержанием соли со 128 перекрестами и препаратом той же ДНК, полученной из раствора с высоким содержанием соли, содержащей только 22 перекреста. Такие изменения приводят к заключению о том, что ДНК не имеет сверхспиральных

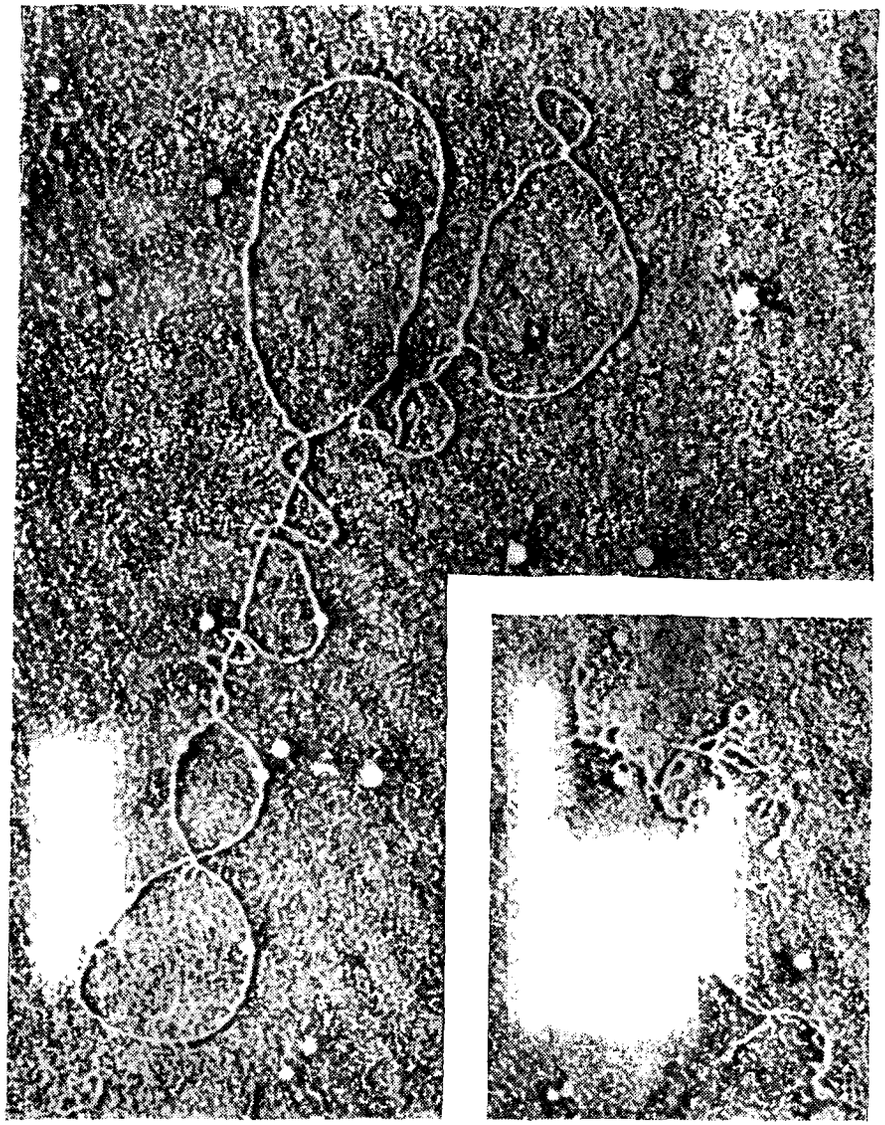


Рис. 22.1.4. Электронные микрофотографии замкнутой кольцевой молекулы ДНК.
Препараты скрученной (128 перекрестов; низкое содержание солей в препарате) и сравнительно нескрученной (22 перекреста; высокое содержание солей в препарате) кольцевой ДНК бактериофага λ [42].

витков *in vivo*, когда разомкнутое кольцо Герши (31) закрывается в замкнутый цикл (32). Однако они образуются при высоко солевом окружении ДНК. Так, когда ДНК выделяют *in vitro* при низкой ионной силе, шаг спирали дуплекса уменьшается, что выражается в увеличении значения α, которое отражает увеличение числа сверхвитков. Эта гипотеза объясняет, почему кольцевые ДНК из различных источников обладают относительно постоянным числом сверхвитков на единицу длины [37, 39].



### (2) *ДНК хромосом*

Высшая форма организации ДНК в клетке — это хромосома. На начальном этапе деления клетки хромосомы организуются в конденсированную форму, которую наблюдали под микроскопом еще около столетия назад. В клетке человека содержится 46 хромосом, имеющих общую длину в 200 мкм, которые содержат 2 метра ДНК. Это дает отношение упаковки 10 000, объясняемое третичной структурой ДНК и ее взаимодействием с хромосомными белками.

Хроматин — материал, составляющий хромосомы, содержит ДНК, небольшое количество РНК, гистоновые белки пяти видов и не гистоновые белки (около 400 типов в клетках млекопитающих), а также некоторое количество липидов. Способ организации хроматина начал выясняться начиная с 1974 г. Последние идеи можно обсуждать, исходя из четырех постепенно усложняющихся стадий структурной организации: нуклеотяж, соленоид, единичное волокно и хроматид.

Для *нуклеотяжа*, как основного компонента структуры хроматина Корнберг [43] предложил модель типа «связки бусинок». Эта модель объясняла обнаруженное соотношение пяти гистоновых белков, находящихся в комплексе с ДНК, природу их агрегации и тот факт, что определенные нуклеазы расщепляют большую часть хроматина на блоки длиной около 200 пар оснований. Эта модель имеет основную структурную единицу, называемую нуклеосомой. Нуклеосома состоит из двух молекул каждого из гистоновых белков H2A, H2B, H3 и H4, ассоциированных с кольцевой ДНК, содержащей 200 пар оснований. Полагают, что лишь одна из четырех нуклеосом находится также в комплексе с негистоновыми белками. Первые предположения заключались в том, что ДНК обернута вокруг внешней оболочки белкового кора нуклеосомы, образующей глобулу (36), которая соединена с соседними глобулами свободной короткой ДНК. Сравнительно недавно показано, что спираль ДНК находится в упорядоченном состоянии между двумя идентичными тетрамерами белков H2A, H2B, H3 и H4. Эти тетрамеры могут «открываться подобно книге», что позволяет осуществлять копирование ДНК без вытеснения гистоновых белков. Электронные микрофотографии хроматиновых зерен не позволяют выбрать более вероятную из этих моделей.

Поскольку глобулы имеют диаметр около 10 нм, а ДНК, ассоциированная с каждой из них, должна иметь длину примерно 70 нм, то фактор ее упаковки должен достигать 7. Из этого следует, что спираль ДНК должна закручиваться по типу гладкого

изгибания, или путем создания резких изгибов. Крик предположил, что последняя альтернатива может оказаться энергетически более выгодной, и описал способ, по которому перегибы, образуемые спиралью ДНК, могут вносить свой вклад в организацию ее третичной структуры [35]. Этот способ заключается в расстыковке оснований в одной точке спирали и повороте вокруг соответствующей связи C-4′, C-5′ дезоксирибозы обеих цепей за счет перехода углеводного остатка из *гош*-конформации в *транс*-. В результате образуется изгиб спирали на 98° в сторону малой бороздки. Ясно, что восемь таких переходов, возникающие через каждые 20 пар оснований, позволяют обернуть 200 пар оснований ДНК вокруг одной белковой глобулы, как это показано для структуры **(36)**, и образовать спираль второго порядка.

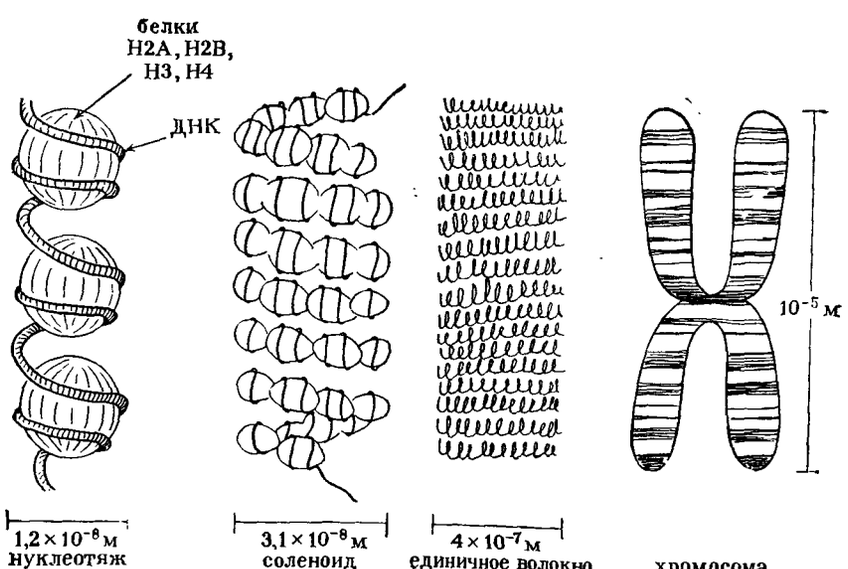
Форма агрегации этих глобул вовлекает ДНК в спирализацию третьего порядка. Как электронные микрофотографии [44], так и данные нейтронной дифракции [45] показывают наличие в структуре хроматинового волокна повторяющихся блоков размером в 11 нм. Модель, предложенная для расположения этих сверхспиралей, имеет конфигурацию *соленоида* с диаметром 31 нм, где один оборот включает 6 нуклеосом **(37)**. Структура соленоида закрепляется пятым гистоновым белком — H1, содержание которого составляет примерно одну молекулу на глобулу. Образование витка соленоида дает дополнительный фактор упаковки 6.

Следует полагать, что существует еще только один более высокий промежуточный уровень скрученности между соленоидом и наполовину разделенной хромосомой, известный под названием *хроматид*. Последние представления об этом промежуточном уровне предполагают, что это *единичное волокно* [46]. При очень тщательном манипулировании можно разделить хроматид человека на единичные волокна длиной 2—10 мкм и толщиной 400 нм. Они представляются похожими на толстостенные трубки, которые могут образоваться при закручивании соленоида плотно вокруг себя наподобие пружины. Кажется вероятным, что эти спирали чувствительны к дифференциальному прокрашиванию основными красителями и в результате этого образуется набор полос, наблюдаемый в образцах окрашенных хромосом **(38)**. Независимо от биологического значения, единичные волокна достигают фактора упаковки ДНК, равного 40. В результате остается только конечный фактор упаковки 6, необходимый для достижения полностью конденсированной ДНК, обнаруженной в хромосоме **(39)**, то есть фактор 3 для хроматида.

При рассмотрении всех этих моделей ничего не говорится ни о вкладе негистоновых регуляторных белков, ни о включении липидов и РНК. Однако они указывают на значительные успехи в структурном анализе ДНК.

Суммируя рассмотренные представления, можно представить себе следующую картину. Хроматид имеет одну молекулу ДНК, обвивающую его по всей длине. Она взаимодействует с четырьмя






гистоновыми белками, образуя нуклеосомы **(36)**, которые, взаимодействуя с пятым гистоновым белком, закручиваются в соленоид **(37)**. Соленоид в свою очередь может содержать негистоновые белки. Дальнейшая организация соленоида зависит от фазы клеточного цикла. В профазе он находится в диффузном состоянии, но резко конденсируется в ходе клеточного деления, вероятно в единичные волокна **(38)**, которые являются первичными компонентами конденсированной хромосомы **(39)**.

Пусть теперь читатель будет готов к тому, что при рассмотрении связи между структурой и функцией (см. гл. 22.5) предстоит обсуждать еще более сложные проблемы. Пока что мы обратимся к более простым вопросам, касающимся природы рибонуклеиновых кислот.

### 22.1.3. СТРУКТУРА РНК

Обсуждение в первую очередь структуры ДНК оправдано хотя бы потому, что в ядрах клеток эукариотов она является компонентом первостепенной важности. В то же время существует много важных типов РНК, обладающих различными индивидуальными свойствами.

#### 22.1.3.1. Выделение и характеристика РНК

Большинство видов клеток содержит три принципиально различных типа РНК. Все они копируются с хромосомной ДНК в соответствии с принципом комплиментарности оснований. Они имеют общую первичную структуру, но различаются последова-

тельностью нуклеотидных звеньев, длиной цепи и пространственной организацией [47].

Основная масса РНК клетки является главным структурным компонентом рибосом — частиц, связанных с синтезом белков (см. разд. 22.5.3.2). Это рибосомальная РНК (рРНК). Рибосомы можно достаточно просто получить центрифугированием, а затем подвергнуть диссоциации на белок (40 %) и рРНК (60 %). Бактериальные клетки продуцируют три основных типа РНК, которые различаются по своим седиментационным характеристикам на 5S, 16S и 23S рРНК (у млекопитающих эти РНК подразделяются на 5S, 18S и 28S рРНК соответственно). Если же характеризовать их по длине цепи, они имеют соответственно 120, 1600 и 3000 остатков. Все они (возможно, за исключением 28S рРНК) представляют собой ковалентносвязанные линейные одноцепочечные молекулы.

Первый охарактеризованный тип РНК — транспортные РНК (тРНК), составляющие 10—15 % от общей массы клеточных РНК и содержащиеся в цитоплазме клетки. В клетке млекопитающих может существовать до 100 миллионов молекул тРНК примерно пятидесяти различных типов; длина каждой из них составляет 73—85 нуклеотидных звеньев. Их легко выделить и очистить методами хроматографии; в некоторых случаях их можно получить в кристаллическом состоянии.

Наиболее короткоживущая форма РНК — это информационная (матричная, мРНК), которая переносит информацию от хромосомы к месту синтеза белков. Такая мРНК, составляющая лишь 3—5% от общего количества РНК в клетке, гетерогенна по размеру (содержит примерно $10^3$ нуклеотидов) и имеет короткое время жизни (значение $\tau_{1/2}$ варьирует от 1 мин у бактерий до 0,5 дня в опухолевых клетках человека). Использование специальной техники, в особенности электрофореза в полиакриламидном геле, дало возможность очистить мРНК, соответствующие таким веществам как β-глобин, миозин и овальбумин [48]. По широко распространенному мнению предшественником гетерогенной мРНК является высокомолекулярная ядерная РНК, известная как яРНК.

Особым и весьма важным типом мРНК являются нуклеиновые кислоты таких вирусов, которые, будучи построены только из белка и РНК, используют рибонуклеиновую кислоту как свой генетический материал. Одноцепочечные вирусные РНК таких объектов, как бактериофаги MS2, R17, f2 и вирус саркомы птиц, действительно выполняют одновременно как функции собственно мРНК, так и функции матрицы для репликации в процессе биосинтеза новых вирусов. Поскольку их относительно просто получить в чистом виде, именно они стали одним из первых объектов изучения последовательности оснований в РНК (см. гл. 22.4).

Помимо перечисленных типов РНК во всех клетках животных существует много малых РНК. Их существование в клетке связывают с организацией хромосом, с биосинтезом рибосомальной



РНК, а также с выполнением в клетке неких еще не идентифицированных функций. Играют ли они структурную роль или же являются реликтовыми по прошлым функциям, выполняемыми теперь белками, этот вопрос является предметом догадок и спекуляций.

### 22.1.3.2. Первичная структура РНК

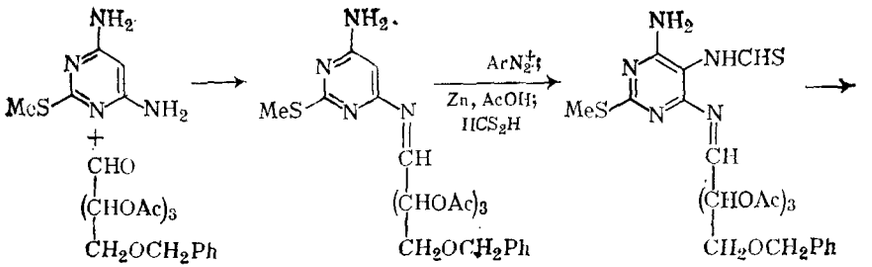
Состав оснований РНК значительно шире, чем состав ДНК (см. гл. 22.4). В ранних работах по первичной структуре РНК был сделан вывод о том, что четыре основных гетероциклических основания — аденин, цитозин, гуанин и урацил, связаны с *D*-рибозой, образуя четыре рибонуклеозида — rA (3), rC (4), rG (5) и rU (6), соответственно. Положение гликозидной связи, приписанное первоначально на основании данных УФ-спектроскопии [16], было окончательно подтверждено полным химическим синтезом {схема (6)} [49]. Показано, что атомы N-9 аденина и C-1 рибозы связаны гликозидной связью, а рибоза существует в фуранозной форме, что уже ранее было установлено по отсутствию образования муравьиной кислоты при периодатном расщеплении *цис*-гликольной группировки [50]. β-Конфигурация гликозидной связи подтверждена превращением 2′,3′-*O*-изопропилиден-5′-*O*-тозиладенозина (40) в циклонуклеозид (41) [51] {схема (7)}.

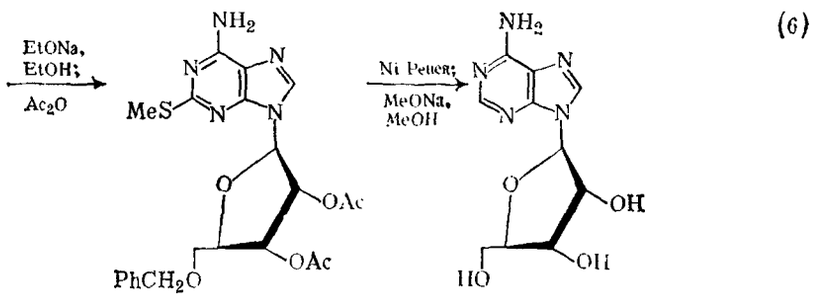
Структуры пиримидиновых нуклеозидов были установлены различными способами. Уридин (6) при метилировании дает моно-*N*-метилуридин (хотя урацил превращается в 1,3-диметилурацил), гидролизуемый до 3-метилурацила (42). Таким образом, в уридине рибоза должна быть присоединена к атому азота N-1 урацила. Цитидин (5) непосредственно превращается в уридин при дезаминировании азотистой кислотой (см. глава 22.5), чем было завершено определение структур рибонуклеозидов.

Конформация, в которой существуют нуклеозиды, не считалась важной до тех пор, пока Фурберг не провел исследование кристаллической структуры цитидина. Оказалось, что плоскость углеводного кольца расположена под прямым углом к плоскости цитозинового основания [52]. Включение этих данных в работу по созданию модели ДНК явилось важным вкладом.

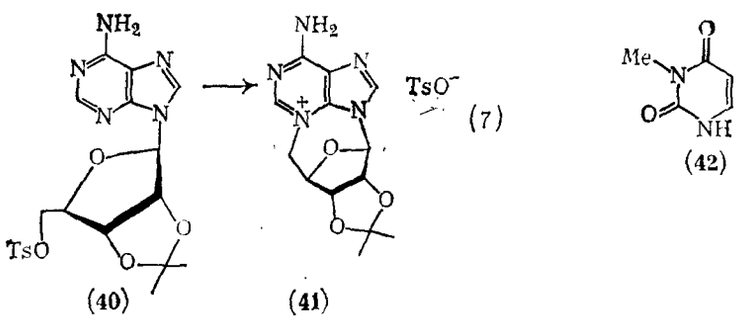
Установлению структуры рибонуклеотидов весьма способствовало применение изопропилиденовой защитной группировки, используемой для реакции с *цис*-диольной системой в положении 2′ и 3′ рибофуранозного остатка. Типичным примером является фосфорилирование изопропилиденаденозина (43) под действием дибензилхлорфосфата. Последующее удаление защитной группы приводит к аденозин-5′-фосфату [53], оказавшемуся идентичным адениновому нуклеотиду, выделенному в 1927 г. [54].

Четыре нуклеотида prA, prC, prG и prU, синтезированные этим способом, отличались, однако, от «четырех мононуклеотидов», полученных при щелочном гидролизе РНК. Правда, в ранних



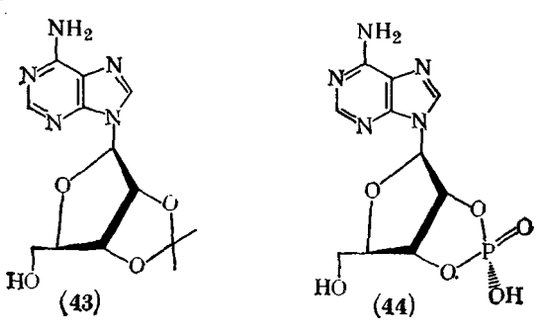


(6)



(40) (41)

работах им приписывали структуру рибонуклеозид-3′-фосфатов, но Кон методом ионообменной хроматографии сумел разделить каждый из «четырех мононуклеотидов» на пару изомеров [55]. В случае двух адениловых кислот было использовано несколько

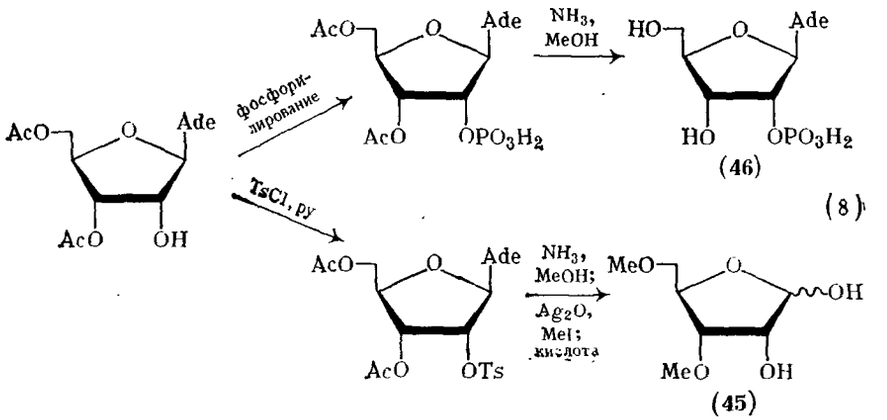


(43) (44)



методов для установления того факта, что они являются 2′- и 3′-фосфатами аденозина. В том числе было осуществлено их взаимное превращение в 2′,3′-циклофосфат (**44**) при обработке трифторуксусным ангидридом [56].

Положение фосфатной группы у этих двух изомеров было первоначально приписано на основании данных физических измерений и их гидролиза, в результате которого образуется *D*-рибозо-2′-фосфат и 3′-фосфат. Тем не менее, однозначный синтез этих соединений оказался необходимым, поскольку выяснилось, что внутримолекулярное взаимопревращение этих двух изомеров, катализируемое кислотой, происходит со скоростью, сравнимой со скоростью гидролиза гликозидной связи. Ацетилирование 5′-*O*-ацетиладенозина приводит к кристаллическому продукту, который является 3′,5′-диацетатом, как установлено путем серии превращений, приводящих в конечном итоге к 3,5-ди-*O*-метилрибозе (**45**). Следовательно, фосфорилирование этого диацетата и удаление защитных групп в щелочных условиях, когда не происходит миграции фосфатной группы, дает аденозин-2′-фосфат (**46**) {схема 8}. Фосфат (**46**) был идентичен *a*-изомеру [57], который элюировался первым с колонки Кона. *b*-Изомер, как показано методом рентгеновской кристаллографии, является [58] аденозин-3′-фосфатом, гАр. Аналогичный синтез продемонстрировал, что уридиловая кислота *a* является 2′-фосфатом. Позднее был проведен кристаллографический анализ цитидиловой кислоты *b*, который подтвердил, что она является 3′-фосфатом, гСр [59].



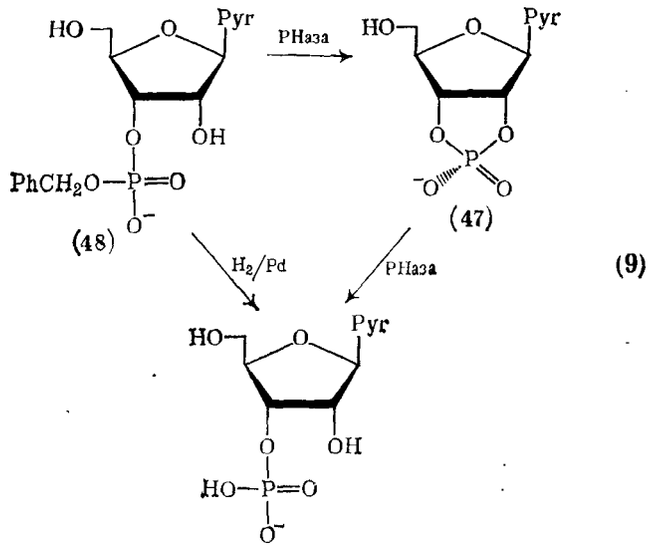
(8)

(45) (46)

На соответствующих стадиях анализа полимерная структура ДНК была фактически сама собой очевидна. Однако для РНК приведенные выше данные о химическом строении мономерных звеньев совместимы с тремя возможными полимерными структурами, содержащими межнуклеотидную связь 5′→3′ или 5′→2′ или содержащую эти два типа связи в различных пропорциях. Эта

проблема была разрешена с использованием избирательного ферментативного гидролиза.

Из панкреатической железы была выделена рибонуклеаза, полученная в 1940 г. в кристаллическом состоянии. Она действует на РНК, расщепляя фосфоэфирную связь присоединенного к положению 3′ пиримидинового нуклеозида (см. гл. 22.3). Особенности ее действия были исследованы Маркхамом и Смитом, которые показали, что первичными продуктами действия этой РНазы на РНК являются 2′,3′-циклофосфаты уридина и цитидина (**47**). Они в свою очередь на следующей стадии ферментативной реакции медленно гидролизуются до 3′-фосфатов [60]. Для пуриновых остатков в то время не было аналогичных ферментов, обладающих подобной специфичностью. (Такодиастаза была открыта позднее). Однако в руках исследователей была фосфодиэстераза селезенки, которая действует как экзонуклеаза * и дает все четыре рибонуклеозид-3′-фосфата.




(9)

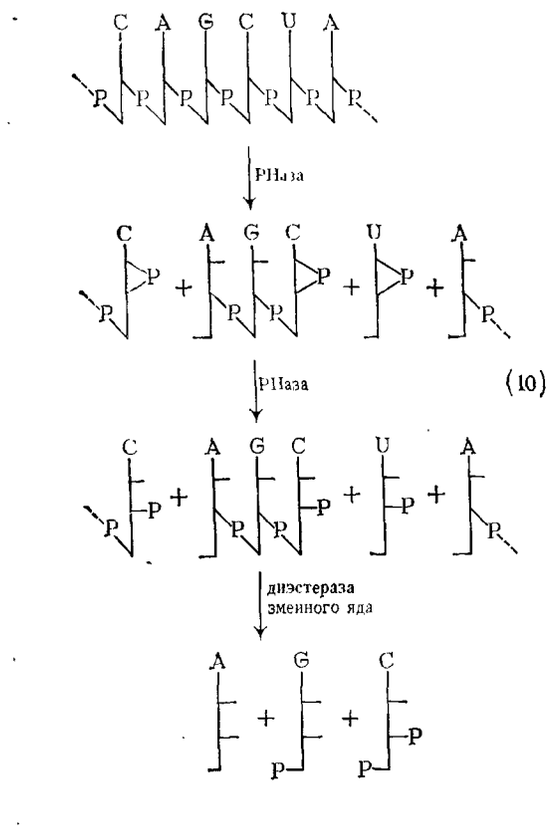
Полученная в результате этих экспериментов информация была дополнена демонстрацией того факта, что эти ферменты столь же хорошо способны гидролизовать бензилфосфатные эфиры 3′-нуклеотидов (**48**), но не действуют на соответствующие бензиловые эфиры 2′-нуклеотидов {схема (9)}. В результате стало очевидным, что в образовании межнуклеотидной связи участвует 3′-, а не 2′-гидроксильная группа рибозы.

Доказательства использования 5′-положения в образовании межнуклеотидной связи вытекали из работ Гуланда и Джексона

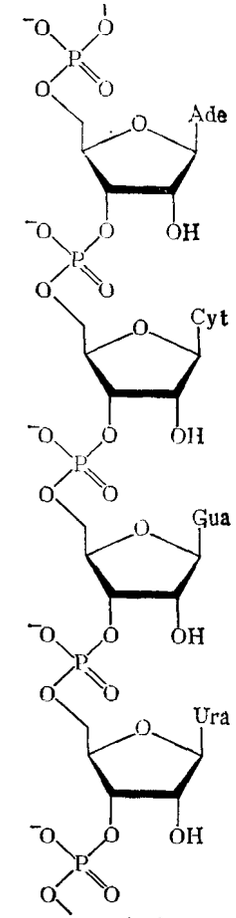
* Эндо-атака проходит по середине цепи, а экзо-атака — по концевым остаткам цепи.



[61] и были дополнены Коном и Волкиным [62]. Использовав арсенит для подавления нежелательной фосфомоноэстеразной активности, они подвергли РНК действию фосфодиэстеразы из кишечника и получили все четыре рибонуклеозид-5′-фосфата. Тот же результат был достигнут позднее с использованием фосфодиэстеразы змеиного яда. Эта работа подтвердила общую первичную структуру РНК как имеющую только 5′→3′-связи (**49**). Путь ферментативного гидролиза показан на схеме (**10**) с использованием компактной формы структурного изображения РНК.




(10)




(49)

Наличие 2′-гидроксильной группы делает формально допустимым наличие разветвлений в структуре РНК. Однако не было представлено ни единого доказательства в поддержку этой возможности. РНК, подобно ДНК, является линейным полинуклеотидом с инвариантной 5′→3′-межнуклеотидной связью.

Важное различие между РНК и ДНК — большое количество модифицированных оснований, найденных в РНК. Это различие особенно резко выражено в случае транспортных РНК.

Обсуждение методов определения первичной последовательности рибонукленовых кислот мы отложим до тех пор, пока не будет обсуждена химия минорных нуклеозидов (см. гл. 22.2). Однако некоторые результаты исследований последовательности (см. гл. 22.4) необходимо суммировать в нижеследующем обсуждении вторичной и третичной структуры РНК.

### 22.1.3.3. Вторичная структура РНК

В то время как основные типы РНК, обнаруживаемые в природе, являются однонитевыми нуклеиновыми кислотами, небольшая часть вирусов, например реовирусы, содержат РНК в виде двойной спирали. Эти РНК имеют такой состав оснований, в котором A = U и G = C. Они проявляют заметную устойчивость к гидролизу рибонуклеазами, если их не подвергать предварительной тепловой денатурации. Такие РНК могут быть выделены из растворов в виде нитей или же аналогичные нити могут быть приготовлены из препаратов синтетических двухцепочечных полимеров типа [(rA)·(rU)] и использованы для исследования методом диффракции рентгеновских лучей [63]. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что двухцепочечные РНК принимают спиральную форму, имеющую очень близкое сходство с *A*-формой ДНК (наклон плоскости пар оснований к основной оси спирали около 10°, и на один виток спирали приходится 11—12 оснований). Создается впечатление, что конформация такой *A*-формы РНК, подобно *A*-форме ДНК, диктуется формой углеводного кольца, находящегося в *C*-3-*эндо*-конформации. Вполне очевидно, что урацил может взаимодействовать с аденином столь же эффективно, как и тимин в образовании водородных связей.

Второй тип двойной спирали, содержащей РНК, был открыт в 1961 г. Он создается в результате «гибридизации» цепи РНК с цепью ДНК, имеющей комплиментарную последовательность оснований [64]. Важность таких РНК-ДНК-гибридов исключительно возросла, и сегодня они являются ключевым звеном в определении первичных последовательностей и в умелом манипулировании с генами (см. разд. 22.4.4 и 22.5.4). Такие гибриды быстро образуются при инкубации раствора двух однонитевых молекул при температуре примерно на 25 °C ниже, чем температура, при которой двойная спираль наполовину диссоциирована. Они более стабильны, чем дуплексы ДНК-ДНК с соответствующей последовательностью оснований [65]. По-видимому, такие гибриды также имеют конформацию *A*-формы ДНК.

Полагают, что стабильность таких спиралей обеспечивается в основном за счет стэкинг-взаимодействий оснований, как и в ДНК.

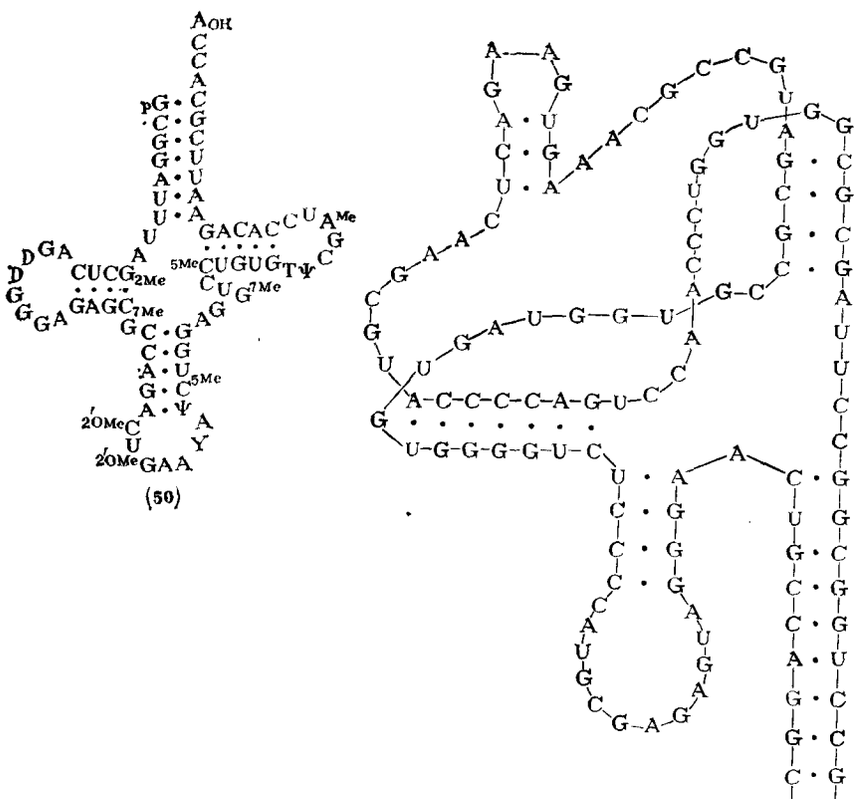


Действительно, однонитевые рибонуклеотиды имеют гораздо более упорядоченную структуру, чем их дезоксирибоаналоги. Так, поли(rA) существует в растворе при комнатной температуре в виде сильновытянутой палочки. Определение свободной энергии димерной ассоциации таких частиц, как $rA_nU_n$, $rA_nCGU_n$, $rA_nUGU_n$, дает возможность оценивать величину энергии стэкинг-взаимодействий пар пурин-пиримидин. Пары C·G, A·U и G·U дают значения величины $\Delta G_0 = -10$; $-5$ и 0 кДж·моль$^{-1}$ соответственно.

Вводя добавки положительной энергии на существование неспаренных оснований в петлях и где-либо еще, можно составить программу для расчета на ЭВМ относительной стабильности возможных вторичных структур однонитевых молекул РНК с известной последовательностью оснований [66]. Теперь полагают, что такие молекулы со случайно выбранной последовательностью оснований могут упорядочиваться во вторичную структуру, в которой около половины всех оснований спарены в спиральных областях, и что такие структуры должны быть термодинамически стабильны [67].

Природа эффективна как никто другой! С тех пор как Холли установил в 1965 г. первую нуклеотидную последовательность [68] для молекулы тРНК, содержащей, как сейчас известно, ложную G·C-пару [69], был проведен анализ первичной последовательности более чем дюжины структур за один год. Для всех них принята структура «клеверного листа». В этой структуре спариваются 40 оснований и, исключая нуклеотиды (73—79), вся молекула может быть спирализована. В качестве типичного примера такой конформации приведена структура $тРНК^{Phe}$ из дрожжей в форме клеверного листа (**50**). Существование в природе такой вторичной структуры первоначально представлялось спекулятивным, но каждая вновь устанавливаемая последовательность тРНК соответствовала той же модели. Вещественное подтверждение этой структуры в настоящее время получено из данных рентгеноструктурного анализа $тРНК^{Phe}$ (см. разд. 22.1.3.4). Это делает в гораздо большей степени заслуживающими доверия общие представления, выдвигаемые в настоящее время, о вторичной структуре таких больших молекул, как рРНК и вирусная РНК.

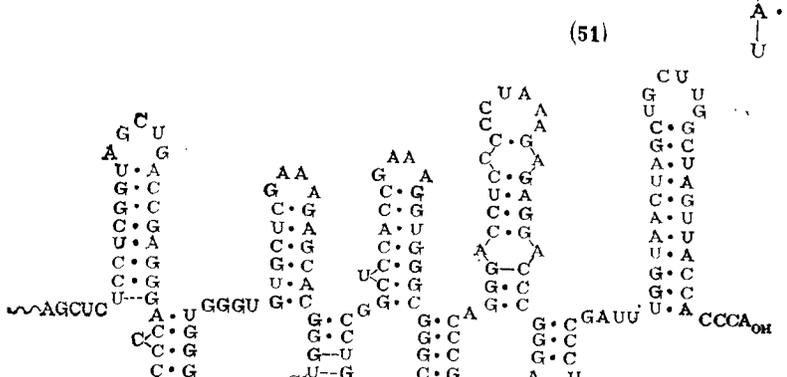
Первым достижением при использовании более быстрого метода определения последовательности [70], чем метод Холли, было установление нуклеотидной последовательности 120 мономерных звеньев 5S РНК из *E. coli*. Свойства ее растворов указывают на наличие структуры высшего порядка с некоторой жесткостью и с большим числом спаренных оснований. Однако ее нуклеотидная последовательность позволяет при свободном выборе построить слишком много вторичных структур. В этом случае для их выбора был применен анализ РНК методом температурно-варьируемой ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Данные, полученные этим методом [71], отдают предпочтение структуре, содержащей



(50)



(51)



(52)

28 пар оснований, 17 из которых представлены наиболее стабильными G-C парами, локализованными в пяти спиральных областях (51) (показана предполагаемая модель вторичной структуры 5S РНК *E. coli* при комнатной температуре).



Многообразие первичных последовательностей мРНК из клеток эукариотов (см. разд. 22.4.4) создает очень много возможностей для предположений о вторичной структуре РНК. Однако они невелики по сравнению с разнообразием, которое возможно для вирусов. Полная первичная последовательность РНК бактериофага MS2 была опубликована в 1976 г. Она содержит цепь из 3569 нуклеотидов, и вторичная структура только одной половины цепи занимает двойную страницу в оригинальной публикации [72]. В качестве иллюстрации приведем возможную вторичную структуру 179 нуклеотидных остатков 3′-конца РНК вируса (52). Она содержит 55 пар оснований, 43 из которых представлены G·C-парами, обеспечивающими около 60% спиральности этого фрагмента структуры. Даже при примерно 70% спиральности, достигаемой во вторичной структуре всего вируса, методами рентгеноструктурного анализа удается лишь приблизиться к проблеме третичной структуры, по крайней мере в настоящее время.

### 22.1.3.4. Третичная структура РНК

Физико-химические измерения однонитевых молекул РНК в растворе не оставляют сомнений в том, что такие молекулы обладают третичной структурой, притом зачастую компактной. Многочисленные водородные связи между основаниями легко определяются методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Однако, как и в области белковых структур, возможности разных методов слишком различаются, чтобы отдать предпочтение какому-либо одному методу кроме рентгеноструктурного анализа. С помощью последнего метода было сделано два важных вклада в понимание третичной структуры РНК.

Два динуклеозидфосфата rApU [73] и rGpC [74] являются самокомплиментарными, что обусловлено способностью их оснований к спариванию. Оба динуклеозидфосфата образуют хорошо сформированные кристаллы, что позволяет провести рентгеноструктурные исследования методом дифракции с разрешением в 0,1 нм. Из этих данных следует, что обе частицы существуют в виде коротких фрагментов правовращающих антипараллельных двойных спиралей, в которых рибозо-фосфат-рибозные остовы связаны уотсон-криковскими водородными связями между парами оснований (53), (54). Структура ApU обладает удивительным сходством с предложенной структурой *A*-формы РНК (рис. 22.1.5).

| ApU | GpC |
|---|---|
| UpA | CpG |
| (53) | (54) |

Вскоре, однако, этот успех затмила расшифровка кристаллографических структур дрожжевой фенилаланиновой тРНК. Первоначальное сообщение о данных, полученных с разрешением в 0,3 нм, на орторомбической кристаллической форме [75] и после-

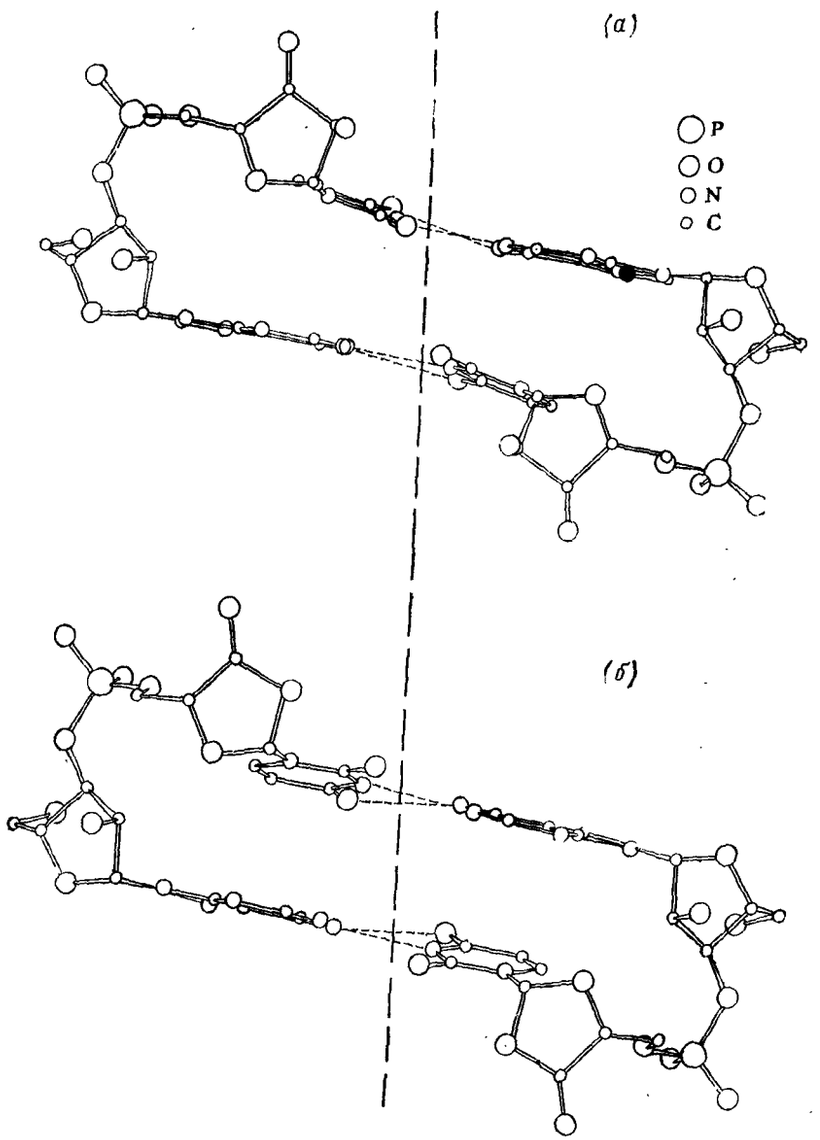



Рис. 22.1.5. Сравнение структур ApU (а) и *A*-формы РНК (*б*).
Взгляд приблизительно перпендикулярно к оси спирали, которая проходит с задней стороны водородной связи [73].

дующее изучение моноклинических кристаллов той же тРНК, проведенное с разрешением в 0,25 нм, дало более точную картину третичной структуры молекулы [76]. При этом более высоком разрешении легко прослеживается остов молекулы, который пред-



ставляет собой модель клеверного листа в *L*-образной третичной конформации. Эта конформация достигается в результате стэкинг-взаимодействия «дигидро-U»-ветви с антикодоновой ветвью и

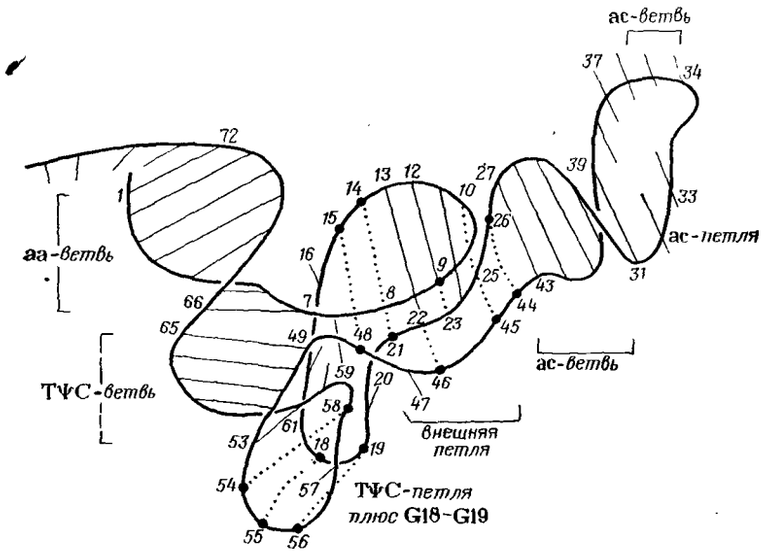



Рис. 22.1.6. Схематическая диаграмма сложенной цепи и третичных взаимодействий между основаниями в дрожжевой тРНК$^{Phe}$.
Рибозо-фосфатный остов показан сплошной линией, пары оснований в спиральных областях представлены длинными тонкими линиями, неспаренные основания изображены более короткими тонкими линиями. Дополнительные пары оснований, образующиеся помимо 21 пары, присутствующей в модели клеверного листа, обозначены точечными линиями [76].

«ТΨС»-ветви с акцепторной ветвью. При этом антикодоновая петля оказывается на одном конце *L*-образной структуры, а 3′-конец — на другом. Третичная конформация поддерживается за счет дополнительного образования пар и триплетов оснований, преимущественно не уотсон-криковского типа. Образование неко-

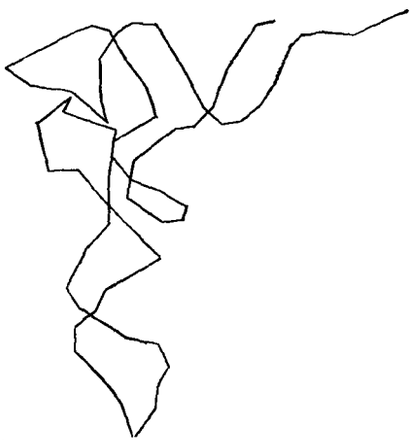


Рис. 22.1.7. Стерео-диаграмма третичной структуры тРНК$^{Phe}$ от положения C-1′ остова [77].

торых из них связывают с особенностями первичной последовательности оснований, которая, как установлено, почти инвариантна для большинства тРНК. Существенно важно, что основания

собираются в стопу так, чтобы исключить молекулу воды (см., например, G-15·C-48 и U-8·A-14). Дополнительной примечательной особенностью этой структуры является широкое использование 2′-гидроксильной группы как донора или акцептора водородной связи (рис. 22.1.6).

На рис. 22.1.7 приводится 3-*D*-проекция этой структуры, построенная на основании данных с разрешением в 0,3 нм.

Постоянные тревоги молекулярных биологов о том, что кристаллические третичные структуры могут «не пережить» растворения в воде, были отчасти рассеяны исследованием протонов, образующих водородные связи в молекуле тРНК$^{Phe}$, находящейся в растворе, методом ПМР-спектроскопии при 360 МГц. Такие протоны характеристически резонируют в области 10—15 млн$^{-1}$ (δ-шкала) и обеспечивают данные температурной зависимости при *CW*- и *FT*-условиях. Анализ всей совокупности данных, полученных при исследовании тРНК в растворе этим методом, составил основу для создания конформации кристаллической структуры молекулы [78].

С момента «рождения» модели Уотсона-Крика структуры ДНК до появления третичной структуры первой молекулы нуклеиновой кислоты прошел 21 год. Будем ли мы столь же долго ждать установления первой полной структуры вируса?

## *ЛИТЕРАТУРА*


1. *F. G. Hopkins*, Report Brit. Assoc. Advmt. Sci., 1933, **103**; 1; in «Hopkins and Biochemistry 1861—1947", ed. J. Needham and J. Baldwin, Heffer, Cambridge, 1949, p. 245.
2. *H. Staudinger*, «From Organic Chemistry to Macromolecules», Wiley, New York, 1970, p. 79.
3. *F. Miescher*, Med. chem. Unt., 1871, 441.
4. *F. Miescher*, «Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten», Vogel, Leipzig, 1897, vol. II, p. 66.
5. *J. Liebig*, Annalen, 1847, **62**, 257.
6. *P. A. Levene and W. A. Jakobs*, Ber., 1911, **44**, 746.
7. *W. Flemming*, «Zellsubstanz, Kern, und Zellthellung», Vogel, Leipzig, 1882, p. 129.
8. *W. Waldeyer*, Arch. mikr. Anat., 1888, **32**, 1.
9. *E. B. Wilson*, «An Atlas of Fertilisation and Karyokinesis of the Ovum», Macmillan, New York, 1895, p. 4.
10. *P. A. Levene, L. A. Mikeska, and T. Mori*, J. Biol. Chem., 1930, **85**, 785.
11. *P. A. Levene*, J. Biol. Chem., 1921, **48**, 119.
12. *E. R. M. Kay, N. S. Simmons, and A. L. Dounce*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 1724.
13. *D. O. Jordan*, «The Chemistry of the Nucleic Acids», Butterworth, London, 1960, pp. 181—193.
14. *W. Klein and S. J. Thannhauser*, Z. physiol. Chem., 1935, **231**, 96.
15. *D. M. Brown, D. B. Parihar, C. B. Reece, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1958, 3035.
16. *J. M. Gulland and L. F Story*, J. Chem. Soc., 1938, 259.
17. *J. M. Gulland and L. F. Story*. J. Chem. Soc., 1938, 692.
18. *W. Anderson, D. H. Hayes, A. M. Michelson., and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1954, 1882.





19. *A. M. Michelson and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1955, 816.
20. *A. M. Michelson and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1953, 951.
21. *D. H. Hayes, A. M. Michelson, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1955, 808.
22. *A. M. Michelson and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1954, 34.
23. *L. Cunningham*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 2546.
24. *C. A. Dekker, A. M. Michelson, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1953, 947.
25. Сокращения используются в соответствии с рекомендациями комиссии IUPAC-IUB: J. Biol. Chem., 1970, **245**, 5171.
26. *J. M. Gulland*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1947, **12**, 95.
27. *W. T. Astbury and F. O. Bell*, Nature, 1938, **141**, 747.
27a. *E. Chargaff, E. M. Vischer, R. Doniger, C. Green, and F. Misani*, J. Biol. Chem., 1949, **177**, 405.
28. *J. D. Watson*, «The Double Helix», Weidenfelt and Nicholson, London, 1968. (*Д. Д. Уотсон.* Двойная спираль. Пер. с англ. М., Мир, 1969).
29. *R. Olby*, «The Path of the Double Helix», Macmillan, London, 1974.
30. *M. H. F. Wilkins*, «Comprehensive Biochemistry», ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1963, vol. 8, chapter IV.
31. *J. H. Davidson*, «The Biochemistry of Nucleic Acids», Butterworth, London, 2nd edn., 1953. (*Дж. Н. Девидсон.* Биохимия нуклеиновых кислот. — Пер. с англ. М., Мир, 1976).
32. *J. D. Watson and F. H. C. Crick*, Nature, 1953, **171**, 737.
33. *S. Arnott, S. D. Dover, and A. J. Wonacott*. Acta Cryst., 1969, **B25**, 2192.
34. *G. A. Rodley, R. S. Scobie, R. H. T. Bates, and R. M. Lewitt*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 2959.
35. *F. H. C. Crick and A. Klug*, Nature, 1975, **255**, 530.
36. *E. Kellenberger*, Adv. Virus. Res., 1961, **8**, 1.
37. *M. J. Waring*, Ann. Reports Chem. Soc., 1967, **64B**, 493; 1968, **65B**, 551.
38. *D. R. Helinski and D. B. Clewell*, Ann. Rev. Biochem., 1971, **40**, 899.
39. *J. Vinograd, J. Lebowitz, and R. Watson*, J. Mol. Biol., 1968, **33**, 173.
40. *W. Bauer and J. Vinograd*, J. Mol. Biol., 1968, **33**, 141.
41. *W. Keller*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, **72**, 4876.
42. *V. C. Bode and L. A. MacHattie*, J. Mol. Biol., 1968, **32**, 673.
43. *R. D. Kornberg*, Science, 1974, **184**, 868.
44. *J. T. Finch and A. Klug*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 1897.
45. *K. Ibel, B. Carpenter, J. Baldwin, and E. M. Bradbury*, Nucleic Acids Res., 1976, **3**, 1739
46. *F. H. C. Crick, A. L. Bax, and J. Zeuthen*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, **74**, 1595.
47. *R. H. Burdon*, «RNA Biosynthesis», Chapman and Hall, London, 1976.
48. *G. Brawerman*, Ann. Rev. Biochem., 1874, **43**, 621.
49. *G. W. Kenner, C. W. Taylor, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1949, 1620.
50. *B. Lythgoe and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1944, 592.
51. *V. M. Clark, A. R. Todd, and J. Zussman*, J. Chem. Soc., 1951, 2952.
52. *S. Furberg*, Acta Chem. Scand., 1950, **4**, 751; Acta Cryst., 1950, **3**, 325.
53. *J. Baddiley and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1947, 648.
54. *G. Embden and M. Zimmermann*, Z., physiol. Chem., 1927, **167**, 137.
55. *W. E. Cohn*, «Currents in Biochemical Research», ed. D. Green, Interscience, New York, 1956, p. 460 и цитированные там работы.
56. *D. M. Brown, D. I. Magrath, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1952, 2708.
57. *D. M. Brown, G. D. Fasman, D. I. Magrath, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1954, 1448.
58. *D. M. Brown, G. D. Fasman, D. I. Magrath, A. R. Todd, W. Cochran, and M. M. Woolfson*, Nature, 1953, 172, 1184.
59. *E. Alver and S. Furberg*, Acta Chem. Scand., 1959, **13**, 910.
60. *R. Markham and J. D. Smith*, Biochem. J., 1952, **52**, 552, 558, 565.
61. *J. M. Gulland and E. M. Jackson*, J. Chem. Soc., 1938, 1492.
62. *W. E. Cohn and E. Volkin*, Nature, 1951, **167**, 483; J. Biol. Chem., 1953, **203**, 319.
63. *S. Arnott*, Progr. Biophys. Mol. Biol., 1970, **21**, 265.

64. *B. D. Hall and S. Spiegelman*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, **47**, 137; *C. L. Schildkraut, J. Marmur, J. Fresco, and P. Doty*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, PC3.
65. *D. E. Kennell*, Progr. Nucleic Acid Res., 1971, **11**, 259.
66. *C. Delisi and D. M. Crothers*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, **68**, 2682.
67. *J. Gralla and C. DeLisi*, Nature, 1974, **248**, 330.
68. *R. W. Holley, J. Apgar, G A. Everett, J. T. Madison, N. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, and A. Zamir*, Science, 1965, **147**, 1462.
69. *J. R. Penswick, R. Martin, and G. Dirheimer*, F. E. B. S. Letters, 1975, **50**, 28.
70. *G. G. Brownlee, F. Sanger, and B. G. Barrell*, Nature, 1967, **215**, 735; J. Mol. Biol., 1968, **34**, 379.
71. *D. R. Kearns and Y. P. Wong*, J. Mol. Biol., 1974, **87**, 755.
72. *W. Fiers, R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert, and M. Ysebaert*, Nature, 1976, **260**, 500.
73. *J. M. Rosenberg, N. C. Seeman, J. J. P. Kim, F. L. Suddath, H. B. Nicholas, and A. Rich*, Nature, 1973, **243**, 150.
74. *R. O. Day, N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, and A. Rich*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, **70**, 849.
75. *S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussmann, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, and A. Rich*, Science, 1974, **185**, 435.
76. *J. E. Ladner, A. Lack, J. D. Robertus, R. S. Brown, D. Rhodes, B. F. C. Clark, and A. Klug*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, **72**, 4414.
77. *S. H. Kim*, Progr. Nucleic Acid Res., 1976, **17**, 181.
78. *R. Römer and V. Varadi*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, **74**, 1561.

## 22.2. НУКЛЕОЗИДЫ

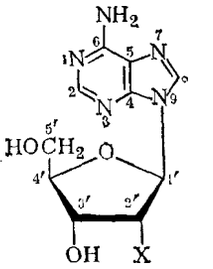
P. T. *Уокер* (University of Birmingham)

Хотя эта глава входит в серию глав, посвященных органической химии, тот факт, что она появляется в разделе, озаглавленном «Нуклеиновые кислоты», означает, что в основном материал в ней будет рассматриваться таким образом, что специальные синтезы и получение многих аналогов нуклеозидов упоминаться не будут, если они не представляют непосредственный интерес для читателя, работающего в области химии нуклеиновых кислот. Поскольку как предмет изучения нуклеиновые кислоты охватывают исключительно много отдельных дисциплин, то в настоящей главе важнее выделить те аспекты химии многих известных антибиотиков и других антиметаболитов, которые являются нуклеозидами, чем перечислять многочисленные соединения с гетероциклами, включающими все возможные положения атомов азота, и содержащие углеводные остатки различной конфигурации, получение которых зачастую было вызвано лишь научными интересами исследователей, и которые зачастую не имеют особо интересных биологических свойств.

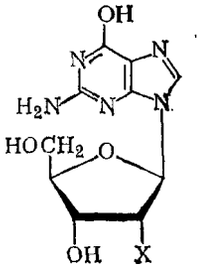
Вероятно, правильнее определять термин «нуклеозид», исходя из первоначального определения, которое связывалось с углеводными производными пуринов и пиримидинов, получаемых гидролизом нуклеиновых кислот. В настоящее время все соединения синтетического или природного происхождения, которые содержат



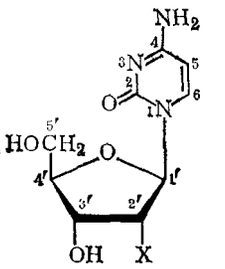
гетероциклическое основание, связанное через атом азота или углерода с положением C-1 сахара, могут считаться нуклеозидами. Однако даже это определение не включает 1,3-дидезазауридин [1], который выглядит очень похожим на производное резорцина. Обычно в природе встречаются следующие нуклеозиды — аденозин (**1**), дезоксиаденозин (**2**), гуанозин (**3**), дезоксигуанозин (**4**), цитидин (**5**), дезоксицитидин (**6**), уридин (**7**) и тимидин (**8**). Все они являются β-*N*-гликозидами пуринов или пиримидинов и *D*-рибозы или 2-дезокси-*D*-рибозы. Принятая в настоящее время система нумерации атомов в гетероциклах показана в формулах (**1**), (**2**) и (**5**), (**6**), хотя в ранних публикациях использовалась другая система нумерации атомов в пиримидинах.



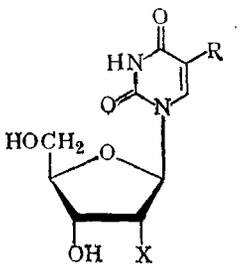
(**1**) X= OH
(**2**) X= H



(**3**) X= OH
(**4**) X= H



(**5**) X= OH
(**6**) X= H



(**7**) X= OH, R= H
(**8**) X= H, R= Me

Нет недостатка в общих учебниках, посвященных этой области [2—14]. Существуют два периодических издания [15, 16], публикующие отдельные химические статьи, есть журнал, освещающий достижения в этой области [17], и сборник рефератов [18], в который включено около 50 000 ссылок на работы в этой области за недавние 6 лет. Основные достижения года, главным образом в области химии, освещаются в таких изданиях, как Annual Reports of the Chemical Society, Annual Reviews of Biochemistry, обычно глубоко рассматривающих отдельные аспекты предмета.

Основные направления исследований в области нуклеозидов с годами существенно изменились. Первоначально основное внимание уделялось доказательству структуры природных соединений, получаемых из гидролизатов нуклеиновых кислот. И хотя этим вопросам еще уделяется определенное внимание в связи с изучением многочисленных модифицированных нуклеозидов, найденных в тРНК, чаще целью исследования является синтез некоторых потенциальных антибиотиков или аналогов нуклеозидов, которые предположительно будут иметь медицинское применение. Констатируя это изменение в направленности работ на недавно состоявшемся Симпозиуме по химии, биологии и клиническому использованию аналогов нуклеозидов было отмечено, что в последующие 25 лет достижения в области нуклеозидов и нуклеотидов внесут существенный вклад в основные разделы медицины.

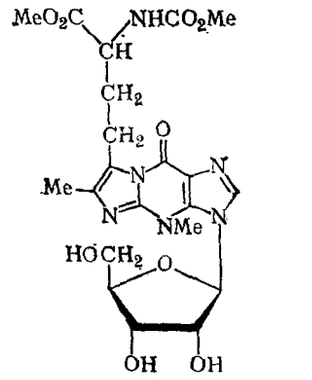
Таким образом, эта глава будет начинаться с широкого рассмотрения методов выделения и разделения смесей нуклеозидов (в основном из природных источников). Общие методы синтеза нуклеозидов будут рассмотрены достаточно подробно, вслед за чем будут описаны синтезы некоторых специфичных типов нуклеозидов, например, *C*-нуклеозидов, циклонуклеозидов и т. д. Будут лишь перечислены физические методы, используемые для определения структуры нуклеозидов, хотя основные литературные ссылки будут приведены. Будут рассмотрены лишь те химические реакции, которые представляют особый интерес для химика, работающего в области нуклеиновых кислот. Помимо того, общие реакции углеводного остатка и гетероциклов можно найти в главах, относящихся к этим вопросам.

### 22.2.1. РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ

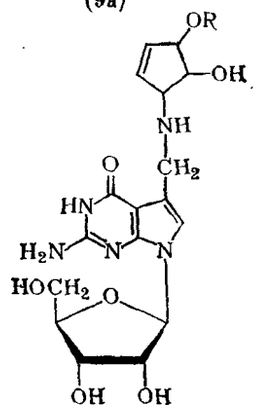
Недостаточно обоснованные выводы о встречаемости нуклеозидов могут оказаться некорректными. Так, помимо восьми основных нуклеозидов (**1**)—(**8**), большинство классов нуклеиновых кислот, столь сильно различающихся между собой, содержат, как было показано, в большем или меньшем процентном отношении модифицированные нуклеозиды. Длительное время было известно, что 5-метилдезоксицитидин образуется в гидролизатах ДНК растений и животных [7]; полагают, что каждая система ферментов рестрикции бактерий содержит метилазу, которая метилирует специфические остатки оснований ДНК хозяина в последовательности, узнаваемой рестрикционной эндонуклеазой [7], давая таким образом появление модифицированных нуклеозидов из бактериальной ДНК. Фаговые ДНК часто содержат большие количества модифицированных нуклеозидов и очень возможно, что нас еще ожидает много неожиданностей по мере определения состава нуклеиновых кислот других фагов [7].



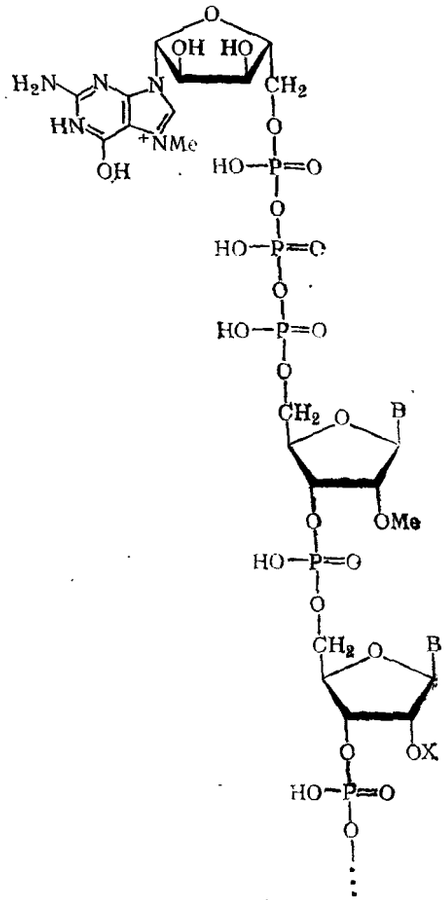
РНК являются лучшими источниками модифицированных нуклеозидов, особенно тРНК, где число модифицированных нуклеозидов, кажется, возрастает со скоростью равной или даже большей, чем количество тРНК, с известной последовательностью оснований [8, 20]. Самыми необычными из идентифицированных к настоящему времени нуклеозидов, которые входят в состав полинуклеотидных структур, должны быть признаны Y (**9а**) [20] и Q* (**9б**) [21], хотя первый был идентифицирован лишь как основание и существуют некоторые сомнения в подлинности нуклеозида [22]. Роль многих модифицированных нуклеозидов непонятна, хотя для достаточно большого числа нуклеозидов установлены отдельные аспекты их функции. Из этого стало очевидным, что лишь немногие



(**9а**)



(**9б**) R= маннозил ) или галактозил



(**10**) X= Me или H

модификации случайны и что присутствие модифицированных нуклеозидов дает организму определенные преимущества.

Рибосомальные РНК также содержат модифицированные нуклеозиды. Их роль также неизвестна, хотя замена двух остатков $N^6$-диметиладенозинов на аденозин в рРНК *Escherichia coli* приводит к появлению резистентности бактерии к лекарственному препарату «касугамицину». Неизвестно, является ли это прямым результатом модификации или только неким побочным эффектом, однако, это и не удивительно, поскольку роль рРНК в функционировании рибосом лишь начинает выясняться. До недавнего времени можно было утверждать, что мРНК, вероятно, не содержит каких-либо модифицированных нуклеозидов, однако, теперь надежно установлено, что многие мРНК эукариотов и вирусов содержат на 5′-конце последовательность $m^7G^{5'}ppp^{5'}(N_{mp})_{1-2}Np$ ... ...(10). Имеются некоторые сомнения относительно назначения этих модифицированных нуклеозидов, но это тем не менее стимулирует химика-органика на синтез нуклеозидов и нуклеотидов, модифицированных таким способом [23].

Очевидно, что многие нуклеозиды являются интермедиатами в биосинтезе и расщеплении нуклеотидов и полинуклеотидов. В дополнение к так называемым спонгонуклеозидам (термин, применяемый к модифицированным пуриновым нуклеозидам, полученным из карибской губки *Cryptotethya crypta*), которые являются производными арабинозы, многие антибиотики являются производными нуклеозидов, часто имеющих модифицированные углеводные остатки; они будут детально обсуждаться позднее. Нуклеозиды сравнительно легко выделить из химических или ферментативных гидролизатов природных полинуклеотидов; условия и практические детали этого процесса можно найти в общих учебниках по нуклеиновым кислотам [2, 7, 24]. Все коммерчески доступные образцы основных нуклеозидов получены этим путем. Для выделения больших количеств таких нуклеозидов наиболее целесообразно применение относительно грубого фракционирования, основанного на различной растворимости, и методов ионного обмена. Для выделения малых количеств модифицированных нуклеозидов либо из природного источника, либо полученных в результате химического синтеза, пригодны многочисленные более эффективные методы, и они будут обсуждаться отдельно. Наконец, следует помнить, что выделение нуклеозидов часто осуществляют дефосфорилированием нуклеотидов [25], выделение и разделение которых не будет рассматриваться в настоящей главе.

### 22.2.1.1. Бумажная и тонкослойная хроматография

Эти методы были в числе первых, примененных в этой области, и много литературы, посвященной этому вопросу, достаточно устарело или ее трудно найти. Большинство исследователей, кажется, предпочитает свои собственные системы растворителей и т. д., часто без четких научных обоснований. Три полезные статьи содержат значения $R_f$ многих нуклеозидов в нескольких системах растворителей [26]; обзор [27] посвящен технике эксперимента. Хроматографию на колонках с целлюлозой применяют редко, так как, кажется, никогда не достигаются результаты такого уровня, как получаемые на бумаге или в тонких слоях. Однако главное преимущество целлюлозы как носителя, кроме ее нейтральности, заключается в том, что компоненты, поглощающие в УФ-области, можно детектировать на целлюлозных пластинках в очень низких концентрациях без добавления флуоресцентного соединения к целлюлозе (которое разрушается кислыми растворителями). В то же время гораздо более стабильные тонкие слои могут быть получены на основе силикагеля, где могут получаться результаты, сходные с получаемыми на бумаге, при использовании тех же растворителей. ТСХ на силикагеле имеет также то преимущество, что можно применять реактив Дише (цистеин-серная кислота) для обнаружения дезоксинуклеозидов, и фактически пластины можно нагревать в течение времени, достаточного для обнаружения рибонуклеозидов, что превращает этот реагент в общий реагент на все нуклеозиды. Препаративная тонкослойная хроматография (пластины для которой могут быть приготовлены наливанием суспензии носителя на подложки и легким постукиванием, что позволяет избежать использования дорогой аппаратуры для нанесения слоя) и колоночная хроматография (главным образом на силикагеле) часто используются для разделения больших количеств нуклеозидов. Короткие толстые колонки, заполненные силикагелем, используемым для ТСХ, и работающие под небольшим давлением, дают очень быстрое и эффективное разделение в условиях, сходных с используемыми для достижения такого же разделения на пластинках с тонким слоем [28]. Препаративная распределительная хроматография (противоточное распределение) также использовалась для разделения нуклеозидов, однако она требует довольно много времени и большого расхода растворителей.

### 22.2.1.2. Ионообменная хроматография

Эта техника имеет преимущества перед распределительной и адсорбционной хроматографией, когда она используется для фракционирования больших количеств материала, растворенного в воде. Очевидно, что основное использование ионообменной хроматографии состоит в выделении и фракционировании полинуклеотидов и нуклеотидов, но величины $pK_a$ гетероциклических оснований таковы, что в интервале pH 4—10 некоторые нуклеозиды могут нести по меньшей мере частичный заряд и, следовательно, могут быть разделены этим методом. Для ионообменника используют два основных типа подложки: либо полистирол, либо целлюлозу, и оба типа широко использовались для разделения нуклеозидов. Вероятно, наиболее широко используется метод.

разработанный Деккером [29]. Поскольку известно, что гидроксильные группы углеводного остатка нуклеозидов имеют величины $pK_a$ в области 13—17, то при использовании сильно основной ионообменной смолы и водного метанола в качестве элюента можно разделять различные производные нуклеозидов и даже смеси аномеров [29].

### 22.2.1.3. Электрофорез

С помощью электрофореза удалось осуществить немногочисленные разделения нуклеозидов, однако обычно этот метод используется для контроля за протеканием реакций. Метод особенно полезен для определения N-замещенных в ядре пиримидиновых нуклеозидов, но интервал pH, при которых исключаются какие-либо существенные миграции, довольно узок, что ограничивает возможности метода. Одно частное применение в области нуклеозидов — это проведение электрофореза рибонуклеозидов в боратном буфере при pH 10. В этих условиях образуется стабильный комплекс между боратом и *цис*-диольными группами, что приводит к миграции рибонуклеозидов к аноду [30].

### 22.2.1.4. Гель-фильтрация

Для фракционирования нуклеозидов можно использовать продажные гель-фильтрующие материалы Сефадекс G10 и G15 и Биогель P2. Преимущества этих материалов в том, что элюируемые вещества не размываются по колонке, количественно снимаются с колонки и нет необходимости применять солевые градиенты. Также маловероятно, что в условиях гель-фильтрации будут протекать какие-либо химические процессы деградации лабильных нуклеозидов, т. е. что-либо похожее на процессы, обязательно происходящие при ионообменной и адсорбционной хроматографии [27].

### 22.2.1.5. Газо-жидкостная хроматография

Спустя 25 лет после изобретения этой техники, ее применение в области нуклеозидов все еще очень ограничено из-за отсутствия летучести у большинства производных нуклеозидов. Необходимой летучестью обладают триметилсилильные эфиры нуклеозидов, которые могут быть получены действием *N,O*-бис(триметилсилил)-ацетамида на нуклеозид [31]. Если вводить пробу при 260 °C, то каждый нуклеозид дает на хроматограмме только один пик. Для получения этих эфиров могут быть также использованы гексаметилдисилазан и/или триметилхлорсилан. Практические детали процесса силилирования и методы, используемые для разделения таких производных, обобщены в обзоре по газо-хроматографическому анализу производных нуклеиновых кислот [31]. В более



поздней работе собраны ссылки, относящиеся к этому вопросу, и проведен детальный анализ корреляции между структурой и временем удерживания для многих нуклеозидов [32]. Для получения триметилсилильных производных нуклеозидов использован также N-триметилсилилимидазол, при реакции которого с пиримидиновыми нуклеозидами не требуется поддержания строго безводных условий; гидроксильные группы углеводного остатка количественно силилируются при комнатной температуре, но экзоциклическая аминогруппа и O-4 в 4-кетонуклеозидах не реагируют. Описана общая методика разделения аномерных *O'*-триметилсилильных производных нуклеозидов на колонке с высокополярным сорбентом, которая может быть использована для аналитических и препаративных целей [33]. В этой же работе дается обзор других методов, пригодных для разделения изомерных смесей нуклеозидов. Пиримидиновые дезоксирибонуклеозиды не могут быть разделены этим способом. При попытках осуществить силилирование гетероциклических остатков с использованием более высоких температур силилирования (для повышения летучести производных) наблюдалась деградация. Однако получающиеся пентозные производные сохраняют конфигурацию нуклеозида при аномерном центре, и поэтому этот метод может быть использован для идентификации и характеристики α- и β-аномеров. Для силилирования пуриновых нуклеозидов требуется несколько более высокая температура.

Вероятно, ограниченное использование в настоящее время этого метода, применение которого в области нуклеозидов в будущем может только возрасти, связано в основном с легкостью разделения нуклеозидов другими методами.

### 22.2.1.6. Жидкостная хроматография высокого давления

Эту технику нельзя, конечно, четко выделить отдельно, поскольку она зависит от набивки колонны; это лишь развитие и совершенствование ранее описанных методов. Однако данный метод имеет столь большие преимущества в эффективности и в скорости разделения, что целесообразно отдельно рассмотреть области его применения. Были применены набивки для ионного обмена, адсорбции и гель-фильтрации; использование всей этой техники описано Леонардом для разделения некоторых цитокининов (производных аденозина), включая их разделение на *цис*- и *транс*-изомеры [34]. Применение в области нуклеиновых кислот находится еще в стадии становления, но со временем этому методу несомненно предназначено сыграть важную роль в разделении смесей нуклеозидов, а колонки для гель-фильтрации будут широко применяться при обессоливании элюатов нуклеозидов после ионообменной хроматографии.

### 22.2.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Химики-органики (и те, кто работает в области нуклеозидов, не составляют исключения) стали усиленно полагаться на физические методы. Тем не менее детальное рассмотрение этих методов не входит в задачу данного издания. По своему характеру исследования в этой области удобно разбить на три группы: (а) теоретические исследования; (б) спектроскопические методы, используемые для идентификации и анализа нуклеозидов, и (в) изучение конформаций молекул. В отведенном объеме можно лишь перечислить недавние обзоры и некоторые основополагающие работы по важнейшим из этих методов.

Теоретические исследования, проведенные Пюльманом [35] и другими [9, 13, 14], в основном посвящены расчетам распределения частичных зарядов в нуклеозидах и расчету дипольных моментов таких молекул. Достигнут значительный успех в получении величин, близких к экспериментально определяемым.

Обзорные работы, посвященные спектроскопической технике, включают такие методы, как ИК- [10, 12—14], Раман- [10, 13, 14], УФ-спектроскопию [8, 10, 12—14, 37], дисперсию оптического вращения [10, 12, 14], круговой дихроизм [10, 13, 36, 37], ЯМР [12, 14, 36, 37], ядерный квадрупольный резонанс [14] и ЭПР [13]. Исследования других электронных свойств нуклеозидов, таких как распределение зарядов и константы ионизации [12], также рассмотрены в обзорах. Помимо методов УФ- и ЯМР-спектроскопии наиболее широко используемым методом идентификации нуклеозидов является масс-спектрометрия. Техника исследования обобщена в [10, 12, 38, 39], некоторые более поздние усовершенствования, особенно удобные для получения спектров малых количеств нелетучих лабильных веществ, описаны в [34, 40]. Изучены также термодинамические свойства нуклеозидов, что может быть полезно для понимания взаимодействия компонентов нуклеиновых кислот друг с другом [14].

При исследовании конформации нуклеозидов неизбежно использовался метод диффракции рентгеновских лучей. Большая работа в этой области проделана и обобщена Арноттом с сотр. [41] и Сандаралингамом с сотр. [12, 19, 42]. Для выяснения предпочтительной конформации нуклеозидов в растворе использованы также методы ЯМР [43], кругового дихроизма [44] и дисперсии оптического вращения [12].

### 22.2.3. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ

Всего лишь 25 лет назад в обзорной статье [45] при рассмотрении синтеза нуклеозидов отмечалось: «Хотя синтез всех природных рибонуклеозидов осуществлен, однако эти методы включают относительно сложные операции, и для большей части биохимических исследований рекомендуется получение рибонуклеозидов и



дезоксирибонуклеозидов из природных источников. Если же необходимо синтетическое вещество, следует обратиться к оригинальной литературе». Это высказывание сопровождалось списком из *двух* ссылок! Многие и сейчас согласятся, что эти методы сравнительно сложны и синтез является скорее искусством, чем наукой, но достигнутый прогресс таков, что многие синтетические нуклеозиды сейчас коммерчески доступны.

Имеется несколько обзоров по синтезу нуклеозидов, и потому в целом будет дано мало отсылок на оригинальную литературу. В этой области преобладают работы отдельных групп исследователей и можно надеяться, что эти обзоры и несколько ссылок на ключевые работы этих групп помогут читателю не только ознакомиться с ситуацией на момент написания данного раздела, но также и следить за дальнейшими достижениями. Из общих монографий отметим книгу, написанную Микельсоном и опубликованную в 1962 г. [3]; в ней исчерпывающе обобщены данные на тот период времени. Более поздний обзор, сделанный Гудманом [46], охватывает литературу до конца 1971 г. Существует также лабораторное руководство, озаглавленное «Синтетические методики в химии нуклеиновых кислот», но оно содержит довольно неполный и, вероятно, случайный набор синтезов нуклеозидов, запрошенный у специалистов, работающих в этой области, с минимальной или вообще отсутствующей системой отбора. В итоге это руководство содержит методики получения необычных аналогов наряду с некоторыми очень полезными и имеющими гораздо более общее значение синтетическими процедурами [12].

До недавнего времени было мало попыток внести какой-либо порядок в неясную область механизма синтеза нуклеозидов путем реакций конденсации. Однако это положение начинает исправляться [47, 48], и хотя эти две работы не столь просты для понимания, они могут быть рекомендованы.

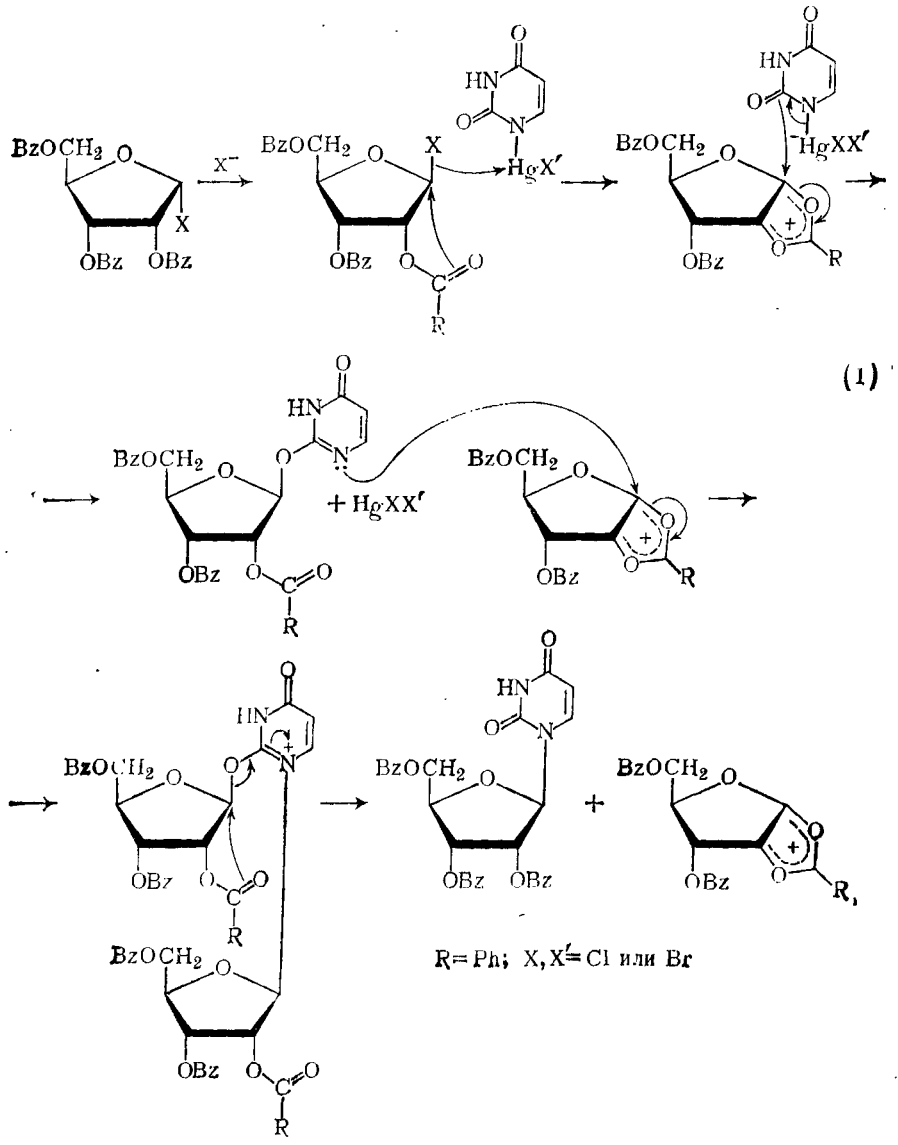
#### 22.2.3.1. Реакции конденсации

##### (*1*) *Реакция Кенигса-Кнорра (с тяжелыми металлами)*

Основой метода послужила реакция ацетобромглюкозы с метанолом в присутствии карбоната серебра, приводящая к метилгликозиду. За этим последовало использование серебряных солей некоторых галогенированных пуринов в реакции с той же галогенозой, что привело к защищенным нуклеозидам. Первое важное достижение реакции в синтезе нуклеозидов состояло в том [49], что хлорртутные производные некоторых пуринов давали гораздо лучшие выходы нуклеозидов. Этот принцип был распространен в дальнейшем на пиримидины после разработки воспроизводимой методики получения необходимых ртутьпиримидиновых производных [50]. Механизм реакции обсуждался [47]. В случае пиримидинов первоначальным продуктом является *О*-гликозид, который

затем реагирует со следующей молекулой галогенуглевода (в присутствии $HgX_2$) с образованием нуклеозидов {схема (1)}.

Скорость превращения *O*-гликозидов в нуклеозиды, катализируемого $HgX_2$, *зависит от легкости расщепления связи C-2, C-1′.*



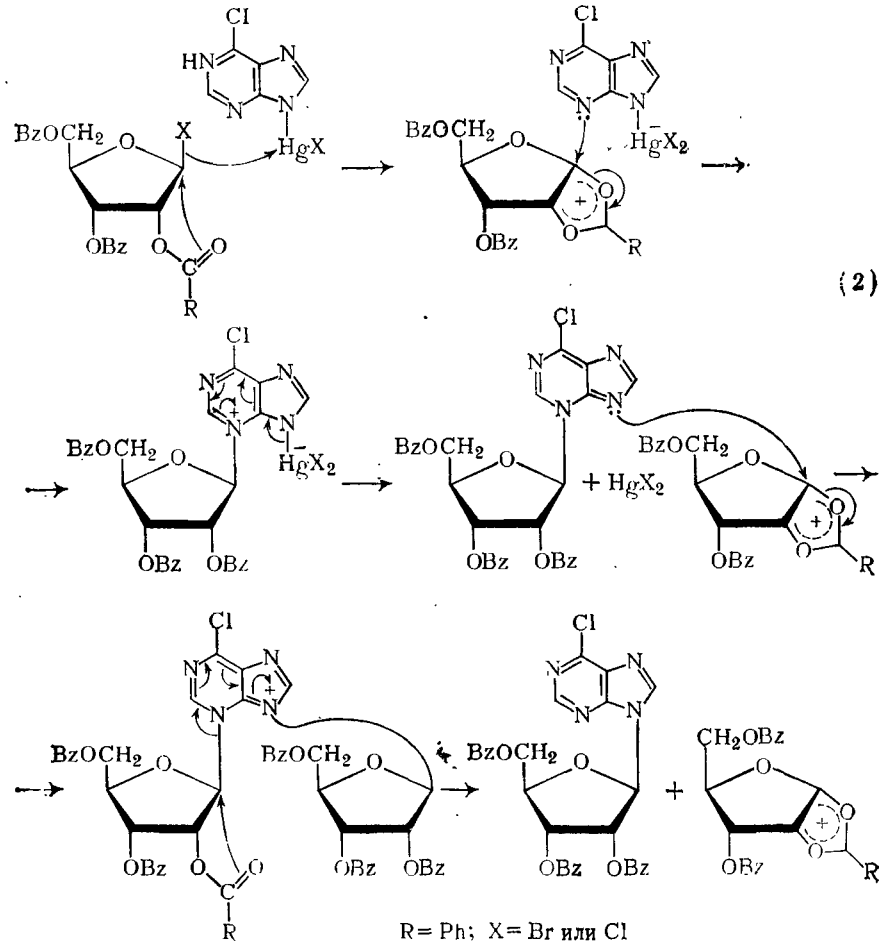
(1)

Возможно, что $HgX_2$ соучаствует в этом расщеплении, образуя π-комплекс с гетероциклическим основанием. Модификация метода [51] состоит в конденсации свободного основания с галогенозой



в нитрометане в присутствии цианида ртути; механизм этой реакции очень сходен.

В синтезе пуриновых нуклеозидов [52] полагают, что начальным продуктом является *N*-3-гликозильное производное, которое перегруппировывается в результате межмолекулярной реакции, давая (обычно) *N*-9-продукт [10] {схема (2)}.



(2)

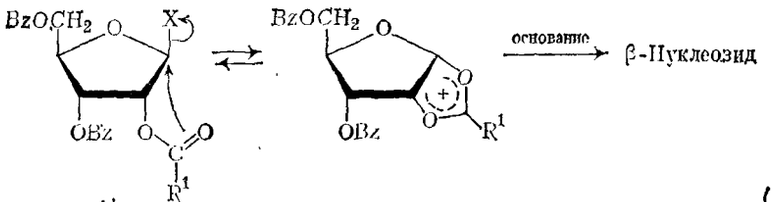
Окончательное место (места), куда мигрирует гликозильный остаток, зависит от термодинамической стабильности продукта (продуктов). Меркурицианид-нитрометановый метод также может быть применен для синтеза пуриновых нуклеозидов.

Из приведенного механизма ясно, что в общем случае в результате таких реакций, в которых используются галогенозы, имеющие 2-ацилоксизаместитель, должны образовываться лишь 1′,2′-*транс*-нуклеозиды. Это (как будет видно ниже) является

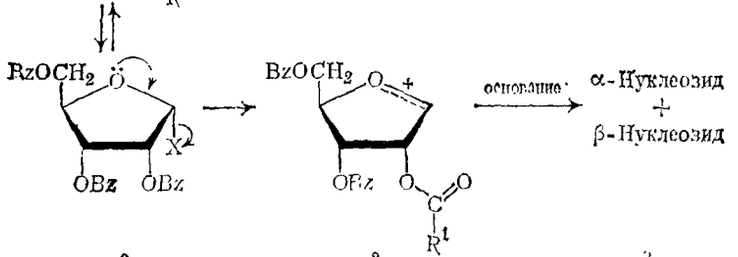
важным преимуществом настоящего метода по сравнению с другими доступными методами, поскольку стереохимический контроль на практике обеспечивает получение β-рибонуклеозидов. При синтезах дезоксинуклеозидов образуется смесь аномеров и мало, что можно предпринять для того, чтобы изменить относительное содержание каждого из изомеров в конечном продукте.

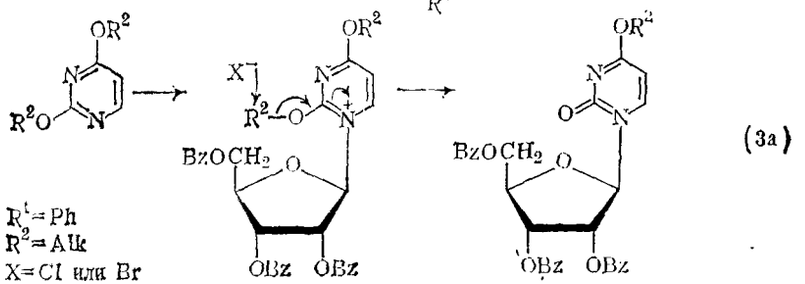
### (2) *Метод Гилберта-Джонсона (и силильный метод)*

*(а) С алкоксипиримидинами.* Синтез 1-метилурацила Гилбертом и Джонсоном в 1930 г. реакцией 2,4-диметоксипиримидина с метилиодидом и последующей кислотной обработкой был первым




(3)



(3а)

$R^1$ = Ph
$R^2$ = Alk
X = Cl или Br

примером этого ныне очень популярного метода синтеза нуклеозидов. Действительно, первый синтез природного нуклеозида, цитидина, был осуществлен с использованием этого метода, поскольку необходимая галогеноза была доступна [53]. С тех пор выходы продуктов значительно повышены за счет проведения реакции в различных растворителях [47]. Полагают, что механизм реакции включает образование четвертичной соли [54]; доказательства существования такого интермедиата получены при изучении влияния серии 5-заместителей в 5-замещенных 2,4-диалкоксипиримидинах {схемы (3), (3а)} [55].



Выделим один факт, не часто отмечаемый, что согласно механизму реакции по схеме (3), часто образуется смесь аномерных нуклеозидов даже с производными рибозы, имеющими 2-ацилоксизаместитель. Относительный вклад карбоксониевого иона в общую реакцию определяет относительное количество 1′,2′-цис-нуклеозида, и хотя во многих случаях из таких реакций был выделен только 1′,2′-*транс*-нуклеозид, нельзя полагать, что образуется именно такой продукт, без осуществления необходимого структурного подтверждения. Описан по крайней мере один случай, когда продукту такой реакции была приписана структура β-аномера, что привело к путанице в литературе [56].

Хотя в качестве продуктов реакции Гилберта-Джонсона можно ожидать как α-, так и β-нуклеозиды, долю каждого из образующихся продуктов можно изменить, меняя условия реакции. Это до некоторой степени объясняет то большое различие в условиях реакций, о которых сообщается в литературе и которое наводит новичка на мысль, что синтез есть больше искусство, чем наука. Наиболее эффективной добавкой, по-видимому, является бромид ртути(II), который не только повышает скорость реакции, но влияет также на стереохимию продуктов таким образом, что образуется больше β-нуклеозида. Это особенно важно в синтезе дезоксинуклеозидов, поскольку используемая галогеноза довольно нестабильна и любое повышение скорости реакции будет увеличивать выход обоих аномеров, хотя на практике в большей пропорции обычно образуется β-аномер. 3,5-Ди-*О*-(*п*-нитробензоил)-2-дезокси-α-*D*-*эритро*-пентафуранозилхлорид можно получить в кристаллическом виде, и его реакция с 2,4-диалкоксипиримидинами, как обнаружено, иногда дает преимущественно α-нуклеозиды с сохранением конфигурации. Это объясняют образованием интермедиата (11), который далее атакуется нуклеофилом по С-1.

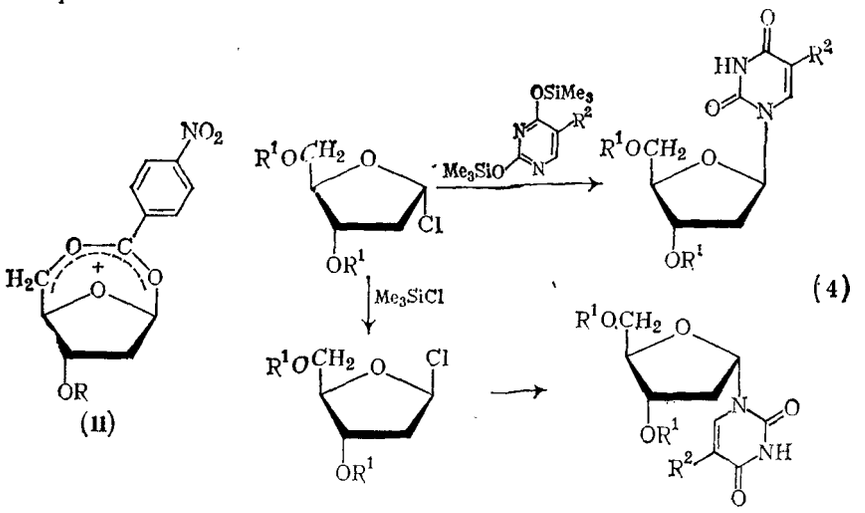
Постулировано, что при реакции с галогенозами, несущими 2-ацилоксигруппу, ртуть способствует образованию 1,2-ацилоксониевого иона, а в реакции с 2-дезоксигалогенозами ртуть способствует диссоциации галогенид-иона, приводящей к образованию карбоксониевого иона. Таким образом, в присутствии бромида ртути метод Гилберта-Джонсона и ртутный метод очень схожи между собой.

*(б) С силилированными гетероциклами.* Это сравнительно недавнее достижение в синтезе нуклеозидов имеет несколько преимуществ. Они заключаются в том, что силилированные производные большинства оснований можно получить очень легко, можно быстро гидролизовать и в некоторых случаях можно заместить, преимущественно аминами, а поскольку можно использовать мягкие условия реакции, выходы продуктов обычно очень высоки. Этот последний факт очень важен, поскольку, как было отмечено ранее, галогенозы, используемые в этих синтезах, довольно нестабильны и, следовательно, если для проведения реакции требуются повы-

шенные температуры или длительное время, нельзя ожидать, что суммарный выход будет очень высок.

Первые полезные методики в этой области предложил Виттенбург [57]; он же провел систематическое исследование по подбору оптимальных условий реакции. Установлено, что наилучшие результаты получаются в сухом инертном растворителе (например, в бензоле) в присутствии бромида ртути (II), хотя позднее было найдено, что применение ацетонитрила с бромидом ртути (II) в сочетании с молекулярными ситами позволяет получить даже более высокие выходы дезоксинуклеозидов (70% и выше) с высоким процентным содержанием β-нуклеозида [58]. Эти реакции проводят при 25 °C в течение нескольких часов. Это опять та область, где для того, чтобы получать наилучшие результаты, требуется практический навык и «чувство реакции».

Механизм реакции подобен предложенному для реакции Гилберта-Джонсона {см. схему (2)} с той разницей, что уходящей группой является не этильная, а триметилсилильная. Обнаружено также, что соотношение получающихся аномерных продуктов зависит от того, образовался или нет триметилсилилхлорид в ходе конденсации [59]. В условиях, которые благоприятствуют его быстрому удалению, образуется исключительно β-нуклеозид. Когда же условия благоприятствуют его сохранению в реакционной смеси, предпочтительно образуется α-аномер. Вероятно, α-аномер образуется в результате прямого $S_N2$ замещения в β-галогенозе, которая образуется при катализируемой триметилсилилхлоридом аномеризации α-галогенозы {схема (4)}.



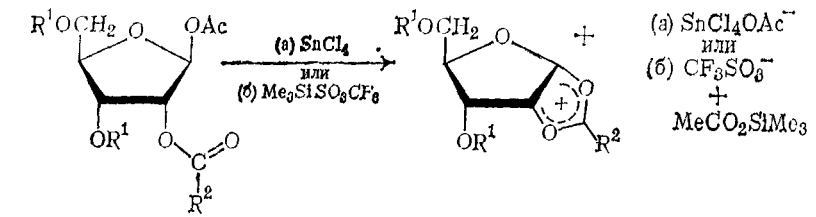

(4)

Другое преимущество силильного метода в том, что он может быть приложим и к синтезу пуриновых нуклеозидов. Первичные продукты представляют собой *N*-3-гликозильные производные, которые далее перегруппировываются в *N*-9-производные. Однако в отличие от ртутного метода синтеза пуриновых нуклеозидов электрофил не способствует диссоциации галогенида от галогенозы, поэтому иногда образуются смеси аномерных нуклеозидов [60].

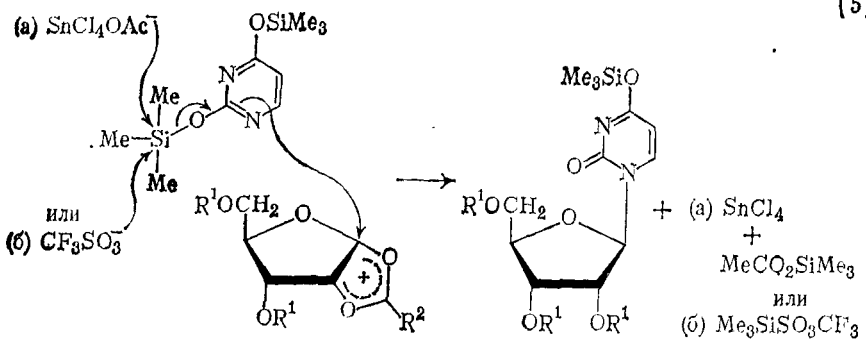
Одно из наиболее интересных достижений в этой области — работа Форбрюггена и сотр. по получению нуклеозидов с помощью катализируемой по Фриделю-Крафтсу реакции перацилированного углевода с силилированным гетероциклом в 1,2-дихлорэтане или в ацетонитриле [48, 61]. Авторы [48] рассматривают эту реакцию как разновидность реакции Гилберта-Джонсона, тогда как автор [47] относит эту реакцию к сплавлению по Гельферихy, обсуждаемому ниже. Преимущество метода в том, что производное углевода легко доступно и стабильно, реакция протекает быстро (от нескольких минут до нескольких часов) при комнатной температуре и с очень высокими выходами (выше 90%). За единственным опубликованным исключением в результате реакции образуется исключительно β-нуклеозид. В качестве катализатора обычно используют хлорид олова(IV), хотя показано, что триметилсилилперхлорат и триметилсилилтрифторметансульфонат $Me_3SiSO_3CF_3$ являются превосходными катализаторами. Кроме того, применение хлорида олова (IV) часто приводит к образованию коллоидных растворов, с которыми трудно работать. В области дезоксинуклеозидов сделано мало, хотя это зависит от того, предполагает ли модификация Форбрюггена использование перацилированных сахаров или катализатора Фриделя-Крафтса, или обоих реагентов. Некоторые дезоксинуклеозиды получены с высокими выходами из нормальной 2-дезоксигалогенозы с использованием катализатора Фриделя-Крафтса, но кажется, что обычным продуктом реакции является смесь аномеров с соотношением 1 : 1. Механизм образования рибонуклеозидов до некоторой степени изучен, он представлен на схеме (5).

Можно доказать, что в этих термодинамически контролируемых и по меньшей мере частично обратимых условиях силилированное основание может только атаковать, давая исключительно β-нуклеозид. В этой методике оба катализатора регенерируются, и следовательно, нет необходимости в использовании их мольных количеств. Форбрюгген [48], однако, отметил, что взаимодействие силилированных оснований с катализаторами не изучалось. Развить работу его побудил тот факт, что силилированный 5-нитроурацил реагирует с перацилированным сахаром очень быстро (5 мин) в присутствии лишь 0,2 экв $SnCl_4$ (выход 97%), тогда как для реакции 5-метоксиурацила требуется 1,4 экв катализатора и через 2,5 ч образуется лишь 53% β-нуклеозида, 27% α-нуклеозида и 13% *N*-1,*N*-3-бис-рибозида. Найдено, что с увеличением электронодонорной способности 5-заместителя образуется более стабильный и, следовательно, менее реакционноспособный донор-акцепторный комплекс между гетероциклом и катализатором, что, возможно, нейтрализует 1 экв катализатора; таким образом, для об-

разования нуклеозида требуется более 1 экв катализатора. Предпочтительны растворители, подобные ацетонитрилу, который ослабляет стабильность таких комплексов, и слабые кислоты Льюиса, такие как $Me_3SiSO_3CF_3$.




(5)



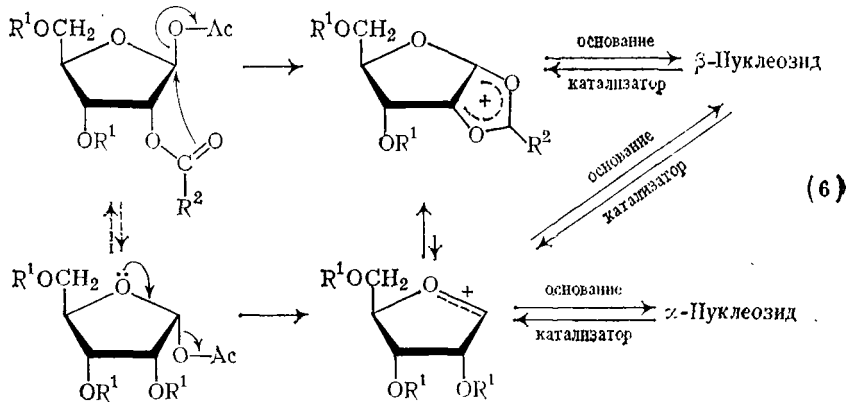

В ацетонитриле силилированный 5-метоксиурацил с 1,4 экв. $SnCl_4$ за 12 ч дает β-нуклеозид с выходом 90%; при использовании в качестве катализатора триметилсилилтрифторметансульфоната аналогичный выход может быть получен в 1,2-дихлорэтане за 4 ч с применением 1,1 экв катализатора. Данные ЯМР показывают, что катализатор образует π-комплекс с атомом N-1 гетероцикла, в итоге лишь свободное силилированное основание реагирует с 1,2-ацилоксониевым ионом, давая желаемый *N*-1-нуклеозид. *N*-1-σ-комплекс реагирует очень медленно, давая *N*-3-нуклеозид. Обратимость этих реакций продемонстрирована нагреванием смеси *N*-1, *N*-3 и *N*-1, *N*-3-бис-гликозидов 6-метилурацила в ацетонитриле в присутствии $Me_3SiSO_3CF_3$, после чего оставался лишь термодинамически наиболее стабильный продукт — бензоилированный 6-метилуридин. Мы еще вернемся к этой реакции при рассмотрении реакции трансгликозилирования.

(*в*) *Другие реакции.* Существует несколько реакций нуклеозидного синтеза, которые можно считать относящимися к методу Гилберта-Джонсона. Среди них описанный синтез аденозина (и *N*-3-гликозида) прямой реакцией аденина с три-*O*-бензоил-*D*-рибофуранозилбромидом в ацетонитриле или диметилформамиде [62]. *N*-2-Ацетилгуанин также рибозилируется в диметилформамиде, что привело к образованию смеси *N*-7- и *N*-9-рибозилгуаниновых производных [63]. Более подробно об этих реакциях см. в [46].



*(3) Метод Гельфериха (процедура сплавления)*

Оригинальный метод Гельфериха для синтеза арилгликозидов был впервые использован для получения пуриновых нуклеозидов Сато и др. [64]. Метод заключается в сплавлении перацилированных углеводов (например, тетра-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозы) с различными плавленными пуринами в вакууме в присутствии каталитических количеств *п*-толуолсульфокислоты в течение 10—20 мин. Выходы варьируют очень широко (от 3 до 74%) и образуется смесь аномеров. Изучено множество различных катализаторов, и наивысшие выходы дают пурины, которые хорошо плавятся. Главное достоинство метода в том, что могут быть использованы свободные пуриновые основания и коммерчески доступные перацилированные углеводы. Тем не менее реакция Гилберта-Джонсона в модификации Форбрюггена имеет много преимуществ, и в настоящее время для синтеза пиримидиновых нуклеозидов практически всегда используют ее, хотя последние могут быть получены и по реакции сплавления [65]. Описана также [66] родственная реакция, не нуждающаяся в катализаторе, и в отличие от ртутной реакции нет данных, подтверждающих промежуточное образование *N*-3-гликозилпуринов.




(6)

Согласно данным [66], при сплавлении в отсутствие катализатора β-углевод дает только β-нуклеозид; с α-углеводом образуется смесь аномеров. В условиях катализа сульфаминовой кислотой β-углевод дает β-нуклеозид, если вести сплавление короткое время; если же сплавление проводить дольше 10 мин, то образуется смесь аномеров. Чистый β-нуклеозид может быть превращен в смесь аномеров при сплавлении с катализатором в течение 10 мин. Эти данные позволили Фоксу предложить механизм реакции [47], приведенный на схеме (6).

### 22.2.3.2. Трансгликозилирование и другие реакции

В этот раздел включены методы синтеза нуклеозидов, которые или не принадлежат явно к одному из уже описанных способов, или же могут быть с равной вероятностью отнесены к нескольким. Аналогично, хотя механизм реакций трансгликозилирования очень сходен с механизмом реакций конденсации, обсуждавшимся ранее, с практической точки зрения его лучше рассматривать отдельно.

Для синтеза нуклеозидов использовано несколько реакций трансгликозилирования, и в этом разделе под трансгликозилированием мы будем понимать только перенос углеводного остатка (обычно от нуклеозида) на другое гетероциклическое основание, но не перенос углеводного остатка из одного положения основания в другое, поскольку гликозильные миграции O→N и N→N уже обсуждались как составная часть реакций конденсации нуклеозидов.

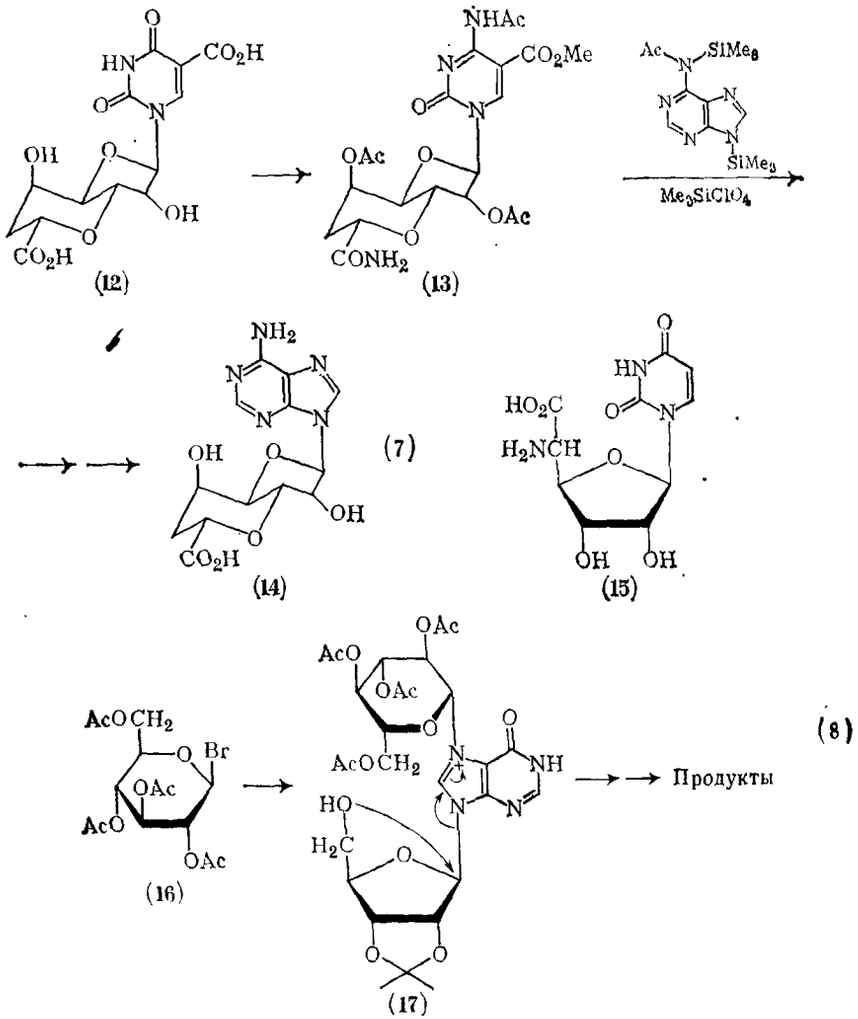
Для того чтобы облегчить расщепление гликозидной связи пиримидиновые нуклеозиды ацилировали по основаниям и гликозильным остаткам, а затем нагревали с пуриновыми основаниями в присутствии кислого катализатора [67]. Так, тетраацетилцитидин при реакции с 6-бензамидопурином в ксилоле в присутствии бромида ртути (II) дает смесь аномеров (в основном β) защищенных α- и β-аденозинов. Многие другие пуриновые и имидазольные основания могут быть замещены бензамидопурином; в качестве гликозильного донора может быть использован тетраацетилуридин.

При дальнейшем исследовании метода [68] установлено, что гликозильный остаток встречающегося в природе полиоксина (**12**) может быть перенесен на пурин, что впервые позволило получать эти аналоги. Предыдущие попытки выделить данный гликозильный остаток были неудачны из-за лабильности сильно напряженного фуранозного кольца этого нуклеозида. Таким образом, превращение октозиловой кислоты А (**12**) в производное цитозина (**13**) (цитозиновые производные дают лучшие выходы) и трансгликозилирование последнего в присутствии триметилсилильного производного 6-бензамидопурина с триметилсилилперхлоратом или триметилсилилтрифторметансульфонатом в качестве катализатора в ацетонитриле-дихлорэтане при кипячении в течение нескольких часов дает после удаления защитных групп кристаллический нуклеозид (**14**) с общим выходом 50%. Аденинновый аналог полиоксина С (**15**) также был получен с использованием этого метода, и показано, что реакция трансгликозилирования является прекрасным методом получения аналогов нуклеозидов с модифицированным углеводным звеном, таким как остаток аминодезоксисахара и остаток уроновой кислоты, производные которых нелегко получить другой стандартной методикой {схема (7)}.

Описана первая реакция трансгликозилирования, включающая обмен одного углеводного остатка (рибозы) на другой (глюкозу) [69]. Катализируемая цианидом ртути реакция ацетобромглюкозы

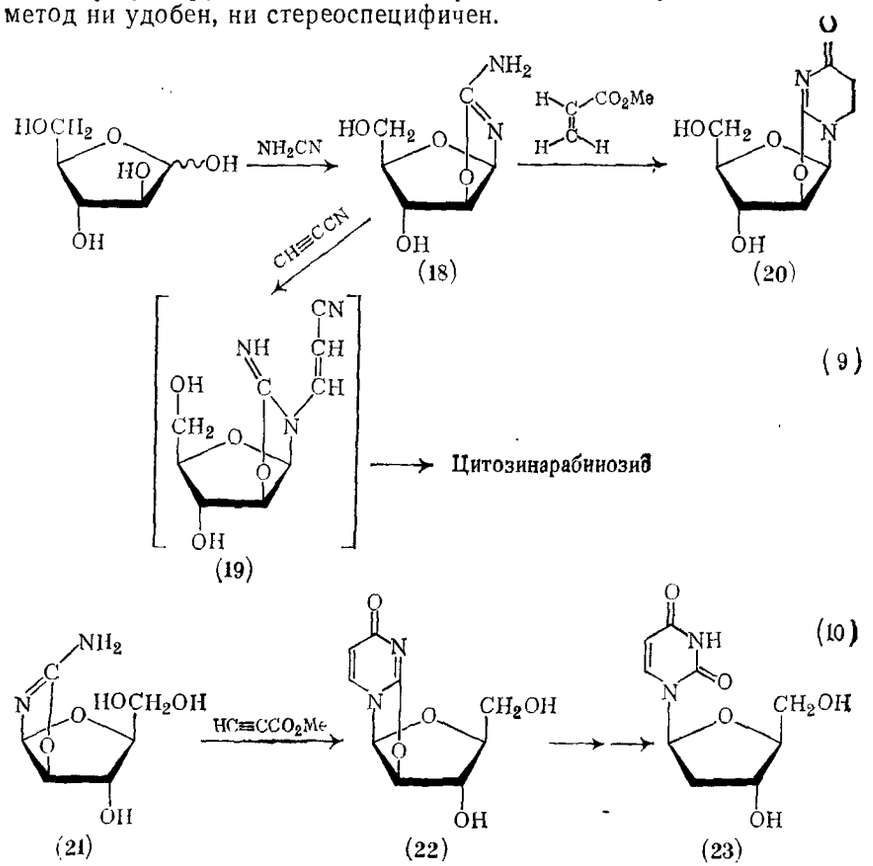


(**16**) с 2′,3′-*O*-изопропилиденинозином в нитрометане дает удовлетворительные выходы (70 °C, 1 ч, 39% N-7, 20% N-9) гликозилгипоксантинов. Полагают, что реакция протекает путем атаки 1,2-ацетоксониевого иона, образующегося в результате действия катализатора на гликозилгалогенид, который затем реагирует с




образованием бисгликозилированной молекулы (**17**) с последующим элиминированием рибозного остатка и переносом N-7→N-9 глюкозильного остатка {схема (8)}. Разработанные реакции трансгликозилирования играют все возрастающую роль в получении аналогов пуриновых нуклеозидов из природных пиримидиновых нуклеозидов и подходящих производных сахаров.

Некоторое время назад полагали, что синтез аденозина и дезоксиаденозина можно осуществить простой конденсацией основания аденина с незащищенными сахарами: *D*-рибозой и 2-дезокси-*D*-*эритро*-пентозой, в «полифосфатном эфире» [70]. Однако независимо повторенная реакция с дезоксисахаром показала, что в продукте реакции присутствует 6 основных веществ, общее содержание которых менее 20% от исходного, и в них присутствуют как дезоксиаденозин, так и его α-аномер в преобладающих количествах [71]. Другие аналогичные реакции подтвердили, что этот метод ни удобен, ни стереоспецифичен.




Опубликован [72] новый синтез цитозинарабинозида, где основание образуется из гликозилированного интермедиата. Как мы увидим ниже, другие исследователи использовали этот метод для синтеза циклонуклеозидов и *L*-нуклеозидов. Ключевой здесь является реакция между арабинозой, цианамидом и аммиаком, приводящая к образованию аминооксазолина (**18**); нет необходимости говорить, что эта реакция первоначально рассматривалась как возможный путь синтеза нуклеозидов. Аминооксазолин далее обрабатывают цианоацетиленом, и в результате, вероятно через интермедиат (**19**) и $O^2$,2′-циклонуклеозид, образуется цитозинарабинозид. Хотя осуществлена фотохимически индуцируемая изомеризация, приводящая к цитидину, выход ее определенно не представлял практического интереса. Аминооксазолин конденсировали также с метилакрилатом, что давало 5,6-дигидро-$O^2$,2′-циклоуридин (**20**), который очень трудно получить каким-либо другим путем [73].

С использованием в качестве исходного *L*-арабинозы получен [74] аминооксазолин (**21**), который при реакции с метилпропиолатом давал $O^2$,2′-цикло-*L*-уридин (**22**). Четырехстадийный синтез приводит к 2′-дезокси-*L*-уридину (**23**) с хорошим выходом и позволяет получать также 2′-дезокси-*L*-нуклеозиды тимина и цитозина {схемы (9), (10)}.

### 22.2.3.3. Создание гетероциклического основания после гликозилирования

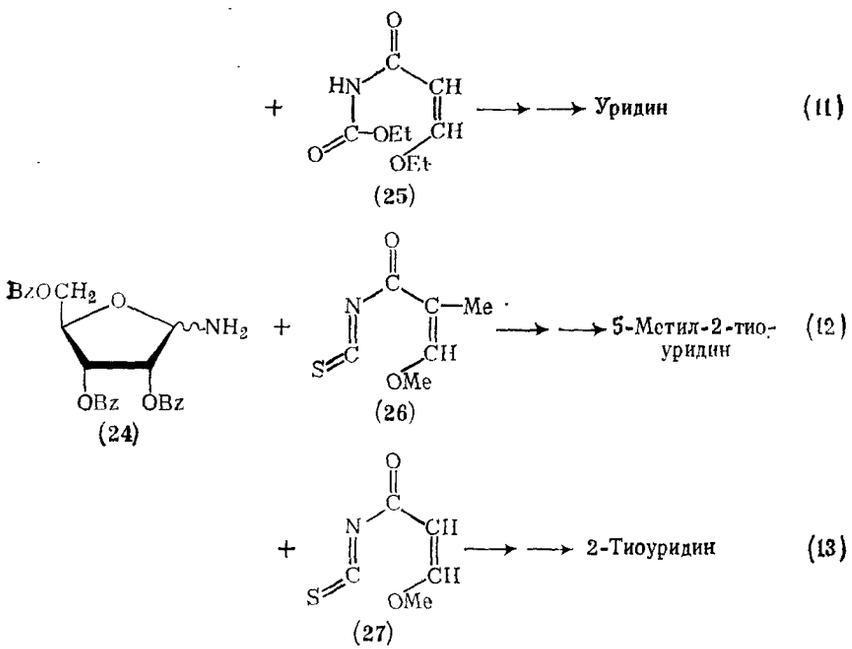
Методы получения нуклеозидов, отличные от реакций прямой конденсации, наверняка будут часто находить применение или как способ доказательства структуры, или как метод получения аналогов (часто аза- или дезазануклеозидов). Мы не намерены детально описывать все значительные примеры синтезов аналогов нуклеозидов, и нижеследующее обсуждение, вероятно, имеет больше исторический, чем практический интерес, хотя основные фундаментальные методы синтеза охвачены и некоторое внимание уделено современным методам, полезным для крупномасштабных синтезов. Необходимо, однако, помнить, что в настоящее время большинство природных нуклеозидов и многие аналоги синтезируют прямой конденсацией гетероциклического основания с углеводом.

#### *(1) Пиримидины*

В синтезах пиримидиновых нуклеозидов в качестве предшественников использованы гликозилазидные интермедиаты. 2,3,5-Три-*O*-бензоил-β-*D*-рибофуранозилхлорид реагирует с азидом натрия, давая гликозил-β-азид, который можно восстановить до аномерной смеси рибозиламинов. К сожалению, этот метод довольно трудоемок, рибозиламины быстро мутаротируют и соединение обычно необходимо готовить *in situ* и использовать немедленно во избежание *O*—*N*-миграции 2-*O*-бензоильной группы [75]. Однако недавно описано [76] получение с высоким выходом (80%) стабильного кристаллического производного рибофуранозиламина, 2′,3′-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозиламин-*n*-толуолсульфоната. Его получают из *D*-рибопиранозиламина, ацетона, 2,2-диметоксипропана и *n*-толуолсульфоновой кислоты. Соотношение аномеров в смеси варьирует в зависимости от используемого растворителя: в хлороформе найдено мало α-аномера, тогда как в диметилсульфоксиде

присутствует 25% α-аномера. Стабильное производное рибофуранозиламина использовано для получения α- и β-аномеров 5-цианоуридина и 5-ацетилуридина, а также β-аномеров 5-метил-2-тиоуридина и уридина, хотя в двух последних случаях нельзя исключить образования незначительных количеств α-аномеров.

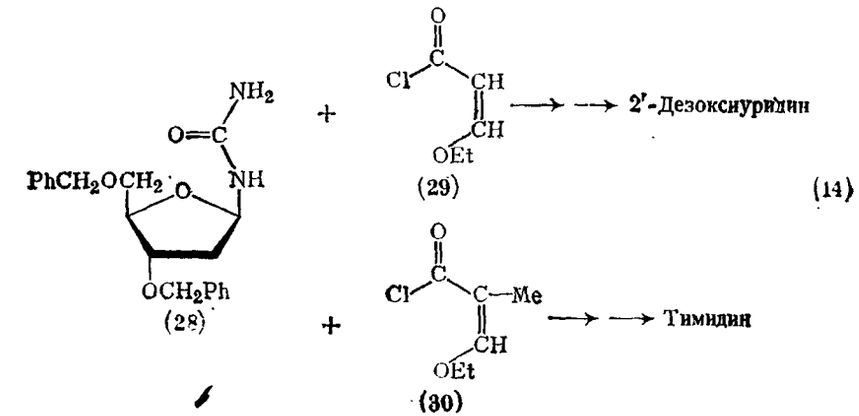
Три-*O*-бензоил-*D*-рибофуранозиламин (**24**) использован для получения уридина по реакции с β-этокси-*N*-этоксикарбонилакриламидом (**25**), 2-тиоуридина (и, следовательно, уридина) — реакцией с β-этоксиакрилоилизотиоцианатом (**26**) и 5-метил-2-тиоуридина — реакцией с β-метокси-α-метилакрилоилизотиоцианатом (**27**) [77]. Сообщалось, что даже при использовании рибофуранозиламина в виде смеси аномеров образуются только β-нуклеозиды.

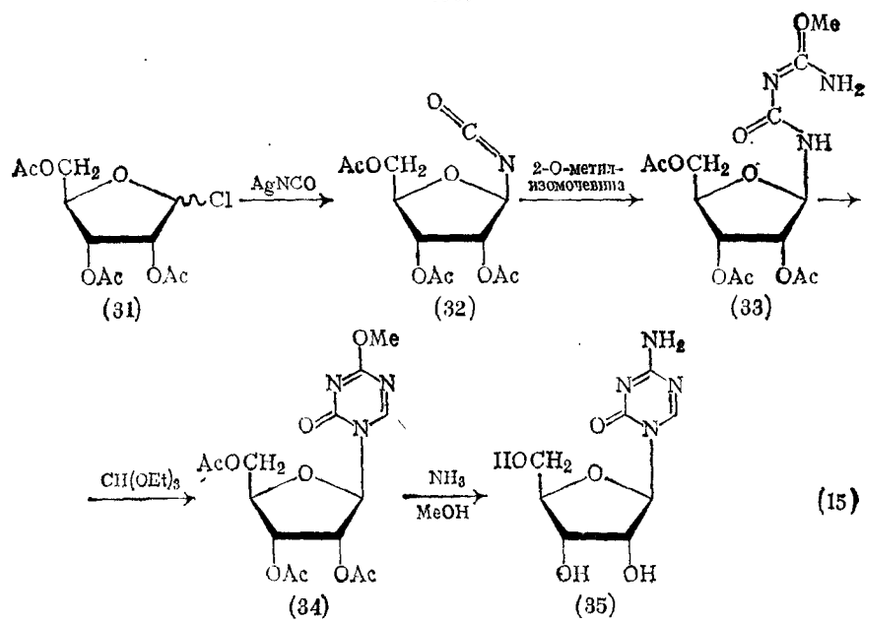



Гликозилмочевины использованы в качестве интермедиатов в синтезах пиримидиновых нуклеозидов. При реакции 1-*O*-ацетил-3,5-ди-*O*-бензил-2-дезокси-*D*-рибофуранозы с мочевиной в уксусной кислоте в присутствии HCl можно получить аномерную смесь 3,5-ди-*O*-бензил-2-дезокси-*D*-рибофуранозилмочевин [78]. Чистый β-аномер (**28**) можно получить в кристаллическом виде, и его реакция с β-этоксиакрилоилхлоридом (**29**) или β-этокси-α-метакрилоилхлоридом (**30**) с последующим замыканием цикла с аммиаком и удалением бензильных групп гидрогенолизом приводит к синтезу 2′-дезоксиуридина и тимидина соответственно {схема (14)}.



Шорм с сотр., осуществившие многочисленные пионерские работы в этой области в 1960-ых годах, аналогичным образом синтезировали 1-β-*D*-рибофуранозил-5,5-диэтилбарбитуровую кислоту [79] и 5-азацитидин [80] из 1-уреидосахара и из рибозного производного (**32**) соответственно. В последнем случае 2,3,5-*O*-аце-




тил-1-хлор-*D*-рибофуранозу (**31**) обрабатывали цианатом серебра, что привело к соответствующему β-*D*-рибофуранозилизоцианату (**32**). Последующая реакция с 2-метилизомочевиной дает метилизобиурет (**33**), который можно ввести в циклизацию с этилортоформиатом с образованием триазина (**34**). Реакция последнего

с аммиаком в метаноле дает с хорошим выходом 5-азацитидин (35) {схема (15)}. Преимущество этих методов в однозначности места присоединения гликозидного остатка.

### (2) *Пурины*

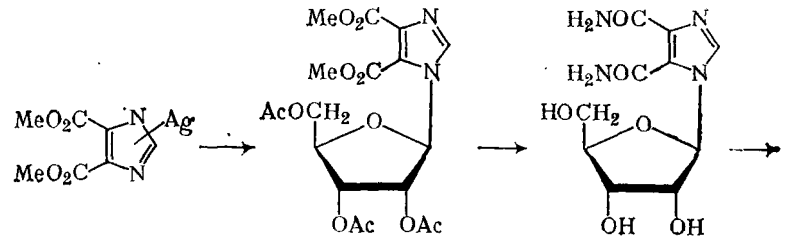
Синтез пуриновых нуклеозидов через пиримидины впервые использован Тоддом с сотр. для однозначного подтверждения положения гликозильного остатка в природных пуриновых нуклеозидах. Исходя из 4,6-диамино-2-метилтиопиримидина и вводя его в конденсацию с 2,3,4-три-*O*-ацетил-5-*O*-бензил-*D*-рибозой, семистадийным синтезом получен аденозин [81]. Метод применен также для синтеза 9-замещенных 6-хлорпуринов [82] и, вероятно, может быть применен для синтеза нуклеозидов из упоминавшегося ранее рибозиламина. Однако изучение этого типа синтезов не представляет интереса, поскольку сейчас имеются гораздо более удобные методы.

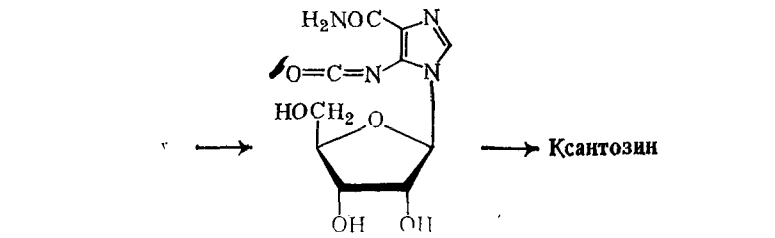
Синтезы пуриновых нуклеозидов через гликозиды имидазола, и особенно синтезы аналогов, используют очень широко; литература по 1966 г. рассмотрена в [83]. Первым синтезированным таким способом нуклеозидом был ксантозин, что сделано также Тоддом с сотр. [81]. Конденсация серебряной соли 4,5-диметоксикарбонилимидазола (**36**) с 2,3,5-три-*O*-ацетил-*D*-рибофуранозилхлоридом дала замещенный имидазольный нуклеозид (**37**), обработка которого аммиаком привела к 1-*D*-рибофуранозилимидазолдикарбоксамиду-4,5 (**38**). Замыкание пиримидинового цикла с использованием модифицированной реакции Гофманна со щелочным гипобромитом дало ксантозин {схема (16)}. Позднее этот метод был модифицирован [84], имидазольный нуклеозид (**37**) получен прямой реакцией 2,3,5-три-*O*-ацетил-*D*-рибофуранозилазида с диметиловым эфиром ацетилендикарбоксилата.

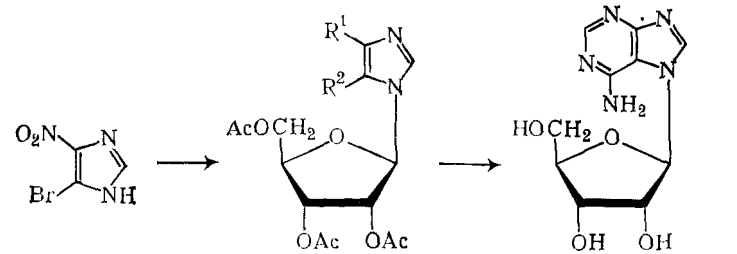
Установлено [34], что наряду с желаемыми *N*-9-гликозильными производными образуются следовые количества *N*-7-производных.

Вариант этого метода использован Робинсом с сотр. специально для получения N-7-гликозилпуриновых нуклеозидов [85]. Имидазольный нуклеозид (**39**) получен катализируемой кислотой реакцией сплавления и обработан далее цианидом калия, что привело к (**40**), который восстанавливали до аминонитрила (**41**). Циклизация последнего с диметоксиметилацетатом с последующим деацетилированием дала 7-(β-*D*-рибофуранозил)аденин (**42**) {схема (17)}. По аналогичной методике получены также соответствующие гуаниновые производные.

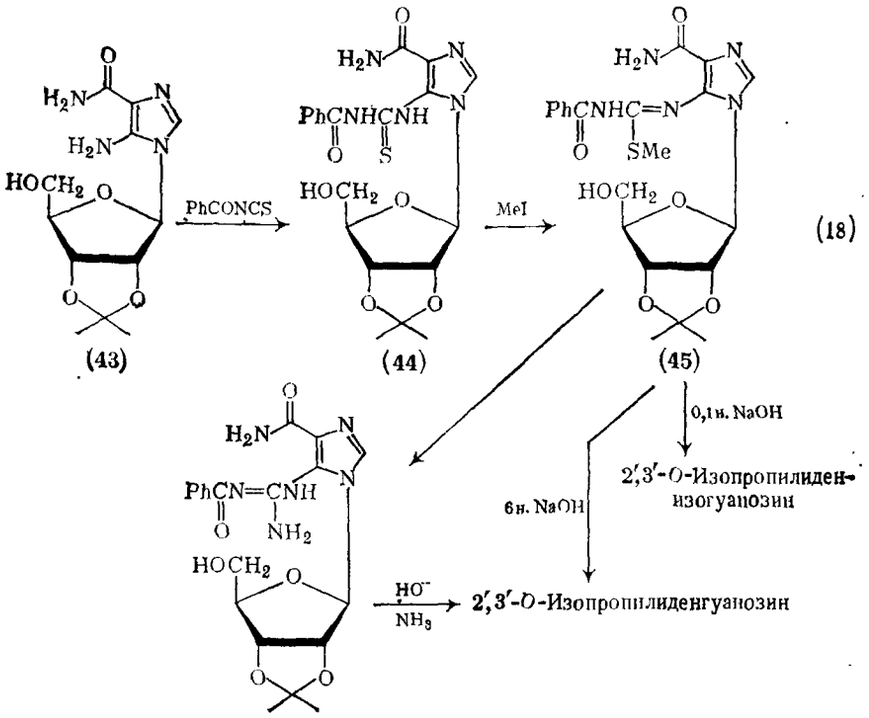
5-Амино-1-β-*D*-рибофуранозилимидазолкарбоксамид-4 (АИКА-рибозид), получаемый ферментативно [86], был предметом интенсивных исследований как исходное вещество для синтеза пуриновых нуклеозидов. Ямазаки с сотр. сообщили о двух методах синтеза гуанозина из АИКА-рибозида (**46**); позднее детально описаны две дальнейшие модификации одного из этих методов для получения гуанозина и инозина. Один из ранних методов описывает обработку 5-(N′-бензоил-5-метилизотиокарбамоил)амино-1-(2′,3′-*O*-изопропилиден-β-*D*-рибофуранозил)имидазолкарбоксиамида-4 (**45**) аммиаком с последующим замыканием цикла в щелочной среде. Второй метод основан на реакции АИКА-рибозида с натриевой солью метилксантина с последующим окислением и аминированием. Последний способ представляется более подходящим для



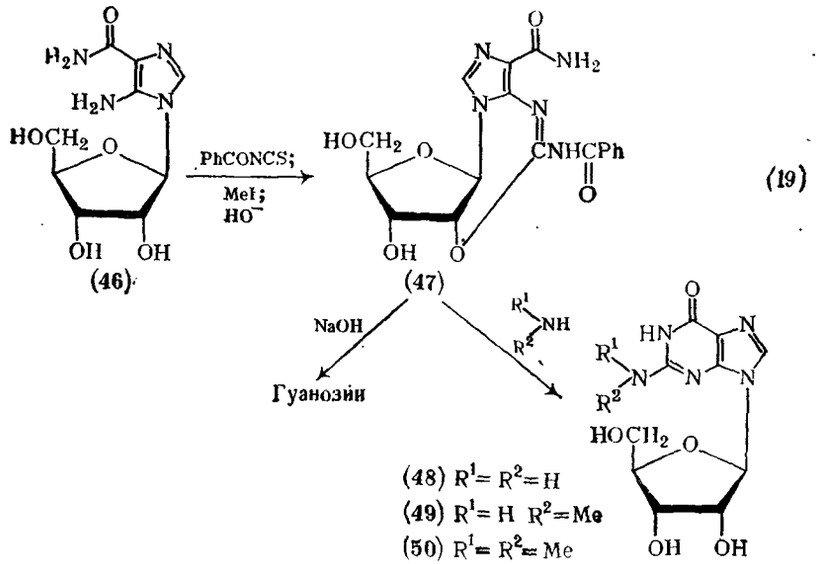




проведения крупномасштабных синтезов. Исследование циклизации (**45**) в щелочной среде позволило разработать новый метод. Найдено, что обработка (**45**) 6 н. NaOH приводит с высоким выходом (суммарно 50% без выделения интермедиата) к 2′,3′-*O*-изопропилиденгуанозину, а обработка (**45**) 0,1 н. NaOH — с удовлетворительным выходом к 2′,3′-*O*-изопропилиденизогуанозину {схема (18)}. Показано также, что интермедиат типа (**45**), образую-



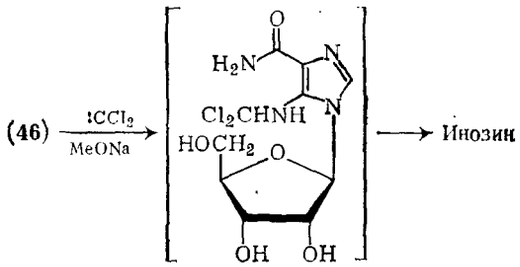

(18)




(19)

щийся из свободного нуклеозида, а не из соответствующего изопропилиденового производиого, при стоянии в растворе со щелочным значением pH превращается в циклонуклеозид структуры (47). Этот продукт может быть превращен в ксантозин, гуанозин (48), $N^2$-метилгуанозин (49) или $N^2$, $N^2$-диметилгуанозин (50) обработкой соответственно NaOH, аммиаком, метиламином или диметиламином {схема (19)}.






(20)

Инозин может быть получен из АИКА-рибозида (46) реакцией с карбеном, генерируемым из хлороформа, тетрахлорида углерода или гексахлорэтана в присутствии метилата натрия {схема (20)} [36].

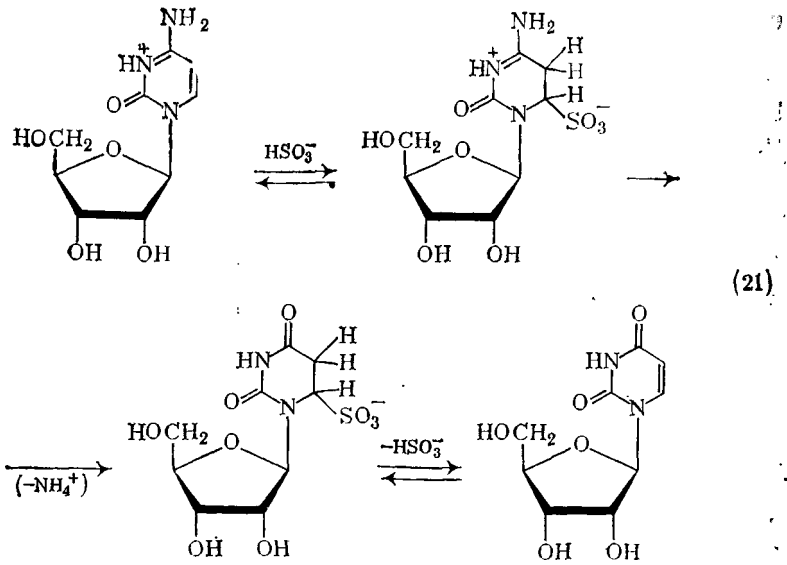
### 22.2.3.4. Взаимопревращения природных нуклеозидов

В этом разделе приводится разнородный набор реакций, которые можно рассматривать как химические реакции нуклеозидов. Однако такое объединение имеет ряд достоинств, в особенности потому, что здесь упор делается на синтез аналогов нуклеозидов.

#### *(1) Дезаминирование*

Методы превращения аденинoвых и цитозиновых нуклеозидов соответственно в гипоксантиновые и урацильные нуклеозиды доступны уже давно (действительно, многие продажные ДНК содержат дезоксиуридиновые остатки за счет дезоксицитидиновых звеньев). Обычно используемым (для дезаминирования) агентом является азотистая кислота, особенно полезная для получения гипоксантинсодержащих нуклеозидов. В ряду пиримидинов цитозиновые нуклеозиды обычно труднее получать, чем урацильные нуклеозиды, и поэтому их дезаминирование нашло меньшее применение в синтезе [87].

Другой мягкий метод дезаминирования цитозиновых производных в урацильные заключается в использовании бисульфита (5 ч, pH 5, 37 °C). Этот реагент обратимо присоединяется по 5,6-двойной связи, образуя 5,6-дигидро-6-сульфонат, который быстро дезаминируется, с последующим отщеплением бисульфита при обработке щелочью {схема (21)}. Обсуждалось [88] использование этой реакции в синтезе.

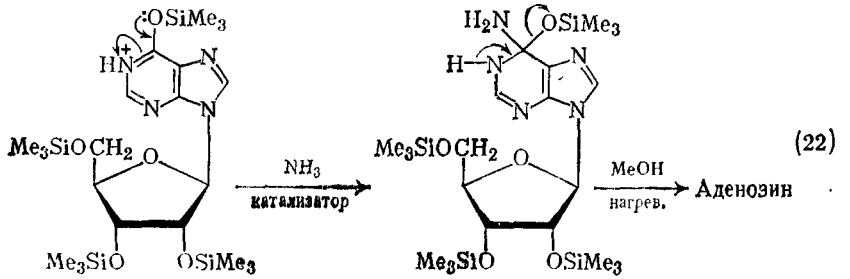


(21)

### (2) *Аминирование*

В литературе [89] описаны два надежных метода получения цитозиновых нуклеозидов, исходя из соответствующих урацильных производных. Фокс использовал реакцию пентасульфида фосфора для превращения 4-оксогруппы в тиольную группу, которая далее может быть замещена обработкой аммиаком. Альтернативно, при использовании реагента Вильсмеера-Хаака [47] (хлорметилендиметиламмонийхлорида) или хлороксида фосфора получают 4-хлорпроизводное, в котором хлор замещают при обработке аммиаком.

Сообщалось, что фенилфосфордиамидат $PhOP(O)(NH_2)_2$ (51) превращает таутомерные оксогидроксигруппы непосредственно в аминогруппы. Этот реагент использован для превращения 6-метилурацила в 2,4-диамино-6-метилпиримидин [90], однако выход цитидина из уридина неудовлетворителен.



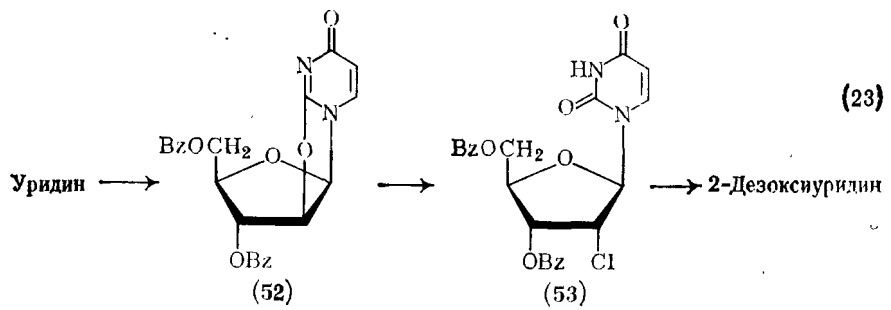
(22)

Форбрюгген и сотр. описали одностадийное превращение уридина в цитидин; метод использован также для превращения тимидина в 5-метил-2′-дезоксицитидин и инозина в аденозин (даже на уровне нуклеотидов) [91]. Персилилирование свободных или ацилированных уридинов активирует положение 4 ядра, и последующая обработка аммиаком дает соответствующие цитозины (цитидины); выход 80 %. Активированные интермедиаты, образующиеся в ходе реакции Гилберта-Джонсона с силилированными урацилами, можно с помощью аммиака аналогичным образом превратить в соответствующие цитидины. Для реакции тимидина требуется добавление каталитических количеств сульфата аммония (дает 5-метил-2′-дезоксицитидин с выходом 61%), а из инозина образуется аденозин (выход 72%). Обсуждался механизм этих реакций и аминирование пуринов определено как типичная катализируемая кислотой реакция присоединения-отщепления {схема (22)}.



### (3) *Рибонуклеозиды → 2′-Дезоксирибонуклеозиды*

Есть определенные преимущества в создании хорошего синтетического метода для осуществления этого превращения. Получение дезоксинуклеозидов всегда более сложно, чем аналогичных рибонуклеозидов, поскольку дезоксисахар менее стабилен (и более дорог) и часто не удается избежать образования смеси α- и β-аномеров. Напротив, синтезы многих рибонуклеозидов идут быстро, количественно и дают только β-нуклеозид. Существуют три метода рибо- ⟶ дезоксирибо-превращения. Первый метод требует получения $O^2$,2′-циклонуклеозида (52) по реакции уридина с дифенилкарбонатом [92]. Неочищенный продукт прямо бензоилируют бензоилцианидом в апротонном растворителе и превращают далее в 2′-хлор-2′-дезоксинуклеозид (53) действием безводного хлорида водорода в ДМФА. В результате образуется исключительно рибопродукт, который может быть восстановлен гидри-



(23)

(52) (53)

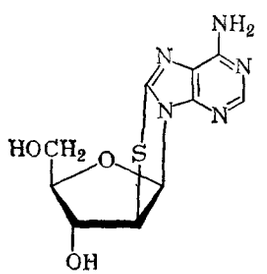
дом три-*н*-бутилолова до защищенного дезоксинуклеозида; удаление защитных бензоильных групп приводит к свободному дезоксинуклеозиду {схема (23)}. Другой метод, в чем-то сходный с первым, состоит в превращении 2′,3′-*O*-бензилиденуридина в 3′-*O*-бензоил-2′,5-дибром-2′-дезоксиуридин реакцией с *N*-бромсукцинимидом, вероятно через $O^2$,2′-циклонуклеозид [93], который можно

превратить каталитическим восстановлением и дебензоилированием в 2′-дезоксиуридин. Выходы, однако, не столь высоки, как в первом методе.

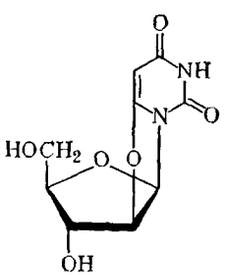
Недавно предложен другой метод синтеза 2′-дезоксинуклеозидов, основанный на восстановлении ацетильных производных аденозин-2′,3′-тиокарбоната гидридом три-*н*-бутилолова в присутствии азобисизобутиронитрила в диметилацетамиде [94]. После удаления защитных групп получают разделимую смесь 2′-дезоксиаденозина (60%) и 3′-дезоксиаденозина (31%).

### 22.2.3.5. Циклонуклеозиды

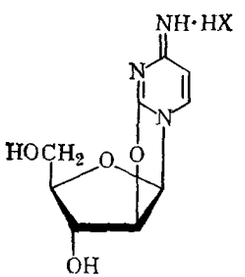
Продукт, образующийся в результате внутримолекулярной реакции гетероциклического основания с углеводным остатком, называется цикло (или ангидро) нуклеозидом. Исторически эти соединения играли важную роль в доказательстве β-конфигурации природных рибо- и дезоксирибонуклеозидов [95]. Однако и сейчас продолжают появляться подобные соединения с интересными свойствами. Так, гомополинуклеотид, содержащий $S^8$,2′-цикло-9-β-*D*-арабинофуранозиладенин (**54**), образует левовращающий дуплекс с гомополинуклеотидом, содержащим 6,2′-цикло-1-β-*D*-арабинофуранозилурацил (**55**) [96], а $O^2$,2′-цикло-1-β-*D*-арабинофуранозилцитозин (**56**) (цикло-ага-С, для биохимика!) используют при лечении острой миелобластозной лейкемии [97]. Нет возможности достаточно обсудить материал этого или любого из последующих разделов. Будет сделана лишь попытка дать описание некоторых общих методов получения различных типов соединений, которые были синтезированы, а также будут приведены некоторые ключевые ссылки. Ранние работы по циклонуклеозидам детально рассмотрены в [3]; более поздние работы обобщены в [46].



(54)



(55)



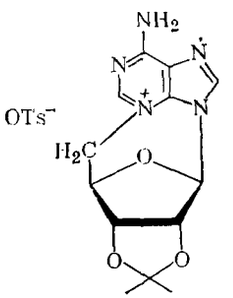
(56)

#### *(1) Пуриновые циклонуклеозиды*

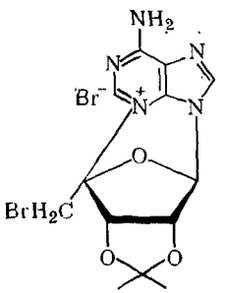
Первым полностью охарактеризованным (данными рентгеноструктурного анализа) циклонуклеозидом был $N^3$,5′-циклонуклеозид аденозина (**57**), который можно легко получить нагреванием раствора 5′-*O*-*n*-толуолсульфонил-2′,3′-*O*-изопропилиденаденозина.



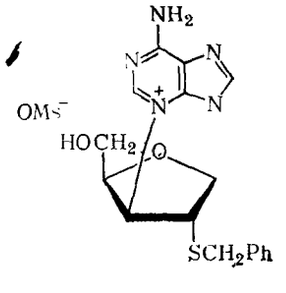
Хотя незащищенный циклонуклеозид может быть получен из 5′-*O*-*n*-толуолсульфониладенозина, эта реакция протекает не столь легко, как с изопропилиденовым производным, поскольку образование циклического ацеталя приводит к изменению конформации углеводного кольца и смещает 5′-углеродный атом вплотную к гетероциклическому основанию. Синтезированы также аналогичные циклонуклеозиды других пуриновых нуклеозидов, такие как $N^3$,4′- (**58**) [98] и $N^3$,3′-циклонуклеозиды (**59**) [99]. Эти циклонуклеозиды часто используют как интермедиаты в синтезе аналогов нуклеозидов. $N^3$,5′-Производные, как этого и следовало ожидать от соединений с положительно заряженным пиримидиновым кольцом, претерпевают раскрытие пиримидинового цикла со щелочью до (**58a**) и нормальное кислотное расщепление гликозидной связи, давая соединения типа (**59a**) {схемы (24), (25)}. Икехара с сотр. опубликовали 29-ую работу по пуриновым циклонуклеозидам [100], в которой в основном исследуются $S^8$,2′-, $S^8$,3′-, $S^8$,5′-, $O^8$,2′-, $O^8$,3′-, $O^8$,5′- и $N^8$,2-циклоаденозины, хотя были использованы и другие пуриновые гетероциклы. Типичный синтез показан на примере превращения (**60**) в циклонуклеозид (**63**) {схема (26)}.



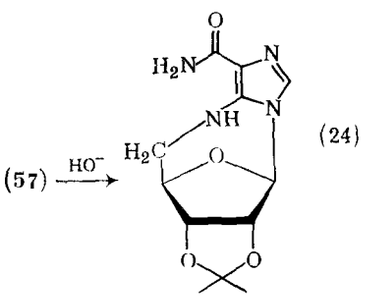
(57)



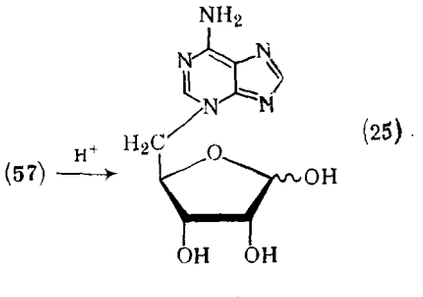
(58)



(59)



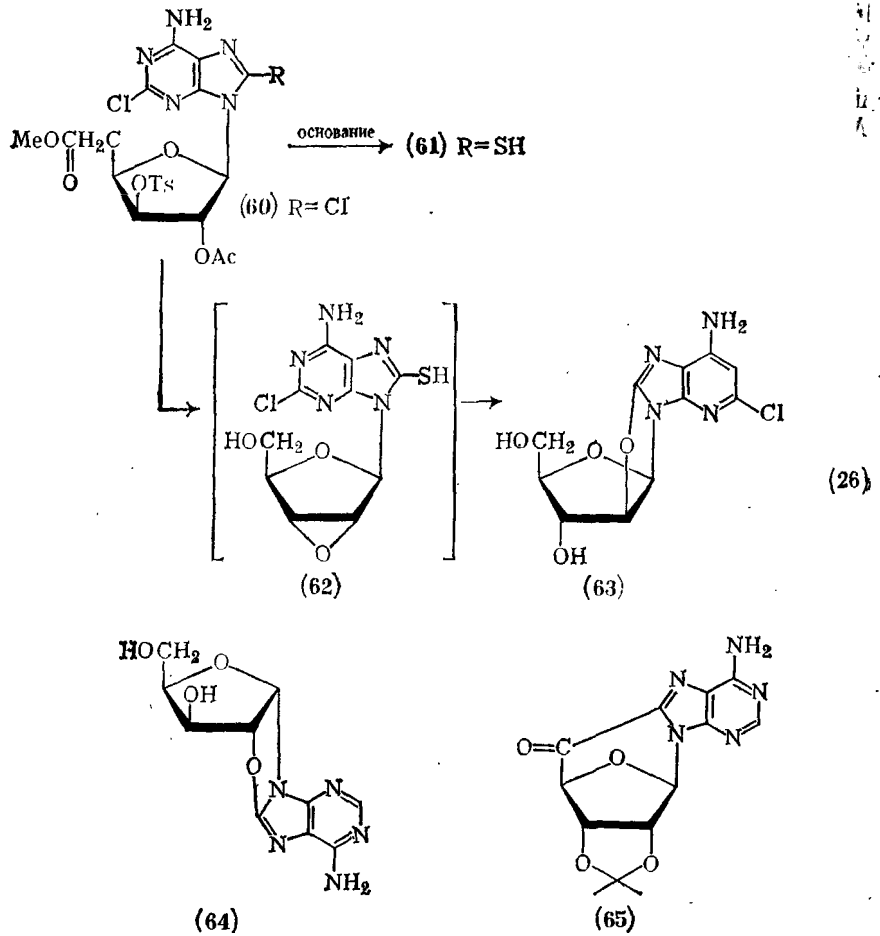
(58a) (24)



(59a) (25)

Сообщалось [101] о синтезе α-циклонуклеозида (**64**) и о синтезе циклонуклеозида 5′-оксо-8,5′-циклоаденозина (**65**), содержа-

щего мостиковый углеродный атом. За исключением работ группы Икехары о химических реакциях пуриновых 8-циклонуклеозидов сообщалось мало.



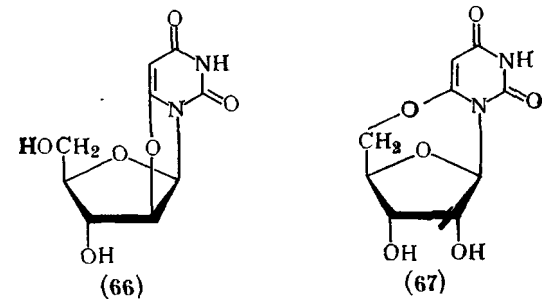

### (2) *Пиримидиновые циклонуклеозиды*

Первым полученным пиримидиновым циклонуклеозидом был тозилат 2′,3′-*O*-изопропилиден-$O^2$,5′-циклоцитидина [95]; он был получен нагреванием изомерного ковалентного соединения, 2′,3′-*O*-изопропилиден-5′-*O*-*n*-толуолсульфонилцитидина. С тех пор было получено много пиримидиновых циклонуклеозидов, которые послужили удобными синтетическими интермедиатами. При обработке аммиаком или разбавленной щелочью 2′-*O*-сульфонатов (рибонуклеозидов) легко образуются $O^2$,2′-циклонуклеозиды. $O^2$,5′-Циклонуклеозиды получаются при обработке 5′-дезокси-5′-



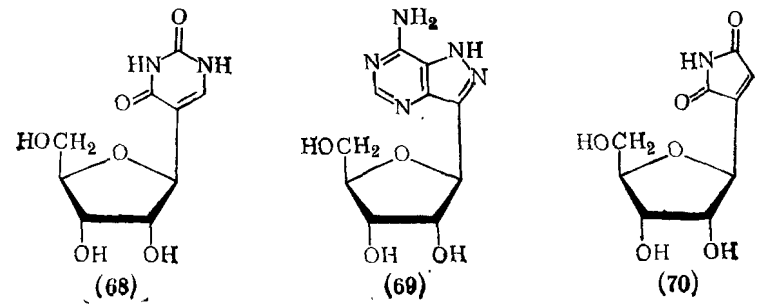
иоднуклеозидов солью серебра, и только $O^2$,3′-циклонуклеозиды образуются с трудом из 3′-*O*-сульфонатных эфиров и требуют *трет*-бутилата натрия и нагревания. Таким образом, легкость образования циклонуклеозидов из рибонуклеозидных предшественников изменяется в ряду: $O^2$,3′- < $O^2$,5′- < $O^2$,2′-.

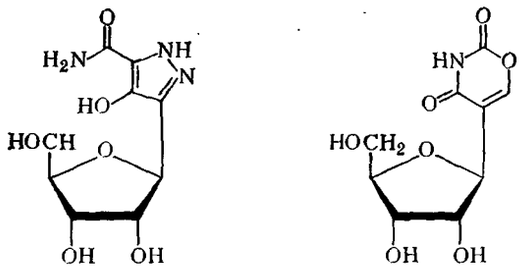
Пиримидиновые $O^2$-циклонуклеозиды реагируют при атаке реагента по любому из концов кислородного мостика. Имеется обзор [103] по превращениям пиримидиновых нуклеозидов, протекающим через ангидронуклеозиды. Гидролиз циклической связи может проходить либо с кислотой, либо со щелочью и из $O^2$,2′- и $O^2$,3′-циклонуклеозидов сопровождается образованием арабинозных и ксилозных производных соответственно. Получены также $N^2$- и $S^2$-циклонуклеозиды, так же как и $O^6$,2′- и $O^6$,5′-циклонуклеозиды уридина **(66)** и **(67)**, тимидина и цитидина.




### 22.2.3.6. C-Нуклеозиды

На период написания этого раздела единственным С-нуклеозидом, чье присутствие доказано в полинуклеотидной цепи, был псевдоуридин (или 5-β-*D*-рибофуранозилурацил) **(68)**, и одно это не оправдывает больших усилий, прикладываемых в этой области [104]. Эта активность практически целиком обусловлена недавними открытиями [105] того факта, что ряд антибиотиков, таких как формицин А **(69)**, шоудомицин **(70)**, пиразомицин **(71)** и оксазиномицин **(72)**, являются С-нуклеозидами. Делались попытки





(71) (72)

улучшить и расширить полезные свойства, до сих пор исключительно безуспешные.

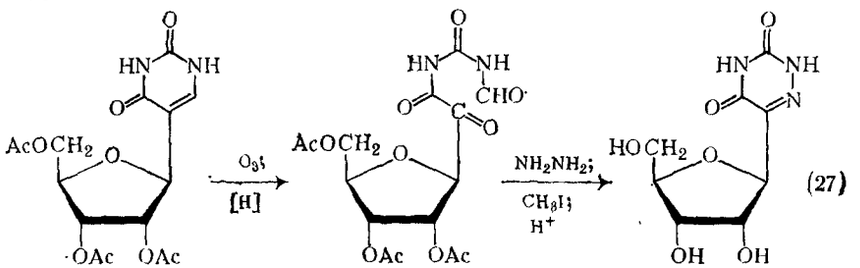
Синтез *C*-нуклеозидов может быть осуществлен тремя путями, каждый из которых будет рассмотрен.

### *(1) Реакции конденсации*

Наиболее хорошо известный *C*-нуклеозид, псевдоуридин, был синтезирован прямой реакцией конденсации. Наилучшие выходы (10%) были получены при конденсации 2,4-ди-*трет*-бутокси-5-литийпиримидина с 2,4; 3,5-ди-*O*-бензилиден-*D*-рибозой с последующим удалением защитных групп [106]. Однако в целом для синтеза *C*-нуклеозидов методы конденсации используются редко, поскольку требуются более предсказуемые и гибкие методы.

### *(2) Превращения C-нуклеозидов*

Этот метод опять-таки широко не используется, хотя псевдоуридин был получен из оксазиномицина (**72**). На схеме (27) представлено превращение псевдоуридина в 5-(β-*D*-рибофуранозил)-6-азаурацил.



(27)

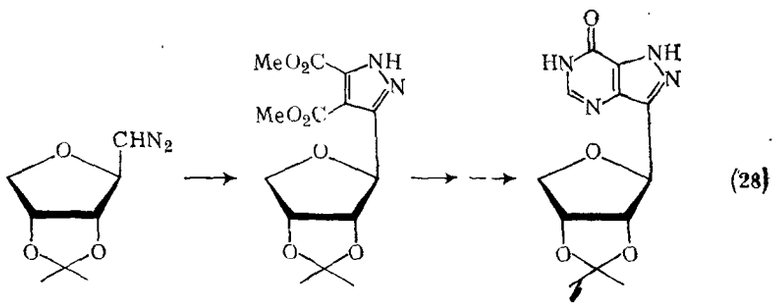
### *(3) Создание гетероциклов из ангидроальдитов с подходящими функциональными группами*

Это гораздо более успешный подход, но здесь могут быть даны лишь несколько типичных примеров многих доступных методов.



В качестве предшественника аналогов формицина А использован 1-диазосахар, который вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с ацетилендикарбоксилатом {схема (28)} [107].

Использован также 1-цианосахар (**73**), который либо вводили в реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения с ацетиленом по методу Тронше с сотр. [108], что приводило к образованию изоксазолов и пиразолов, либо по методу Моффатта с сотр. [109] получали из него амидоксим (**74**) по реакции с гидроксиламином, последующая циклизация которого приводила к оксадиазолам (**75**) или оксадиазолинам {схема (29)}.



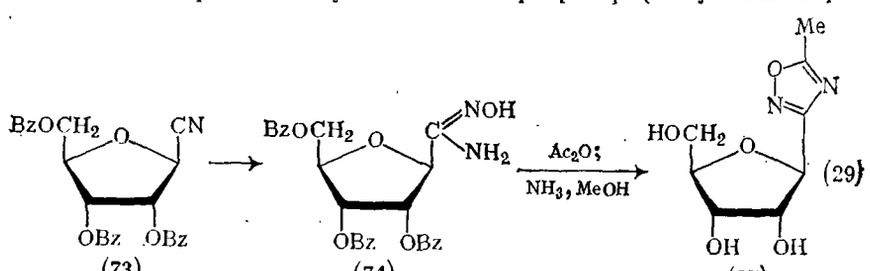
(28)

Шорм и сотр. [110] использовали на первой стадии синтеза шоудомицина озонолиз 1-арилрибозида (**76**). Реакция протекает через последовательное образование пируватного эфира (**77**), малеатного эфира (**78**) и малеамида (**79**) {схема (30)}.

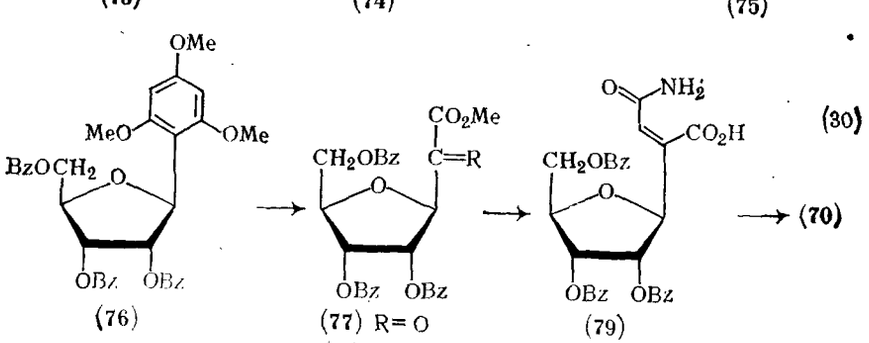
Метод, привлекший недавно большое внимание, заключается в прямой конденсации альдофуранозилгалогенидов со стабилизованными карбанионами. Ханессиан и сотр. [111] были первыми, кто показал, что такие производные сахаров могут реагировать с диалкилнатриймалонатами, давая с умеренными выходами β-*C*-гликозиды (**80**), но для предотвращения образования соединений типа (**81**) при использовании 2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозилгалогенидов необходимо наличие несоучаствующей группы при С-2.

Фокс и сотр. [112] детально разработали синтез 2,3-*O*-изопропилиден-5-*O*-тритил-β-*D*-рибофуранозилхлорида (с хорошим выходом), который является идеальным исходным материалом для синтеза β-*D*-рибофуранозил-*C*-гликозидов. Моффатт и сотр. [113] детально исследовали реакцию 2,3-*O*-изопропилиденсахаров со стабилизованными илидами и показали, что вопреки ожиданию (и предположениям [112]) стерически более затрудненные α-изомеры, в которых аномерный заместитель и изопропилиденовые остатки находятся в *цис*-положении по отношению друг к другу, являются термодинамически наиболее стабильными продуктами, в то время как нужный *транс*-изомер является кинетическим продуктом. Изучено присоединение как фосфоранов, так и натрий-

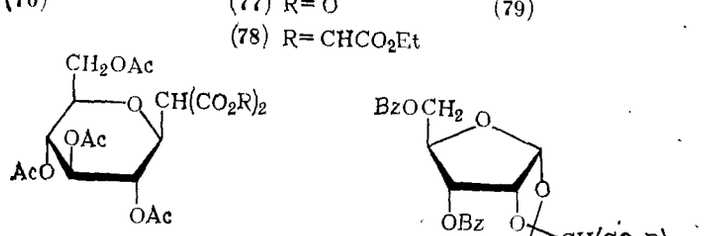
малонатов. И наконец, использовано циклоприсоединение к гликозилэтинам в работах Буханана и сотр. [114] (получение пира-



(73) (74) (75) (29)



(76) (77) R = O (78) R = $CHCO_2Et$ (79) (30) (70)



(80) (81)

золов и пиразолонов), Фокса и сотр. [115] (получение триазолов), Моффатта и сотр. (получение пиразолов и триазинов) и Аракава и др. [116] (получение пиразолов).

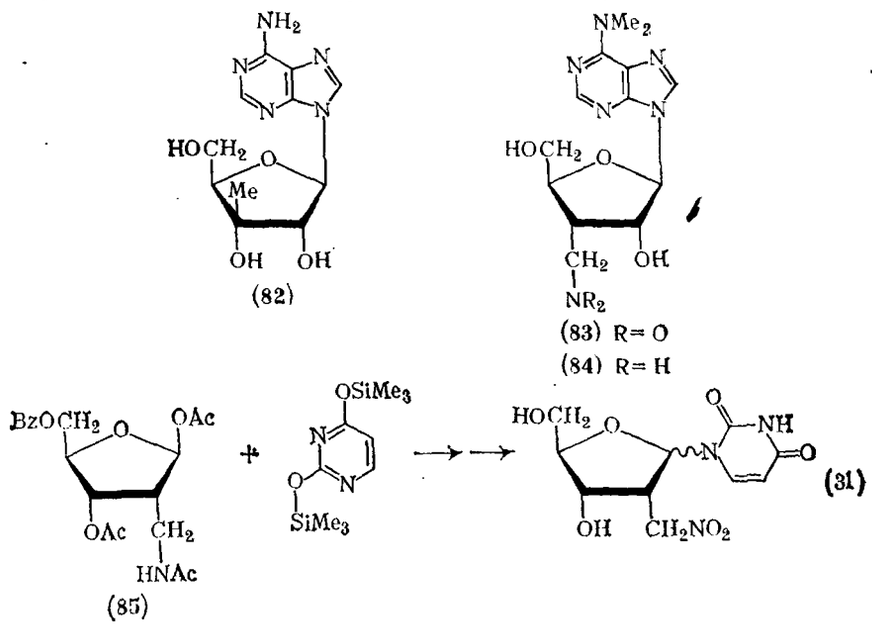
### 22.2.3.7. Нуклеозиды с разветвленными углеводными остатками

Толчком, инициировавшим синтез нуклеозидов с разветвленными углеводными остатками, послужили сообщения, что 2′- и 3′-*C*-метилцитидины являются эффективными антивирусными агентами в опытах на мышах, а также, что два 2′-*C*-нитрометилгексопиранозилпурина обладают активностью против опухолевых КВ-клеток. Существуют два основных метода получения таких нуклеозидов: во-первых, синтезом подходящего углеводного предшественника

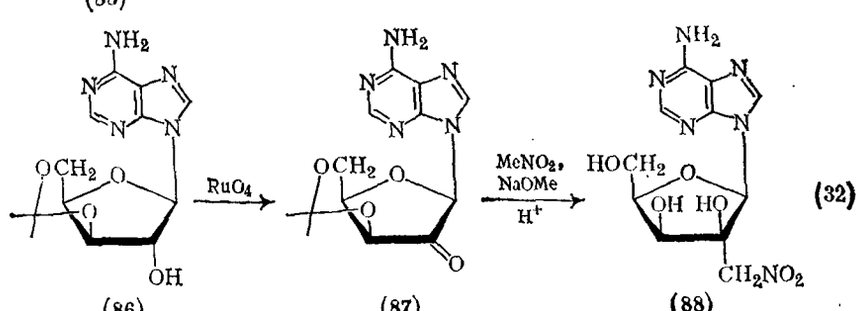


с последующей обычной конденсацией в нуклеозид и, во-вторых, реакцией нуклеофилов с 2′- или 3′-кетонуклеозидами. Таким образом, большая часть химических вопросов относится к обычной химии углеводов и, они рассматриваются в части 26 настоящего издания. Поэтому здесь будет достаточно дать лишь несколько примеров.

Авторы [117] сообщили о получении сахаров, необходимых для синтеза (по методике тяжелых металлов) 2′-*C*- и 3′-*C*-метиладенозинов (82). Аналогичной реакцией конденсации Альбрехт и Моффатт синтезировали 6-диметиламино-9-[′-дезокси-′-нитро- (и -амино)]метил-β-*D*-рибофуранозилпурины [118] (83) и (84). 2′-*C*-Нитрометилуридин получен катализируемой по Фриделю-Крафтсу конденсацией силилированного урацила с подходящим углеводным производным (85) {схема (31)}. Недавно опубликован обзор [119] по химии и биохимии разветвленных сахаров.



(82) (83) R = O (84) R = H (85) (31)



(86) (87) (88) (32)

Розенталь и сотр. [120] использовали альтернативный подход и получили 2′-(*C*-нитрометил)-9-β-*D*-ликсофуранозиладенин (88) окислением нуклеозидного производного (86) тетраоксидом рутения с последующей реакцией кетопроизводного (87) с нитрометаном в присутствии метилата натрия {схема (32)}.

### 22.2.3.8. Нуклеозиды с ненасыщенными и эпоксиуглеводными остатками

Нуклеозиды, содержащие ненасыщенные сахара, вызывают значительный интерес, особенно с тех пор, как показано, что такие антибиотики, как августмицин А (декоинин) (89), содержат подобные структуры. Очевидно также использование этих соединений в качестве промежуточных при синтезе других аналогов, и недавние работы, касающиеся этого аспекта, см. в [121].

Пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды, содержащие 1′,2′-ненасыщенные углеводные звенья, представляют недавно синтезированные члены этой группы. Первые были синтезированы из 2′,3′-*O*-метоксиэтилиденаденозина (91), который с иодидом натрия и пивалоилхлоридом в пиридине дает наряду с другими продуктами 2′-иодпроизводное (92) [122]. Его обрабатывали перманганатом для удаления 3′-енольной эфирной группы, затем продукт силилировали и после элиминирования HI с помощью 1,5-диазабицикло[4.3.0]нонена-5 (ДБН) и удаления защитных групп получали нуклеозид с ненасыщенным углеводным остатком (93) {схема (33)}. Пиримидиновые 1′,2′-ненасыщенные нуклеозиды получали обработкой производного 1-β-*D*-арабинофуранозил-$O^2$,2′-циклоуридина (94) *трет*-бутилатом калия с последующим удалением защитных групп, что приводило к (95) {схема (33а)} [123].

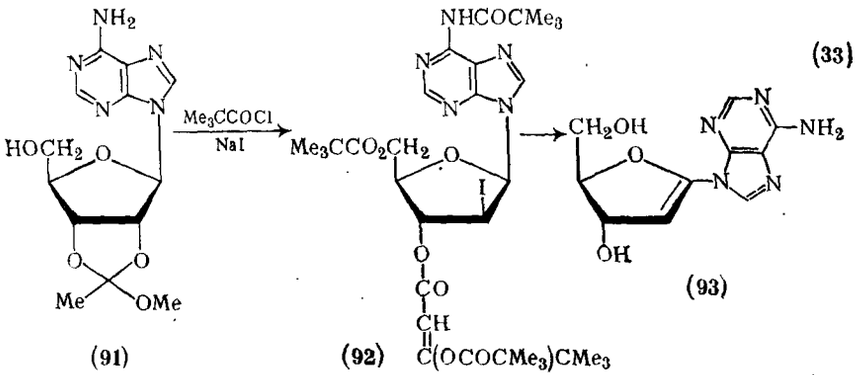
Нуклеозиды с 2′,3′-ненасыщенными углеводными звеньями получены в результате катализируемых основаниями реакций элиминирования либо 3′-*O*-метансульфонил-, либо $O^2$,3′-циклопроизводных 2′-дезоксинуклеозидов [124]. Недавний метод [124], использующий в качестве исходного материала более дешевые рибонуклеозиды, позволяет получать и пуриновые, и пиримидиновые нуклеозиды {схема (34)}.

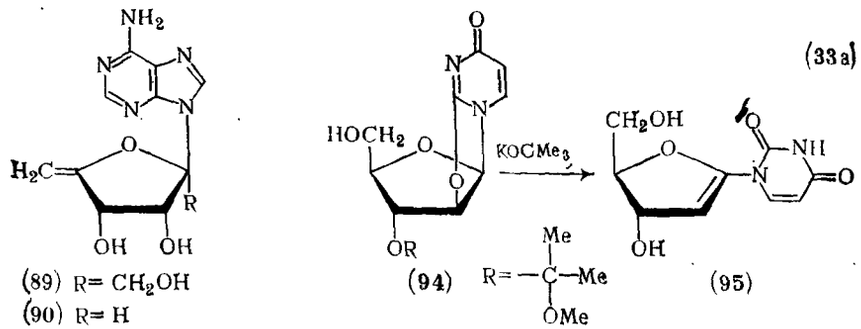
До недавнего времени нуклеозиды с 3′,4′-ненасыщенными углеводными звеньями получали только из 2′-дезоксинуклеозид-5′-уронатов катализируемым основаниями элиминированием и восстановлением эфирной функции [124]. Соответствующие рибонуклеозиды получены в результате катализируемого основаниями элиминирования ацетальной функции 2′,3′-*O*-бензилиденнуклеозидальдегидов-5′ с последующим восстановлением альдегидной группы боргидридом. Альтернативный синтез (97) с хорошим выходом осуществлен при обработке нуклеозида (96) ДБН в ацетонитриле при 80 °C [124] {схема (35)}.

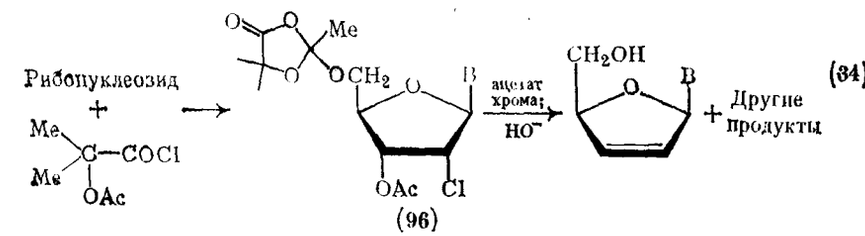
Пиримидиновые 4′,5′-рибо- и 2′-дезоксирибонуклеозиды получены из соответствующих нуклеозидов дегидрогалогенированием

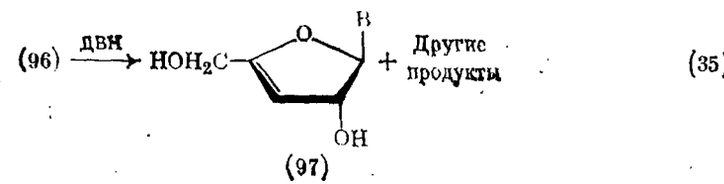


подходящим образом ацилированных 5′-дезокси-5′-иоднуклеозидов с использованием либо фторида серебра в пиридине, либо ДБН [125]. Адениновый аналог (90) можно получить реакцией 5′-*O*-(*n*-толуилсульфонил)-2′,3′-*O*-этоксиметилиденаденозина с *трет*-бутилатом калия и последующим мягким снятием защитных группировок.

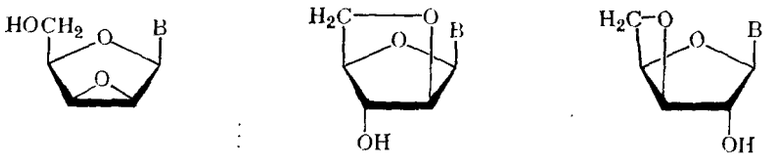


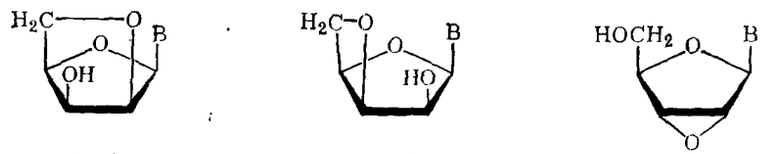



Как результат исследований химии простых рибофуранозидных производных методы синтеза эпоксидов нуклеозидов доступны достаточно давно [126]. Для каждого гетероциклического основания возможно существование шести эпоксипентофуранозилпроизводных (98)—(103). Большинство из них может быть получено действием основания на подходящим образом защищенный мезилированный или тозилированный нуклеозид.



(98) (99) (100)



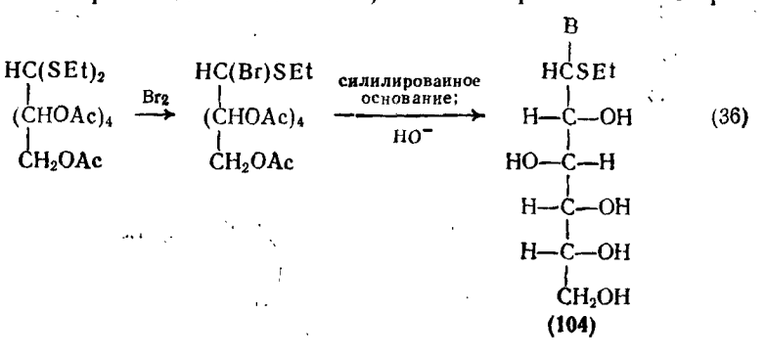
(101) (102) (103)

Фокс и сотр. описали синтез четырех урацильных производных [127]. Пример получения оставшихся двух производных (типа (98) и (103) аденина описан Робинсом и сотр. [128].

### 22.2.3.9. Нуклеозиды с ациклическими углеводными остатками и *L*-нуклеозиды

Почти все исследования каждого из этих двух типов нуклеозидов осуществлены одной группой исследователей. Нуклеозиды с ациклическими углеводными звеньями получены Вольфромом и Хортоном [19, 129], а *L*-нуклеозиды — Шормом и Холи [130].

Все нуклеозиды с ациклическими углеводными звеньями получены конденсацией подходящего ациклического углевода (обычно дитиоацеталь производного глюкозы) с силилированным гетероциклом с образованием производных типа (104) {схема (36)}. Получены производные аденина, цитозина, урацила и тимина. В результате реакции образуется смесь эпимеров по С-1′, которую можно разделить и идентифицировать эпимеры физическими методами. Получающиеся соединения являются потенциальными антиметаболитами; интенсивно исследовались конформации ациклического углеводного остатка.

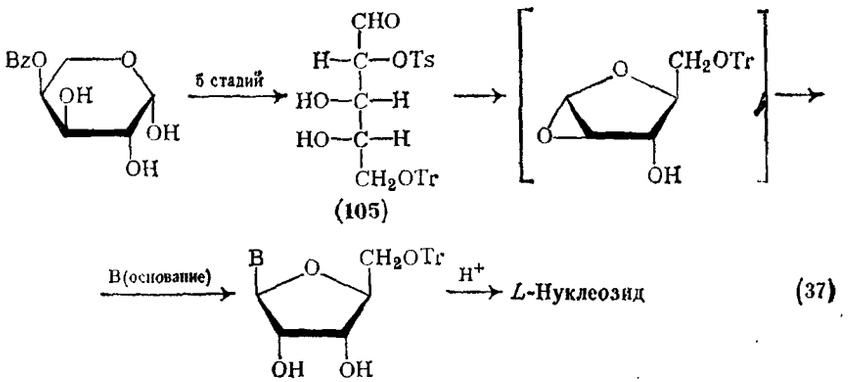


(104) (36)



Разработаны методики химического синтеза как пуриновых, так и пиримидиновых *L*-рибонуклеозидов, а также пиримидиновых 2′-дезокси-*L*-рибонуклеозидов, однако нет общего метода синтеза значительных количеств пуриновых 2′-дезокси-*L*-рибонуклеозидов из легко доступных исходных веществ.

Пуриновые и пиримидиновые *L*-рибонуклеозиды получены реакцией натриевой соли гетероцикла в ДМФА с 2-*O*-тозил-5-*O*-тритил-*L*-арабинозой (105), которую получают из *L*-арабинозы (легко доступного *L*-сахара) в несколько стадий {схема (37)}. Альтернативно, пиримидиновые *L*-рибонуклеозиды и пиримидиновые 2′-дезокси-*L*-рибонуклеозиды можно получить из $O^2$,2′-ангидро-*L*-уридина, который готовят из *L*-арабинозы через ранее описанный аминооксазолин (18).



(105)

(37)

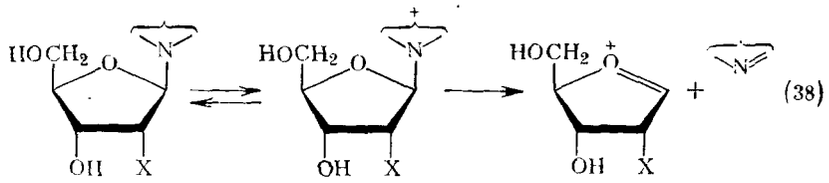
В бактериальных клеточных стенках существует сильный барьер для проникновения *L*-нуклеозидов, который управляется пермеазной белковой системой таким образом, что *L*-нуклеозиды и сами по себе не проникают в клетку, и не препятствуют проникновению других нуклеозидов. Поэтому удивительно, что подтвержден синтез ди- и тринуклеотидов при действии полинуклеотидфосфорилазы из *Micrococcus luteus* на 5′-дифосфат *L*-аденозина [131]. *L*-Нуклеозиды вводили также крысам и хотя не наблюдалось существенного включения в ДНК или РНК, но происходило образование некоторых нуклеозиддифосфатов. Аналогично, введение *L*-уридина приводило к образованию *in vivo* *L*-цитидина, тогда как такой процесс не известен для нуклеозидов природного *D*-ряда.

### 22.2.4. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НУКЛЕОЗИДОВ

Нельзя даже попытаться достичь полноты освещения этого предмета, многие области которого во всяком случае рассматриваются в других главах. Многие учебники, посвященные этой теме, уже упоминались. В данном разделе мы сконцентрируем свое внимание на немногих вопросах и реакциях, представляющих особый интерес и имеющих отношение к химии нуклеозидов. Так, речь пойдет о реакциях с участием гликозидной связи или о таких реакциях, где изменение в углеводном остатке происходит одновременно с изменениями в гетероциклической части молекулы. Наконец, внимание будет уделено отдельным вопросам химии пиримидиновых нуклеозидов, которые имеют отношение к получению некоторых 5-замещенных пиримидиновых нуклеозидов, являющихся потенциальными антиметаболитами. Многие химические реакции, проявляющие некоторую специфичность по отношению к гетероциклическим остаткам одного или более из нуклеозидных составляющих тРНК, детально рассмотрены в [8].

#### 22.2.4.1. Гидролиз гликозидной связи

Достигнут определенный прогресс в объяснении хорошо известной разницы в скоростях гидролиза гликозидной связи рибо- и дезоксирибонуклеозидов. Первые более стабильны, чем последние; в каждом классе соединений, пуриновые основания отщепляются гораздо быстрее пиримидиновых. Сейчас доступны некоторые кинетические данные для обычных нуклеозидов в широком интервале pH, и эти данные могут быть объяснены в рамках механизма, включающего предравновесное протонирование гетероциклического кольца с последующей скорость-лимитирующей ионизацией гликозидной связи, но не (как рассматривается в большинстве учебников) через промежуточные основания Шиффа с последующим начальным протонированием атома кислорода углеводного кольца {схема (38)} [132, 133].

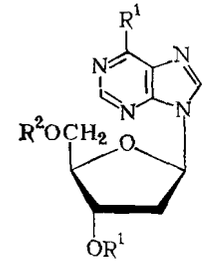


(38)

Большая разница в величинах $\Delta S^{\neq}$ объясняет чувствительность дезоксинуклеозидов к гидролизу. Влияние заместителей при C-5 в пиримидиновых нуклеозидах согласуется с этим механизмом [133]; так, электроноакцепторные галогены ускоряют гидролиз. Это объяснение механизма гидролиза гликозидной связи использовано Робинсом [134] для создания метода стабилизации гликозидной связи в пуриновых 2′-дезоксинуклеозидах таким образом,



что стало возможно осуществлять различные реакции замещения в гетероциклическом остатке. Высказано предположение, что наличие в углеводном остатке сильных электроноакцепторных групп будет оказывать максимальное замедляющее действие на расщепление гликозидной связи за счет дестабилизации образующегося карбениевого иона. Так, 2′-дезоксиинозин (**106**) был превращен в 3′,5′-бис-*O*-трифторацетат (**107**). Последний можно далее превратить в 6-хлорпроизводное (**108**) с выходом 81%, тогда как в идентичных условиях 3′,5′-ди-*O*-ацетил-2′-дезоксиинозин (**109**) давал более 90% основания, гипоксантина.




(**106**) $R^1$ = OH, $R^2$ = H
(**107**) $R^1$ = OH, $R^2$ = $CF_3CO$
(**108**) $R^1$ = Cl, $R^2$ = $CF_3CO$
(**109**) $R^1$ = OH, $R^2$ = MeCO

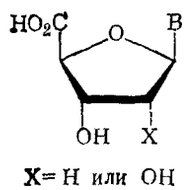
#### 22.2.4.2. Окисление

*(1) Углеводный остаток*

5′-Карбоновые кислоты нуклеозидов (**110**) получены из свободных нуклеозидов с использованием кислорода и платины [135] или комплекса пиридин-триоксид хрома [136]. Однако в последнем случае выходы недостаточно высоки из-за сопутствующего окисления гидроксильной группы при C-3′, сопровождающегося катализируемым основанием β-элиминированием гетероциклического основания из 3′-кетонуклеозида. Окисление 2′,3′-*O*-изопропилиденаденозина перманганатом калия в щелочных условиях дает с хорошими выходами 5′-карбоновую кислоту [137], однако этот метод ограничен адениновыми нуклеозидами, поскольку, как будет видно далее, все другие гетероциклические группы обычных нуклеозидов легко окисляются перманганатом.

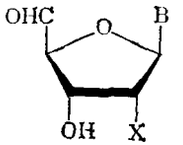
Нуклеозид-5′-альдегиды (**111**), которые имеют большее синтетическое применение, чем 5′-карбоновые кислоты, получены действием реагента Пфицнера-Моффатта [138] (*N*,*N*′-дициклогексилкарбодиимид-диметилсульфоксид) на 2′,3′-*O*-изопропилиденовые производные нуклеозидов. 3′-*O*-Ацетилтимидин претерпевает аналогичную реакцию. Полученные таким способом альдегиды довольно нестабильны. 5′-Альдегиды аденозина и уридина получены гидролизом продуктов фотолиза соответствующих нуклеозид-5′-азидов [139]. Возможно, что хлорхромат пиридиния также может быть эффективным реагентом для получения 5′-альдегидов и 2′- и 3′-кетонуклеозидов [140], хотя этот реагент, по-видимому, еще

не использовался в области нуклеозидов. Как отмечалось, 3′-кетонуклеозиды нестабильны в щелочных условиях, и следовательно, для получения 3′-кетоуридина (**112**) требуется действие реагента Пфицнера-Моффатта (или, что лучше, использование диметилсульфоксида либо с уксусным ангидридом, либо с фосфорным ангидридом) на 2′,5′-ди-*O*-тритилуридин. Применение сходных методов привело к получению 2′-кетоуридина и других пиримидиновых и пуриновых кетонуклеозидов.

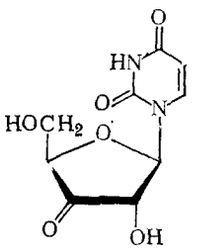


**X**= H или OH

(**110**)



(**111**)



(**112**)

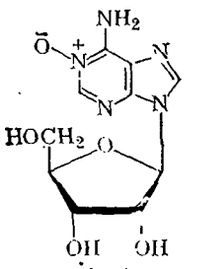
Реакция периодата с нуклеозидом, дающая так называемый нуклеозиддиальдегид, хорошо известна и использована помимо всего прочего для получения нуклеозидов, содержащих остатки аминоуглеводов [141], и как основа методов определения последовательности оснований [142] и состава оснований [143] в полирибонуклеотидах. Первоначально полагали, что диальдегиды нестабильны, однако недавно диальдегиды всех четырех основных рибонуклеозидов были выделены в стабильной форме в твердом виде [144, 145]. Однако структура этих соединений неясна. В полученных веществах, если и есть свободные альдегидные группы, то их мало, и хотя эти вещества гомогенны по данным ТСХ во всех испытанных системах растворителей, из их ЯМР-спектров очевидно, что они представляют собой смесь соединений с различной конфигурацией углеводного остатка. На основании этого предположено, что они превратились в полимеры [145].

### *(2) Гетероциклическое звено*

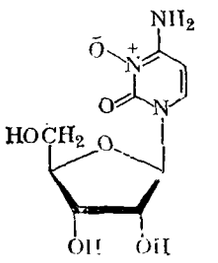
Действие пероксида водорода или органических пероксидов на нуклеозиды приводит к *N*-оксидам, некоторые из которых, как обнаружено, канцерогенны [146]. Так, реакция аденозина с 30%-ным пероксидом водорода в уксусной кислоте дает 1-*N*-оксид (**113**). Для получения соответствующих производных пуриновых дезоксинуклеозидов из-за их кислотолабильности требуется применение монопероксифталевой кислоты. Цитидин-*N*-3-оксид (**114**) образуется при действии на цитидин *м*-хлорпербензойной кислоты в уксусной кислоте.

Адениновые нуклеозиды относительно инертны к действию щелочного перманганата калия, тогда как другие нуклеозиды окисляются с различными скоростями, давая сложную смесь продуктов. 2′,3′,5′-Три-*O*-ацетилгуанозин образует с низким выходом 2′,3′,5′-три-*O*-ацетилрибофуранозилмочевину (**115**) и гуанидин [147]. 2′,3′,5′-Три-*O*-бензоилцитидин дает *N*-(2,3,5-три-*O*-бензоилрибофуранозил)-*N*′-оксалилмочевину (**116**) [148], а тимидин дает 5,6-дигидро-5,6-дигидрокситимидин (**117**) [149].

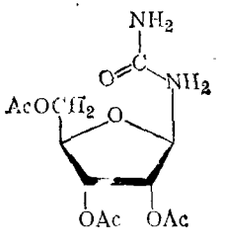
Несомненно, сходные продукты образуются и при окислении других пиримидиновых нуклеозидов, но показано, что они слишком нестабильны, чтобы их можно было выделить. Если не защищать гидроксильные группы углеводного остатка, то происходит деградация углевода с элиминированием основания. Конечными азотсодержащими продуктами окисления являются гликозилмочевины, гликозилбиуреты (из цитидина) и гуанидин (из гуанина).



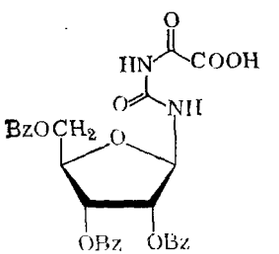
(**113**)



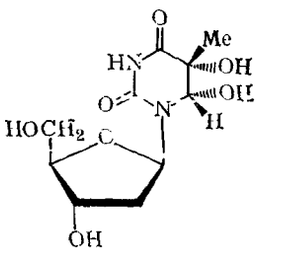
(**114**)



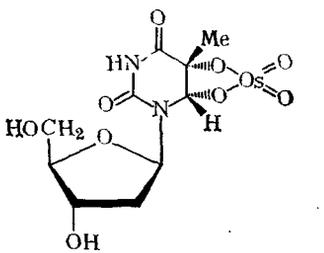
(**115**)



(**116**)



(**117**)



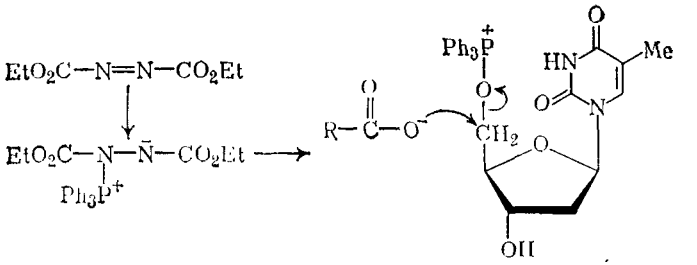
(**118**)

Тетраоксид осмия окисляет остатки тимина гораздо быстрее, чем другие основания; из реакционной смеси выделен также 5,6-дигидро-5,6-дигидрокситимидин [149]. При реакции тетраоксида осмия с 3′,5′-ди-*O*-ацетилтимидином в бензоле выделены (**118**) и другой циклический осмиевый эфир [150]. Пероксидисульфат калия $K_2S_2O_8$ имеет другую специфичность. Гуанозин и дезоксигуанозин окисляются им в 500 раз быстрее, чем любой другой нуклеозид, при этом образуются продукты, сходные с продуктами перманганатного окисления [151].

### 22.2.4.3. Ацилирование

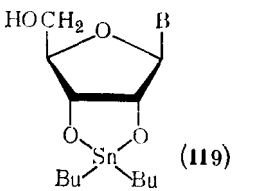
Ацилированные производные нуклеозидов и нуклеотидов широко используются в полинуклеотидном синтезе и применение этих производных будет рассмотрено в другом месте. Корана проложил пути к получению подходящим образом ацилированных по остатку основания производных; детали синтезов опубликованы [152, 153]. Вообще говоря, экзоциклические аминогруппы ацилируются в условиях, в которых столь же хорошо ацилируются и гидроксильные группы углеводного остатка, но последние могут быть дезацилированы в мягких условиях, что приводит к *N*-ацилированным нуклеозидам. При действии бензоилхлорида на уридин в пиридине образуется 2′,3′,5′-три-*O*-бензоилуридин, но с избытком реагента образуется $N^3$-бензоил-2′,3′,5′-три-*O*-бензоилуридин. *N*-Бензоильная группа устойчива к кислотному гидролизу. Энергичное ацилирование цитидина и аденозина приводит к пентабензоильным производным, и есть основания полагать, что две ацильные группы присоединяются к экзоциклическому атому азота [154]. $N^4$-Ацетилцитидин можно получить непосредственно из цитидина селективным методом, описанным Фоксом и сотр. [155]. Метод модифицирован для получения более стабильных результатов, и описано получение других $N^4$-ацилированных цитидинов [156]. $N^4$-Бензоил-2′,3′,5′-три-*O*-бензоилцитидин (или, что лучше, $N^4$-ацетил-2′,3′,5′-три-*O*-бензоилцитидин) может быть селективно $N^4$-дезацилирован в мягких кислотных условиях и, вопреки ранним сообщениям, при этом не обнаружено дезаминирования или расщепления гликозидной связи [157]. Первое соединение может быть также селективно $N^4$-дебензоилировано обработкой фенолом [158]. Аналогичным образом, $N^6$,$N^6$-дибензоил-2′,3′,5′-три-*O*-бензоиладенозин можно селективно $N^6$-дебензоилировать [158] или селективно 2′-*O*-дебензоилировать; последнюю реакцию осуществляют гидразинолизом [159]. Гидразин селективно 2′-*O*-дебензоилирует также $N^2$-бензоил-2′,3′,5′-три-*O*-бензоилгуанозин и 2′,3′,5′-три-*O*-бензоилинозин. Частичная избирательность для 2′-положения может также достигаться для полностью бензоилированных уридина и цитидина.

Защита спиртовых гидроксильных групп в виде эфиров — широко используемый метод, особенно в области углеводов и стероидов [160]. Поэтому наше внимание будет обращено лишь на те производные, которые находят особое применение в химии нуклеозидов. Наиболее часто использовались ацетильные и бензоильные защитные группы; их удаляют щелочным гидролизом или аммонолизом. Кроме того, использовались чувствительные к основаниям метокси- и арилокси-ацетильные группы [161], 2,2,2-трибромэтоксикарбонильная [162] (удаляется восстановлением), 3-бензоилпропионильная [163] (удаляется гидразинолизом), левулинильная [164] (удаляется борогидридом натрия или гидразином в смеси пиридина и уксусной кислоты [165]), а также эфиры дигидрокоричной кислоты [166] (удаляется химотрипсином). Использование тозильных и мезильных эфиров уже отмечалось при обсуждении синтезов циклонуклеозидов и эпоксинуклеозидов. 5′-Гидроксильная группа может проявлять некоторую избирательность в реакциях с тозилхлоридом; такая же селективность отмечена при обработке тимидина диэтилазодикарбоксилатом, трифенилфосфином и бензойной кислотой в гексаметилфосфотриамиде {схема (39)} [167].

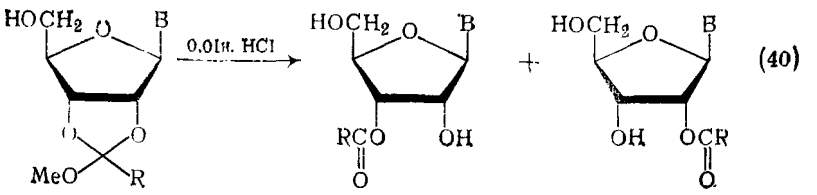


(39)

Пивалоильная (триметилацетильная) группа также проявляет селективность по отношению к 5′-гидроксильной группе. Реакция рибонуклеозидов с дибутилоловооксидом дает кристаллические 2′,3′-*O*-(дибутилстаннилен)нуклеозиды (**119**) [168], которые при реакции с ацилхлоридами и ангидридами дают 3′-*O*-ацильные производные, в то время как реакция с тозилхлоридом избирательно приводит к образованию 2′-*O*-тозилнуклеозидов. Моноацетилирование 5′-*O*-замещенных производных уридина и аденозина дает смесь 2′-*O*- и 3′-*O*-ацетатов. При кипячении этой смеси в пиридине или при кристаллизации может быть получена равновесная смесь с преобладанием 3′-*O*-ацетата; при частичном ацетилировании 5′-*O*-ацетилуридина можно получить 3′,5′-ди-*O*-ацетилуридин практически с количественным выходом [169]. Для специфического получения 2′(3′)-*O*-моноацилнуклеозидов лучше всего использовать кис-



(119)



(40)

лотный гидролиз соответствующих 2′,3′-циклических ортоэфиров {схема (40)} [170]. Тетраацетоксисилан $Si(OAc)_4$ реагирует с 5′-*O*-ацетилуридином с образованием в качестве основного продукта 3′,5′-ди-*O*-ацетилуридина [171].

### 22.2.4.4. Алкилирование

Поскольку с алкилирующими реагентами связано проявление мутагенности и канцерогенности, существует огромное количество данных по алкилированию нуклеозидов. Однако ограниченность объема позволяет сделать лишь краткий обзор методов, пригодных для получения алкилированных производных, имеющих синтетическое значение; для знакомства с другими аспектами этой темы следует воспользоваться соответствующими обзорными работами [133, 172].

В молекуле нуклеозида потенциально существует так много мест, которые могут быть алкилированы, что, если не принимать предосторожностей, получается очень сложная смесь продуктов. Это означает, что выделение любого отдельного соединения с разумным выходом, несмотря на использование колонок с Дауэксом ($^-OH$) [29], является скорее вопросом удачи, чем планирования. Даже причины найденных различий в степени алкилирования различных положений в нуклеозиде не полностью понятны. Если рассмотреть атомы азота кольца, способные к алкилированию в пуриновых и пиримидиновых нуклеозидах, то не существует прямой корреляции между основностью этих положений, по данным измерения $pK_a$, и относительной легкостью их алкилирования. Сделано заключение [173], что протонирование является равновесным процессом, тогда как алкилирование необратимо и, таким образом, подчиняется кинетическому контролю и влиянию стерических факторов.

Так, алкилирование нуклеозидов диазометаном, алкилгалогенидами или диметилсульфатом приводит к сложной смеси продуктов *O′*-, *O*-, циклического *N*- и экзоциклического *N*-алкилирования, хотя наиболее реакционноспособным местом по отношению к действию эфиров сильных кислот в гуанозине является атом *N*-7, в аденозине — *N*-1 и в цитидине — *N*-3, тогда как уридин реагирует очень медленно. Тем не менее при реакции с диалкилсульфатами в сильно щелочных условиях образуются только продукты *O′*-алкилирования [174] и, хотя в результате реакции может также образоваться сложная смесь соединений, это один из наиболее легких путей получения таких *O′*-алкилированных нуклеозидов. Эта реакция использована для аденин- и цитозин- (и, следовательно, уридин-, после дезаминирования) -содержащих нуклеозидов, а также для реакции алкилгалогенидов с 2′,3′-*O*-изопропилиденуридином [175], что приводит почти исключительно к *O′*-алкилированным продуктам. Реакция объяснена в терминах жестких и мягких реакционных центров, и установлена корреляция реакции по жесткому центру с механизмом типа $S_N1$ и реакции по мягкому центру — с механизмом $S_N2$. Реакции с алкилирующими агентами в сильных водных щелочах являются реакциями $S_N1$-типа, которые, таким образом, благоприятствуют протеканию реакции по жесткому *O′*-положению.



Использование диазометана в присутствии каталитических количеств $SnCl_2$ позволяет из рибонуклеозидов получать исключительно 2′-*O*- и 3′-*O*-алкилированные нуклеозиды, однако этот метод, хотя и очень удобный, ограничивается моноалкилированием *цис*-гидроксильных групп нуклеозидов [176]. Избирательное *O′*-алкилирование рибонуклеозидов можно осуществить также действием алкилгалогенидов на промежуточные производные олова, описанные ранее [168]. 2′-*O*-(о-Нитробензил)уридин также получен через производное олова; эта группа удаляется фотохимически и использована в синтезе олигорибонуклеотидов [177].

Другими эфирами, имеющими синтетическое применение, являются бензиловые эфиры, которые можно удалить гидрированием, и тритиловые эфиры (а также их *п*-метоксипроизводные), которые избирательно реагируют с 5′-гидроксильной группой и чувствительны к мягкому кислотному гидролизу.

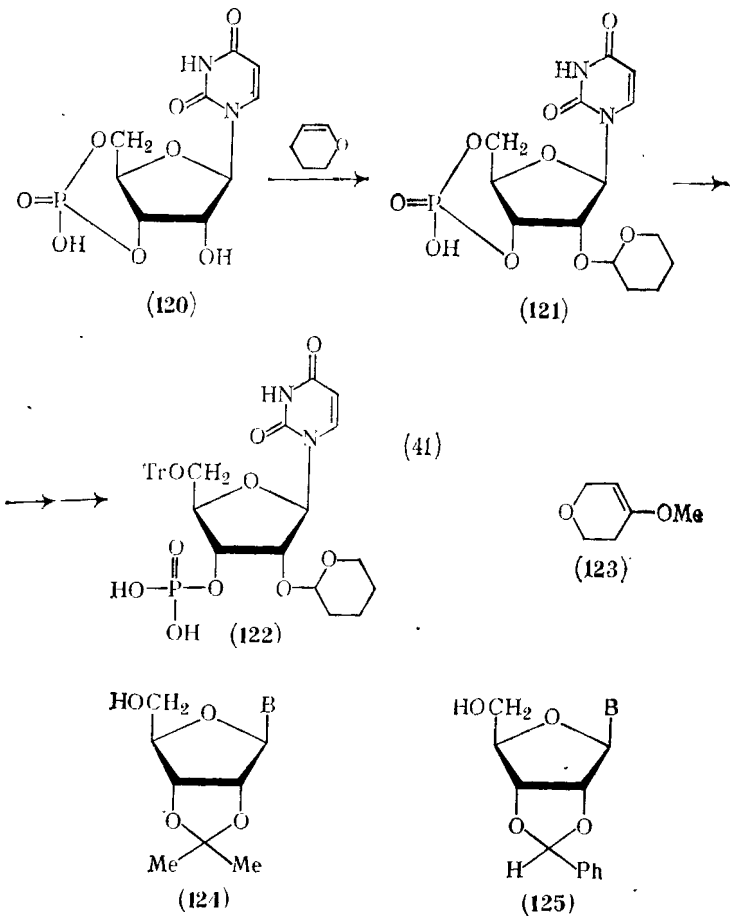
Использованы также силильные эфиры, приводящие к *O′*-алкилсилиловым эфирам нуклеозидов [178]. Наиболее полезными реагентами для рибонуклеозидов являются *трет*-бутилдиметилсилилхлорид и три-изопропилсилилхлорид; с их помощью из уридина были получены 2′- и 2′,5′-защищенные нуклеозиды. Удаление силильных групп осуществляется действием тетра-*н*-бутиламмонийфторида *н*-$Bu_4NF$ в тетрагидрофуране, который обычно не действует ни на кислото-, ни на щелочелабильные защитные группировки.

### 22.2.4.5. Образование ацеталей

Эти производные часто используются в качестве защитных групп в олигорибонуклеотидном синтезе. Подобно обычным спиртам, нуклеозиды реагируют с виниловыми простыми эфирами в условиях кислотного катализа. Первой описанной реакцией такого типа была реакция дигидропирана с уридин-3′,5′-циклофосфатом (**120**), приводящая к 2′-*O*-тетрагидропиранилуридин-3′,5′-циклофосфату (**121**) [179]. Последний далее превращали в 2′-*O*-тетрагидропиранил-5′-*O*-тритилуридин-3′-фосфат (**122**), который использовали в первом олигорибонуклеотидном синтезе. Тетрагидропиранильная защита удаляется действием разбавленной кислоты. Недостаток метода в том, что образуется смесь диастереомеров. Последнее обстоятельство часто означает, что кристаллизация продукта затруднена. Это затруднение преодолено использованием 4-метокси-5,6-дигидропирана (**123**) [180]. Образующаяся в результате действия этого реагента защитная группа симметрична, не образует диастереомеров и очень легко удаляется в кислых условиях.

Однако исходное вещество не легко доступно. Описаны также реакции с некоторыми другими виниловыми эфирами [9].

Наиболее широко распространенной реакцией является, вероятно, получение 2′,3′-*O*-изопропилиденовых производных рибонуклеозидов (**124**) реакцией свободного нуклеозида с ацетоном в кислых условиях. Получено много различных циклических ацеталей такого типа, с широким интервалом устойчивости к кислотному гидролизу [9].




Реакция бензальдегида в присутствии трифторуксусной кислоты с рибонуклеозидом приводит к образованию диастереомерной смеси 2′,3′-*O*-бензилиденнуклеозидов (**125**). Они быстро гидролизуются в мягких кислотных условиях, и кроме того, введение заместителей в ароматическое кольцо может менять скорость гидролиза в тысячу раз [9].



### 22.2.4.6. Синтез и свойства некоторых пиримидиновых (в частности, 5-замещенных) нуклеозидов

Множество 5-замещенных пиримидиновых нуклеозидов проявляют отчетливую антивирусную активность в культурах клеток млекопитающих и на экспериментальных животных. В этом разделе будут рассмотрены синтезы и свойства таких соединений и в ходе этого рассмотрения будут обсуждены многие вопросы химии пиримидиновых нуклеозидов. Будет оценено потенциальное применение аналогов нуклеозидов в медицине.

В качестве исходных соединений, используемых для введения заместителей в положение 5 гетероциклического кольца, использованы 5-ртуть- [181] и 5-палладийуридины [182]. Так, 5-меркурированные уридины можно превратить в 5-тритий(меченные)уридины восстановлением боротритидом натрия. Действие *N*-бромсукцинимида приводит к образованию 5-бромпроизводных, действие иода дает 5-иоднуклеозиды. Палладийорганические интермедиаты генерированы *in situ* из меркурированных нуклеозидов и использованы для введения углеродных цепей в положение 5. Таким способом можно синтезировать 2′-дезокси-5-этилуридин и 5-аллилуридин с выходами 68 и 78% соответственно. Реакция уридина, но не 5-бромуридина, с перфторалкилмедным комплексом дает 5-(перфторалкил)уридин, однако механизм этой реакции неясен [183].

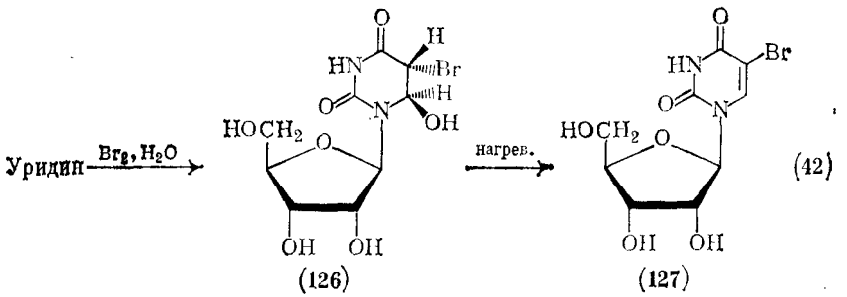
Несомненно, положение С-5 пиримидиновых нуклеозидов является наиболее ароматическим положением в молекуле и для него могут наблюдаться реакции электрофильного ароматического замещения, приводящие к С-5 производным. Однако, как будет видно далее, из-за легкости, с которой в пиримидиновых нуклеозидах происходит присоединение и последующее отщепление от 5,6-двойной связи, часто бывает трудно установить отличие между этими механизмами и, в любом случае, точный механизм протекания многих реакций детально не исследован.

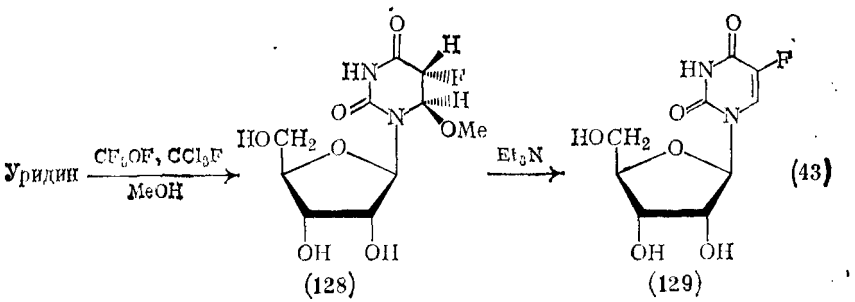
Так, 5-нитроуридин можно получить из подходящим образом защищенного уридина в условиях классического нитрования ароматических соединений [184] и это, вероятно, является примером реакции этого типа. Гидроксиметилирование уридина формальдегидом дает с выходом 20% 5-гидроксиметилуридин [9], но лучше использовать катализируемое основаниями оксиметилирование 2′,3′-*O*-изопропилиденуридина [185]. Кроме высказывания о том, что реакция обратима, кажется, никто не готов сделать заключение о механизме этой реакции [9].

Механизм реакции галогенирования еще более запутан. В неводных условиях хлорирование и бромирование идут очень легко, приводя к 5-галогенпиримидиновым нуклеозидам, однако для иодирования требуется нагревание с азотной кислотой в течение нескольких часов. По этой причине и из-за относительной лабильности гликозидной связи цитозинсодержащих нуклеозидов их иоди-

рование осуществляют иодом в хлороформе в присутствии $HIO_3$. Но оказалось, что при этом также протекает реакция, приводящая к 5,6-дигидропродуктам [9]. Действие *N*-галогенимидов и ICl также приводит к 5-иодпроизводным. Полагают, что все эти реакции в безводных условиях протекают по механизму электрофильного ароматического замещения, но в присутствии воды происходит перекрестное присоединение по 5,6-двойной связи и можно выделить 5-галоген-5,6-дигидро-6-гидроксипиримидиновые нуклеозиды. Так, бромирование уридина бромной водой дает 5-бром-5,6-дигидро-6-гидроксиуридин (**126**), но при нагревании элементы воды могут элиминироваться и можно выделить 5-бромпроизводное (**127**) {схема (42)}.

Прямой синтез 5-фторпиримидиновых нуклеозидов, очевидно, имеет огромную коммерческую значимость и, используя реагент трифторметилгипофторит, предложенный Бартоном [186], Робинс и сотр. [134] сумели получить 5-фторуридин, 2′-дезокси-5-фторуридин и соответствующие цитозинсодержащие нуклеозиды фторированием на нуклеозидном уровне. Реакцию проводят в трихлорметане-метаноле и известно, что она идет через 5,6-дигидро-6-метокси-5-фторпроизводное (**128**). Для получения 5-фторпиримидинового нуклеозида (**129**) необходимо добавление триэтиламина {схема (43)}.



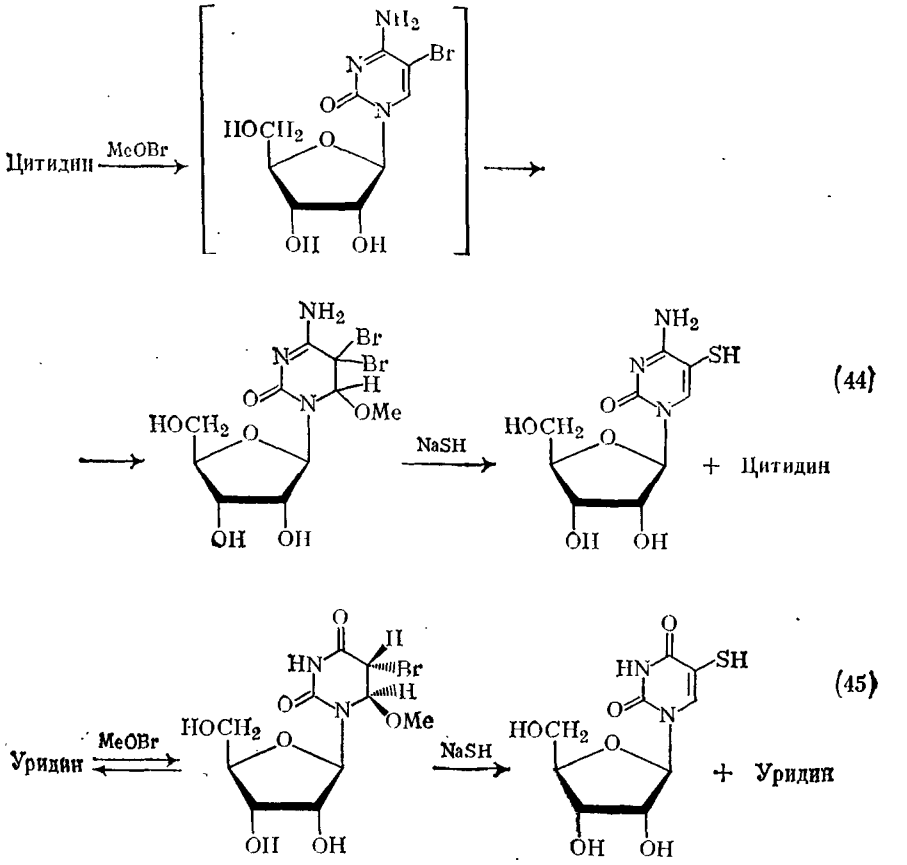




По аналогии с описанной реакцией с урацилом, кажется, что действие фтора, разбавленного азотом, в ледяной уксусной кислоте на уридин может приводить к образованию 5-фторуридина,



через промежуточное образование 5,6-дигидро-6-гидрокси-5-фторпроизводного [187].

Прямое тиоцианилирование уридина и 2′-дезоксиуридина осуществлено с помощью псевдогалогена хлортиоцианогена ClSCN [188]. 5-Меркаптопиримидиннуклеозиды легко получают восстановлением тиоцианопроизводных дитиотреитом. 5-Меркаптопиримидиновые нуклеозиды получали также непосредственно реакцией метилгипобромита с пиримидиновым нуклеозидом в метаноле. Образующийся продукт реагирует далее с гидросульфидом натрия в диметилацетамиде. Реакция также идет через 5,6-дигидропроизводное, хотя истинный путь реакции с урацил- и цитозинсодержащими нуклеозидами различен {схемы (44), (45)}.




Известны две хорошо изученные реакции пиримидиновых нуклеозидов, каждая из которых включает промежуточное образование 5,6-дигидропроизводного. Эта реакция производных цитозина с гидроксиламином и реакция производных уридина и цитидина с бисульфитом. Обе реакции были авторитетно рассмотрены в

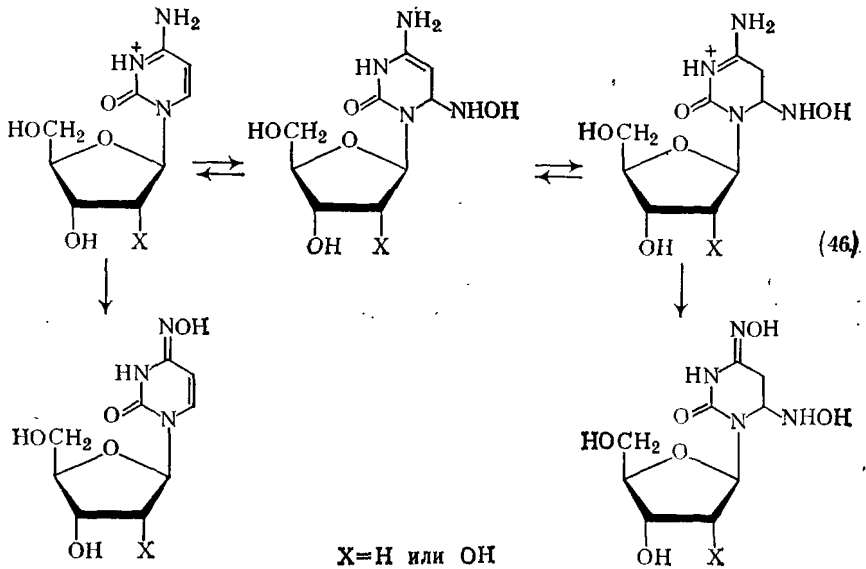
литературе [88, 133], а действие бисульфита уже детально обсуждалось в этой главе (см. раздел 22.2.3.4). Реакция гидроксиламина с цитозиновыми производными показана на схеме (46).

Реакция с бисульфитом использована также для проведения изотопного обмена при С-5 в уридине и цитидине, а также для дегалогенирования 5-бромуридина. Цистеин также может вызывать изотопный обмен при С-5 [189] и дегалогенирование 5-бромуридина при pH 8,9 [190]; полагают, что эти реакции также идут через промежуточное образование 5,6-дигидропроизводных.

5-Замещенные пиримидиновые нуклеозиды получены также химической модификацией других нуклеозидов. Например, триметилсилиловый эфир 2′-дезокси-5-иодуридина превращен в 2′-дезокси-5-цианоуридин действием цианида меди в сухом пиридине [191].

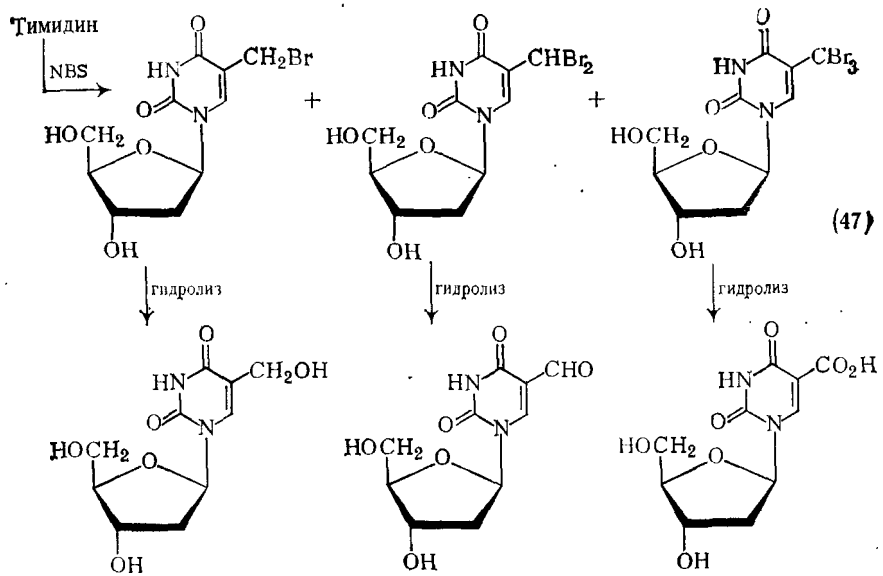
5-Бромурацилсодержащие нуклеозиды превращали в 5-аминонуклеозиды обработкой аммиаком [192] и окисляли в 5-гидроксинуклеозиды оксидом свинца [193]. 5-Нитроуридин можно восстановить до 5-аминоуридина [46]. Тимидин был использован как исходное вещество для получения 5-формил-, 5-гидроксиметил- и 2′-дезокси-5-карбоксиуридина {схема (47)} [194].

Аналогично, обработка 2′-дезокси-5-этилуридина *N*-бромсукцинимидом приводит к 5-(1-бромэтил)-2′-дезоксиуридину, из которого под действием основания можно отщепить HBr, что приводит к 5-винил-2′-дезоксиуридину. 5-Формилуридин можно получить окислением 5-гидроксиметилуридина [195]; 5-ацетилуридин можно восстановить в 5-(1-гидроксиэтил)уридин, а 2′-дезокси-5-(2,2-дибромвинил)уридин, реагируя с фениллитием, дает 2′-дезокси-5-этинилуридин [196].




(46)






(47)

Многие 5-замещенные пиримидиновые нуклеозиды получены прямой конденсацией углевода с заранее синтезированными основаниями. В их число входят 5-циклопропилуридин [197], несколько 5-алкилированных (например, изопропил-, *трет*-бутил- и *н*-гексил-) и 5-галогенированных 2′-дезоксиуридинов [198], 5-гидроксиметил-2′-дезоксиуридин [199], 5-бензилоксиметил-2′-дезоксиуридин [200], 5-азауридин, 5-ацетил-2′-дезоксиуридин, 5-винил-2′-дезоксиуридин [201], 2′-дезокси-5-этинилуридин [196], 2′-дезокси-5-дибромвинилуридин [196] и 2′-дезокси-5-трифторметилуридин [202].

Многие из этих 5-замещенных нуклеозидов, особенно 5-замещенные 2′-дезоксиуридины, являются аналогами тимидина, и было опубликовано много работ по исследованию антивирусных свойств этих соединений [19, 203—208]. Однако, в 1974 г. [203] 2′-дезокси-5-иодуридин был всего лишь одним из трех соединений, официально одобренных для ограниченного клинического применения в антивирусной химиотерапии и используется в лечении герпеса простого зернистого кератита. Существует несколько возможных путей ингибирования развития вирусов в клетках. Они заключаются в ингибировании адсорбции вируса, ингибировании проникновения вируса и его развертывания и, наконец, в ингибировании внутриклеточных явлений. Именно этим последним свойством мы и интересуемся больше всего при обсуждении действия аналогов тимидина. Однако даже здесь способ действия многих существующих аналогов неизвестен, и многие явно схожие соединения обладают очень различным действием. Проблема может быть наилучшим образом проиллюстрирована на примере 5-галоген-2′-дезокси-

нуклеозидов. 2′-Дезокси-5-фторуридин не включается в ДНК и действует, после его превращения в 5′-монофосфат, как мощный ингибитор тимидилатсинтетазы. Этот нуклеозид в настоящее время, конечно, не применяется в качестве антивирусного агента, но является противоопухолевым средством. Есть несколько сообщений [209, 210], авторы которых полагают, что он не обладает антивирусными свойствами, но недавно [208] показано, что этот препарат столь же эффективен (и при этом менее токсичен), как и 2′-дезокси-5-иодуридин, в качестве средства защиты первичных клеток почки кролика от цитопатического действия вируса коровьей оспы и простого герпеса. 2′-Дезокси-5-иодуридин и 5-бром-2′-дезоксиуридин легко включаются в ДНК и, как показано, ингибируют ряд ферментов, участвующих в синтезе ДНК хозяина и вируса. Однако полагают, что эти соединения оказывают свое первичное действие после включения в ДНК, нарушая нормальное считывание информации с этой ДНК. После фосфорилирования 2′-дезокси-5-трифторметилуридин является также мощным ингибитором тимидилатсинтетазы; он включается и в вирусную, и в ДНК хозяина [19] и, как полагают, нарушает транскрипцию поздней вирусной мРНК.

2-Дезокси-5-иодуридин и 5-бром-2′-дезоксиуридин являются также мутагенами. Полагают, что более низкое значение $pK_a$ 2′-дезокси-5-иодуридина допускает бóльшую возможность ошибок в спаривании оснований после его включения в ДНК из-за того, что он в значительно большей степени существует в анионной форме [204]. Известно также, что гликозидная связь 5-галогеннуклеозидов более лабильна, и присутствие таких нуклеозидов в ДНК, как известно, повышает лабильность ДНК к действию радиации. Известно, что помимо увеличения скорости мутаций у бактерий, 2′-дезокси-5-иодуридин вызывает образование вирусных частиц в культуре клеток, создает хромосомные повреждения и нарушает эмбриональное развитие и дифференциацию. Таким образом, очевидно, имеется поле деятельности для создания улучшенного противовирусного агента, и в то время как индекс $ID_{50}$, который характеризует концентрацию лекарственного препарата, необходимую для ингибирования вирусиндуцируемой цитопатогенности, является полезным индексом, вероятно, важнее терапевтический индекс, который представляет собой отношение величины $ID_{50}$ синтеза ДНК хозяина к $ID_{50}$ ДНК вируса (т. е. мера полезности лекарства внутри предела его токсичности).

2′-Дезокси-5-этилуридин имеет высокий терапевтический индекс из-за низкой токсичности и, поскольку он не является мутагеном, может оказаться полезным дополнением к списку антивирусных агентов. Однако известно, что этот нуклеозид включается в ДНК хозяина и вируса, но 2′-дезокси-5-цианоуридин, который также имеет очень высокий терапевтический индекс, поскольку он совершенно нетоксичен, как показано, не включается в бактериальную или вирусную ДНК [191]. Вероятно, из-за того, что он не включается в ДНК, 2′-дезокси-5-фторуридин также имеет очень высокий терапевтический индекс.

Недавно [204] составлен список из 10 желательных специфичных свойств антивирусного агента. В этом списке значатся: легкость приготовления, хорошая растворимость при физиологических значениях pH, химическая и метаболическая стабильность, достаточная неполярность для преодоления проблем транспорта в клетку, отсутствие включения в ДНК неинфицированных клеток, отсутствие иммуносупрессии, отсутствие активации вирусов, отсутствие тератогенного, мутагенного или канцерогенного эффектов. 2′-Дезокси-5-иодуридин, очевидно, не обладает некоторыми из этих свойств, а 5-фтор-, 5-этил-, и 5-циано-2′-дезоксиуридины, очевидно, способны быть антивирусными агентами. Обнадеживающие результаты были также сообщены для ряда других 5-алкил-2′-дезоксиуридинов, включая 5-аллил-, 5-пропил- и 5-винил-2′-дезоксиуридины [206]. Полагают, что эти вещества оказывают эффект за счет ингибирования вирусспецифических тимидинкиназ.

Лишь вопрос времени, когда некоторые полезные антивирусные агенты, являющиеся производными нуклеозидов, станут доступны. С ростом объема знаний о способе действия этих, уже обнаруженных, веществ, возрастает возможность научного предсказания новых направлений полезных исследований. Так, объединение известных свойств 2′-дезокси-5-иодуридина и 5′-амино-5′-дезокситимидина в таком соединении как 5′-амино-2′,5′-дидезокси-5-иодуридин очевидно привело к получению соединения, которое имеет мощные вирусингибирующие свойства 2′-дезокси-5-иодуридина и в то же время, вероятно, не способно включаться в ДНК и, таким образом, является гораздо менее токсичным [204]. Будет ли когда-либо получен идеальный антивирусный агент, это вопрос из области предположений, но вероятно, что в будущем многие из кандидатов на это завидное положение будут нуклеозидами.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *R. A. Sharma, M. Bobek, and A. Bloch*, J. Medicin. Chem., 1975, 18, 473.
2. «The Nucleic Acids», ed. E. Chargraff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, 1955, vol. 1.
3. *A. M. Michelson*, «The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides», Academic Press, New York, 1963.
4. *D. O. Jordan*, «The Chemistry of the Nucleic Acids», Butterworths. Washington, 1960.
5. *J. H. Parish*, «Principles and Practice of Experiments with Nucleic Acids», Longman, London, 1972.
6. *W. Guschlbauer*, «Nucleic Acid Structure», Springer Verlag, Berlin, 1976.
7. *J. N. Davidson*, «The Biochemistry of the Nucleic Acids", Chapman and Hall, London, 8th edn., 1976.
8. *R. H. Hall*, «The Moodified Nucleosides in Nucleic Acids», Columbia, New York, 1971.
9. *N. K. Kochetkov and E. I. Budovskii*, «Organic Chemistry of Nucleic Acids». Parts A and B, Plenum, London, 1971. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И.,*

*Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф.* Органическая химия нуклеиновых кислот. М., Химия, 1970.
10. «Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry», ed. P. O. P. Ts'O, Academic Press, New York, 1974, vols I and II.
11. *P. Langen*, «Antimetabolites of Nucleic Acid Metabolism», Gordon and Breach, New York, 1975.
12. «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», ed W. W. Zorbach and R. S. Tipson, Wiley, New York, 1973, vols. 1 and 2.
13. «Physico-chemical Properties of Nucleic Acids», ed. J. Duchesne, Academic Press, London, 1973, vols. 1 and 2.
14. *V. A. Bloomfield, D. M. Grothers, and I. Tinoco*, Jr., «Physical Chemistry of Nucleic Acids», Harper and Row, New York, 1974.
15. «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», ed. W. E. Cohn, Academic Press, New York.
16. «Progress in Biophysics and Molecular Biology», ed. J. A. V. Butler and D. Noble, Pergamon, Oxford.
17. «Nucleic Acids Research», Information Retrieval Ltd., London, vol. 1, 1974.
18. «Nucleic Acids Abstracts», ed. A. Williamson, Information Retrieval Ltd., London, vol. 1, 1971.
19. «Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleoside Analogues», ed. A. Bloch, Ann. New York Acad. Sci., 1975, 255.
20. *B. G. Barrell and B. F. C. Clark*, «Handbook of Nucleic Acid Sequences», Joynson-Bruvvers Ltd., Oxford, 1974.
21. *H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, J. A. McCloskey, H. J. Gross, and S. Nishimura*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 5044; N. Okada, N. Shindo-Okada, and S. Nishimura, Nucleic Acids Res., 1977, **4**, 415.
22. *C. B. Reese and N. Whittall*, Nucleic Acids Res., 1976, **3**, 3439.
23. *M. J. Robins, M. MacCoss, and A. S. K. Lee*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 70, 356.
24. «Methods in Enzymology», ed. L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, New York, 1967, vol. 12, pt. A; «Microbial Production of Nucleic Acid Related Substances», ed. K. Ogata, S. Kimoshita, T. Tsuneda, and K. Aida, Wiley, Chichester, 1976.
25. *S. Nishimura*, in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», ed. J. N. Davidson and W. E. Cohn, Academic Press, New York, 1972, vol. 12, p. 49.
26. *K. Fink, R. E. Cline, and R. M. Fink*, Anal. Chem., 1963, **35**, 389; *K. Fink and W. S. Adam*, J. Chromatog., 1966, **22**, 118; *H. Rogg, R. Brambilla, G. Keith, and M. Staehelin*, Nucleic Acids Res., 1976, **3**, 285.
27. *S. Zadražil*, См. cc. 12, vol. 2, chapter 9.
28. *B. J. Hunt and W. Rigby*, Chem. and Ind. (London), 1967, 1868.
29. *C. A. Dekker*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 4027.
30. *J. D. Smith*, См. cc. 2, Chapter 8.
31. *A. E. Pierce*, См. cc. 12, vol. 2, chapter 3.
32. *S. E. Hattox and J. A. McCloskey*, Anal. Chem., 1974, **46**, 1378.
33. *T. D. Kulikowski and D. Shugar*, Acta Biochim. Polon., 1974, **21**, 169.
34. *D. L. Cole, N. J. Leonard, and J. C. Cook*, in «Proceedings of International Conference on Recent Developments in Oligonucleotide Synthesis and Chemistry of the Minor Bases of tRNA», Poznań, Poland, 1974, pp. 153—174.
35. *B. Pullman and A. Pullman*, in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», ed. J. N. Davidson and W. E. Cohn, Academic Press, New York, 1969, vol. 9, p. **327**.
36. *A. M. Jeffrey, K. W. Jennette, S. H. Blobstein, I. B. Weinstein, F. A. Beland, R. G. Harvey, H. Kasai, I. Miura, and K. Nakanishi*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 5714.
37. *A. M. Jeffrey, S. H. Blobstein, I. B. Weinstein, F. A. Beland, R. G. Harvey, H. Kasai, and K. Nakanishi*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 2311.
38. *H. Kasai, Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, N. J. Oppenheimer, P. F. Crain, J. G. Liehr, D. L. von Minden, and J. A. McCloskey*, Biochemistry, 1975, **14**, 4198.
39. *J. G. Liehr, D. L. von Minden, S. E. Hattox, and J. A. McCloskey*, Biomedical Mass Spectrometry, 1974, **1**, 281.
40. *R. D. Macfarlane and D. F. Torgerson*, Science, 1976, **191**, 920.
41. *S. Arnott*, in «Progress in Biophysics and Molecular Biology», ed. J. A. V. Butler, Pergamon, New York, 1970, vol. 21, p. 265.
42. «Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions», ed. M. Sundaralingam, and S. T. Rao, University Park Press, Baltimore, 1975.
43. *W. Guschlbauer and T. D. Son*, Nucleic Acids Res., Special Publication No. **1**, 1975, S85.
44. *A. Andre and W. Guschlbauer*, Nucleic Acids Res., 1974, **1**, 803.
45. *A. R. Todd*, in «Methods in Enzymology», ed. S. P. Colowik and N. O. Kaplan, Pergamon, Oxford, 1957, vol. 3, p. 811.
46. *L. Goodman*, См. cc. 10, vol. **1**, chapter **2**.
47. *K. A. Watanabe, D. H. Hollenberg, and J. J. Fox*, J. Carbohydrates, Nucleosides Nucleotides, 1974, **1**, 1.
48. *H. Vorbüggen*, См. cc. 34, p. 428; U. Niedballa and H. Vorbüggen, J. Org. Chem., 1976, **41**, 2084.
49. *J. Davoll and B. A. Lowy*, J. Amer. Chem. Soc., 1951, **73**, 1650.
50. *J. J. Fox, N. Yung, J. Davoll, and G. B. Brown*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 2117.
51. *N. Yamaoka, K. Aso, and K. Matsuda*, J. Org. Chem., 1965, **30**, 149; *K. A. Watanabe and J. J. Fox*, J. Heterocyclic Chem., 1969, **6**, 109.
52. *B. Shimizu and M. Miyaki*, Chem. and Ind. (London), 1966, 664; *B. Shimizu and M. Miyaki*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1970, **18**, 1446.
53. *G. A. Howard, B. Lythgoe, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1947, 1052.
54. *T. L. V. Ulbricht*, J. Chem. Soc., 1961, 3345.
55. *M. Prystaš and F. Sorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1966, **31**, 3990 и цитированные там работы.
56. *M. Roberts and D. W. Visser*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 668; *F. Farkaš, L. Kaplan, and J. J. Fox*, J. Org. Chem., 1964, **29**, 1469.
57. *E. Wittenburg*, Z. Chem., 1964, **4**, 303; *E Wittenburg*, Chem. Ber., 1968, **101**, 1095.
58. *L. Otvös, A. Szabolcs, J. Sági, and A. Szemzó*, Nucleic Acids Res., Special Publication No 1, 1975, S49.
59. *T. J. Bardos, M. P. Kotick, and C. Szantay*, Tetrahedron Letters, 1966, 1759.
60. *T. Nishimura and B. Shimizu*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1965, **13**, 803.
61. *U. Niedballa and H. Vorbrüggen*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 3672 и цитированные там работы.
62. *M. J. Covill, H. G. Garg, and T. L. V. Ulbricht*, Tetrahedron Letters, 1968, 1033.
63. *B. Shimizu and M. Miyaki*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1967, **15**, 1066.
64. *T. Simadate, Y. Ishido, and T. Sato*, Chem. Abs., 1962, **56**, 11 692.
65. *W. Pfleiderer and R. K. Robins*, Chem. Ber., 1965, **98**, 1511.
66. *A. Hosono, K. Fujii, T. Tada, H. Tanaka, Y. Ohgo, Y. Ishido, and T. Sato*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1973, **46**, 2818.
67. *B. Shimizu and M. Miyaki*, Tetrahedron Letters, 1968, 855.
68. *T. Azume, K. Isono, P. F. Crain, and J. A. McCloskey*, Tetrahedron Letters, 1976, 1687.
69. *F. W. Lichtenthaler and K. Kitahara*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 815.
70. *G. Schramm, H. Groetsch, and W. Pollman*, Angew. Chem., 1961, **73**, 619.
71. *J. A. Carbon*, Chem. and Ind. (London), 1963, 529.
72. *R. A. Sanchez, and L. E. Orgel*, J. Mol. Biol., 1970, **47**, 531.
73. *C. M. Hall, G. Slomp, S. A. Mizsak, and A. J. Taylor*, J. Org. Chem., 1972, 37, 3290.
74. *A. Holý*, Tetrahedron Letters, 1971, 189.

75. *J. Baddiley, J. G. Buchanan, R. Hodges, and J. F. Prescott*, J. Chem. Soc., 1957, 4769
76. *N. J. Cusack, B. J. Hildick, D. H. Robinson, P. W. Rugg, and G. Shaw*, J. C. S Perkin I, 1973, 1720.
77. *G. Shaw, R. N. Warrener, M. H. Maguire, and R. K. Ralph*, J. Chem Soc., 1958, 2294.
78. *J. Šmejkal, J. Farkaš, and F. Šorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1966, **31**, 291.
79. *M. Sprinzl, J. Farkaš, and F. Šorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1967, **32**, 4280.
80. *A. Piskala and F. Šorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1964, **29**, 2060.
81. *G. W Kenner, C. W. Taylor, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1949, 1620.
82. *M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, K. Yagi, and Y. Tonomura*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 2679.
83. *L. B. Townsend*, Chem. Rev., 1967, **67**, 533.
84. *J. Baddiley, J. G. Buchanan, and G. O. Osborne*, J. Chem. Soc., 1958, 3606.
85. *R. J. Rousseau, R. K. Robins, and L. B. Townsend*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 2661.
86. *A. Yamazaki, M. Okutsu, and Y. Yamada*, Nucleic Acids Res., 1976, **3**, 251; а также две предшествующие статьи и цитированные там работы.
87. *J. R. Tittensor and R. T. Walker*, European Polymer J., 1968, **4**, 39.
88. *H. Hayatsu*, in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», 1976, vol. 16, p. 75.
89. *J. Brokěs and J. Beránek*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1974, **39**, 3100.
90. *Арутюнян Н. А., Гунар В. И., Завьялов С. И.* Изв. АН СССР, Сер. хим., 1970, 904.
91. *H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz, and U. Niedballa*, Annalen, 1975, 988; *H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz, and U. Niedballa*, Ann. New York Acad. Sci., 1975, 255, 82.
92. *A. Holý and D. Cech*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1974, **39**, 3157.
93. *M. M. Ponpipom, and S. Hanessian*, Canad. J. Chem., 1972, **50**, 2530 и цитированные там работы.
94. *D. H. R. Barton and R. Subramanian*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 867.
95. *V. M. Clark, A. R. Todd, and J. Zussman*, J. Chem. Soc., 1951, 2952; *W. Andersen, D. H. Hayes, A. M. Michelson, and A. R. Todd*, ibid., 1954, 1882.
96. *M. Ikehara and T Tezuka*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 4054.
97. *J. H. Burchenal, V. E. Currie, M. D. Dowling, J. J. Fox, and I. H. Krakoff*, Ann. New York Acad. Sci., 1975, **255**, 202.
98. *G. Lünzmann and G. Schramm*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, **169**, 263.
99. *A. P. Martinez, W. W. Lee, and L. Goodman*, J. Org. Chem., 1966, **31**, 3263.
100. *M. Ikehara and M. Muraoka*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1976, **24**, 672.
101. *M. Ikehara, Y. Nakahara, and S. Yamada*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1970, **18**, 2441.
102. *P. J. Harper and A. Hampton*, J. Org. Chem., 1972, 37, 795.
103. *J. J. Fox*, Pure Appl. Chem., 1969, **18**, 223.
104. *S. Hanessian and A. G. Pernet*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1976, **33**, 111.
105. *R. J. Suhadolnik*, «Nucleoside Antibiotics», Wiley Interscience, New York, 1970; *K. Gerzon, D. C. de Long, and J. C. Cline*, Pure Appl. Chem., 1971, **28**, 489.
106. *D. M. Brown, M. G. Burdon, and R. P. Slatcher*, J. Chem. Soc. C, 1968, 1051.
107. *E. M. Acton, K. J. Ryan, D. W. Henry, and L. Goodman*, Chem. Comm., 1971, 986.
108. *J. M. J. Tronchet and A. Jotterand*, Helv. Chim. Acta, 1971, **54**, 1131.
109. *D. B. Repke, H. P. Albrecht, and J. G. Moffatt*, J. Org. Chem., 1975, **40**, 2481.
110. *L. Kalvoda, J. Farkaš, and F. Sorm*, Tetrahedron Letters, 1970, 2297.
111. *S. Hanessian and A. G. Pernet*, Canad. J. Chem., 1974, **52**, 1280.
112. *H. Ohrui and J. J. Fox*, Tetrahedron Letters, 1973, 1951; *R. S. Klein, H. Ohrui, and J. J. Fox*, J. Carbohydrates, Nucleosides Nucleotides, 1974, **1**, 265.
113. *H. Ohrui, G. H. Jones, J. G. Moffatt, M. L. Maddox, A. T. Christensen, and S. K. Byram*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 4602.





114. *J. G. Buchanan, A. R. Edgar, M. J. Power, and G. C. Williams*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 501.
115. *F. G. De Las Heras, S. Y.-K. Tam, R. S. Klein, and J. J. Fox*, J. Org. Chem., 1976, **41**, 84.
116. *K. Arakawa, T. Miyasaka, and N. Hamamichi*, Nucleic Acids Res., Special Publication No. 2, 1976, S1.
117. *S. R. Jenkins, B. A. Arison, and E. Walton*, J. Org. Chem., 1968, 33, 2490 и цитированные там работы.
118. *H. P. Albrecht and J. G. Moffatt*, Tetrahedron Letters, 1970, 1063.
119. *H. Grisebach and R. Schmid*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1972, **11**, 159.
120. *A. Rosental, M. Sprinzl, and D. A. Baker*, Tetrahedron Letters, 1970, 4233.
121. *J. Zemlicka, J. V. Freisler, R. Gasser, and J. P. Horwitz*, J. Org. Chem., 1973, **38**, 990.
122. *M. J. Robins and R. A. Jones*, J. Org. Chem., 1970, **39**, 113.
123. *M. J. Robins and E. P. Trip*, Tetrahedron Letters, 1974, 3369.
124. *T. C. Jain, I. D. Jenkins, A. F. Russell, J. P. H. Verheyden, and J. G. Moffatt*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 30.
125. *J. P. Verheyden and J. G. Moffatt*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 3573.
126. *C. A. Dekker and L. Goodman*, in «The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry», ed. W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 1970, vol. IIA, chapter 29.
127. *I. L. F. Doerr, J. F. Codington, and J. J. Fox*, J. Org. Chem., 1965, **30**, 467 и последующие работы.
128. *M. J. Robins, Y. Fouron, and R. Mengel*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 1564.
129. *D. Horton, K. Blieszner, and R. A. Markovs*, «Proceedings of International Conference on the Synthesis, Structure and Chemistry of tRNA and their Components», Poznań, Poland, 1976, p. 68.
130. *A. Holý*, См. сс. 129, p. 134.
131. *J. Simúth and A. Holý*, Nucleic Acids Res., Special Publication No. 1, 1975, S165.
132. *R. T. Walker*, Ann. Reports Chem. Soc., 1972, **69B**, 531.
133. *D. M. Brown*, in «Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry», ed. P. O. P. Ts'O, Academic Press, New York, 1974, vol. II, chapter 1.
134. *M. J. Robins*, Ann. New York Acad. Sci., 1975, **255**, 104.
135. *G. Moss, C. B. Reese, K. Schofield, R. Shapiro, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1963, 1149.
136. *A. S. Jones, A. R. Williamson, and M. Winkley*, Carbohydrate Res., 1965, **1**, 187.
137. *R. P. Schmidt, U. Schloz, and D. Schwille*, Chem. Ber., 1968, **101**, 590.
138. *K. E. Pfitzner and J. G. Moffatt*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 3027.
139. *D. C. Baker and D. Horton*, Carbohydrate Res., 1972, **21**, 393.
140. *E. J. Corey and J. W. Suggs*, Tetrahedron Letters, 1975, 2647.
141. *H. A. Friedman, K. A. Watanabe, and J. J. Fox*, J. Org. Chem., 1967, **32**, 3775.
142. *K. Randerath, E. Randerath, L. S. Y. Chia, R. C. Cupta, and M. Sivarajan*, Nucleic Acids Res., 1974, **1**, 112.
143. *E. Randerath, C. T. Yu, and K. Randerath*, Anal. Biochem., 1972, **48**, 172.
144. *A. S. Jones, A. F. Markham, and R. T. Walker*. J. C. S. Perkin I, 1976, 1567.
145. *F. Hansske, M. Sprinzl, and F. Cramer*, Bioorganic Chem., 1974, **3**, 367.
146. *G. B. Brown*, in «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology», ed. J. N. Davidson and W. E. Cohn, Academic Press, New York, 1968, vol. 8, p. 209.
147. *A. S. Jones and R. T. Walker*, J. Chem. Soc., 1963, 3554.
148. *R. S. Goody, A. S. Jones, and R. T. Walker*, Tetrahedron, 1971, **27**, 65.
149. *P. Howgate, A. S. Jones, and J. R. Tittensor*, J. Chem. Soc., C, 1968, 275.
150. *P. J. Highton, B. L. Murr, F. Shafa, and M. Beer*, Biochemistry, 1968, **7**, 826.
151. *R. C. Moschel and E. J. Behrman*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 1983, 2699.
152. *H. G. Khorana, K. L. Agarwal, H. Buchi, M. H. Caruthers, N. K. Gupta, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. RajBhandary, J. H. van de Sande, V. Sgaramella, T. Terao, H. Weber, and T. Yamada*, J. Mol. Biol., 1972, **72**, 209 и последующие работы.

153. *H. G. Khorana, K. L. Agarwal, P. Besmer, H. Buchi, M. H. Caruthers, P. J. Cashion, M. Fridkin, E. Jay, K. Kleppe, R. Kleppe, A. Kumar, P. C. Loewen, R. C. Miller, K. Minamoto, A. Panet, U. L. RajBhandary, B. Ramamoorhty, T. Sekiya, T. Takeya, and J. H. van de Sande,* J Biol. Chem., 1976, **251**, 565 и последующие работы.
154. *P. A. Lyon and C. B. Reese,* J. C. S. Perkin I, 1974, 2645.
155. *B. A. Otter and J. J. Fox,* in «Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry», ed. W. W. Zorbach and R. S. Tipson, Wiley, New York, 1973, vol. 1, p. 285.
156. *R. C. Bleaney, A. S. Jones, and R. T. Walker,* Tetrahedron, 1975, **31**, 2423.
157. *R. S. Goody and R. T. Walker,* J. Org. Chem., 1971, **36**, 727.
158 *N. Nakazaki, N. Sakairi, and Y. Ishido,* Nucleic Acids Res., Special Publication No. 2, 1975, S9.
159. *Y. Ishido, N. Nakazaki, and N. Sakairi,* J. C. S Chem. Comm., 1976, 832.
160. *C. B. Reese,* in «Protective Groups in Organic Chemistry», ed. J. F. W. McOmie, Plenum, London, 1973, p. 95.
161. *C. B. Reese and J. C. M. Stewart,* Tetrahedron Letters, 1968, 4273.
162. *A. F. Cook,* J. Org. Chem., 1968, 33, 3589.
163. *R. L. Letsinger and P. S. Miller,* J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 3356.
164. *A. Hassner, G Strand, M. Rubenstein, and A. Patchornik,* J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 7327.
165. *J. H. van Boom and P. M. J. Burgers,* Tetrahedron Letters, 1976, 4875.
166. *H. S. Sachdev and N. A. Starkovsky,* Tetrahedron Letters, 1969, 733.
167. *O. Mitsunobu, J. Kimura, and Y. Fujisawa,* Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, **45**, 245.
168. *D. Wagner, J. P. H. Verheyden, and J. G. Moffatt,* J. Org. Chem., 1974, **39**, 24.
169. *D. M. Brown, G. D. Fasman, D. I. Magrath, and A. R. Todd,* J. Chem. Soc., 1954, 1448.
170. *H. P. M. Fromageot, C B. Reese, and J. E. Sulston,* Tetrahedron, 1968, **24**, 3533.
171. *K. Kondo, T. Adachi, and I. Inoue,* Nucleic Acids Res. Special Publication No. 2, 1975, S5.
172. *P. Brookes,* Life Sci., 1974, **16**, 331.
173. *R. Shapiro,* Ann. New York Acad. Sci., 1969, **163**, 624.
174. *Z. Kazimierczuk, E. Darzynkiewicz, and D. Shugar,* Biochemistry, 1976, **15**, 2735 и цитированные там работы.
175. *A. S. Jones, R. K. Patient, and R. T. Walker,* J. Carbohydrates, Nucleosides Nucleotides, 1977, **4**, 301.
176. *M. J. Robins, S. R. Naik, and A. S. K. Lee,* J. Org. Chem., 1974, **39**, 1891.
177. *E. Ohtsuka, S. Tanaka, and M. Ikehara,* Nucleic Acids Res., 1974, 1, 1351.
178. *K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, M. A. Quilliam, and J. B. Westmore,* Tetrahedron Letters, 1974, 2861 и последующие работы.
179. *M. Smith, D. H. Rammler, I. H Goldberg, and H. G. Khorana,* J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 430.
180. *B. E. Griffin and C. B. Reese,* Tetrahedron, 1969, **25**, 4057.
181. *R. M. K. Dale, E. Martin, D. C. Livingstone, and D C. Ward,* Biochemistry, 1975, **14**, 2447.
182. *D. E. Bergstrom and J. L. Ruth,* J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 1587.
183. *D. Cech, R. Wohlfeil, and G. Etzold,* Nucleic Acids Res., 1975, **2**, 2183.
184. *I. Wempen, I. L. Doerr, L. Kaplan, and J. J. Fox,* J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 1624.
185. *K. H. Scheit,* Chem Ber., 1966. **99**, 3884.
186. *D. H. R. Barton,* Pure Appl. Chem., 1970, **21**, 285.
187. *D. Cech, L. Hein, R. Wuttke, M. v. Janta-Lipinski, A. Otto, and P. Langen,* Nucleic Acids Res., 1975, **2**, 2177.
188. *T. Nagamachi, J.-L. Fourray, P. F. Torrence, J A Waters, and B Witkop,* J. Medicin. Chem., 1974, **17**, 403.
189. *Y. Wataya, H. Hayatsu, and Y. Kawazoe,* J. Biochem., 1973, **73**, 871.
190. *F. A. Sedor and E. G. Sander,* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1973, **50**, 328.



191. *R. C. Bleackley, A. S. Jones, and R. T. Walker,* Nucleic Acids Res., 1975, **2**, 683.
192. *M. Friedland and D. W. Visser,* Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 148.
193. *M. Roberts and D. W. Visser,* J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 668.
194. *D. Bärwolff and P. Langen,* Nucleic Acids Res., Special Publication No. 1, 1975, S29.
195. *R. E. Cline, R. M. Fink, and K. Fink,* J. Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 2521.
196. *J. Perman, R. A. Sharma, and M. Bobek,* Tetrahedron Letters, 1976, 2427.
197. *I. Bašnak and J. Farkaš,* Nucleic Acids Res., Special Publication No. 1, 1975, S81.
198. *L. Otvös, A. Szabolcs, J. Sági, and A. Szemzó,* Nucleic Acids Res., Special Publication No. 1, 1975, S49.
199. *V. S. Gupta and G. L. Bubbar,* Canad. J. Chem., 1971, **49**, 719.
200. *M. P. Mertes and M. T. Shipchandler,* J. Heterocyclic Chem., 1971, 8, 133.
201. *R. A. Sharma and M. Bobek,* J. Org. Chem., 1975, **40**, 2377.
202. *C. Heidelberger, D. G. Parsons, and D. C. Remy,* J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 3597.
203. *D. Shugar,* F. E. B. S. Letters, 1974, **40**, S48.
204. *W. H. Prusoff and D. C. Ward,* Biochem. Pharmacol., 1976, **25**, 1233.
205. *E. De Clercq, P. F. Torrence, J. A. Waters, and B. Witkop,* Biochem. Pharmacol., 1975, **24**, 2171.
206. *Y.-C. Cheng, B. A. Domin, R. A. Sharma, and M. Bobek,* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1976, **10**. 119.
207. *E. De Clercq and D. Shugar.* Biochem. Pharmacol., 1975, **24**, 1073.
208. *E. De Clercq* (частное сообщение).
209. *E. C. Herrmann,* Appl. Microbiol., 1968, **16**, 1151.
210. *T. Y. Shen, J. F. McPherson, and B. O. Linn,* J. Medicin. Chem., 1966, **9**, 366.

## 22.3. НУКЛЕОТИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ФОСФАТЫ

*Д. В. Хатчинсон (University of Warwick)*

### 22.3.1. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ФОСФАТОВ

Нуклеотиды являются фосфорными эфирами нуклеозидов. Фосфорная кислота присоединена к одной из гидроксильных групп углеводного остатка нуклеозида. Фосфорная кислота может быть присоединена к 2′-, 3′- или 5′-гидроксильной группе в рибонуклеозидах, тогда как 2′-дезоксинуклеозиды могут быть этерифицированы по 3′- или по 5′-гидроксильным группам сахара. Мононуклеотиды (например, аденозин-5′-фосфат AMP *) являются эфирами ортофосфорной кислоты и, следовательно, содержат один атом фосфора на молекулу нуклеозида. Большинство обычных мононуклеотидов являются моноэфирами фосфорной кислоты; хотя известны и диэфиры нуклеозидов (например, аденозин-3′,5′-циклофосфат, цикло-AMP). Моно- и диэфиры пирофосфорной кислоты (например, аденозиндифосфат ADP или никотинамидадениндинуклеотид NAD) также встречаются в природе, наряду с моноэфирами триполифосфорной кислоты (например, аденозинтрифосфат

* Подробнее о сокращении для обычных нуклеотидов см. в инструкции для авторов журнала Biochemical Journal.

*Таблица 22.3.1. Физические свойства некоторых нуклеотидов [4а]*

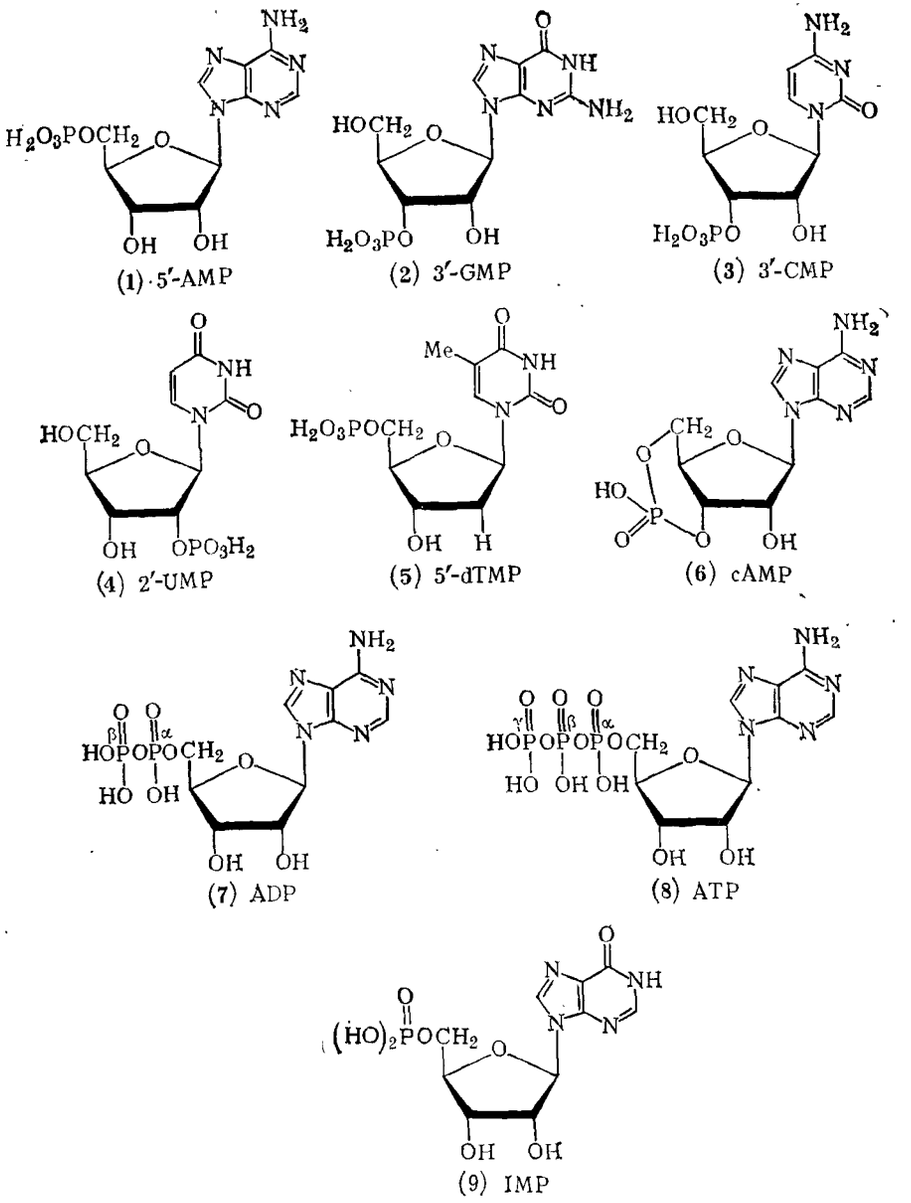
| Соединение | Суммарная формула | Т. пл., °С | Данные УФ-спектров | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $[\alpha]_D$ | pH | $\lambda_{макс}$, нм | $\varepsilon \cdot 10^{-3}$ |
| Аденозин-5′-фосфат (1) | $C_{10}H_{14}N_5O_7P$ | 192 | −26,0 | 2 | 257 | 15,0 |
| | | | | 11 | 259 | 15,4 |
| Гуанозин-3′-фосфат (2) | $C_{10}H_{14}N_5O_8P$ | 175—180 | −57,0 | 1 | 257 | 12,2 |
| | | | | 10,8 | 257 | 11,25 |
| Цитидин-3′-фосфат (3) | $C_9H_{14}N_3O_8P$ | 233 | +27,1 | 2 | 279 | 13,0 |
| | | | | 12 | 272 | 8,9 |
| Уридин-2′-фосфат (4) | $C_9H_{13}N_2O_9P$ | 190—191 | +22,3 | 2 | 262 | 9,9 |
| | | | | 13 | 261 | 7,3 |
| Тимидин-5′-фосфат (5) | $C_{10}H_{15}N_2O_9P$ | — | +7,3 | 2 | 267 | 10,2 |
| | | | | 7 | 267 | 10,2 |
| Аденозин-3′,5′-циклофосфат (6) | $C_{10}H_{12}N_5O_6P$ | 219—220 | −51,3 | 2 | 256 | 14,5 |
| | | | | 6 | 260 | 15,0 |
| Аденозин-5′-дифосфат (7) | $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$ | 125 (разл.) | — | 2 | 257 | 15,0 |
| | | | | 11 | 259 | 15,4 |
| Аденозин-5′-трифосфат (8) | $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ | 218 (разл.) | — | 2 | 257 | 14,7 |
| | | | | 11 | 259 | 15,4 |

ATP). Нуклеотиды оптически активны за счет углеводных остатков и обладают сильным поглощением в ультрафиолетовой области за счет гетероциклических оснований. Последнее свойство часто используют для обнаружения и оценки нуклеотидов, например в ходе хроматографии. Структуры некоторых основных нуклеотидов представлены формулами (1)—(9); некоторые из их физических свойств приведены в табл. 22.3.1.

Моно- и диэфиры фосфорной кислоты являются кислыми водорастворимыми соединениями и их кислотная природа определяет выбор хроматографических методов, используемых для их анализа. Бумажная хроматография была одним из наиболее ранних хроматографических методов, примененных для разделения нуклеотидов, и эта техника использовалась на протяжении многих лет [1]. Тонкослойная хроматография с использованием целлюлозы или силикагеля представляет собой другой метод быстрого анализа смеси нуклеотидов [2].

Применение ионообменной хроматографии для анализа смесей нуклеотидов явилось логическим развитием этой техники разделения неорганических ионов. Хронологически катионообменная хроматография была изучена раньше анионообменной, однако последний метод дает наилучшие результаты по разделению фосфорных эфиров [3]. Адсорбция смеси фосфатов на анионообменной смоле с последующей элюцией их возрастающей концентрацией кислоты или соли является стандартным приемом для выделения и анализа нуклеотидов. Позднее были применены ионообменные целлюлозы и декстраны, преимущества которых заключаются в

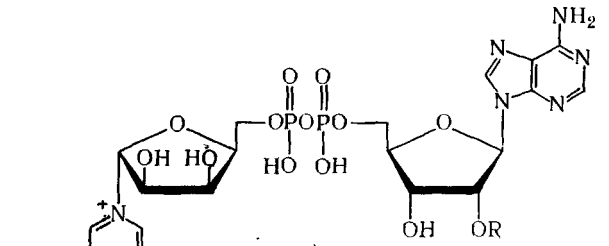





более высокой селективности по сравнению с полистирольными носителями [4]. Газо-жидкостная хроматография мало использовалась для обнаружения и анализа нуклеотидов [5] в основном из-за нелетучести и необходимости предварительного получения производных.

Первым выделенным мононуклеотидом была инозиновая кислота (IMP, **9**), которая была получена из гидролизата мяса Либихом в 1847 г. примерно за 20 лет до выделения нуклеиновых кислот из гнойных клеток Мишером. Взаимосвязь между мононуклеотидами и нуклеиновыми кислотами стала понятна в первой половине двадцатого столетия главным образом в результате работ Левина и др. [6]. Инозиновая кислота не является широкораспространенным в природе нуклеотидом; она образовалась в процессе выделения по Либиху за счет дезаминирования AMP, который сам по себе был выделен из мышц лишь в 1927 г. Были выделены все обычные нуклеотиды аденина, цитозина, гуанина, тимина и урацила, так же как и многие минорные нуклеотиды, например, образующиеся из псевдоуридина, дигидроуридина и метилированных производных аденозина и гуанозина.

Первым открытым нуклеотидным коферментом был никотинамидадениндинуклеотид (NAD+, **10**), который был обнаружен в начале XX века Харденом и Янчом как температурно-стабильный кофактор спиртовой ферментации. Вслед за развитием метода радиоактивных меток и техникой мягкого выделения (например, ионообменная хроматография) были обнаружены многие другие коферменты [7]. Они принимают участие в биологических реакциях окисления-восстановления, переноса групп, в реакциях синтеза полимеров. Эти коферменты будут обсуждены в настоящей главе более детально позднее. Другие же важные встречающиеся в природе эфиры фосфорной кислоты, такие как составляющие клеточных мембран (фосфолипиды и техоевые кислоты) или участвующие в биосинтезе природных соединений (таких, как терпены или стероиды) здесь обсуждаться не будут, но будут рассмотрены в других главах, посвященных природным продуктам.



(10)

$NAD^+$ R= H

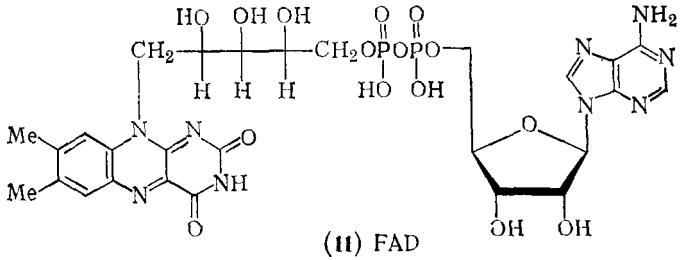
$NADP^+$ R= $PO_3H_2$

Нуклеотиды являются мономерными звеньями нуклеиновых кислот; последние образуются в результате ферментативной полимеризации нуклеозидтрифосфатов. Эта реакция детально обсуждается в гл. 22.4. Одним из наиболее важных природных мононуклеотидов является AMP, который вместе с ADP и ATP играет роль в промежуточном метаболизме. ADP и ATP являются ангидридами кислот и могут играть важную роль в биологических



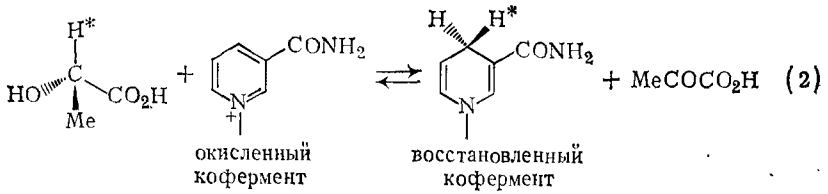
процессах, являясь донорами или акцепторами фосфорильных остатков. Например, в присутствии соответствующего фермента ATP и флавинмононуклеотид FMN, взаимодействуя между собой, образуют кофермент окислительно-восстановительных реакций — флавинадениндинуклеотид FAD (**11**) {схема (1)}

$$FMN + ATP \rightleftharpoons FAD + \text{Неорганический пирофосфат} \qquad (1)$$



(11) FAD

Никотинамидные коферменты NAD+ и его 2′-фосфат — NADP+ также являются окислительно-восстановительными коферментами и участвуют в дегидрогенизации спиртов до карбонильных соединений {схема (2)}. В данном случае происходит гидридный перенос со спирта, например с этанола или лактата, в положение 4 никотинамидного кольца, что приводит к образованию восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Известны два класса никотинамид-зависимых дегидрогеназ, которые различаются по стереоспецифичности гидридного переноса от C-4 на NADH. *L*-Лактатдегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа печени являются двумя типичными ферментами, которые осуществляют гидридный перенос на никотинамид с образованием *R*-конфигурации при C-4 [8]. Функция аденозинового и пирофосфорильного остатков в этих коферментах заключается в связывании кофермента с апоферментным белком наиболее благоприятным для осуществления гидридного переноса способом.



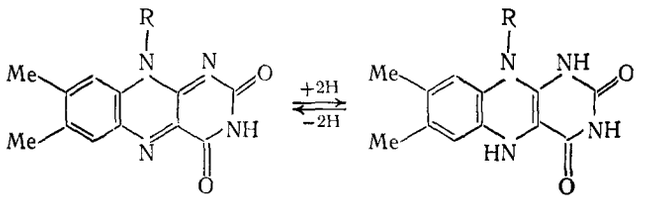
окисленный кофермент — восстановленный кофермент

Никотинамидные коферменты обычно можно отделить от соответствующих апоферментов без существенных осложнений, однако флавиновые коферменты (**11**) гораздо более прочно связаны со своими апоферментами и часто могут быть удалены лишь после существенной денатурации. Флавопротеины катализируют широкий набор реакций дегидрогенизации, например восстановление NAD+, окисление пуринов, таких как ксантин, окисление амино-

кислот и дегидрогенизацию сукцината. В последней реакции происходит удаление двух атомов водорода, находящихся в *транс*-положении по отношению друг к другу, с образованием фумарата {схема (3)}.

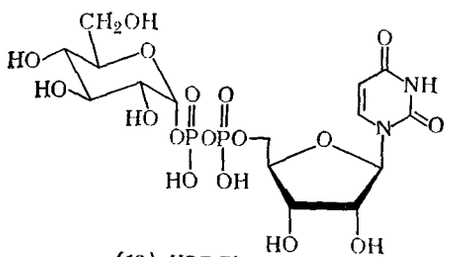
$$\text{Сукцинат} + \text{FAD} \rightleftarrows \text{Фумарат} + \text{FAD-H}_2 \qquad (3)$$

До 1970 г. полагали, что процесс восстановления флавинового остатка происходит в две одноэлектронные стадии и что интермедиатами являются семихиноны. Однако позднее было предложено [9], что окисление-восстановление, наблюдаемое в реакциях, катализируемых флавопротеинами {схема (4)}, может быть связано не с прямым переносом водорода, но может быть следствием последовательной многоступенчатой реакции, не включающей свободные радикалы. Исследования, проведенные с аналогами субстратов, подтвердили эту точку зрения.




(4)

*окисленный кофермент* — *восстановленный кофермент*




(12) UDPGlc

Другая функция нуклеотидных коферментов в биологических реакциях заключается в катализе реакций переноса функциональных групп. Так, нуклеозиддифосфатсахара [например, уридиндифосфатглюкоза UDPGlc (**12**)] играют основную роль в синтезе олиго- и полисахаридов. Иллюстрацией может служить биосинтез сахарозы в растениях [10]. Один из основных путей включает превращение *D*-фруктозо-6-фосфата в сахарозофосфат с последующим практически необратимым гидролизом последнего до сахарозы {схема (4а)}.

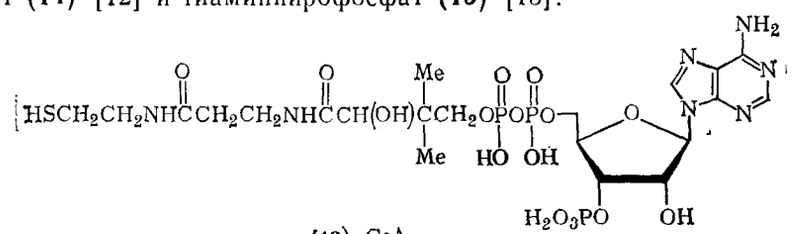
$$\text{UDPGlc} + \text{Фруктозо-6-фосфат} \rightleftarrows \text{UDP} + \text{Сахарозофосфат} \qquad (4а)$$

В этой реакции разрывается связь глюкоза-пирофосфат и происходит перенос глюкозильного остатка на фруктозофосфат.

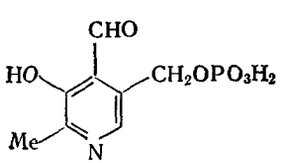


UDPGlc является также предшественником крахмала в растениях и гликогена в дрожжах. В биосинтезе полисахаридов принимают участие и другие нуклеозиддифосфатсахара — ADPGlc (биосинтез гликогена бактериями) и GDPGlc (биосинтез целлюлозы у растений).

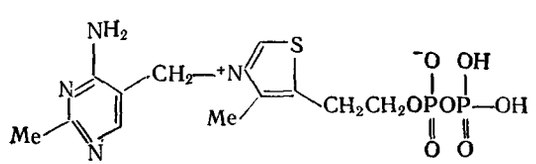
В биохимических реакциях переноса групп принимают участие и другие коферменты — кофермент А (**13**) [11], пиридоксальфосфат (**14**) [12] и тиаминпирофосфат (**15**) [13].




(13) CoA




(14)




(15)

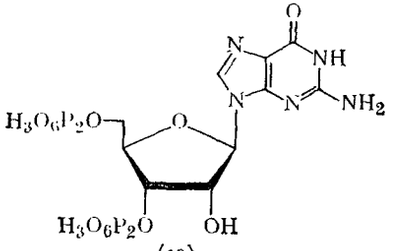
Кофермент А содержит активные SH-группы и катализирует реакции переноса ацильного остатка *in vivo*, в частности в биосинтезе жирных кислот. Пиридоксальфосфат катализирует реакции трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот, в то время как тиаминпирофосфат участвует в метаболизме пентоз и в биохимических реакциях α-кетокислот.

При определении структуры индивидуальных нуклеотидов часто используют химический или ферментативный гидролиз, а также дефосфорилирование до соединений известной структуры. Исторически сложилось так, что гетероциклические основания и углеводные составляющие основных нуклеотидов были уже известны и нерешенным оставался лишь вопрос о положении фосфорильного остатка в углеводной части молекулы [14]. Эта проблема была решена сравнительно легко для 5′-нуклеотидов и для дезоксинуклеозид-3′-фосфатов. Однако быстрое взаимопревращение рибонуклеозид-2′- и -3′-фосфатов оказалось серьезной проблемой для исследователей, начинавших работы в этой области. Применение ионообменной хроматографии для разделения компонентов гидролизата дрожжевой РНК позволило однозначно определить положение фосфорильных остатков в этих нуклеотидах. Для всех четырех основных нуклеотидов были получены пары изомеров (*a*) и (*b*). Осторожный гидролиз аденилових кислот (*a*) и (*b*) дал соответственно рибозо-2- и -3-фосфат, которые были идентифици-

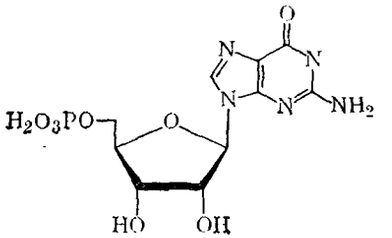
рованы восстановлением до соответствующих рибитфосфатов. Рибит-3-фосфат является оптически неактивным соединением, тогда как при восстановлении рибозо-2-фосфата получено оптически активное соединение. Структуры других изомерных нуклеотидов были установлены аналогичным образом; структуры нуклеотидных коферментов определены также гидролизом.

Применение современной техники, в особенности радиоактивной метки, ферментативного гидролиза и спектроскопии, для определения структуры нуклеотидов, доступных в очень ограниченных количествах, хорошо иллюстрируется следующим примером [15]. Нуклеотид, участвующий в контроле синтеза РНК *Escherichia coli*, был выделен ионообменной хроматографией, и методом ультрафиолетовой спектроскопии показано, что он содержит гуанин. По специфической цветной реакции установлено также наличие в нем рибозы. При выращивании *E. coli* на среде, содержащей $^{32}P$-меченный ортофосфат, получен меченый нуклеотид. Гидролиз меченого нуклеотида фосфомоноэстеразой показал, что он содержит четыре фосфатных остатка на молекулу гуанозина. Маловероятно, что хотя бы один из этих фосфатных остатков присоединен к гетероциклическому основанию, поскольку это привело бы к значительному изменению УФ-спектра гуанина. Нуклеотид стабилен к действию периодата — следовательно, какие-то из фосфатных остатков должны быть присоединены к 2′- или 3′-гидроксильной группе сахара. Подвижность нуклеотида в процессе ионообменной хроматографии при различных значениях pH указывала на то, что для него характерны четыре первичные и две вторичные диссоциирующие группы фосфорильных остатков. Вышеприведенным данным могут отвечать три изомерные структуры: pppGp, ppGpp и pGppp (или их 2′-изомеры). Фосфодиэстераза змеиного яда, расщепляющая связь между α- и β-фосфатными остатками в нуклеозид-5′-полифосфатах, расщепила нуклеотид до трифосфата и, следовательно, его структура должна соответствовать гуанозин-3′,5′-дипирофосфату (**16**) или -2′,5′-дипирофосфату. Окончательное доказательство структуры (**16**) получено в результате ферментативного синтеза [16]. При использовании неочищенной ферментной системы из *E. coli* концевой пирофосфорильный остаток ATP был перенесен на молекулу GDP, что привело к образованию (**16**). В двух независимых экспериментах с использованием ATP, меченного $^{32}P$ либо в β-, либо в α-положениях, получены $ppG^{32}pp$ и $ppGp^{32}p$. Гидролиз $ppG^{32}pp$ пирофосфатазой дал известный гуанозин-3′,5′-дифосфат, меченный в положении 3′, и следовательно, нуклеотид (**16**) был 3′,5′-дипирофосфатом.

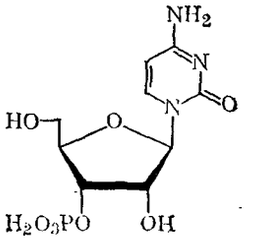
Конформации моно- и олигонуклеотидов в растворе и в твердом состоянии были исследованы различными методами [17]. Например, исследование дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма показали, что олигонуклеотиды существуют в растворе предпочтительнее в *анти*-конформации (**17**), (**18**), чем в *син*-конформации (**19**), (**20**). Исследования методом дифракции рентгеновских лучей показали, что эта тенденция сохраняется и для мононуклеотидов в кристаллическом состоянии [18]. Из изменений химических сдвигов протона при C-8 при изменении pH в спектрах $^1H$-ЯМР пуриновых нуклеозид-5′-фосфатов сделано заключение [17], что эти нуклеотиды существуют в *анти*-конформации, поскольку для 3′-фосфатов характерно незначительное изменение химического сдвига от pH. Метод лантанидного зонда показал, что нуклеозидный остаток в AMP находится в *анти*-конформации как в воде, так и в ДМСО, хотя величина торсионного угла в этих двух растворителях различается [19]. Определение структуры динатриевой соли ATP методом дифракции рентгеновских лучей показало, что нуклеозидный остаток существует в *анти*-конформации и фосфатная цепь повернута в сторону аденинового остатка [20]. Сближенность фосфатной цепи и аденинового кольца



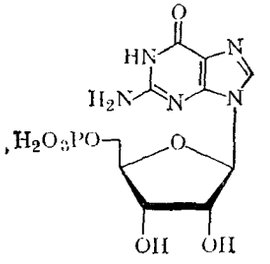
(16)



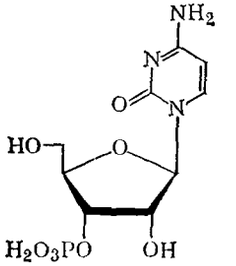
(17) *анти*-pG



(18) *анти*-Cp



(19) *син*-pG



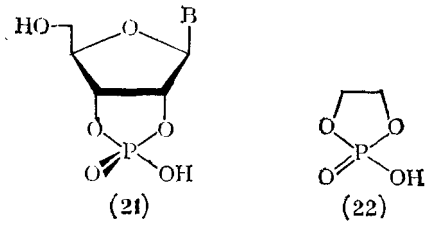
(20) *син*-Cp

может быть также показана методом $^1$H-ЯМР для комплексов АТР с парамагнитными ионами, где сигнал, относящийся к протону при С-8, значительно уширен [21].

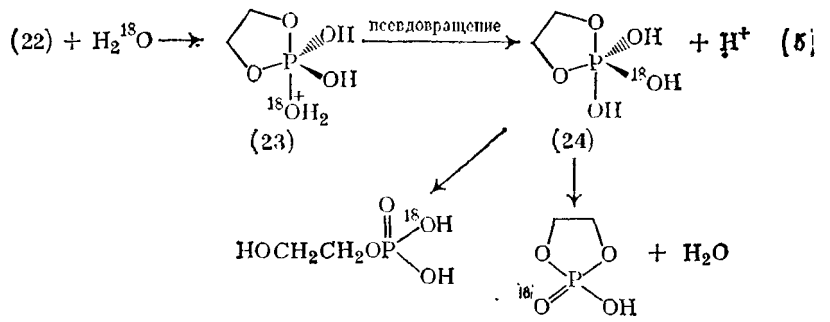
### 22.3.2. НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ И АНГИДРИДОВ

Поскольку реакции углеводных и гетероциклических остатков в нуклеозидах обстоятельно обсуждались выше (см. гл. 22.2), в этом разделе будут описаны только реакции, затрагивающие атом фосфора в нуклеотидах. Так, будут рассмотрены некоторые детали химического и ферментативного гидролиза моно- и полинуклеотидов, в то время как другие гидролитические реакции нуклеиновых кислот, например кислотная апуринизация, будут лишь упомянуты в связи с тем, что в результате этой реакции происходит увеличение лабильности фосфодиэфирной связи.

Большинство простых моно- и диалкилфосфатов весьма медленно гидролизуются кислотой или щелочью [22]; то же наблюдается и в случае ДНК. Напротив, РНК гораздо чувствительнее к гидролизу. Она с заметной скоростью расщепляется в кислоте и быстро гидролизуется в щелочи. Эта повышенная реакционноспособность РНК объясняется соучастием соседней 2′-гидроксильной группы рибозных остатков. Аналогичная картина наблюдается для других фосфатов. Так, эфиры глицерофосфорных кислот гидролизуются гораздо быстрее, чем эфиры простых ациклических фосфорных кислот, например, этилфосфорной кислоты. Начальными продуктами щелочного гидролиза РНК являются рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфаты (**21**), которые быстро расщепляются до 2′- и 3′-фосфатов. Легкое расщепление рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфатов является основным свойством фосфодиэфиров, существующих в виде пятичленного цикла; в сравнимых условиях они гидролизуются в $10^7$—$10^8$ раз быстрее, чем фосфодиэфиры с открытой цепью [23]. Повышенная реакционная способность этих циклических фосфатов обусловлена в основном напряжением цикла, которое может быть снято за счет образования в ходе реакции гидролиза тригонального бипирамидального интермедиата. Например, в случае этиленфосфата (**22**) присоединение воды к фосфорильной группе приводит к образованию пентаковалентного промежуточного иона (**23**), в котором этиленовая группа занимает одно апикальное и одно экваториальное положения. Поскольку группы могут входить в пентаковалентный интермедиат (**23**) и уходить из него только из апикального положения, и если при этом происходит псевдовращение [24], приводящее к (**24**) {схема (5)}, то может происходить или раскрытие цикла, или внедрение кислорода из растворителя. Более того, раскрытие цикла происходит исключительно с расщеплением связи Р—О. В ходе кислотного гидролиза рибонуклеозид-2′,3′-циклофосфаты могут образовывать сходные пентаковалентные интермедиаты и может происходить псевдовращение с занятием апикального положения либо связью С-2′—О, либо связью С-3′—О. Это объясняет наблюдаемое в ходе гидролиза образование смеси изомерных нуклеотидов.

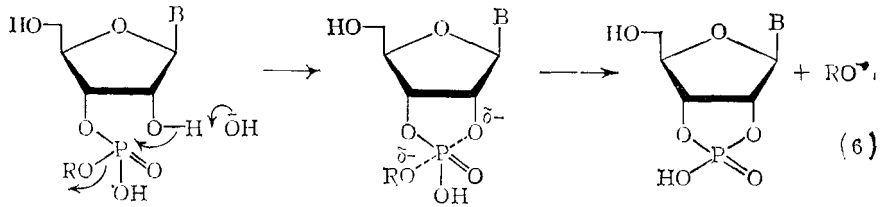


(**21**) (**22**)




(**23**) (**24**) (5)

Катализируемый основаниями гидролиз полирибонуклеотидов или рибонуклеозид-2′(3′)-фосфодиэфиров может проходить через интермедиаты, подобные (**23**). В процессе частичного гидролиза не наблюдается изомеризации нуклеозид-3′-фосфодиэфиров в -2′-фосфодиэфиры. Возможно, это происходит в силу того, что псевдовращению пентаковалентного интермедиата препятствует присутствие отрицательно заряженного лиганда Р—О$^-$, а не Р—ОН. Энергетически неблагоприятно помещение отрицательно заряженного лиганда в апикальное положение в процессе псевдовращения; следовательно, в качестве продуктов катализируемого основаниями гидролиза РНК преобладают 3′-фосфаты. Альтернативно, эту реакцию можно отнести к простому $S_N2$(P)-замещению по механизму типа «in-line» (в линию) {схема (6)}.



(6)

Ионы металлов могут действовать как электрофильные катализаторы в ходе гидролиза фосфатных эфиров, и в этом случае реакция, вероятно, протекает через образование комплексов

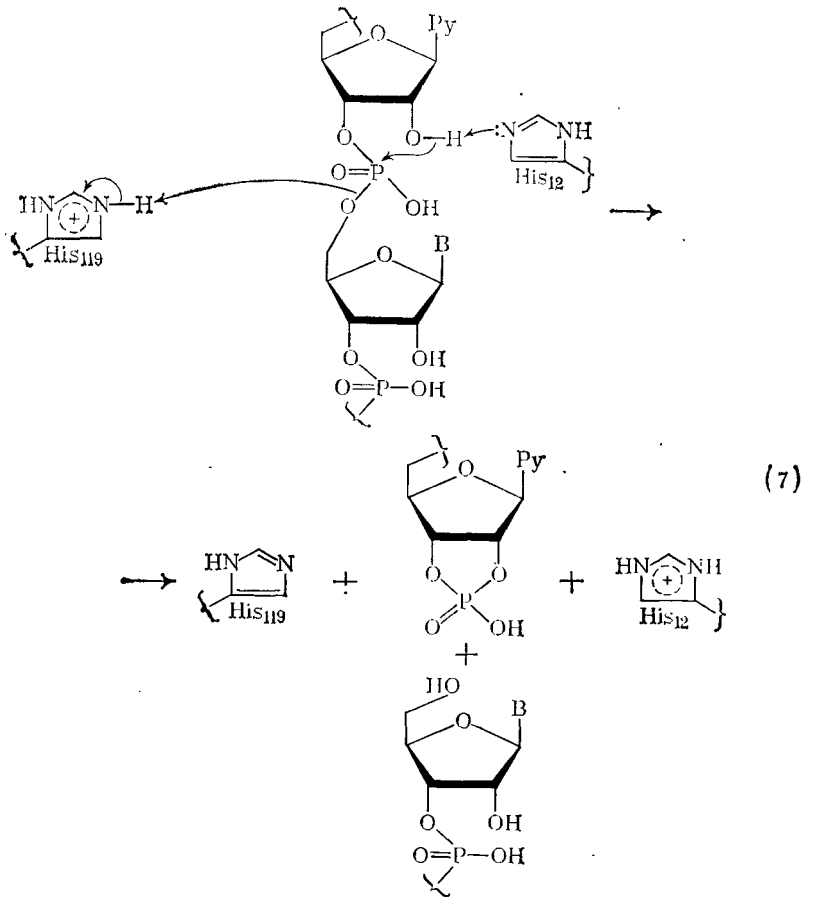
с металлами. И здесь присутствие соседней гидроксильной функции приводит к резко выраженному эффекту ускорения реакции, и полирибонуклеотиды гораздо чувствительнее к катализируемой ионами металлов деградации, чем полидезоксирибонуклеотиды. Вторичная структура, по-видимому, защищает полинуклеотид от атаки, и двуспиральные полимеры атакуются сравнительно медленнее [25].

Существует три вида ферментов, разрушающих (деполимеризующих) нуклеиновые кислоты: (а) фосфотрансферазы — эти эндонуклеазы разрушают РНК с соучастием 2′-гидроксильной группы рибозы, которая атакует атом фосфора на стадии расщепления цепи, перенося таким образом фосфатную группу с 5′-гидроксильной группы соседнего нуклеотида на 2′-группу; (б) фосфодиэстеразы — существует большое количество этих ферментов (которые могут быть эндо- или экзонуклеазами), различающихся по своей специфичности к основаниям и углеводным остаткам; (в) фосфорилазы — ферменты этого класса расщепляют полинуклеотидную цепь по ортофосфату так, что обычно процесс развивается с одного конца цепи.

Панкреатическая бычья рибонуклеаза (РНаза А) и рибонуклеаза из микробного источника (РНаза $T_1$) представляют собой две фосфотрансферазы, явившиеся объектом серьезного изучения. РНаза А известна достаточно давно и была первым ферментом, выделенным Кюнитцом в 1940 г. в кристаллическом состоянии. Известна ее полная аминокислотная последовательность; кристаллическая структура изучена рентгеноструктурным анализом [26]. Фермент специфически расщепляет РНК после пиримидиновых остатков в полинуклеотидной цепи, образуя олигонуклеотиды, оканчивающиеся пиримидиновыми нуклеозид-3′-фосфатами, и пиримидиновые 3′-мононуклеотиды. Гидролиз РНК представляет двухступенчатый процесс, состоящий из расщепления цепи (фосфотрансферазная реакция) и фосфодиэстеразной реакции. Два гистидиновых остатка в молекуле фермента ($His_{12}$ и $His_{119}$) особенно важны для каталитической реакции, и метоксикарбонилирование этих гистидинов инактивирует фермент {схема (7)}. Расщепление РНК этим ферментом протекает по механизму общего кислотно-основного катализа; его механизм, впервые предложенный Рабином и сотр. [27], в настоящее время считается общепринятым. На фосфотрансферазной стадии атака на атом фосфора неподеленной электронной пары 2′-кислородного атома рибозного кольца облегчается оттягиванием от него протона гистидином $His_{12}$. Расщепление цепи сопровождается протонированием 5′-кислородного атома следующего нуклеотида цепи за счет гистидина $His_{119}$. На фосфодиэстеразной стадии процесса, которая протекает значительно медленнее фосфотрансферазной стадии, пиримидиновый нуклеозид-2′,3′-циклофосфат специфически расщепляется ферментом в присутствии воды до 3′-фосфата {схема (8)}. Эта реакция идет по механизму общего кислотно-основного катализа, осуществляемого двумя гистидиновыми остатками рибонуклеазы.



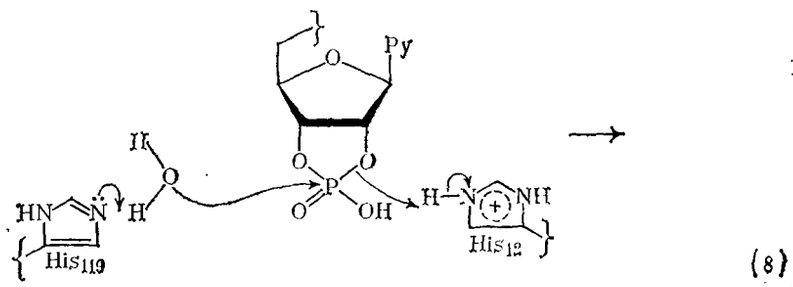
Фосфодиэфирная стадия протекает по механизму «in-line», что однозначно показано на примере уридин-2′,3′-циклотиофосфата [28]. Из двух диастереомеров этого циклического тиофосфата, один, а именно (25), может быть получен в кристаллическом состоянии в виде триэтиламмониевой соли. Этот изомер гидролизуется РНазой А, кинетические параметры процесса его гидролиза



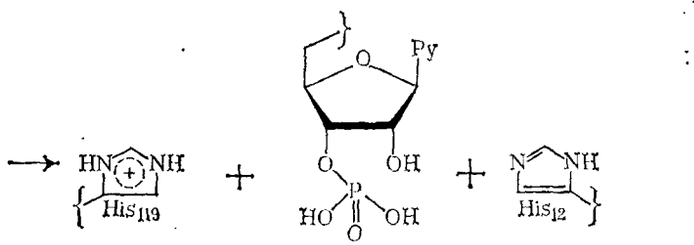

сходны с таковыми для уридин-2′,3′-циклофосфата. Когда изомер (25) гидролизовали в $O^{18}$-обогащенной воде до 3′-тиофосфата, а последний вновь превращали в циклический тиофосфат методом с известной «in-line» стереохимией, то пропорция включения изотопа в кристаллическую соль находилась в прекрасном соответствии с величиной, необходимой для «in-line» раскрытия циклического тиофосфата рибонуклеазой {схема (9)}.

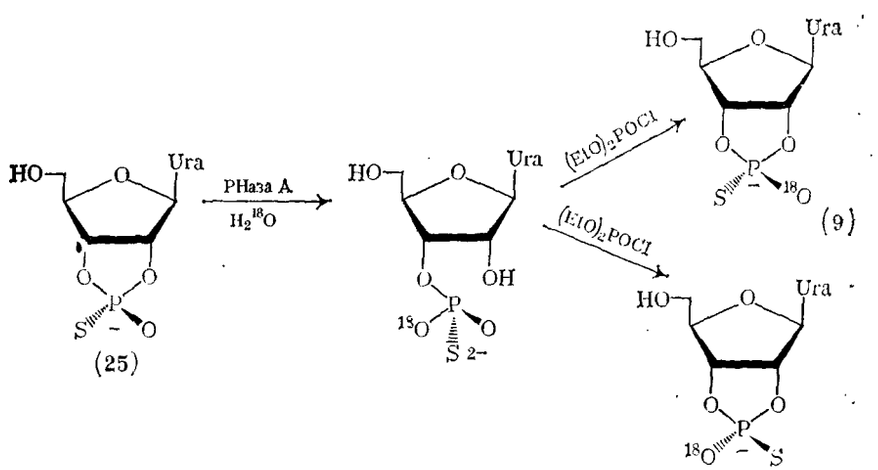
Рибонуклеаза $T_1$ открыта гораздо позднее, чем РНаза А. Известна ее аминокислотная последовательность, но полная кристал-

лическая структура пока еще не опубликована. РНаза $T_1$ является эндонуклеазой, расщепляющей РНК после гуанозиновых остатков. Механизм ее действия очень сходен с механизмом действия




(8)




РНазы А за исключением того, что вместо двух остатков гистидина в общем кислотно-основном катализе гидролиза принимают участие остатки гистидина и глутаминовой кислоты [29]. И в этом случае гидролиз промежуточно образующегося гуанозин-2′,3′-циклофосфата протекает по механизму «in-line» [30]. Оба фермента (РНаза А и РНаза $T_1$) с их различной специфичностью к основаниям интенсивно использовали при определении последовательности оснований в рибонуклеиновых кислотах.



Нуклеаза стафилококков является примером фосфодиэстеразы с малой субстратной специфичностью, поскольку она расщепляет ДНК, РНК и олигонуклеотиды до 3′-мононуклеотидов [31]. Нуклеаза стафилококков получена в кристаллическом виде; определены ее аминокислотная последовательность и трехмерная структура. Необычность фермента заключается в том, что для проявления активности он нуждается в ионах кальция. Ион металла присоединяется к нуклеазе только в присутствии субстрата или ингибитора, например тимидин-3′,5′-дифосфата. Нуклеаза стафилококков действует как эндонуклеаза, но после того, как осуществлены разрывы цепи, она может действовать как экзонуклеаза.

Необычная особенность гидролиза нуклеазой тимидин-3′-фосфо-5′-(4-нитрофенил)фосфата заключается в том, что единственными продуктами реакции являются тимидин-3′-фосфат и 4-нитрофенилфосфат [32]. Не происходит образования 4-нитрофенола, как можно наблюдать при химическом гидролизе этого субстрата. Можно полагать, что 4-нитрофеноксид будет гораздо лучшей уходящей группой в этой гидролитической реакции, чем 5′-оксианион тимидина. Нет кинетических доказательств существования группы, действующей в качестве кислоты, которая давала бы возможность элиминировать нейтральный нуклеозид. Предложено, что наблюдаемый путь гидролиза можно объяснить предположением образования пентаковалентного интермедиата, который не может претерпевать свободного псевдовращения из-за стерических препятствий, налагаемых ферментом, особенно в результате координации с ионом кальция. Таким образом, лучшая уходящая группа (4-нитрофеноксид) не может занимать апикальное положение в интермедиате. Когда происходит исключение тимидин-5′-оксианиона из апикального положения, то за ним следует протонирование в стадии, не лимитирующей скорость процесса.

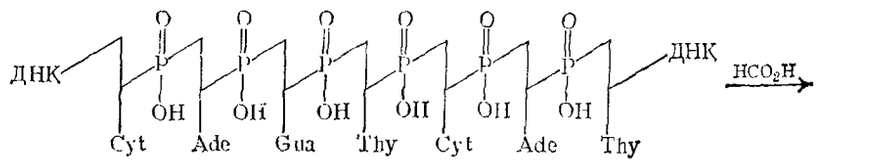
Полинуклеотидфосфорилаза, являющаяся примером третьего класса полинуклеотидразрушающих ферментов, обратимо расщепляет полирибонуклеотиды в присутствии неорганического ортофосфата, давая нуклеозид-5′-дифосфаты [33]. Хотя этот фермент известен уже более 25 лет, его биологическая функция непонятна. Полинуклеотидфосфорилаза была первым ферментом, для которого установлено, что он способен полимеризовать нуклеозид-5′-дифосфаты {схема (10)}.

$$\mathrm{ADP} \underset{Mg^{2+}}{\overset{\text{полинуклеотидфосфорилаза}}{\rightleftharpoons}} \text{poly (A)} + P_i \qquad (10)$$

Для полимеризации без начального лаг-периода чистому ферменту из некоторых бактерий, например из *E. coli*, необходима затравка. Полинуклеотидфосфорилаза до сих пор не получена в чистом виде и нет информации о аминокислотных остатках, формирующих ее активный центр. Однако несмотря на отсутствие данных о детальном механизме ее действия, фермент интенсивно

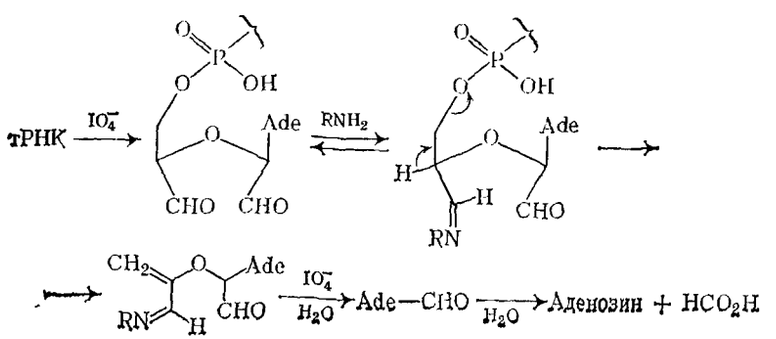
используют для получения полирибонуклеотидов, содержащих природные или синтетические остатки оснований.

Расщепление цепи может идти вслед за химической апуринизацией полинуклеотида. Например, дифениламин в водной муравьиной кислоте будет расщеплять ДНК до олигонуклеотидов с образованием некоторого количества неорганического ортофосфата {схема (11)} [34]. Эту реакцию интенсивно использовали для определения последовательности в нуклеиновых кислотах.




$$\longrightarrow \text{ДНК—dCp} + P_i + \text{pdTpdCp} + \text{pdT—ДНК} \qquad (11)$$

Продуктом реакции является левулиновая кислота и, вероятно, альдегидные группы дезоксирибозных остатков, которые освобождаются в результате апуринизации, реагируют с дифениламином, образуя основания Шиффа. Последние отщепляют затем фосфорильный остаток из положения 5′. Деградация апуриновой ДНК щелочью ведет к разрыву цепи, но этот метод менее удовлетворителен, чем кислотно-катализируемая реакция, описанная выше, поскольку при этом наблюдаются побочные реакции. Терминальное основание можно отщепить из молекулы РНК после ее катализируемой амином реакции с последующим повторным периодатным окислением {схема (12)}. Амин катализирует удаление модифицированного нуклеозида с 3′-конца РНК; дальнейшее окисление



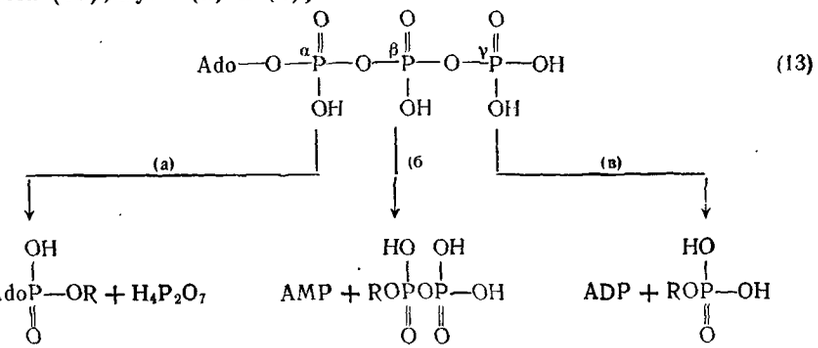

(12)



элиминированного фрагмента высвобождает свободное основание [35].

Аденозинтрифосфат играет ключевую роль во внутреннем метаболизме. В 1941 г. Липманн предложил концепцию «энергетически-богатых фосфатных связей» для того, чтобы объяснить, почему кажется, что стандартная свободная энергия гидролиза АТР и других родственных фосфатов, например креатинфосфата, является существенно более высокой, чем стандартная свободная энергия гидролиза других фосфатов, таких как AMP [36]. Эту концепцию часто применяли при обсуждении реакций АТР [37]. В ряде случаев было заявлено, что АТР может «запасать» энергию, освобождающуюся в результате деградационных процессов метаболизма и может использовать запасенную энергию по мере необходимости для осуществления синтетических реакций. Недавно концепция энергетически-богатых фосфатных связей была подвергнута критической переоценке [38] и сделан вывод, что концепция Липманна применима лишь для замкнутых систем, с энергетически-связанными реакциями. Поскольку реальные организмы являются открытыми системами, то к ним, строго говоря, не может быть применена концепция энергетически-богатых связей и, несмотря на то, что эфиры фосфатов могут быть расположены в порядке уменьшения стандартной свободной энергии их гидролиза, это может служить лишь указанием на направление трансфосфорилирования в замкнутой системе.

Жизненно важная роль АТР в процессах метаболизма связана с его способностью фосфорилировать субстраты с образованием эфиров или смешанных ангидридов, которые могут быть затем гидролизованы до желаемых продуктов. На схеме (13) показаны возможные пути расщепления АТР. Подавляющее большинство реакций переноса фосфорильной группы, в которых принимает участие АТР, проходят либо по α-, либо по β-атому фосфора. При этом переносится либо ортофосфорил, либо аденилильный остаток {схема (13), пути (а) и (в)}.




(13)

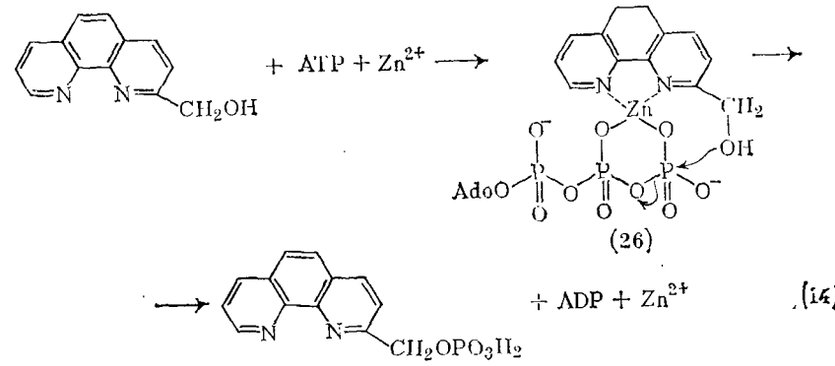
Реакций АТР, проходящих по β-фосфорному атому и приводящих к переносу пирофосфорильного остатка {путь (б) на схеме

(13)}, крайне мало. Одна из причин такого различия в реакционной способности может быть связана с различиями в электронной плотности на атомах фосфора, и данные $^{31}$P-ЯМР-спектроскопии показывают, что α- и γ-атомы фосфора дезэкранированы по сравнению с β-атомом фосфора [39]. Реакции фосфорильного и нуклеотидильного переноса могут протекать по механизмам, изменяющимся в границах двух предельных случаев: (1) диссоциативный ($S_N1$) механизм, при котором уход нуклеофила происходит из такой реактивной частицы как трижды координированный метафосфат, или (2) $S_N2$-механизм, включающий образование пентаковалентного интермедиата, аналогичного обсуждавшемуся при рассмотрении действия нуклеаз. Протонирование, образование координационных комплексов с металлами или этерификация ингибируют реакции, протекающие по $S_N1$-механизму. Вероятно, это связано с уменьшением способности неподеленной пары электронов кислорода к образованию $d_\pi$—$p_\pi$-связи с фосфором в метафосфатном интермедиате. Напротив, $S_N2$-замещение будет ускоряться в результате нейтрализации заряда, например при образовании комплексов с металлом, вероятно из-за того, что возрастает оттягивание электронов от атома фосфора [40]. Образование хелатных комплексов с металлами может не только влиять на электрофильность атома фосфора, но также вызывать напряжение в основном состоянии и благоприятно влиять на псевдовращение. Кроме того, ионы металлов могут самопроизвольно образовывать координационные комплексы с входящим лигандом и фосфорильной группой в ходе атаки и, следовательно, повышать нуклеофильность входящего лиганда. Действие иона металла на механизм ферментативной реакции уже обсуждалось ранее на примере нуклеазы стафилококков, когда ион металла, по-видимому, влияет на псевдовращение пентаковалентного интермедиата.

Химический гидролиз ATP до ADP и неорганического фосфата активируется ионами двухвалентных металлов, и из числа изученных металлов наиболее эффективными являются ионы Cu (II) [41]. Аденинovое основание также играет важную роль в гидролизе в результате комплексообразования по атому N-7. Ионы Cu (II) слабо влияют на гидролиз CTP до CDP, когда это дополнительное координирование не может осуществляться. Другим примером активируемого ионами металлов дефосфорилирования ATP является катализируемое ионами цинка фосфорилирование 2-гидроксиметил-1,10-фенантролина [42]. Перенос фосфорила полностью зависит от присутствия ионов цинка и, вероятно, протекает через трехкомпонентный комплекс (**26**), в который входят фенантролин, ATP и ион цинка. Если образовался комплекс (**26**), то его стереохимия может привести к пространственной сближенности первичной спиртовой группы фенантролина с α-фосфорильной группой ATP и, следовательно, фосфорилирование облегчается {схема (14)}.



Предложено, что эта реакция является моделью многих биологических реакций переноса фосфорильного остатка с ATP.




(14)

Недавние исследования методом $^{31}$P-ЯМР-спектроскопии показали, что ионы меди связываются с β- и γ-фосфорильными группами ATP, а ионы магния связываются только с β-фосфорильной группой [39], что опровергает заключения, сделанные в более ранних работах [21]. Ионы марганца (II), никеля (II) и кобальта (II) связываются со всеми тремя фосфорильными группами ATP, так же как и с атомом N-7 аденинового основания. Эти различия в характере комплексообразования между марганцем (II) и магнием (II), как следует из $^{31}$P-ЯМР-спектров, необходимо принимать во внимание при проведении модельных опытов по изучению фермент-субстратных взаимодействий с использованием ионов марганца (II) в качестве парамагнитного зонда. Механистические заключения, вытекающие из исследований, проведенных с использованием ионов марганца (II), могут не иметь силу *in vivo*. Например, в реакционном комплексе многих ферментативных реакций переноса фосфорильных и нуклеотидильных групп, которым требуются ионы магния для проявления полной активности, может происходить координация иона металла по β-фосфорильной группе ATP наряду с нейтрализацией заряда либо α-, либо γ-фосфорильной группы положительно заряженным боковым радикалом аминокислотного остатка фермента или другим ионом металла, как в случае мембраносвязанной АТФазы [40], которой для проявления полной активности необходимы моновалентные ионы, так же как и ионы Mg (II). Примеры ферментативных реакций нуклеозидполифосфатных эфиров, включающих перенос фосфорила, пирофосфорила или нуклеотидила, даны в табл. 22.3.2.

Известно мало четко подтвержденных реакций ATP, в которых происходит перенос пирофосфорильного остатка на субстрат. Два хорошо изученных примера представляют синтез *D*-рибозо-5-фосфо-1-пирофосфата из *D*-рибозо-5-фосфата ферментом, который был выделен из многих источников, и синтез тиаминпирофосфата из тиамина ферментом, который был выделен как из тканей живот-

*Таблица 22.3.2. Некоторые ферментативные реакции переноса фосфорила и нуклеотидила, включающие нуклеозидполифосфатные эфиры [40a]*

| Перенос фосфорила | Перенос пирофосфорила | Перенос нуклеотидила |
|---|---|---|
| ATP:*D*-фруктозо-1-фосфотрансфераза<br>ATP:рибофлавин-5′-фосфотрансфераза (аденилаткиназа) | ATP:тиаминпирофосфотрансфераза<br>ATP:*D*-рибозо-5-фосфатпирофосфотрансфераза | ATP:$NMN^+$-аденилилтрансфераза<br>ATP:FMN-аденилилтрансфераза<br>UTP:α-*D*-глюкозо-1-фосфатуридилилтрансфераза<br>GTP:α-D-маннозо-1-фосфатгуанилилтрансфераза |
| ATP:креатинфосфотрансфераза<br>ATP:пируватфосфотрансфераза (пируваткиназа) и т. д. | | CTP:холинфосфат-цитидилилтрансфераза<br>Нуклеозиддифосфат:полинуклеотид-нуклеотидилтрансфераза (полинуклеотидфосфорилаза)<br>Нуклеозидтрифосфат:РНК-нуклеотидилтрансфераза (РНК-полимераза)<br>Дезоксинуклеозидтрифосфат:ДНК-нуклеотидилтрансфераза (ДНК-полимераза) и т. д. |

ных, так и из дрожжей. Оба фермента нуждаются в ионах магния, как в кофакторе, и если β-фосфорильная группа ATP координирована с ионом магния, как продемонстрировано методом $^{31}$P-ЯМР, тогда нуклеофильная атака будет приводить к переносу пирофосфорильной группы. Однако необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы выяснить истинный механизм действия этих ферментов.

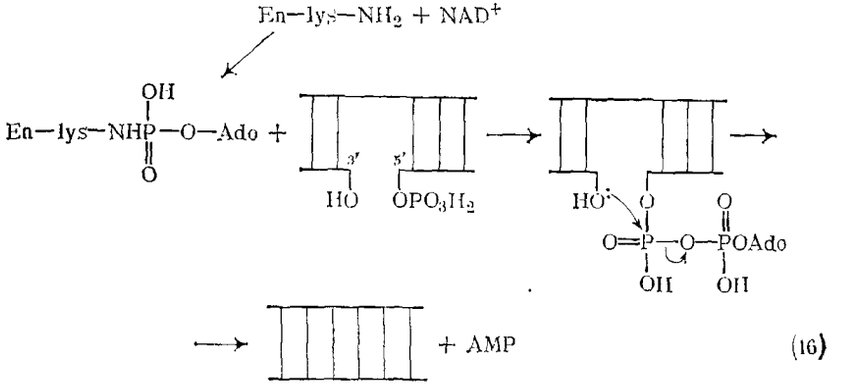
В переносе нуклеотидила могут участвовать нуклеозидполифосфатные эфиры, отличные от ATP. Например, РНК- и ДНК-полимеразы катализируют нуклеотидильный перенос с обычных рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, в то время как реакция полимеризации, катализируемая полинуклеотидфосфорилазой, является примером ферментативной реакции, в которой нуклеотидильные остатки переносятся с рибонуклеозид-5′-пирофосфатов. Биосинтез нуклеозиддифосфатосахаров осуществляется ферментами нуклеотидильного переноса. Например, UDP-глюкоза синтезируется UTP-α-*D*-глюкозо-1-фосфатуридилилтрансферазой {схема (15)}.

$$\text{UTP} + \alpha\text{-D-Глюкозо-1-фосфат} \rightleftharpoons \text{UDPGlc} + \text{Пирофосфат} \qquad (15)$$

ДНК-лигаза является ферментом, который может сшивать цепи ДНК друг с другом, и в ходе этого репарационного процесса протекают довольно необычные реакции нуклеотидильного переноса.



При инкубировании лигазы из бактериофага $T_4$ с ATP получена аденилат-лигаза, у которой аденилоый остаток присоединен к ε-аминогруппе белка фосфорамидной связью [43]. Фосфорамид далее реагирует с 5′-фосфорильной группой «поврежденной» ДНК, образуя пирофосфат, который в свою очередь расщепляется при участии 3′-гидроксильной группы дезоксирибонуклеозида на другой стороне «повреждения» с завершением образования межнуклеотидной связи и высвобождением AMP. ДНК-лигаза из *E. coli* является еще более необычным ферментом, поскольку аденилатный остаток переносится из молекулы $NAD^+$ на ε-аминогруппу лизина активного центра фермента {схема (16)}. Это пока что единственный обнаруженный случай, когда $NAD^+$ выступает в роли кофактора переноса аденилата предпочтительнее, чем в более обычном для него качестве окислительно-восстановительного кофермента.




(16)

Роль аденозин-3′,5′-циклофосфата cAMP, (**6**) как внутриклеточного вторичного посредника, контролирующего действие многих гормонов, надежно установлена [44]. Другим вторичным посредником, контролирующим разнообразные биологические процессы, является гуанозин-3′,5′-циклофосфат. Другие циклические фосфаты, например cCMP, также могут принимать участие в биологическом контроле. В тканях из самых разнообразных источников катехоламины и пептидные гормоны (например, инсулин или глюкагон) действуют через фермент аденилатциклазу [45], который превращает ATP в cAMP. Уровень cAMP в клетке в каждый данный момент времени контролируется двумя ферментами, аденилатциклазой и специфической фосфодиэстеразой, которая инактивирует cAMP, расщепляя его до 5′-AMP {схема (17)}.

$$\text{ATP} \xrightarrow{\text{аденилатциклаза}} \text{PP}_i + \text{cAMP} \xrightarrow{\text{фосфодиэстераза}} \text{5′-AMP} \qquad (17)$$

В целом, аденилатциклаза является мембраносвязанным ферментом и стимулируется гормонами, которые связываются с участком рецептора на внешней стороне мембраны и активируют ката-

литический (циклизующий) центр на внутренней стороне мембраны, который и превращает ATP в cAMP {схема (18)}.

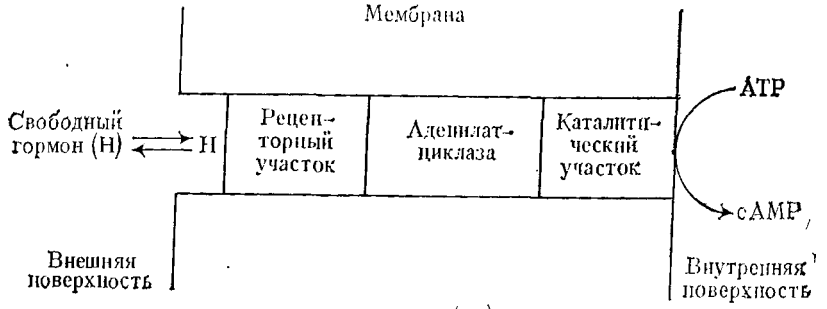
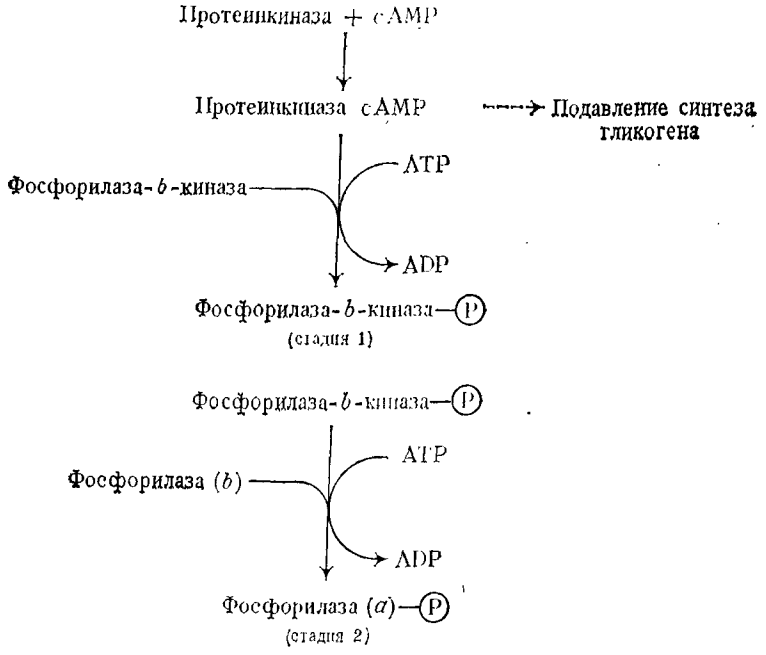



Схема (18)

cAMP-фосфодиэстераза стимулируется пуринами, такими как кофеин, и рядом лекарственных препаратов, но, по-видимому, на нее не оказывают существенного влияния гормоны.

Прояснены пути контроля cAMP ряда биологических процессов, и ниже рассмотрен процесс регуляции деградации гликогена [46] как модель, демонстрирующая механизм действия cAMP.




Гликоген + $H_3PO_4$ + Фосфорилаза (*a*)—(P) ⟶ Глюкозо-1-фосфат
(стадия 3)

Схема (19)



Гликоген разрушается в присутствии неорганического фосфата до глюкозо-1-фосфата ферментом гликогенфосфорилазой, который существует в мышцах и печени в двух формах: (*a*) и (*b*). Неактивная фосфорилаза (*b*) превращается в активную фосфорилазу (*a*) в результате ее фосфорилирования фосфорилаза-*b*-киназой. Однако последняя также существует в фосфорилированной (активной) и нефосфорилированной (неактивной) формах. Первым актом, приводящим к разрушению гликогена, является фосфорилирование неактивной фосфорилаза-*b*-киназы протеинкиназой, причем это фосфорилирование происходит только в присутствии cAMP. Протеинкиназа может фосфорилировать не только фосфорилазокиназу, но также многие другие белки, такие как казеин и даже гликогенсинтетазу. Фосфорилирование гликогенсинтетазы инактивирует фермент, и в итоге cAMP не только активирует деградацию гликогена, но также и «выключает» его синтез. Фосфорилированная фосфорилаза (*a*) в присутствии неорганического фосфата расщепляет затем гликоген до глюкозо-1-фосфата {схема (19)}. В результате «каскадного» процесса, описанного выше, эффект малого количества cAMP усиливается, cAMP может осуществлять очень тонкий контроль за процессом деградации гликогена.

### 22.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФОРНЫХ КИСЛОТ, АМИДОВ, АНГИДРИДОВ И ЭФИРОВ

Все природные фосфорорганические соединения являются производными пятивалентного фосфора и обычно являются эфирами ортофосфорной кислоты или конденсированных полифосфорных кислот {схема (20)}, хотя в природе встречаются и некоторые фосфонаты. Молекула ортофосфорной кислоты $H_3PO_4$ содержит четыре атома кислорода, связанных с атомом фосфора; фосфорилирование спирта (нуклеозида) происходит с переносом атома фосфора и только трех атомов кислорода на субстрат (спирт). Фосфорилирование является всего лишь частным случаем ацилирования: реакции переноса ацила от производных карбоновых кислот были хорошо изучены [47]. На схеме (21) показаны различные пути карбоксилирования. Выявлены два основных пути протекания реакции: либо мономолекулярное расщепление до ацилиевого иона {схема (21), путь (а)}, либо реакция синхронного замещения. Последняя может включать или не включать образование тетраэдрического интермедиата {пути (б) и (в) на схеме (21)}. Аналогично, при реакциях фосфорилирования может происходить первоначальное мономолекулярное расщепление до метафосфата {путь (г) на схеме (22)}, хотя зарегистрировано мало однозначных случаев протекания реакции через промежуточные метафосфаты [48]. Большинство реакций фосфорилирования протекают как реакции замещения, которые могут включать или не включать образование пятивалентных интермедиатов {пути (д)

и (е)}. Эти реакции замещения уже обсуждались при рассмотрении гидролиза полинуклеотидов. В литературе встречается мало четких доказательств, являются ли пятивалентные аддукты про-

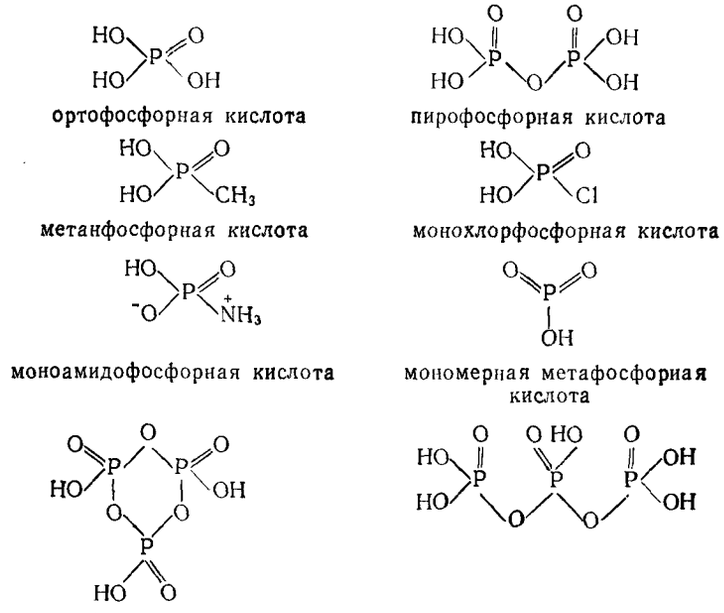



Схема (20). Некоторые кислоты пятивалентного фосфора

межуточными во многих реакциях фосфорилирования, хотя фосфорилирующие агенты, действие которых должно приводить к образованию таких аддуктов, применяются теперь достаточно широко [49].

В простейших реакциях фосфорилирования (фосфорильного переноса) используется замещение галогена у углеродного атома. При обработке серебряной соли или сложного эфира фосфорной кислоты ацил- или алкилгалогенидом выпадает в осадок хлорид серебра и получается фосфорилированное производное {схема (23)}. Метод был использован для получения динуклеозидфосфатов, фосфолипидов и ацилфосфатов, но в основном он заменен другими методами, поскольку продукты реакции обычно получаются с низкими выходами и недостаточно чистыми. Альтернативные методы фосфорилирования включают активацию ортофосфорной кислоты и основная проблема состоит в селективном проведении процесса и в мягких условиях [50—52].

Активация фосфорной кислоты первоначально достигалась использованием фосфохлоридов, которые являются ацилгалогенидами. Много лет назад в практику получения нуклеотидов и других фосфатов углеводов был введен фосфорилхлорид, действующий в



присутствии четвертичного основания. Этот реагент до сих пор считается лучшим для синтеза симметричных арильных фосфотриэфиров {схема (24)}. Необходимо принимать меры предосторожности для предотвращения образования побочных продуктов, таких как моно- и диэфиры; при фосфорилировании алифатических спиртов могут быть получены значительные количества алкилхлоридов {схема (26)}. Вероятно, на первой стадии реакции образуется алкилфосфодихлорид, а затем хлорид-ион атакует углеродный атом, замещая дихлорфосфорную кислоту или ее анион.

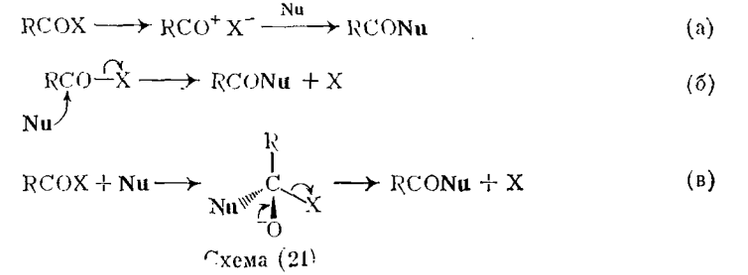



Схема (21)

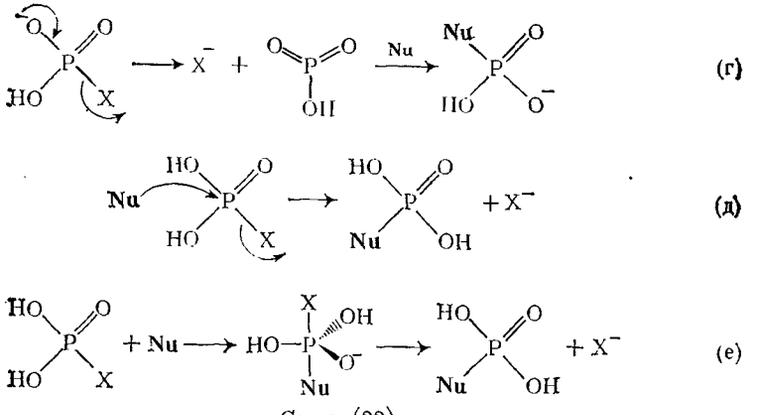
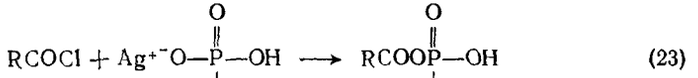


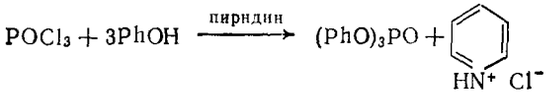

Схема (22)

Фосфорилхлорид в растворе триалкилфосфата интенсивно используется для фосфорилирования незащищенных нуклеозидов; основным продуктом после гидролиза является 5′-фосфат [53] {схема (25)}. Точный механизм этой реакции не установлен; причиной стереоселективности может являться образование объемистого комплекса между фосфорилхлоридом и растворителем. Нежелательное образование ди- и триэфиров при синтезе нуклеотидов можно предотвратить применением в качестве фосфорилирующего агента монохлорфосфорной кислоты $(HO)_2POCl$. Хотя эта кислота очень нестабильна, диэфиры монохлорофосфорной кислоты стабильны и интенсивно использовались в качестве фосфорилирующих агентов. Предложен ряд диэфиров, позволяющих при-

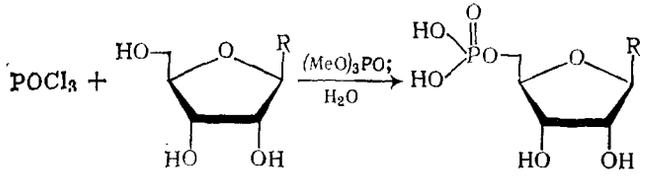
менять различные методы удаления защитных групп в конце синтеза. Преимущество применения дибензил- и дифенилхлорфосфатов в том, что бензильная и фенильная группы при необходимости легко удаляются каталитическим гидрогенолизом. Парциальное дебензилирование продуктов реакции может быть достигнуто либо гидрогенолизом в присутствии отравленного катализатора, либо нуклеофильным замещением. С другой стороны, дибензилхлорфосфат (27) нестабилен и его необходимо готовить из дибензилфосфита (28) {схема (27)} непосредственно перед использованием. В условиях, когда соединение (27) стабильно, т. е. при



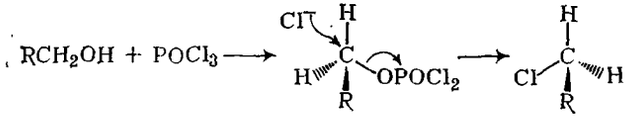
(23)



(24)



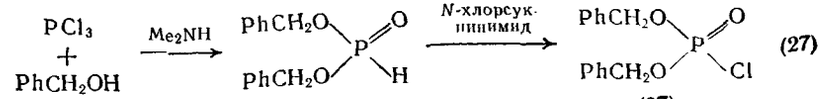
(25)



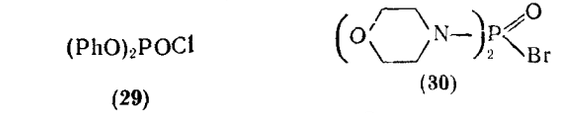
(26)

низких температурах в присутствии четвертичного основания, оно не очень реакционноспособно и лишь с трудом фосфорилирует вторичные гидроксильные группы. Преимуществом дифенил- (29) и бис(4-нитробензил)хлорфосфатов является их существенно большая стабильность, чем (27), и их можно использовать при более высоких температурах, повышая тем самым реакционную способность. Бис(2-нитробензил)хлорфосфат использован для фосфорилирования защищенных нуклеозидов; в этом случае защитные группы с фосфорильного остатка удаляли фотолитически [54]. Незащищенные нуклеозиды могут быть специфически превращены в 5′-нуклеотиды в результате обработки бис(2-*трет*-бутилфенил)-хлорфосфатом, с последующим кислотным гидролизом [55]. Здесь вновь важную роль в проявляемой селективности реакции играют стерические препятствия. Другие используемые галогенфосфаты с кислотолабильными защитными группами — это бисморфолинобромфосфат (30) и бисанилинохлорфосфат (31), хотя защитные группы с субстратов, фосфорилированных (31), лучше удаляются обработкой алкилнитритами [56] {схема (28)}. Бис (2,2,2-трихлорэтил)хлорфосфат является фосфорилирующим агентом, который нашел широкое применение для получения нуклеотидов и фосфолипидов; 2,2,2-трихлорэтильные группы удаляют из полученных продуктов цинковой пылью в уксусной кислоте {схема (29)} [57].

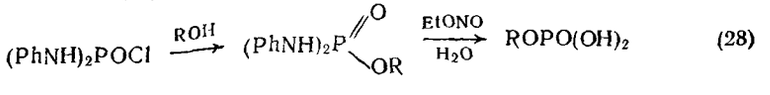
1,2-Фениленхлорфосфат (32) предложен как реагент для получения моноалкилфосфатов и нуклеотидов. Циклические триэфиры, образующиеся из (32), легко гидролизуются с раскрытием цикла, и 2-гидроксифенильный остаток легко удаляется окислением продукта с открытым циклом {схема (30)} [58]. Незащищенные нуклеозиды можно избирательно фосфорилировать в растворе фенольного растворителя в положение 5′ пирофосфорилхлоридом (33). Связь P—O—P в первичном продукте реакции (34), вероятно, гидролитически расщепляется до замещения хлорид-иона, и таким образом, основным продуктом реакции является 5′-фосфат, а не пирофосфат {схема (31)}.



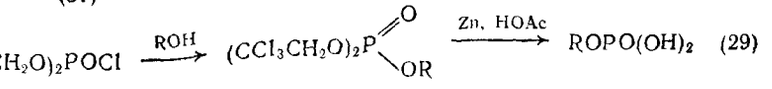
(27)



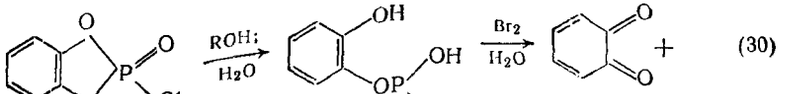
(28)



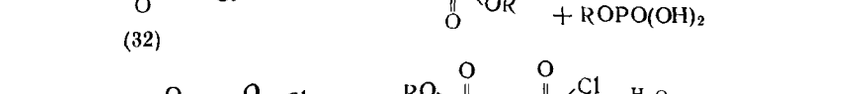
(29)



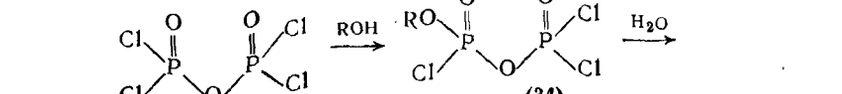
(30)



(31)



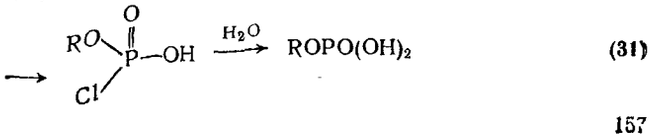
(32)



(33)

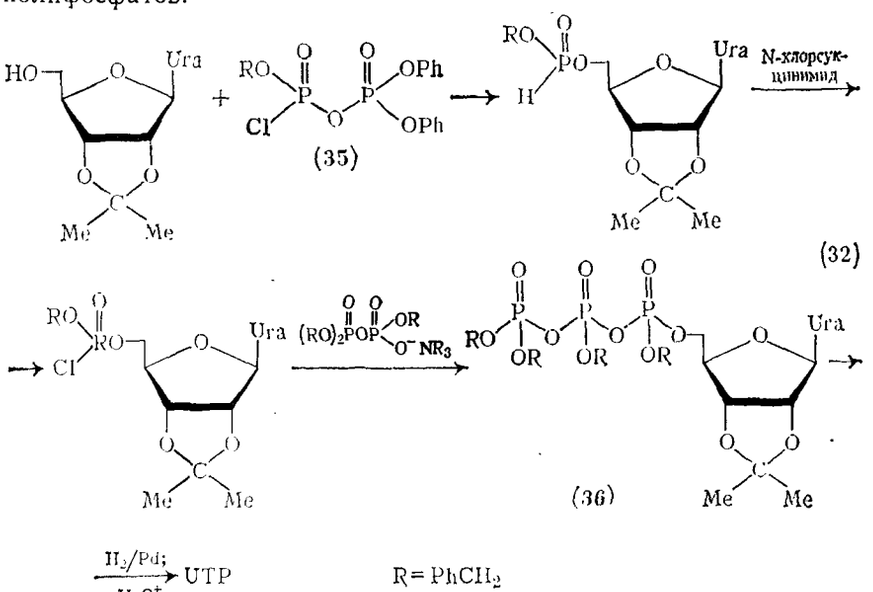


(34)



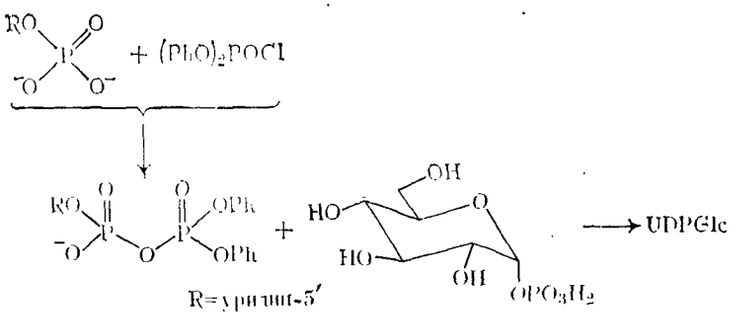
(31)

Для получения динуклеозидфосфатов и полифосфорных эфиров можно использовать и сложные хлорфосфаты, однако синтезы их обычно трудоемки, и этот метод был вытеснен карбодиимидным или фосфоамидным методами, которые ниже обсуждаются подробнее. Примером использования хлорфосфатного метода является синтез UTP [60]. Смешанный ангидрид (**35**), получаемый обработкой соли монобензилфосфита дифенилхлорфосфатом (**29**), является фосфонилирующим агентом и реагирует с 2′,3′-*O*-изопропилиденуридином, давая вторичный фосфит. Хлорирование последнего дает уридин-5′-бензилхлорфосфат, который далее реагирует с солью трибензилпирофосфорной кислоты, давая полностью этерифицированный нуклеозидтрифосфат (**36**) {схема (32)}. Гидрирование (**36**) приводит к UTP. Основной недостаток такого синтеза в том, что полностью этерифицированные интермедиаты, например (**36**), очень легко гидролизуются. Более того, несимметрично замещенные полифосфаты легко перегруппировываются в симметричные продукты, и оба эти фактора являются причиной низких выходов. Однако триэфиры пирофосфорной кислоты стабильнее тетраэфиров, и это различие в реакционной способности дало возможность разработать простой метод синтеза нуклеозидполифосфатов.




Дифенилхлорфосфат реагирует с солями нуклеотидов и другими фосфомоноэфирами, образуя триэфиры пирофосфорной кислоты. Эти триэфиры вступают в обменную реакцию со вторым фосфомоноэфиром, давая диэфир пирофосфорной кислоты и дифенилфосфат. С использованием этого подхода осуществлен синтез UDPGlc из UMP и α-*D*-глюкозо-1-фосфата {схема (33)} [61].

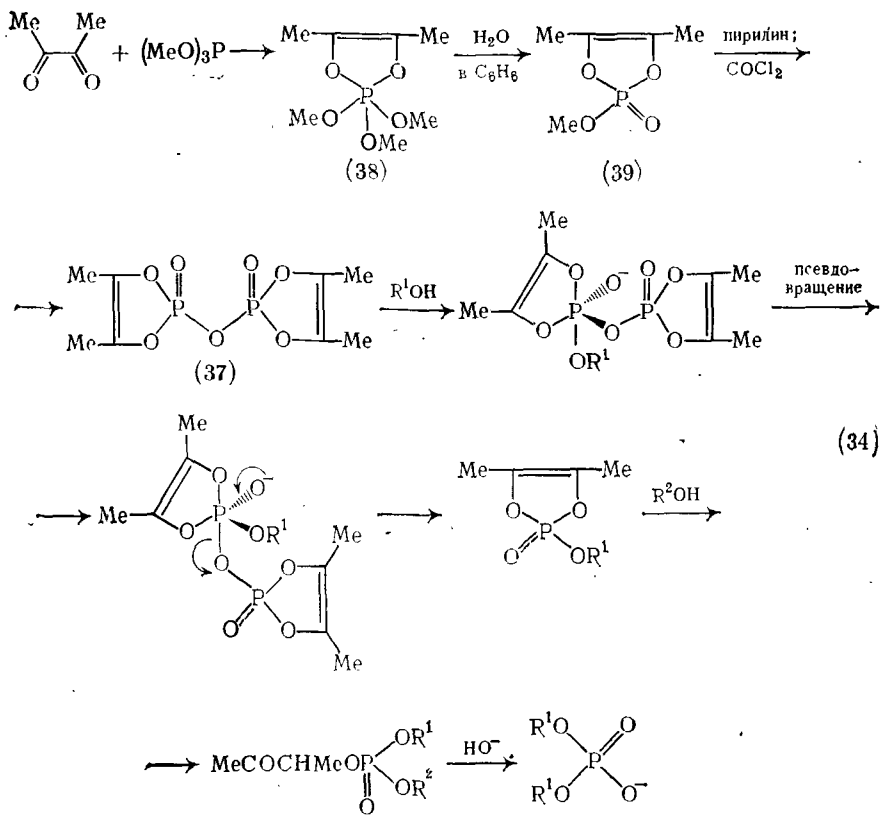





(33)

Тетрафенил- и тетракис(4-нитрофенил)пирофосфаты, которые можно легко приготовить из соответствующих фосфодиэфиров, являются мощными фосфорилирующими агентами и могут быть использованы для фосфорилирования спиртов. Ацетоин-ендиолциклопирофосфат (**37**) избирательно фосфорилирует первичные спирты в присутствии вторичных спиртов [49]. Этот реагент может быть получен из фосфорана (**38**) по схеме (34). Обработка диацетила триметилфосфитом дает (**38**), который гидролизовали в контролируемых условиях до метилацетоин-ендиолциклофосфата (**39**). Деметилирование (**39**) пиридином с последующей обработкой деметилированной соли фосгеном приводит к (**37**). Последовательная реакция (**37**) с двумя различными спиртами дает несимметричный фосфодиэфир (вероятными интермедиатами являются пятивалентные производные). Катализируемое гидроксид-ионом отщепление диметилацетоинового остатка от триэфира происходит по крайней мере в $10^6$ раз быстрее, чем гидролиз триметилфосфата. Поскольку реагент (**37**) был применен лишь для синтеза модельных фосфодиэфиров, предполагали, что его можно использовать для получения олигонуклеотидов [49]. Однако реагент (**37**), подобно всем тетраэфирам пирофосфорной кислоты, очень чувствителен к действию воды и может быть использован только в абсолютно безводных условиях. Это значительное неудобство в области нуклеотидов, где субстраты часто лишь с трудом растворяются в безводных растворителях.

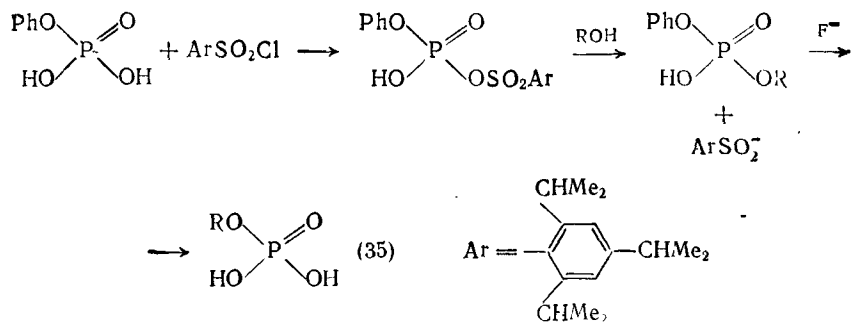
Аренсульфонилхлориды образуют с фосфомоноэфирами смешанные ангидриды, которые являются фосфорилирующими агентами, и эти смешанные ангидриды широко использовались Кораной и сотр. для получения олиго- и полинуклеотидов. Кульминацией этой работы явился синтез структурного гена аланиновой тРНК из дрожжей [62]. Недостаток метода в том, что сульфонилхлорид сульфонирует спиртовые группы и, следовательно, понижает выход желаемого продукта. Склонность агента к сульфонированию может быть преодолена, если использовать аренсульфонилгалогениды, несущие объемистые группы, например триизопропилбензсульфонилхлорид (ТПС), или если использовать сульфонилхлориды, иммобилизованные на инертном носителе. Динуклеозидфосфаты




можно получать без осложнений из подходящим образом защищенных мономерных звеньев с использованием аренсульфонилхлоридов. Эти реагенты использованы также для синтеза фосфолипидов. Более того, защищенные дезоксирибонуклеозиды можно подвергнуть блок-полимеризации в присутствии фенилфосфорной кислоты и ТПС, что приводит к образованию олигонуклеотидов с фосфотриэфирными связями. Фенильные группы можно удалять щелочным гидролизом и после удаления других защитных групп получать олигонуклеотиды [63]. Метод не пригоден для получения олигорибонуклеотидов, поскольку в ходе реакции с водным основанием будет происходить расщепление цепи. Однако фторид-ион удаляет фенильные группы фосфотриэфиров в условиях, когда межнуклеотидная связь остается стабильной, что может обеспечить возможность синтеза олигорибонуклеотидов этим методом {схема (35)} [64]. По-видимому, аренсульфонилтриазолы и -тетразолы могут служить прекрасными конденсирующими агентами в олигонуклеотидном синтезе [65].

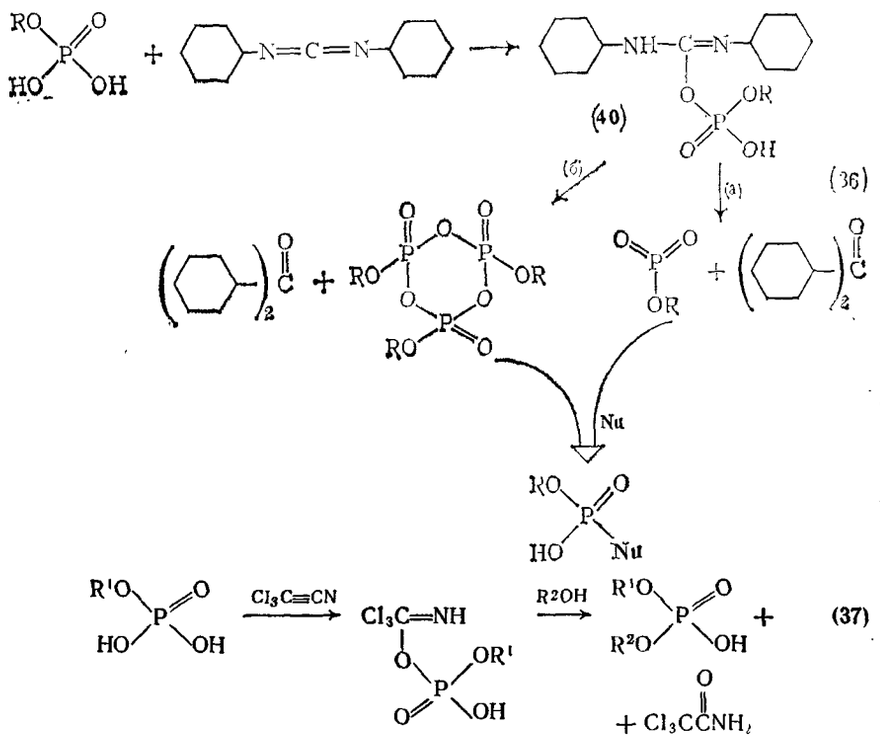
Как отмечалось выше, синтез олигонуклеотидов и нуклеозидполифосфатов с использованием фосфогалогенидов часто пред-





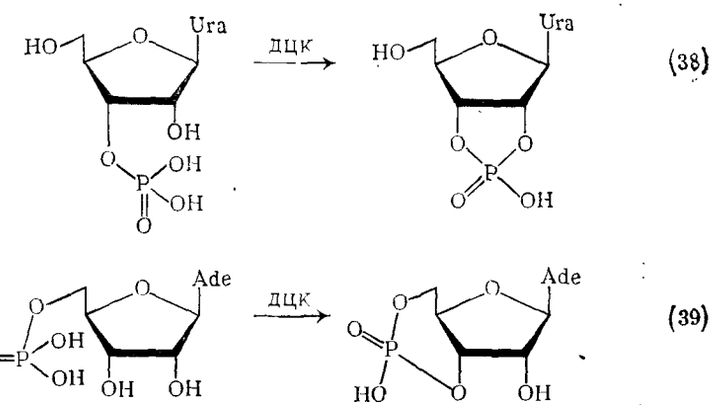

ставляет собой сложную синтетическую методику и выходы целевых продуктов часто низки из-за побочных обменных реакций и гидролиза полностью этерифицированных интермедиатов. Желательней прямая активация фосфорных кислот, так как это позволило бы уменьшить количество стадий в синтетической схеме. Одной из таких реакций является активация фосфорных кислот аренсульфонилхлоридами, но с другой стороны, для получения оптимальных выходов в этом случае из реакционной среды должна быть полностью исключена влага. Альтернативный метод прямой активации фосфорных кислот заключается в использовании карбодиимидов. Этот метод допускает присутствие заметных количеств воды. Нет необходимости в защите дополнительных кислотных групп фосфомоноэфира, и реакция конденсации быстро протекает при комнатной температуре. Если используют дициклогексилкарбодиимид (ДЦК), то продукт его гидратации (дициклогексилмочевина) очень плохо растворим в большинстве растворителей и может быть легко удален в конце синтеза [50]. Механизм образования эфиров фосфорной кислоты с помощью ДЦК все еще является предметом дискуссий. При обработке фосфорных кислот избытком ДЦК в безводных растворителях образуются, вероятно путем тримеризации мономерных метафосфатов, триметафосфаты [66]. С другой стороны, хотя на основании данных $^{31}$P-ЯМР-спектроскопии подтверждено [67] образование монометафосфатов нуклеозидов в процессе реакции между нуклеотидами и аренсульфонилхлоридами, при обработке нуклеотидов ДЦК в пиридине не наблюдалось ни моно-, ни триметафосфатов. Наблюдали сигналы, относящиеся к сложной смеси продуктов, включая сигналы, относящиеся к тризамещенному пирофосфату. При реакции ДЦК с фосфорной кислотой первоначально образуется имидоилфосфат (40) {схема (36)}. Однако необходимо еще однозначно установить, распадается ли он до мономерного метафосфата {путь (а)}, или же реагирует с дополнительным количеством фосфорной кислоты, давая эфиры полифосфатов {путь (б) на схеме}. Как отмечалось, конденсации с карбодиимидом в отличие от конденсаций с сульфонилгалогенидами могут протекать в присутствии заметных количеств воды. Отсюда следует, что высоко реакционноспособный

мономерный метафосфат не может являться интермедиатом в этих реакциях. Имидоилфосфаты являются фосфорилирующими агентами типа P—XYZ [52]; была исследована способность ряда систем генерировать имидоилфосфаты. Среди исследованных реагентов этого типа наиболее широкое применение получил трихлорацетонитрил [68], который не только быстро реагирует с фосфорными кислотами, но имеет также то преимущество по сравнению с ДЦК, что образует летучий продукт гидратации (хлорацетамид) {схема (37)}.



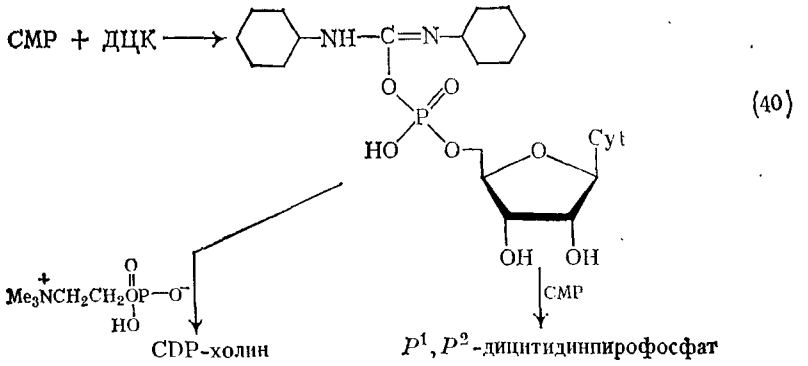

Несмотря на неясность механизма реакции фосфорилирования, легкость использования ДЦК привела к тому, что он был применен для синтеза многих фосфодиэфиров и олигонуклеотидов [50]. Карбодиимиды являются также ценными реагентами для получения внутримолекулярных фосфодиэфиров. Так, рибонуклеозид-2′(3′)-фосфаты в разбавленных растворах превращаются в 2′,3′-циклофосфаты, в то время как нуклеозид-5′-фосфаты, например AMP, превращаются в 3′,5′-циклофосфаты, например cAMP {схемы (38), (39)}.

С использованием ДЦК можно получать нуклеозидполифосфаты. Однако если в реакцию с карбодиимидом вводятся две разные фосфорные кислоты, происходит образование в произвольном соотношении двух симметричных и одного несимметричного продукта, что ведет к снижению выходов. Более того, когда одним из реагирующих компонентов является ортофосфорная кислота, могут образовываться полимерные продукты, например нуклеозидтри- и -тетрафосфаты, что также снижает выходы. В результате произошло активное вытеснение карбодиимидов другими более

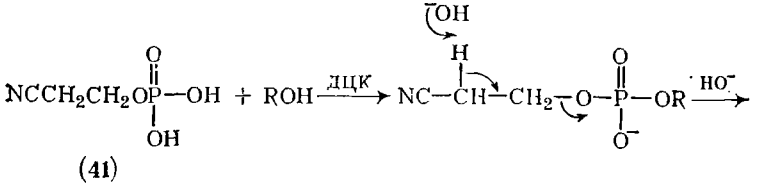



специфичными реагентами для синтеза пирофосфатов, например фосфорамидами. В отдельных случаях асимметричные $P^1,P^2$-диэфиры пирофосфорной кислоты можно получать с удовлетворительными выходами. В противоположность синтезу UDPGlc карбодиимидным методом, при котором получены очень низкие выходы продукта, цитидиндифосфатхолин может быть получен этим методом с удовлетворительным выходом, и при этом не образуется $P^1,P^2$-дихолинпирофосфат [69]. В условиях конденсации холинфосфат является цвиттерионом и, следовательно, — более сильной кислотой, чем CMP. Поэтому холинфосфат является менее активным нуклеофилом для атаки углеродного атома и CMP присоединяется к ДЦК, испытывая незначительную конкуренцию со стороны холинфосфата. Поскольку фосфорильные группы являются хорошими нуклеофилами для атаки по атому фосфора, то различие в реакционной способности холинфосфата или CMP по отношению к имидоилфосфату (или продуктам его реакции) мало, и на второй стадии реакции образуются как CDP-холин, так и $P^1,P^2$-дицитидинпирофосфат {схема (40)}.

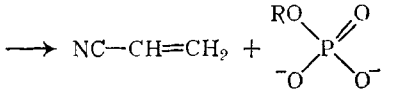
2-Цианоэтилфосфат (**41**) — более удобный реагент для фосфорилирования спиртов с участием ДЦК, чем ортофосфорная кислота {схема (41)} [70]. При использовании (**41**) образуется фосфодиэфир, который не реагирует далее с образованием полифосфатов. 2-Цианоэтильную группу можно удалить, когда это требуется, щелочным гидролизом. Другой класс щелочнолабильных защитных групп для фосфатов образуют S-замещенные 2-меркаптоэтанолы (**42**). Последние можно окислить в мягких условиях




(40)

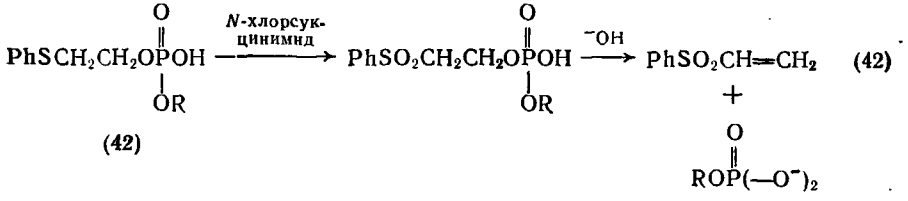


(41)



(41)

до сульфонов, а сульфоны легко удаляются щелочным гидролизом {схема (42)} [71].

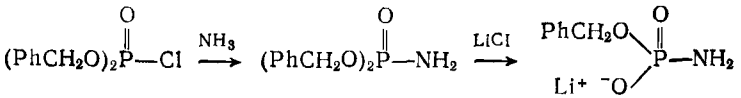


(42)

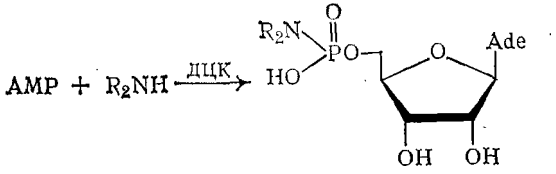
Некоторые фосфорорганические соединения, содержащие связь P—N, могут действовать как фосфорилирующие агенты и избирательно реагируют с фосфорильными группами, давая полифосфаты. Наиболее полезными для синтеза реагентами этого класса являются амидофосфорная кислота и ее производные, и ранее уже отмечалось участие *N*-фосфолизинового остатка в ряде реакций, катализируемых ДНК-лигазой. Диэфиры амидофосфорной кислоты легкодоступны, они могут быть получены с высоким выходом, например обработкой диэфира хлорофосфорной кислоты амином. Однако они являются плохими фосфорилирующими агентами. Избирательная деэтерификация диэфиров амидофосфорной кислоты, например дебензилирование дибензилового эфира хлоридом лития, приводит к моноэфирам, которые являются потенциальными фосфорилирующими агентами {схема (43)}. Удобнее получать моноэфиры амидофосфатов реакцией между ДЦК, фосфомоноэфиром



(нуклеотидом) и амином {схема (44)} [72], что особенно нашло применение для получения нуклеозидфосфорамидов.

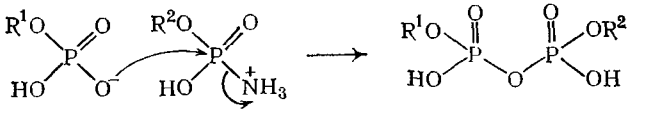


(43)

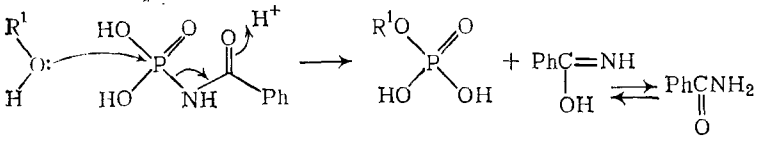


(44)

При нагревании моноэфира амидофосфорной кислоты с фосфатами происходит образование пирофосфата; реакция следует кинетике второго порядка {схема (45)} [73]. Этот факт, а также известная избирательность взаимодействия моноэфиров амидофосфатов в большей степени с фосфорильными группами, чем со спиртовыми, дает основания полагать, что фосфорильный перенос с амидофосфатов происходит предпочтительнее в результате реакции прямого замещения, а не по пути, включающему образование мономерных метафосфатов. Природа уходящего амина играет важную роль, определяя скорость фосфорильного переноса. Например, монофенилфосфат реагирует почти количественно с аденозин-5′-фосфопиперидином в пиридине в течение 1 ч при комнатной температуре, в то время как фосфоамид, полученный из более слабого основания аденозин-5′-фосфоанизидина реагирует в тех же условиях менее чем на 10% [72].



(45)

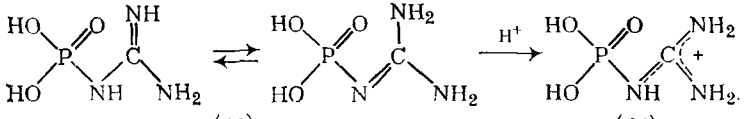


(46)

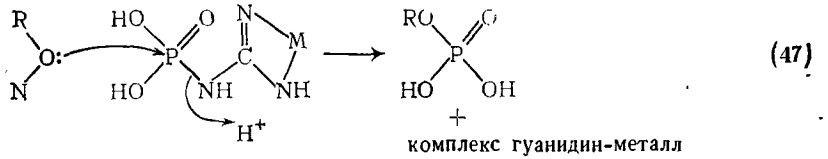
Нуклеозидфосфоморфолиды обладают преимуществами с точки зрения их реакционной способности и растворимости в органических растворителях и являются наилучшими реагентами для синтеза несимметричных пирофосфатов, таких как NAD⁺, FAD, кофермент А и нуклеозиддифосфаты сахаров [51]. Они интенсивно применялись также для синтеза нуклеозидди- и -трифосфатов, содержащих природные или нетипичные основания, например для синтеза 5-хлорцитидиндифосфата [74].

В противоположность амидофосфорным кислотам, получаемым из простых аминов, *N*-ациламидофосфаты способны фосфорилиро-

вать спирты в нейтральных условиях с высокими выходами {схема (46)} [75]. Вероятно, ацилирование атома азота понижает вклад $p_\pi$—$d_\pi$ в связь P—N и, как следствие этого, повышает реакционную способность амидофосфата. Фосфогуанидины (43) гораздо стабильнее амидофосфатов. Они устойчивы к гидролизу и не реагируют как фосфорилирующие агенты в тех условиях, в которых амидофосфаты легко участвуют в переносе фосфорила. Это заметное различие в реакционной способности может быть приписано различию в природе связи P—N этих двух классов соединений. У фосфогуанидинов $p_\pi$—$d_\pi$-связывание существенно не ослабляется при протонировании, поскольку формальный положительный заряд может быть распределен по всему гуанидиновому остатку (44). Если электроны оттягиваются с гуанидинового остатка либо в результате ацилирования, либо при образовании комплексов с металлами, то $p_\pi$—$d_\pi$-вклад в связь P—N существенно понижается, и тогда возможен фосфорильный перенос {схема (47)} [52].



(43) (44)

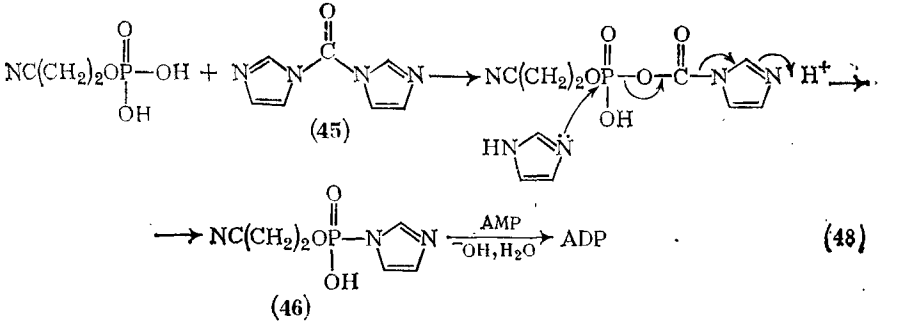


(47)

комплекс гуанидин-металл

Фосфоимидазолиды более реакционноспособны, чем простые фосфамиды, и могут фосфорилировать спирты, амины и фосфорные кислоты [76]. *N,N*-Карбонилдиимидазол (45) энергично реагирует с фосфомоноэфирами, такими как AMP, давая фосфоимидазолиды. На основе этой реакции разработан простой способ получения нуклеозиддифосфатов [77]. 2-Цианоэтилфосфоимидазолид (46), который может быть получен из (41) и (45), предложено использовать [78] для синтеза $\alpha$-$^{32}$P-меченных нуклеозиддифосфатов с высокой удельной радиоактивностью {схема (48)}.

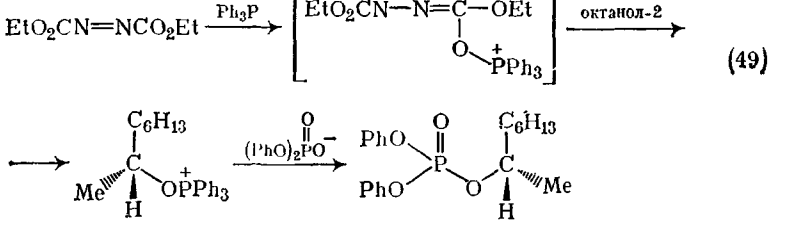
В подавляющем большинстве реакций фосфорилирования, проводившихся в области нуклеотидов, углеводов и фосфолипидов, использованы четыре отмеченных класса реагентов, а именно: аренсульфонилхлориды, карбодиимиды, фосфохлориды или тетраэфиры пирофосфатов и амидофосфаты. Однако на протяжении последних десятилетий значительные усилия были затрачены на разработку других простых избирательных фосфорилирующих агентов, для реакции которых требуется минимальная или не требуется вовсе защита обрабатываемого субстрата. Объем этой главы не позволяет детально обсудить все эти реагенты, поэтому ниже будут отмечены лишь некоторые перспективные из них.



(45) (46)

(48)

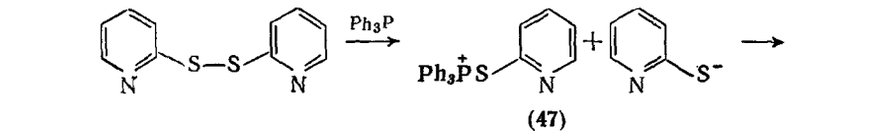
Избирательное фосфорилирование объемным фосфорилирующим агентом 5′-гидроксильной группы нуклеозида уже отмечалось. Другой фосфорилирующий агент, позволяющий использовать стерические препятствия для проявления избирательности, получают смешением трифенилфосфина, диэтилазодикарбоксилата и фосфодиэфира [79]. Эта смесь избирательно фосфорилирует незамещенные нуклеозиды, давая 5′-нуклеотиды, а также фосфорилирует октанол-2 с обращением конфигурации при C-2 {схема (49)} [80]. Это позволяет предположить, что конечной стадией реакции является $S_N2$-замещение трифенилфосфина в фосфороксифосфониевом ионе.



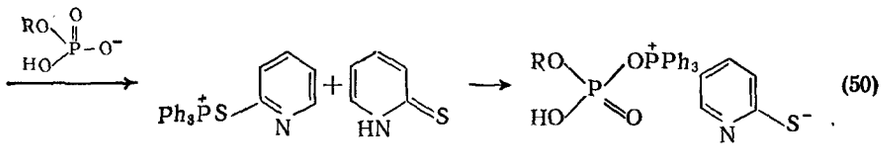
(49)

Как иллюстрировалось выше, синтез нуклеотидов и олигонуклеотидов можно проводить в отсутствие кислот или оснований с использованием реакций окислительно-восстановительной конденсации [81]. Смесь трифенилфосфина и ди(пиридил-2)дисульфида может действовать как конденсирующий агент в синтезе олигонуклеотидов. Реакция сопровождается образованием трифенилфосфиноксида и 2 экв. пиридинтиона-2. Эти реагенты превращают также нуклеозид-2′(3′)- и -5′-фосфаты в соответствующие циклические фосфодиэфиры. Постулировано, что взаимодействие между трифенилфосфином и дисульфидом приводит к образованию фосфониевой соли (47), которая далее реагирует с фосфоноэфиром, давая фосфороксифосфониевую соль (48) {схема (50)}. Реакции

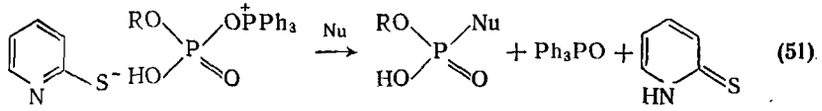
фосфорилирования, промотируемые фосфониевыми и карбониевыми ионами, хорошо известны [82], и, следовательно, соединение (48) должно быть потенциальным фосфорилирующим агентом {схема (51)}, Таким путем, который, как кажется, таит значительные синтетические возможности, получены сложные молекулы, такие как кофермент А.



(47)

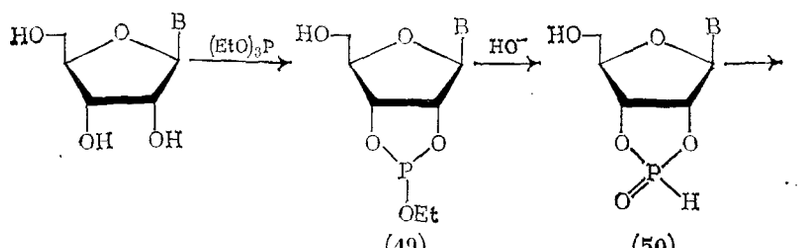


(48) (50)

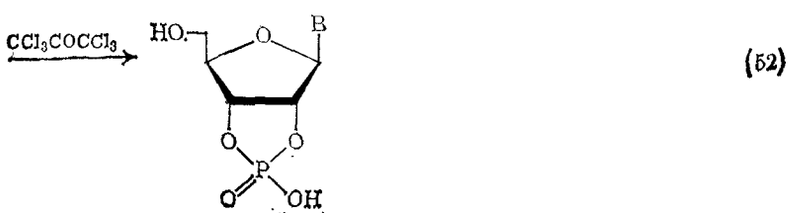


(48) (51)

При взаимодействии с триалкилфосфитами нуклеозиды могут претерпевать переэтерификацию, что приводит к эфирам 2′,3′-*O*-циклофосфитов (49), которые можно дезалкилировать до циклических фосфонитов (50). Окисление последних гексахлорацетоном приводит к нуклеозид-2′,3′-циклофосфатам {схема (52)} [83]. В ходе дезалкилирования может происходить частичное раскрытие цикла циклических фосфонитов, и в итоге в ходе стадии окисления



(49) (50).

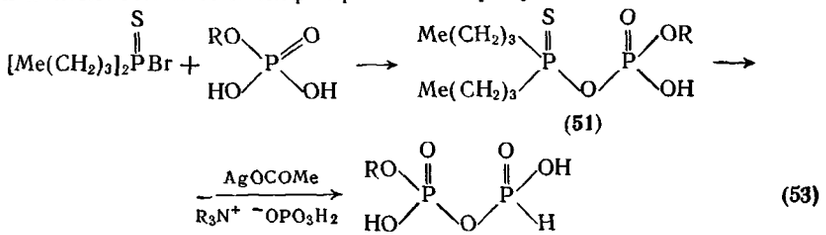


(52)



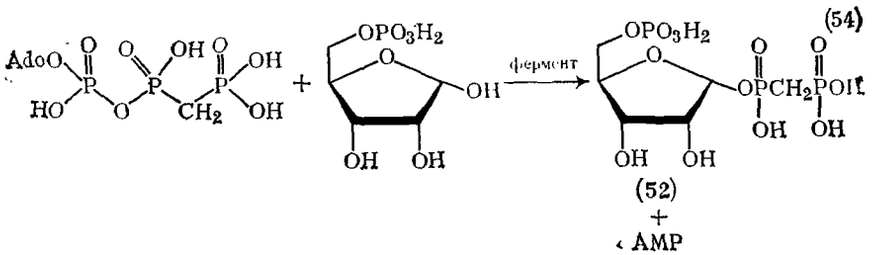
образуются нуклеозид-2′(3′)-фосфаты. Это одно из наиболее успешных применений окисления фосфитов в синтезе нуклеотидов.

Ангидриды нуклеозид-5′-фосфорной и ди-*н*-бутилтиофосфиновой кислот (51), которые количественно образуются при реакции между нуклеотидами и ди-*н*-бутилтиофосфинбромидом, легко выделяются в виде стабильных твердых веществ [84]. Поскольку эти ангидриды быстро не гидролизуются водой, они активируются окислительными агентами, такими как ацетат серебра, и в присутствии солей орто- или пирофосфорной кислот дают ADP, ATP и т. д. с отличными выходами {схема (53)}. Большое преимущество этого синтетического пути получения нуклеозидполифосфатов состоит в том, что нет необходимости в защите спиртовых функций и нежелательные полифосфаты не образуются.



(51) (53)

Для изучения механизма действия ферментов интенсивно использовались модифицированные нуклеотиды, у которых атом кислорода фосфорного остатка был заменен на серу, азот или атом углерода. Особенно широкое применение нашли нуклеозидтиофосфаты [85]. Исследования механизма рибонуклеазного гидролиза с помощью уридин-2′,3′-циклотиофосфата уже упоминались ранее в этой главе. Применение аналогов ATP с метиленовыми группами вместо атомов кислорода, между α,β- или между β,γ-атомами фосфора может давать информацию о переносе фосфорила или нуклеотидила в биологических системах. Например, 5-фосфорибозо-1-метилендифосфонат (52) выделен в результате реакции между рибозо-5-фосфатом и 5′-аденилилметилендифосфонатом, которая катализируется 5-*фосфорибозилпирофосфатсинтетазой* из клеток асцитной опухоли Эрлиха {схема (54)} [86]. Этот факт подтверждает отмеченное ранее в этой главе наблюдение, что в этой ферментативной реакции пирофосфорильный остаток переносится в одну стадию.

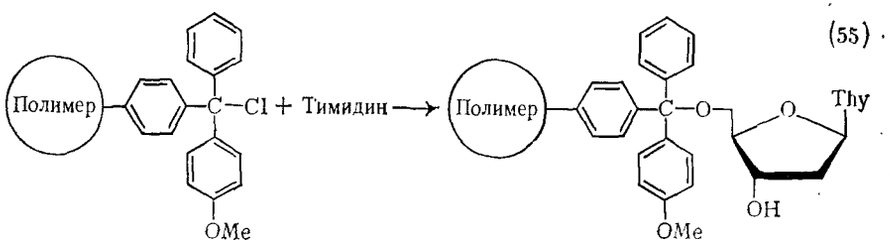


(54)

(52) + AMP

Получены полинуклеотиды и нуклеозидтрифосфаты, содержащие фосфамидные связи [87], но они не нашли применения для изучения механизма действия ферментов из-за лабильности связи P—N в мягких кислотных условиях.

Химический синтез полимеров с заданной последовательностью мономерных звеньев может быть очень сильно облегчен присоединением одного конца растущей полимерной цепи к нерастворимой подложке. При этом очистка полимера после каждой стадии химической реакции может легко достигаться фильтрованием. Этот метод был очень популярен в области пептидов, при этом повторяющиеся стадии могут быть автоматизированы [88]. Твердофазный синтез полинуклеотидов не был столь успешен, как твердофазный синтез полипептидов, в основном из-за трудностей в достижении количественных выходов на последовательных стадиях синтеза. Наиболее полезными реагентами для создания межнуклеотидной связи являются аренсульфонилхлориды, хотя для достижения максимальных выходов необходимо обеспечение безводных условий. Полистирол и сшитые стирол-дивинилбензольные сополимеры, содержащие остатки 4-метокситритилхлорида, были использованы для присоединения первого нуклеозида, через его 5′-гидроксильную группу к твердой подложке {схема (55)}.




(55)

Затем последовательно присоединяют дополнительные защищенные нуклеотиды, применяя аренсульфонилхлориды или ДЦК, и в конце реакции снимают полимер с подложки действием кислоты [89]. Другой подложкой, к которой «пришивали» по 5′-гидроксильным группам нуклеозиды, для проведения твердофазного синтеза является сукцинилированный полистирол [90]. В этом случае олигонуклеотид удаляли с подложки щелочным гидролизом. В качестве нерастворимых подложек в полинуклеотидном синтезе с удовлетворительным успехом были испытаны силикагель, Сефадекс LH 20 и полиэтиленгликоль [91]. Представлены доказательства того, что для реакций, протекающих на твердых подложках, необходимо кооперативное взаимодействие, как минимум, трех фосфорильных остатков, прежде чем произойдет индуцируемое карбодиимидом фосфорилирование [92]. Аналогичное взаимодействие трех или более фосфорильных остатков также кажется необходимым в твердофазных реакциях, промотируемых аренсульфонилхлоридами. Это является доказательством большей степени участия полифосфатов, а не мономерных метафосфатов в этих реакциях фосфорилирования.



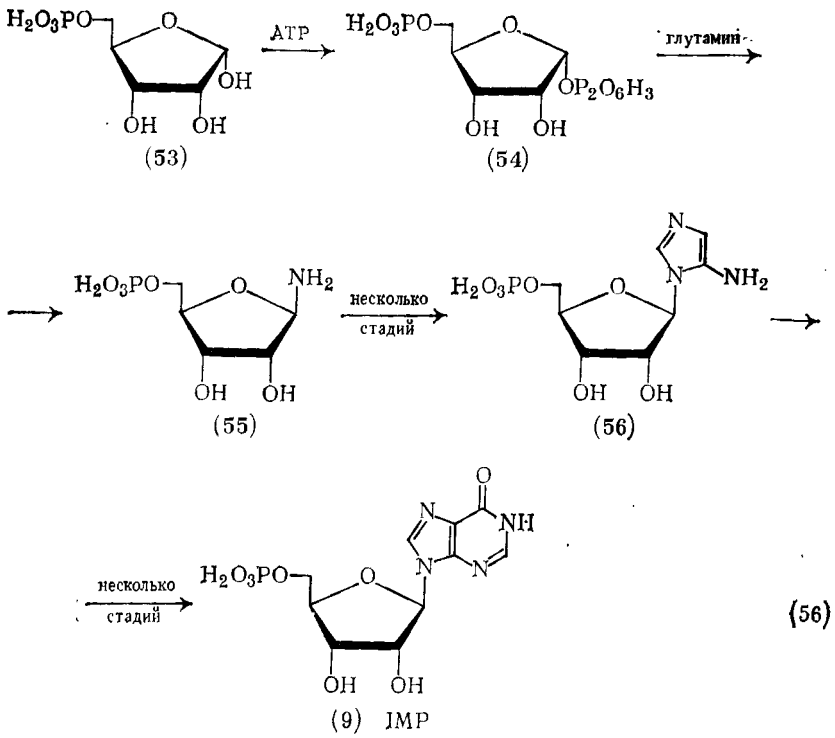
Как примечание к разделу, посвященному синтезу нуклеотидов, необходимо упомянуть простой ферментативный метод. Неочищенная фосфотрансфераза, полученная гомогенизацией проростков пшеницы, использует 4-нитрофенилфосфат в качестве фосфорильного донора для избирательного фосфорилирования 5′-положения нуклеотидов с практически количественным выходом за несколько часов [93]. Реакция может быть проведена в большом масштабе, и нет необходимости защищать другие реакционноспособные группы.

### 22.3.4. БИОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

Как уже обсуждалось ранее в этой главе, химический синтез нуклеотидов обычно осуществляют фосфорилированием подходящим образом защищенных нуклеозидов [101]. Это привело к тому, что значительные усилия были затрачены на поиск защитных групп для гидроксильной [94] и экзоциклической аминофункций [95]. В живых организмах главные пути, приводящие к образованию как пуриновых, так и пиримидиновых нуклеотидов, начинаются с фосфорилированного сахара, рибозо-5-фосфата (**53**). В печени голубя биосинтез пуриновых нуклеотидов происходит следующим образом [96]. Пирофосфорилирование (**53**) с помощью ATP приводит к 5-фосфорибозо-1-пирофосфату (**54**), который далее ферментативно аминируется с помощью глутамина до β-*D*-1-аминорибозофосфата-5 (**55**). Затем в несколько стадий синтезируется имидазольный цикл пурина. Кульминацией является образование 1-β-*D*-рибофуранозил-5-аминоимидазолфосфата-5′ (**56**). Затем на основе имидазольного цикла строится пиримидиновое кольцо, что приводит к получению инозин-5′-фосфата (**9**, IMP) {схема (56)}, который является предшественником как AMP, так и GMP. Аминирование IMP ферментом, который берет аминогруппу от аспарагиновой кислоты, приводит к AMP {схема (57)}, тогда как ферментативное окисление IMP до ксантозин-5′-фосфата с последующим аминированием положения 2 с помощью фермента, который нуждается в глутамине, приводит к GMP {схема (58)}.

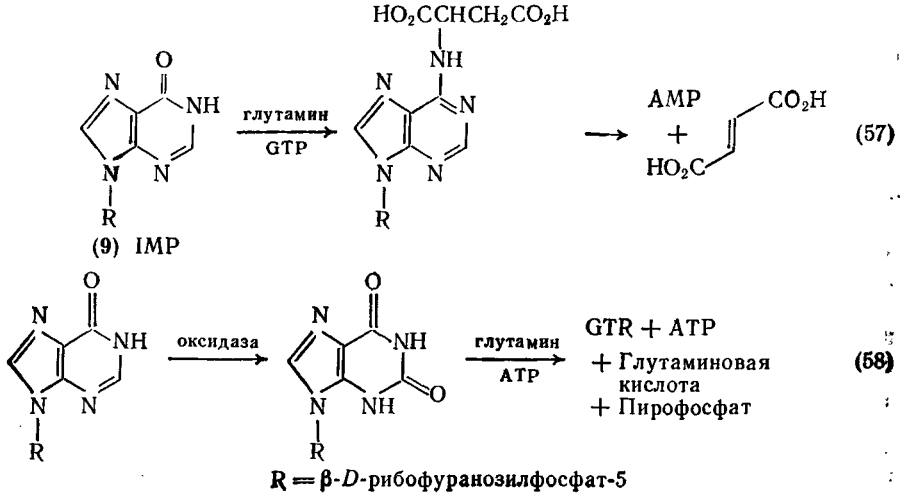
Как AMP, так и GMP могут фосфорилироваться соответствующими киназами до ATP и GTP, которые далее могут использоваться в синтезе нуклеиновых кислот и коферментов. Нарушение описанного выше пути, например в результате обработки лекарственными препаратами, может подавить природные контролирующие системы; в этом случае начинает играть важную роль биосинтез пуриновых нуклеотидов из ранее образованных пуринов [97].

Оротидин (**57**) и его 5′-фосфат являются ключевыми интермедиатами в биосинтезе пиримидинов [98]. Пиримидиновое кольцо в (**57**) синтезируется ферментативно из карбамилфосфата и



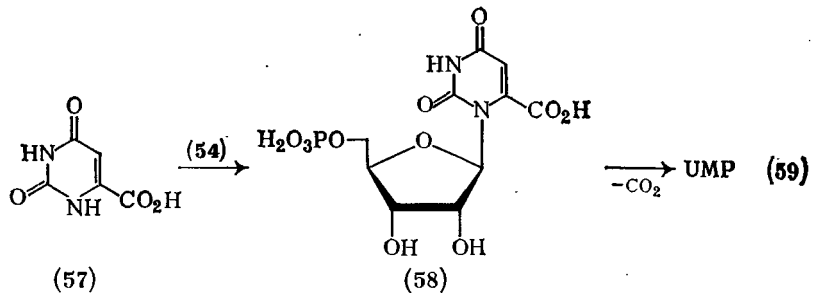

(53) (54) (55) (56) (9) IMP (56)

аспарагиновой кислоты. Гликозидная связь (58) образуется в результате реакции оротидина (57) с (54) в присутствии оротидин-5′-фосфатпирофосфорилазы {схема (59)}. Декарбоксилирование (58) приводит к UMP. После фосфорилирования UMP до UTP




(9) IMP (57) (58)





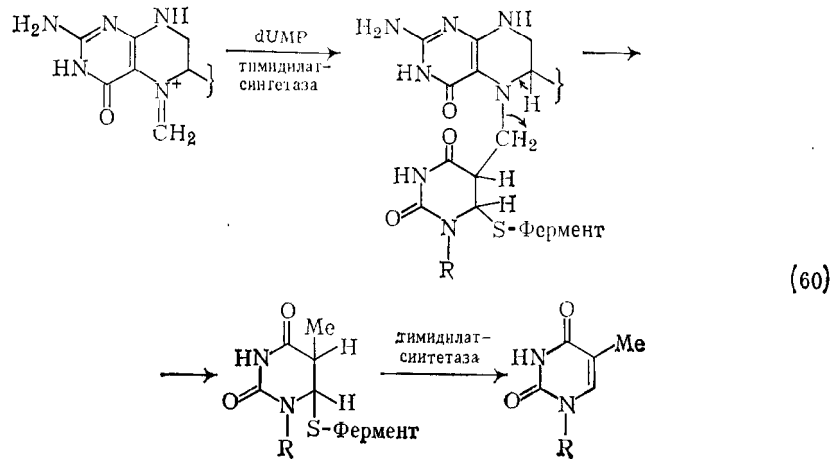

(57) (58) (59)

соответствующей киназой может происходить аминирование пиримидинового кольца, приводящее к образованию CTP. Обнаружены два различных фермента, способные осуществлять этот процесс. В бактериях источником азота является аммиак, в то время как у животных используется азот, получаемый из глутамина.

Независимые ферментативные системы могут восстанавливать углеводные остатки в рибонуклеозидди- и -трифосфатах до соответствующих 2′-дезоксинуклеотидов [99]. Рибонуклеозиддифосфаты восстанавливаются негемовыми железосодержащими редуктазами, в то время как на уровне трифосфатов действуют аденозил-кобаламин-зависимые редуктазы. Однако в целом процесс восстановления, осуществляемый этими двумя классами ферментов, очень схож. Во всех случаях основным восстановителем является NADPH и перенос водорода происходит в процессе окисления восстановленного тиоредоксина, серусодержащего белка. Более того, во всех случаях 2′-гидроксильная группа замещается с сохранением конфигурации.

Тетрагидрофолат + $CH_2O$ ⇄ $N^5,N^{10}$-Метилентетрагидрофолат + $H_2O$

$N^5,N^{10}$-Метилентетрагидрофолат + dUMP ⇄ dTMP + Дигидрофолат




(60)

Гидролиз dUTP до dUMP может сопровождаться превращением последнего в dTMP до синтеза dTTP и включения тимина в ДНК. Замещение атома водорода при С-5 урацильного кольца в dUMP на метильную группу катализируется тимидилатсинтетазой, ферментом, которому необходим в качестве кофактора тетрагидрофолат [100]. dUMP, тимидилатсинтетаза и формилированный тетрагидрофолат образуют тройной комплекс. Последующий внутримолекулярный перенос водорода и отщепление тимидилатсинтетазы от конечного продукта приводит к dTMP {схема (60), R = β-*D*-2-дезоксирибофуранозилфосфат}.

В тРНК обнаружен ряд нуклеотидов, содержащих модифицированные основания. Кажется, что это происходит в результате модификации оснований в предшественнике тРНК. Модификация происходит на макромолекулярном уровне и конформация предшественника тРНК оказывает влияние на то, какие основания подвергаются модификации.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *G. R. Wyatt*, in «The Nucleic Acids», ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, 1955, vol. 1, p. 243.
2. *H. K. Mangold*, in «Thin Layer Chromatography», ed. E. Stahl, Springer Verlag, Berlin, 1965, p. 440.
3. *E. Heftmann*, «Chromatography», Reinhold, New York, 1961, p. 554.
4. *S. R. Ayad*, «Techniques of Nucleic Acid Fractionation», Wiley-Interscience, London, 1972, p. 64.

4a. «Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology", 2nd edn., ed. H. A. Sober, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970.

5. *J. L. Wiebers and J. A. Shapiro*, Biochemistry, 1977, **16**, 1044; *D. R. Burgard, S. P. Perone and J. L. Wiebers*, Ibid., 1977, **16**, 1051.
6. *P. A. Levene and L. W. Bass*, «Nucleic Acids», A. C. S. Monograph No. 56, Reinhold, New York, 1931.
7. *D. W. Hutchinson*, «Nucleotides and Coenzymes», Methuen, London, 1964.
8. *J. W. Cornforth*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1969, **23**, 125.
9. *M. Akhtar and D. C. Wilton*, Ann. Rep. Chem. Soc. (B), 1973, **70**, 98.
10. *H. Nikaido and W. Z. Hassid*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1971, **26**, 351.
11. *P. Goldman and P. R. Vagelos*, in «Comprehensive Biochemistry», ed. M. Florkin and E. H. Stolz, Elsevier, Amsterdam, 1964, vol. 15, p. 71.
12. *H. C. Dunathan*, Adv. Enzymol., 1971, **35**, 79.
13. *L. O. Krampitz*, «Thiamin Diphosphate and Its Catalytic Functions», Dekker, New York, 1970.
14. *A. M. Michelson*, «The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides», Academic Press, London, 1963, p. 98 (*А. М. Михельсон.* Химия нуклеозидов и нуклеотидов. — Пер. с англ. М., Мир, 1968).
15. *M. Cashel and B. Kalbacher*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 2309.
16. *J. Sy and F. Lipmann*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, **70**, 306.
17. P. O. P. Ts'o, in «Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids», ed. G. D. Fasman and S. N. Timasheff, Dekker, New York, 1970, p. 49.
18. *G. A. Jeffrey and M. Sundaralingam*, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., 1976, 32, 353.
19. *C. D. Barry, J. A. Glasel, A. C. T. North, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, **47**, 166
20. *O. Kennard, N. W. Isaacs, J. C. Coppola, A. J. Kirby, S. G. Warren, W. D. S. Motherwell, D. G Watson, D. L. Wampler, D. H. Chenery, A. C. Larson, K. A. Kerr, and L. R. di Sanseverino*, Nature, 1970, **225**, 333.
21. *M. Cohn and T. R. Hughes*. Jr., J. Biol. Chem., 1962, **237**, 176.
22. *J. R. Cox, Jr., and O. B. Ramsay*, Chem. Rev., 1964, **64**, 317.
23. *F. H. Westheimer*, Accounts Chem. Res., 1968, **1**, 70.
24. *I. Ugi, D. Marquarding, H. Klusacek, P. Gillespie, and F. Ramirez*, Accounts Chem. Res., 1971, 4, 288.
25. *G. L. Eichorn*, in «Inorganic Biochemistry», ed. G. L. Eichorn, Elsevier, Amsterdam, 1973, vol. 2, p. 1210
26. *F. M. Richards and H. W. Wyckoff*, in «The Enzymes», ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, 3rd edn., vol. 4, p. 647.
27. *A. Deavin, A. P. Mathias, and B. R. Rabin*, Nature, 1966, **211**, 252.
28. *D. A. Usher, D. I Richardson, Jr., and F. Eckstein*, Nature, 1970, **228**, 663.
29. *T. Uchida and F. Egami*, in «The Enzymes», ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, 3rd edn., vol. 4, p. 205.
30. *F. Eckstein, H. H. Schulz, H. Rüterjans, W. Haar, and W. Maurer*, Biochemistry, 1972, **11**, 3507.
31. *C. B. Anfinsen, P. Cuatrecasas, and H. Taniuchi*, in «The Enzymes», ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, 3rd edn., vol. 4, p. 177.
32. *B. M. Dunn, C. DiBello, and C. B. Anfinsen*, J. Biol. Chem., 1973, **248**, 4769.
33. *T. Godefroy-Colburn and M. Grunberg-Manago*, in «The Enzymes», ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1972, 3rd edn., vol. 7, p. 533.
34. *K. Burton*, in «Methods in Enzymology», ed. L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, New York, 1967, vol. 12A, p. 222.
35. *M. Uziel*, Biochemistry, 1973, **12**, 938.
36. *F. Lipmann*, Adv. Enzymol., 1941, **1**, 99.
37. *E. R. Stadtman*, in «The Enzymes», ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1973, 3rd edn., vol. 8, p. 1.
38. *B. E. C. Banks and C. A. Vernon*, J. Theoret. Biol., 1970, **29**, 301.
39. *T.-D. Son, M. Roux, and M. E. Ellenberger*, Nucleic Acids Res., 1975, **2**, 1101.
40. *A. S. Mildvan and C. M. Grisham*, Structure and Bonding, 1974, **20**, 1.

40a. *M. Dixon and E. C. Webb*, «The Enzymes», Longmans, London, 1964, 2nd edn.

41. *P. E. Amsler and H. Sigel*, European J. Biochem., 1976, **63**, 569.
42. *D. S. Sigman, G. M. Wahl, and D. J. Creighton*, Biochemistry, 1972, **11**, 2236.
43. *I. R. Lehman*, Science, 1974, **186**, 790.
44. *G. A. Robinson, R. W. Butcher, and E. W. Sutherland*, «Cyclic AMP», Academic Press, New York, 1971.
45. *T. Braun and L. Birnbaumer*, in: «Comprehensive Biochemistry», ed. M. Florkin and E. H. Stolz, Elsevier, Amsterdam, 1975, vol. 25, p. 65.
46. *I. Pastan and R. L. Perlman*, Nature New Biology, 1971, **229**, 5.
47. *D. P. N. Satchell*, Quart. Rev. Chem. Soc., 1963, **17**, 160; *D. P. N. Satchell*, Chem. and Ind. (London), 1974, 683.
48. *C. H. Clapp, A. Satterthwait, and F. H. Westheimer*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 6873.
49. *F. Ramirez*, Synthesis, 1974, 90; *F. Ramirez, J. F. Marecek, and I. Ugi*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3809.
50. *H. G. Khorana*, «Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest», Wiley, New York, 1961.
51. *D. M. Brown*, in «Advances in Organic Chemistry: Methods and Results», ed. R. A. Raphael, E. C. Taylor, and H. Wynberg, Interscience, New York, 1963, vol. 3, p. 75.
52. *V. M. Clark and D. W. Hutchinson*, in «Progress in Organic Chemistry», ed. Sir James Cook and W. Carruthers, Butterworths, London, 1968, vol. 7, p. 75.
53. *M. Yoshikawa, T. Kato, and T. Takenishi*, Tetrahedron Letters, 1967, 5065; F. Eckstein, M. Goumet, and R. Wetzel, Nucleic Acids Res., 1975, **2**, 1771.

54. *M. Rubinstein, B Amit, and A. Patchornik*, Tetrahedron Letters, 1975, 1445.
55. *J. Hes and M. P. Mertes*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 3767.
56. *W. S. Zielinski and J. Smrt*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1974, **39**, 2483.
57. *F. Eckstein and K. H. Scheit*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1967, **6**, 362.
58. *T. A. Khwaja, C. B. Reese, and J. C. M. Stewart*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 2092; T. A. Khwaja and C. B. Reese, Tetrahedron, 1971, **27**, 6189.
59. *K.-I. Imai, S. Fujii, K. Takanohashi, Y. Furukawa, T. Masuda, and M. Honjo*, J. Org. Chem., 1969, **34**, 1547.
60. *G. W. Kenner, A. R. Todd, R. F. Webb, and F. J. Weymouth*, J. Chem. Soc., 1954, 2288.
61. *A. M. Michelson*, Chem. and Ind. (London), 1960, 1267.
62. *H. G. Khorana, K L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, N. K. Gupta, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. RajBhandary, J. H. van de Sande, V. Sgaramella, T. Terao, H. Weber, and T. Yamada*, J. Mol. Biol., 1972, **72**, 209.
63. *R. Arentzen and C. B. Reese*, J. C. S. Perkin I, 1977, 445.
64. *K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, and D. W. Entwistle*, Tetrahedron Letters, 1976, 1255.
65. *N. Katagiri, K. Itakura, and S. A. Narang*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 7332; J. Stawinski, T. Hozumi, and S. A. Narang, Canad. J. Chem., 1976, **54**, 670.
66. *G. Weimann and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 4329.
67. *D. G. Knorre and V. F. Zarytova*, Nucleic Acids Res., 1976, **3**, 2709.
68. *F. Cramer and G. Weimann*, Chem. Ber., 1961, **94**, 996.
69. *E. P. Kennedy*, J. Biol. Chem., 1956, **222**, 185.
70. *G. M. Tener*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 159.
71. *K. L. Agarwal, M. Fridkin, E. Jay, and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 2020.
72. *J. G. Moffatt and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 649.
73. *V. M. Clark and S. G. Warren*, J. Chem. Soc., 1965, 5509.
74. *M. A. W. Eaton and D. W. Hutchinson*, Biochemistry, 1972, **11**, 3162.
75. *C. Zioudrou*, Tetrahedron, 1962, **18**, 197.
76. *H. Schaller, H. A. Staab, and F. Cramer*, Chem. Ber., 1961, **94**, 1621.
77. *D. E. Hoard and D. G. Ott*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 1785.
78. *R. H. Symons*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 209, 296.
79. *O. Mitsunobu, K. Kato, and J. Kimura*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 6510.
80. *O. Mitsunobu and M. Eguchi*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1971, **44**, 3427.
81. *T. Mukaiyama*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1976, **15**, 94.
82. *H. Kaye and Lord Todd*. J. Chem. Soc. (C), 1967, 1420; *V. M. Clark, D. W. Hutchinson, and P. F. Varey*, ibid., 1969, 74.
83. *A. Holý and F. Šorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1969, **34**, 1929.
84. *T. Hata, K. Furusawa, and M Sekine*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 196.
85. *F. Eckstein*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 160.
86. *A. W. Murray, P. C. L. Wong, and B. Fredrichs*, Biochem. J., 1969, **112**, 741.
87. *R. L. Letsinger, J. S. Wilkes, and L. B. Dumas*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 292.
88 *J. M. Stewart and J. D. Young*, «Solid Phase Peptide Synthesis», Freeman, San Francisco, 1969.
89. *H. Hayatsu and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 3880.
90. *K. F. Yip and K. C. Tsou*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 3272.
91. *H. Köster and K. Heyns*, Tetrahedron Letters, 1972, 1527, 1531, 1535.
92. *G. M. Blackburn, M. J. Brown, M. R. Harris, and D. Shire*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 676.
93. *J. Giziewicz and D. Shugar*, Acta Biochim. Polon., 1975, **22**, 87.
94. *C. B. Reese*, in «Protective Groups in Organic Chemistry», ed. J. F. W. McOmie, Plenum. London, 1973, p. 95.
95. *R. I. Zhdanov and S. M. Zhenodarova*, Synthesis, 1975, 222.
96 *J. M. Buchanan*, in «The Nucleic Acids», ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, 1960, vol. III, p. 303.
97. *A. W. Murray, D. C. Elliott, and M. R. Atkinson*, Progr. Nucleic Acid Res.. Mol. Biol., 1970, **10**, 87.
98. *G. W. Crosbie*, in «The Nucleic Acids», ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, 1960, vol. III, p. 323.
99. *H. P. C. Hogenkamp and G. N. Sando*, Structure and Bonding, 1974, **20**, 24.
100. *T. K. Bradshaw and D. W. Hutchinson*, Chem. Soc. Rev., 1977, **6**, 43.
101. *V. Amarnath and A. D. Broom*, Chem. Rev., 1977, **77**, 183.



## 22.4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: СТРУКТУРА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ И СИНТЕЗ

*Г. М. Блекборн (University of Sheffield)*

В этой главе будут рассмотрены четыре вопроса, относящиеся к определению структуры и к синтезу нуклеиновых кислот. Эти вопросы связаны с определением последовательности и с химическим синтезом как ДНК, так и РНК. Порядок рассмотрения материала: вначале синтез, а затем установление последовательности, и сначала ДНК, а затем РНК — в какой-то мере может быть спорным, но частично его можно объяснить исторической последовательностью.

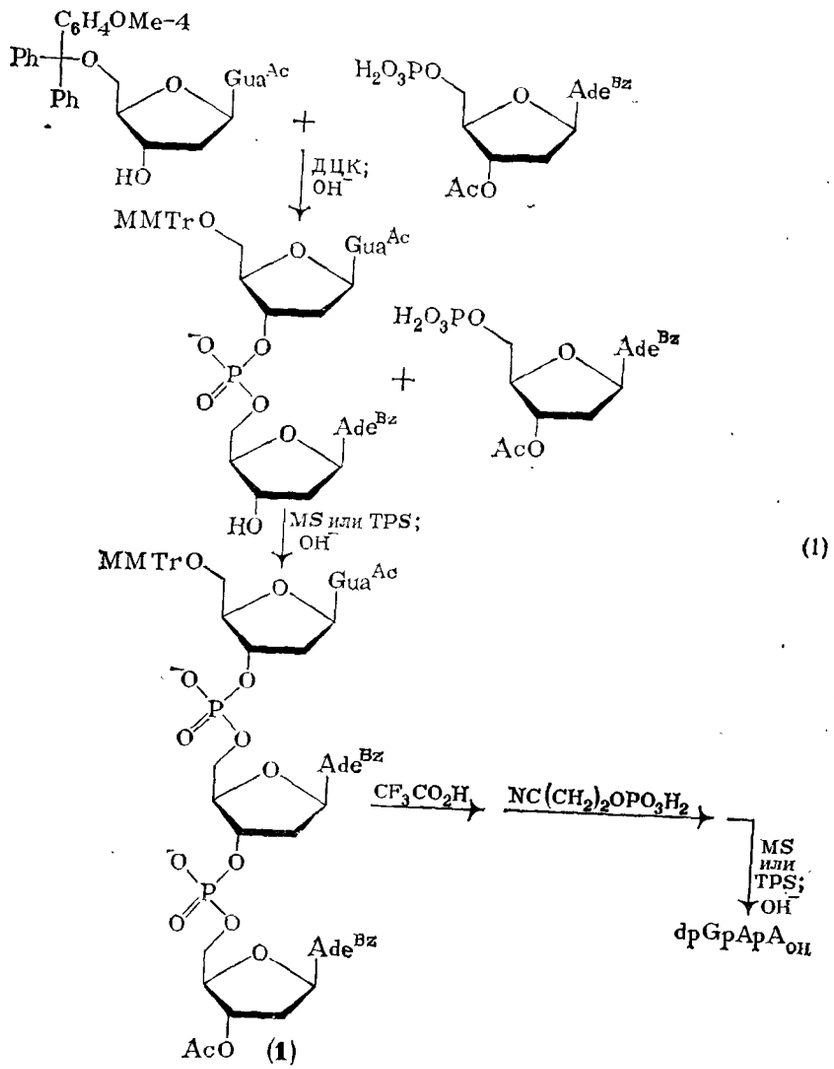
### 22.4.1. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Проблема синтеза малых фрагментов молекул ДНК в течение примерно 20 лет ассоциировалась с именем Хара Гобинда Кораны. В течение этого времени цели синтеза изменились, в то время как методы, используемые для достижения этих целей, в значительной степени остались на прежнем уровне. Первоначально получение риботринуклеозиддифосфатов обеспечило средства для расшифровки генетического кода (см. гл. 22.5). Вслед за этим была осуществлена блок-сополимеризация дезоксирибоолигонуклеотидов, которая подтвердила, что код действительно работает. После определения последовательности первых видов тРНК синтез комплиментарных им ДНК, синтез генов, стал реальной целью. В настоящее время технология рекомбинантных ДНК делает в принципе возможной наработку многочисленных копий синтетических кусочков ДНК и внедрение их в бактерии по соседству с любым выбранным участком ДНК. Формулировка целей, лежащих вне этой сферы, в настоящее время является компетенцией политика в такой же степени, как и ученого.

#### 22.4.1.1. Синтез через фосфодиэфиры

Основной метод [1], разработанный для получения олигомеров длиной от 4 до 18 нуклеотидов, включает ступенчатую или блочную конденсацию 5′-фосфата с мономерным звеном, имеющим свободную 3′-гидроксильную группу. Конденсирующим агентом обычно является аренсульфонилхлорид. В отдельных случаях (при

получении динуклеозидфосфатов) дициклогексилкарбодиимид создает, однако, меньше проблем с выделением и очисткой продукта. Для предотвращения нежелательных реакций конденсации остаток, имеющий 3′-OH группу, обычно несет на 5′-конце кислотола-

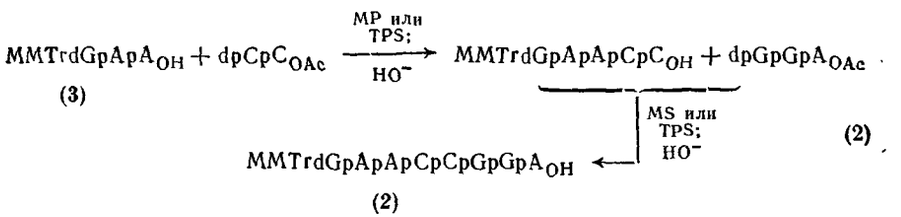



бильную защитную группировку. Напротив, 5′-фосфат обычно ацетилирован по 3′-гидроксильной группе. Аминогруппы трех оснований будут непосредственно реагировать с аренсульфонилхлоридом и поэтому их защищают ацилированием, как это обсуждалось ранее. Такие синтезы иллюстрируются {схема (1)} получением защищенного тримера (1), из которого в дальнейшем может быть



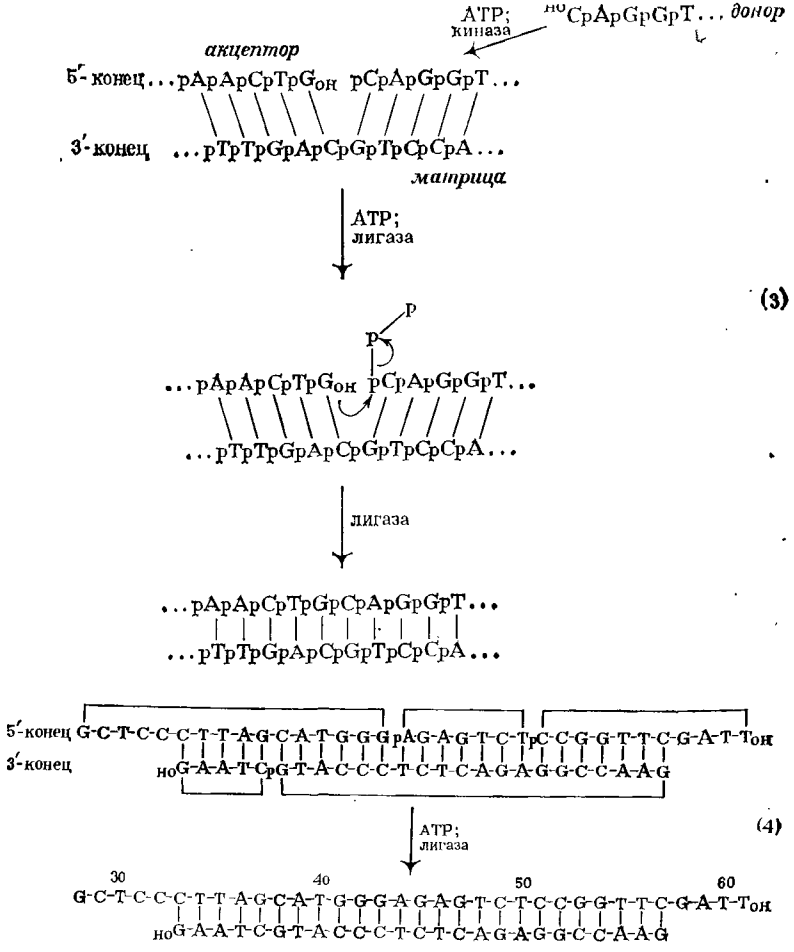
получен октамер (2) добавлением блоков dpCpC и dpGpGpA {схема (2), MMTr = монометокситритил}.

Если, альтернативно, тример (1) обработать кислотой, для удаления монометокситритильного остатка, и затем фосфорилировать по положению 5′, то в результате дезацетилирования и обработки конденсирующим агентом можно получить блок-сополимер. Принято добавлять небольшое количество 5′-защищенного 3′-OH тримера (3) в качестве инициатора роста цепи. Такой синтез ведет к образованию полимера dGpApA(pGpApA)$_n$. Впоследствии читатель будет способен представить себе структуру мРНК, которая должна быть получена в результате транскрипции этого полимера и, следовательно, указать аминокислоты, которые должны быть включены в биосинтез белка с помощью такой синтетической матрицы (см. гл. 22.5).




Синтезы этого типа использованы для получения фрагментов, содержащих вплоть до 20 мономерных остатков. Корана полагал [2], что такая длина цепи близка к максимальной для эффективной очистки. Исходя из этой точки зрения, удлинение цепи требует применения наряду с химическими и ферментативных методов.

Ключевым катализатором в данном случае является фермент ДНК-лигаза. Его функции заключаются в репарации «повреждений» одной цепи двуспиральной ДНК, которые находятся между 5′-фосфатом одного остатка и 3′-гидроксильной группой его соседа (*акцептора*). Некоторым лигазам необходим в качестве кофактора ATP: другие используют для этой цели различные коферменты. Для того, чтобы расположить 5′-фосфат сегмента *донора* в непосредственной близости с сегментом *акцептора*, их «отжигают» с третьим сегментом, *матрицей* (splint), который имеет подходящую последовательность оснований, комплиментарную фрагментам донора и акцептора в обратной полярности {схемы (3), (4)}. На практике должны быть завязаны как минимум по четыре водородные связи между парами оснований каждого сегмента. Для устранения неоднозначности в направлениях комплиментации могут быть сделаны два или три таких связывания одновременно, как это показано для образования отрезка дуплекса (4). Этот нуклеотидный блок фактически соответствует остаткам с 30 по 60 молекулы аланиновой тРНК установленной Холли последовательности (см. разд. 22.1.3.3).




**(4)**

Несмотря на то, что синтез ДНК, соответствующей последовательности этой тРНК, еще не был завершен, Корана взялся за вторую задачу — синтез гена для тирозиновой тРНК$^{Tyr}_{Su^{3+}}$ из *E. coli* длиной в 76 нуклеотидов, которая была выбрана в основном по причинам, связанным с ее специфическими биологическими свойствами. После того, как началась работа по этой программе, более новыми исследованиями было показано, что эта тРНК образуется из молекулы предшественника тРНК, содержащей 126 остатков нуклеотидов, на синтез которой и была переориентирована вся программа. Методами, сходными с описанными, сотрудники Кораны получили 26 фрагментов, варьирующихся по длине от 4 до 13 дезоксинуклеотидов и объединили их в четыре дуплекса, 1—26, 27—56, 57—89 и 90—126, с соответствующими «липкими» концами каждый. Затем эти дуплексы были соединены вместе с использованием соответствующего фосфорилирования киназой, отжига и связывания [3].

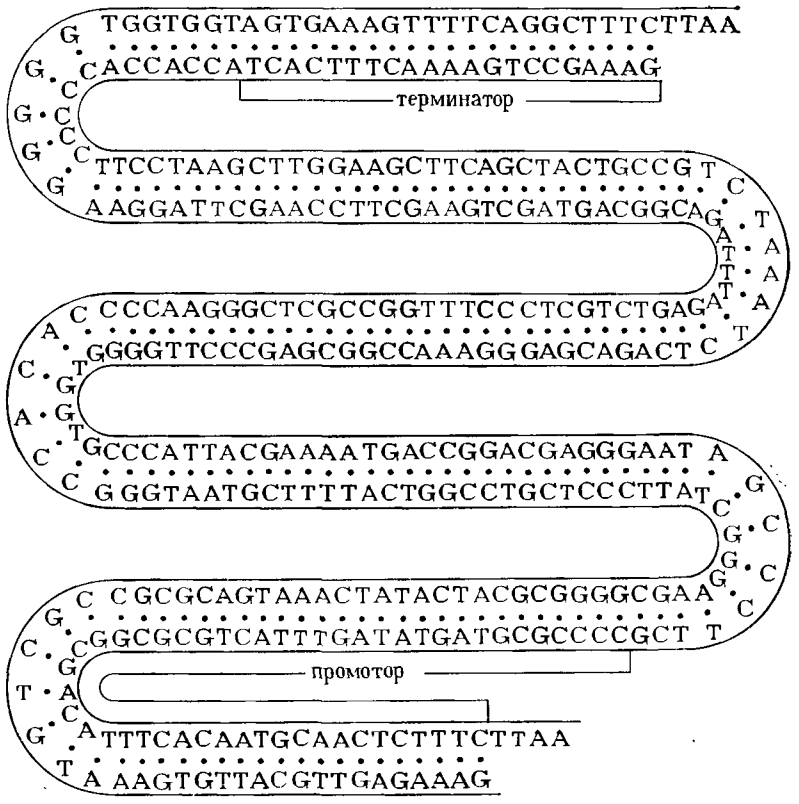



Рис. 22.4.1. Полный ген тРНК$^{Tyr}$.

Показаны контролирующие последовательности и однонитевые концы, используемые для введения в вирус с целью биологического тестирования.

Это достижение было всего лишь незначительной стадией огромного замысла. Этот ген может проявлять свою биологическую активность лишь в том случае, если он ограничен с концов терминаторной последовательностью из 21 пары оснований и промоторным сегментом длиной в 59 пар оснований. Определение последовательности этих фрагментов технически было более сложно, чем определение последовательности предшественника тРНК, но все же было завершено. Заключительные сегменты были должным образом получены и пришиты к ранее созданной молекуле, что привело к получению конечного объекта размером в 206 пар оснований, синтез которого был закончен в 1976 г. (рис. 22.4.1).

Это, неоспоримо, не только величайшее достижение, уже совершенное в синтетической химии, но оно вполне может войти в историю неповторенным. Тем не менее, была создана технология синтеза меньших, менее трудоемких фрагментов, которые могут быть использованы совместно с генами, полученными из природных источников (см. разд. 22.5.4).

### 22.4.1.2. Синтез через фосфотриэфиры

Фосфодиэфирный синтез дает продукты, которые являются полианионами. Этот факт создает для подобного рода работы две основные проблемы: растворимость в неполярных растворителях незначительна и очистка ограничивается разделением по заряду. Обе эти трудности могут быть преодолены, если обратиться к триэфирам фосфатов. Они могут быть получены конденсацией подходящим образом защищенного диэфира нуклеозид-3′-фосфата с 5′-гидроксильной группой нуклеотида акцептора. Хлориды аренсульфоновых кислот и некоторые сульфонилтриазолы или -тетразолы являются подходящими реагентами для решения этой задачи. Образующиеся продукты являются нейтральными молекулами, растворимыми в органических растворителях, и могут быть очищены хроматографическими методами, особенно высокоэффективной жидкостной хроматографией на силикагеле. После завершения синтеза нуклеотидного фрагмента триэфиры фосфатов могут быть без труда расщеплены до диэфиров. При этом не происходит дальнейшего гидролиза межнуклеотидной фосфодиэфирной связи. В различных синтезах для этерификации фосфатной группы были использованы 2-цианоэтанол [4], 2,2,2-трихлорэтанол [5] или один из замещенных фенолов [6].

Метод иллюстрируется здесь ссылкой на один из трех синтезов самокомплиментарных декамерных фрагментов ДНК, которые, в форме дуплексов, являются субстратами для расщепления ферментами рестрикции [7] (см. разд. 22.4.3 и 22.5.4). Динуклеотид dCpCp защищен с помощью 4-хлорфенола по фосфатным группам, бензоильными остатками — по основаниям и диметокситритилированием — по 5′-гидроксильной группе. Акцептором является 5′-гидроксильная группа защищенного тринуклеотида dGpGpA. Конденсация осуществляется с помощью сульфонилтетразолида, а затем щелочелабильный 2-цианоэтильный остаток избирательно удаляется с 3′-концевого фосфата в мягких щелочных условиях, давая защищенный пентамер (5) {схема (5)}. Аналогичная конденсация защищенного динуклеотида dTpCp с тринуклеотидом dCpGpG дает пентамер (6). Затем эти пентамеры сшивают, что приводит к декамерному соединению, которое после удаления всех защитных групп аммиакатом пиридиния и последующей мягкой кислотной обработки было очищено тонкослойной хроматографией на целлюлозе. В результате было получено 25 мг продукта (7) в виде гомогенного дуплекса {схема (5), Ar = $C_6H_4Cl$-4, TPST = 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилтетразолид}. Вещество (7) является субстратом для фермента рестрикции *Bam I*.

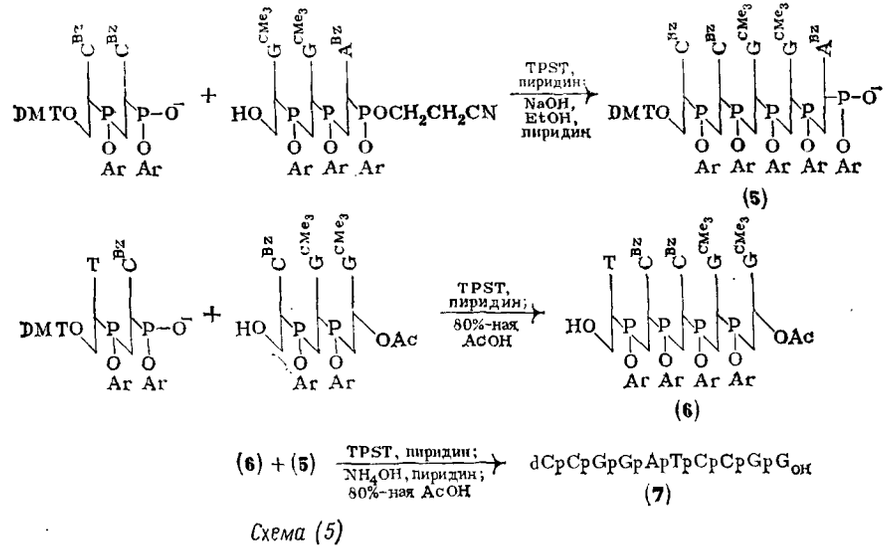



*Схема (5)*

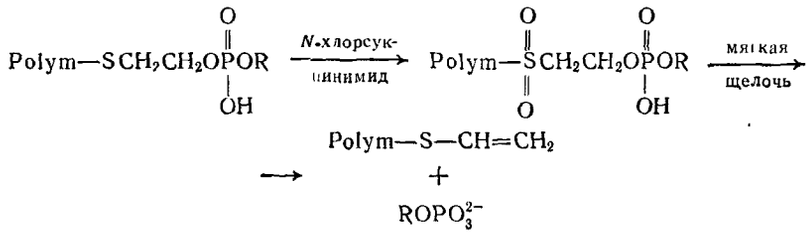
Синтетические декамерные дуплексы такого рода предназначены для «присоединения встык» к генам ДНК, полученным химически или ферментативно путем связывания лигазами. Когда они затем подвергаются зависимому от последовательности эндонуклеазному действию фермента рестрикции (см. разд. 22.4.3), они превращаются во фрагменты, имеющие липкие концы. Поскольку идентичные липкие концы могут быть получены в результате действия того же фермента рестрикции на бактериальную хромосому, то может быть создана возможность для введения искусственного гена в хромосому (см. разд. 22.5.4).

### 22.4.1.3. Синтез с использованием твердофазной подложки

Идея использования твердофазной подложки в последовательном синтезе полимера с определенной последовательностью была развита Меррифильдом для работы с пептидами (см. гл. 23.6). Ранние попытки применить эту идею и сходную технологию для синтеза олигонуклеотидов были сравнительно безуспешны [1]. Попросту говоря, растущий олигонуклеотид, по-видимому, образует клубок вблизи полимерной подложки, что делает его конец недоступным для дальнейшего удлинения: выходы значительно снижаются прежде, чем количество нуклеотидов достигает двузначной цифры. Эта ситуация, по-видимому, была преодолена, когда обратились к новому типу полиамидной подложки, которая

была первоначально разработана [8] для работы с пептидами.

Первый нуклеотид присоединяется к полимерной матрице в результате этерификации его 5′-фосфата *2-тиоэтанольной группой*. В конце последовательности реакций, удлиняющих полинуклеотидную цепь, эта связь окисляется, давая сульфон, который может быть отделен от завершенного полинуклеотида путем β-элиминирования в щелочных условиях {схема (6)} [9].




(6)

Методики, используемые для удлинения нуклеотидной цепи, по существу такие же, как описанные для фосфодиэфирного подхода, с незначительными техническими новинками. 3′-Ацетилдезоксинуклеозид-5′-фосфаты конденсируют к растущему полимеру, используя триизопропилбензолсульфонилхлорид с последующим дезацетилированием обычным образом. Эту операцию повторяют при добавлении второго, третьего и т. д. остатков. На этой стадии добавляется лишь процедура очистки, которая заключается в тщательном промывании нерастворимого полимера для удаления избытка реагентов и побочных продуктов. По завершении наращивания цепи проводится щелочная обработка, приводящая к смеси олигонуклеотидов, которая в идеальном случае должна быть гомогенной. На практике неполное прохождение реакции конденсации на каждой из стадий ведет к накоплению ошибок и образованию олигонуклеотидов с пропущенными одним, двумя или тремя нуклеотидами. Пока полная цепь не слишком велика, такая смесь может быть разделена тщательной хроматографией. Таким методом был получен с выходом 15—20% гептануклеотид dpCpApGpTpGpApT, свободный от гекса- и пентануклеотидов.

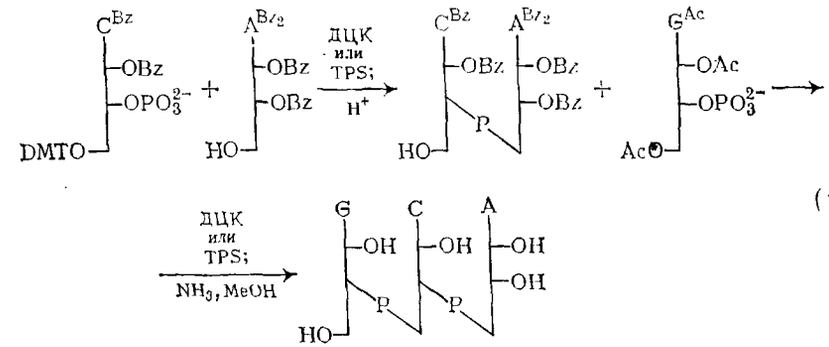
### 22.4.2. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ РИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Присутствие 2′-гидроксильных групп в ряду производных рибозы вносит трудности, которые сильно затормозили прогресс синтеза в этой области по сравнению с дезоксирибоолигонуклеотидным синтезом. Несмотря на создание специальных защитных групп (см. гл. 22.2) и других приемов, основные цели могут быть успешнее достигнуты комбинацией химического синтеза дезоксиолигонуклеотида с ферментативным удлинением и транскрипцией в РНК [10].



#### 22.4.2.1. Синтез через фосфодиэфиры

Легкость получения фосфомоноэфиров в результате рибонуклеазного переваривания РНК оказала влияние на выбор пути синтеза рибонуклеотидов. В химическом синтезе 64 возможных риботринуклеозиддифосфатов [11], 3′-фосфат которых несет кислотолабильную монометокситритильную группу, конденсировали со свободной 5′-гидроксильной группой нуклеотида акцептора. Избирательное снятие защиты с 5′-гидроксильной группы и повторение последовательности операций приводит к желаемому продукту. Метод иллюстрируется получением кодона rGpCpA {схема (7), DMT = диметокситритил, или бис(*n*-анизил)фенилметил}.



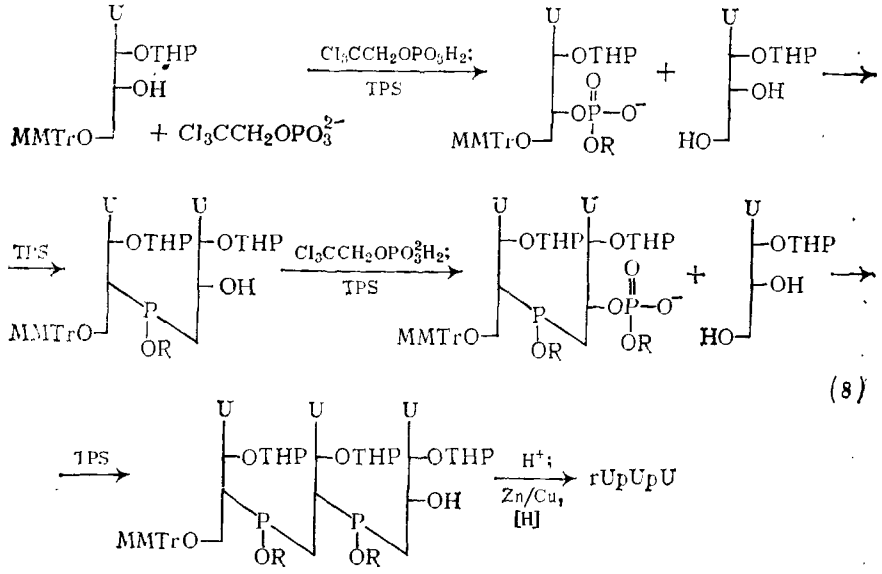

(7)

Этот путь добавления остатков к 5′-концу растущей цепи такой же, как и способ, используемый для триэфирного синтеза в ряду дезоксирибонуклеотидов. Этот метод был использован в синтезе нонануклеотида rCpGpUpCpCpApCpCpA$_{OH}$ путем блочной конденсации. Последний был получен присоединением защищенного тримера rCpGpUp к продукту соединения rCpCpAp + rCpCpA$_{OH}$ (все нуклеотиды использовались в подходящим образом защищенной форме) [12].

#### 22.4.2.2. Синтез через фосфотриэфиры

Преимущества в очистке при применении триэфирного синтеза в области рибонуклеотидов едва ли преобладают над возникающими дополнительными проблемами. Прежде всего, эти проблемы возникают из-за риска миграции фосфорного остатка с 3′-положения в 2′-положение в ходе конечного превращения триэфиров фосфатов в диэфиры и, во-вторых, из-за необходимости избирательного манипулирования *четырьмя* видами защитных групп — на основании, на фосфате, а также на 2′- и на 5′-гидроксильных группах. Тем не менее, тот факт, что таким путем был получен нонануклеотид, весомо говорит о детальном развитии использования защитных групп в этой области синтеза.

Развиты подходы наращивания цепи как с 5′-, так и с 3′-конца. Кажется, что ни один из них еще не показал своего превосходства над другим. Синтез последовательности из антикодоновой петли $тРНК_f^{Met}$ *E. coli* представляет собой прекрасный пример использования методов ступенчатого и блочного присоединения к 3′-гидроксильной группе [13]. Примененные методики сходны с теми, которые используются для получения простого тримера rUpUpU {схема (8), R=$CH_2CCl_3$, THP=тетрагидропиранил, MMTr=монометокситритил, или анизилдифенилметил}.




(8)

Отметим следующие особенности: (а) трихлорэтильная группа, используемая для защиты фосфата, легко удаляется восстановлением с использованием цинк/медной пары в нейтральной среде; (б) для защиты 2′-гидроксильной группы применена тетрагидропиранильная защитная группировка; (в) триизопропилбензолсульфонилхлорид ускоряет конденсацию трихлорэтилфосфата по вторичной гидроксильной группе 2′,5′-защищенного нуклеозида с образованием фосфодиэфира; но (г) тот же самый конденсирующий агент показывает хорошую региоселективность по отношению к первичной 5′-гидроксильной группе при образовании фосфотриэфира. Вероятно, стерические препятствия, возникающие между 2′-*О*-тетрагидропиранильной группой и промежуточно образующимся сульфонилфосфорным ангидридом, исключают возможность конденсации по вторичной спиртовой функции и, таким образом, устраняют необходимость защиты 3′-гидроксильной группы.

Эта региоселективность приводит к сходству между вышеописанными синтезами и схемами, в которых используется присоединение мономеров к 5′-концу [1, 6]. Оба подхода сталкиваются с одной и той же проблемой, которая заключается в том, что скорость образования фосфотриэфиров ниже, чем скорость образования фосфодиэфиров. Так был разработан смешанный синтез, объединяющий лучшие особенности обеих стратегий. В этом методе межнуклеотидная связь образуется с помощью обычной фосфодиэфирной методики, а затем ее превращают в триэфир с помощью 2-цианоэтанола и триизопропилбензолсульфонилхлорида до присоединения следующего мономера [14].

### 22.4.2.3. Синтез с использованием ферментативно-катализируемого фосфорилирования

С помощью ферментативных методов можно эффективно осуществить два типа реакций конденсации, присоединение мономерного остатка к 5′-концу олигонуклеотида и соединение по типу «голова-к-хвосту» двух цепей с помощью фермента лигазы. Действие ДНК-зависимой РНК-полимеразы описано в разд. 22.5.2.

Фермент полинуклеотидфосфорилаза широко использовался для присоединения рибонуклеозид-5′-пирофосфата к 3′-гидроксильной группе динуклеозидфосфата или к акцептору большего размера. Недостатком используемого метода является образование в ходе реакции неорганического фосфата, который ускоряет обратный процесс, т. е. частичный фосфоролиз 3′-концевого остатка. Это затруднение было преодолено удалением фосфата из реакционной смеси по мере его образования [15].

Нежелательное повторное присоединение мономеров к 3′-концу может быть предупреждено использованием в реакции конденсации в качестве донора 2′(3′)-*О*-изовалерилрибонуклеозид-5′-пирофосфатов. Объемная защитная группа блокирует дальнейшее присоединение мономера к 3′-концу [16]. Таким путем могут быть последовательно присоединены два или даже три остатка, что позволяет получать продукты гептануклеотидного размера. Однако этот метод наиболее полезен для присоединения одного остатка, часто содержащего модифицированное основание, к предварительно полученному олигомеру.

ДНК-лигазе, использованной Кораной в синтезе гена, для соединения элементов донора и акцептора требовалось применение матрицы из *E. coli*, инфицированной бактериофагом Т4. Однако была выделена менее требовательная РНК-лигаза. Она катализирует фосфорилирование 3′-гидроксильной группы рибоолигонуклеотида 5′-фосфатом донора. Фермент, по-видимому, не проявляет специфичности к основаниям и такие малые фрагменты как тримеры могут быть сосдинены им без участия матрицы. Сшиванием двух гексамеров $r(Ap)_5C$ и $гр(Up)_5U$ был получен с прекрасным выходом додекамер $r(Ap)_5Cp(Up)_5U$ [17].

Поскольку синтетические достижения в области РНК до сих пор еще намного отстают от успехов в синтезе ДНК, то главная

проблема для исследователей, прилагающих усилия для развития обеих областей, заключалась в поиске целей, способных оправдать затраты огромных усилий на их достижение. Ранние примеры по очистке и определению последовательности различных РНК через молекулы ДНК представляли собой ДНК-гены для молекулы тРНК как первые основные объекты синтеза. Напротив, невозможность чтения генетического кода в обратном направлении для определения индивидуальной последовательности РНК из последовательности конкретного белка ограничивает цели синтеза РНК до синтеза меньших фрагментов, которые часто содержат особые минорные основания.

Это казавшееся ограниченным будущее было сразу изменено. Выдающиеся достижения в определении последовательности ДНК должны обеспечить обширный запас важных синтетических целей в конструировании ДНК на последующий период развития области. Более того, прогресс в области генной инженерии может сильно зависеть от наличия синтетических фрагментов ДНК-дуплексов для решения специфических задач.

### 22.4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Еще в 1973 г. эффективный подход к определению последовательности ДНК представлял собой трансформацию задачи в проблему последовательности РНК! Всего четыре года спустя произошел крутой поворот, перевернувший эту зависимость. За этот поворот ответственны два метода.

Сенжер и Коулсон создали метод анализа последовательности ДНК, который основан на ферментативном копировании однонитевых частиц ДНК [18]. Максам и Гилберт создали метод, в основу которого положена химическая модификация четырех оснований, входящих в состав ДНК, и который с одинаковым успехом применим как к однонитевым, так и к двунитевым молекулам ДНК [19]. Оба метода используют авторадиографическое определение $^{32}$P-меченных олигонуклеотидов, которые разделяют в зависимости от их длины электрофорезом денатурированных фрагментов в полиакриламидном геле. На практике, успех этих методов во многом определяется недавними достижениями в энзимологии нуклеиновых кислот, особенно использованием ферментов рестрикции, расщепляющих молекулы ДНК, и обратной транскриптазы, с помощью которой получают циклические ДНК, комплиментарные РНК-матрице. Нижеследующее описание методики анализа будет, однако, предполагать наличие гомогенных образцов ДНК подходящей длины.

Сенжеровский «плюс и минус»-метод обеспечивает получение информации о последовательности двумя взаимоподтверждающими способами. «*Минус*»-процедура включает получение копий с одноцепочечной ДНК с использованием ДНК-зависимой полимеразы или с частиц РНК с применением обратной транскриптазы.



Вновь синтезируемые цепи получают радиоактивно меченными за счет включения $^{32}$P. Фрагменты различной длины, синтез каждого из которых останавливается перед заданным основанием, получают лимитированием подачи этого основания. В результате протекания четырех параллельных синтезов, осуществляемых в условиях дефицита по A, C, G и T, соответственно, происходят остановки перед различными основаниями (—A, —C, —G и —T). Одновременный электрофорез этих четырех образцов дает последовательность полос на авторадиограмме, с которой можно непосредственно считать последовательность примерно 100—150 остатков.

«*Плюс*»-процедура включает экзонуклеолитическое расщепление синтетических фрагментов ДНК путем удаления одного за другим оснований с 3′-конца. Эта процедура требует применения модифицированной ДНК-полимеразы I, которую можно останавливать в определенных положениях разрушаемой последовательности *добавлением* одного из четырех нуклеозидтрифосфатов. Снова, проводя параллельно четыре реакции, каждая из которых наращивает один нуклеотид (+A, +C, +G или +T), расщепление может быть остановлено перед одним из оснований (A, C, G или T). Снова гель-электрофорез дает картину ряда полос, с которой можно непосредственно считывать последовательность. Эта методология иллюстрируется рис. 22.4.2.

Наиболее значительные успехи с применением «плюс и минус»-метода были получены при определении последовательности циклической ДНК, получаемой на основе мРНК β-глобина человека [20], и при определении первой полной последовательности ДНК бактериофага ФХ 174 [21].

Метод определения последовательности ДНК Максама-Гилберта получил известность, начав широко применяться еще до его публикации [19]. Он, в сущности, связан с использованием четырех контролируемых процессов химической деградации, каждый из которых проявляет бóльшую или меньшую избирательность по отношению к одному из четырех оснований. Этот метод в равной степени хорошо применим и к одно- и к двунитевым ДНК; предполагая, что только одна цепь радиоактивно мечена $^{32}$P. Это достигается фосфорилированием конца молекулы с использованием $\gamma$-$^{32}$P-меченного ATP и либо 3′-концевой, либо 5′-концевой киназы. Этим способом вводится $^{32}$P метка по обоим концам дуплекса, но по чередующимся цепям. Поэтому расщепление ферментом рестрикции дает разделимые фрагменты, каждый из которых имеет одну метку и потенциально перекрывающуюся последовательность по отношению к другому (зависящую от выбора фермента рестрикции). В результате четырех отдельных реакций этот материал подвергается четырем химическим деградациям в мягких условиях с тем, чтобы модифицировалось примерно лишь одно основание из 50—100. Расщепление цепи по модифицированному положению дает смесь фрагментов, каждый из которых кончается определенным основанием. Точно так же, как и в «плюс и минус»-методе,

гельэлектрофорез и авторадиография дают картину полос, с которой можно считать последовательность оснований (до 150 остатков за один раз).

Избирательные расщепления осуществляют следующим образом. Обработка ДНК диметилсульфатом приводит к метилирова-

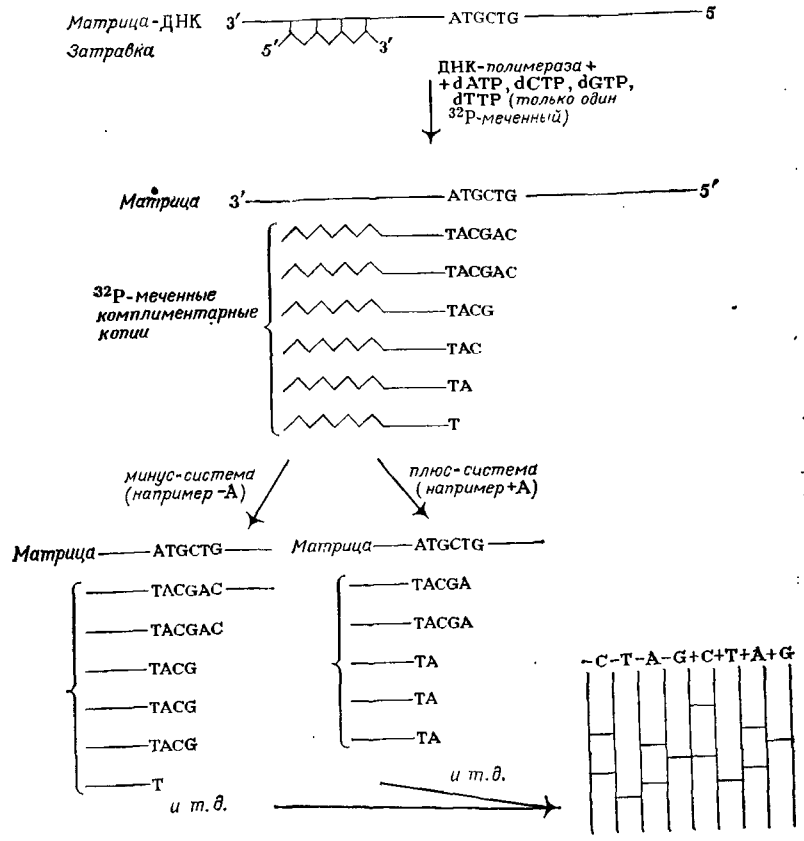


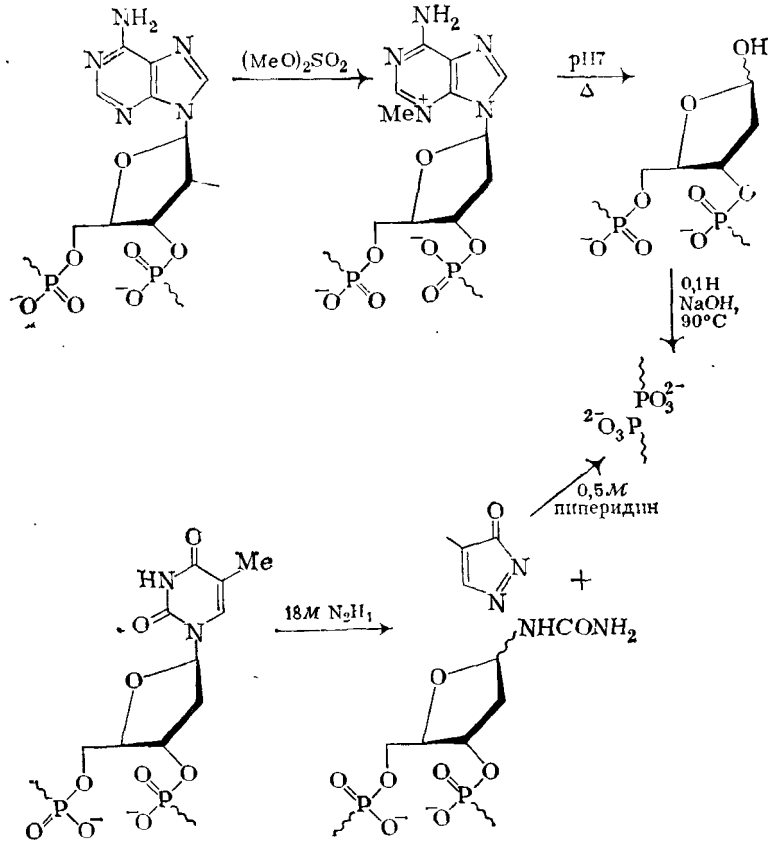

Рис. 22.4.2. Принцип «плюс и минус»-метода определения последовательности ДНК [18].

нию гуанинов по N-7 и аденинов по N-3 [22]. Гликозидная связь таких производных легко гидролизуется, и последующая щелочная обработка отщепляет фосфаты от свободной дезоксирибозы {схема (9)}. Гуанин метилируется в 5 раз быстрее, чем аденин, и поэтому этот путь приводит, в основном, к расщеплению по гуанину (G > A). Эта ситуация легко меняется на обратную, когда достигается сильное расщепление по аденину и слабое по гуанину, при использовании для гидролиза гликозидной связи слабокислых условий, в которых подавляется гидролиз 7-метилгуанозина. По-



следующее щелочное расщепление фосфатов приводит в основном к расщеплению по остаткам аденина (A > G).

Оба пиримидина подвергаются атаке гидразином [23] (см. гл. 22.2), который расщепляет основание с раскрытием кольца, приводя к образованию рибозилмочевины. Затем расщепляют остов ДНК с использованием пиперидина, вызывая β-элиминирование обоих фосфатов. В то время как этот подход приводит к расщеплению в равной мере по цитозину и тимину (C + T), добавление 2*M* хлорида натрия предпочтительно подавляет реакцию тиминов с гидразином. Таким образом может быть осуществлено избирательное расщепление по цитозину (C).




В идеальном случае все четыре расщепления регулируют таким образом, чтобы получать один разрыв на цепь ДНК. Это далее позволяет идентифицировать основания прямым анализом авторадиограммы гель-электрофореза четырех одновременно исследуемых образцов. Аденин обнаруживается в виде более темной полосы в продуктах второй реакции (A ≥ G), по сравнению

с продуктами первой, гуанин — как более темная полоса в продуктах первой реакции (G > A), по сравнению со второй. Тимин появляется в виде полосы только в продуктах третьей реакции (C + T), в то время как цитозин также появляется как единственная полоса в продуктах четвертой реакции (C).

Незначительные ограничения этого метода компенсируются информацией, которая может быть получена из независимых анализов комплиментарных цепей. Применение ферментов в этом методе ограничивается введением метки в концевой фосфат и рестрикционным расщеплением цепей на блоки подходящей длины, примерно в 100—150 остатков, с частичным их перекрыванием. Метод нашел наибольшее применение в определении последовательности оснований контролирующих областей генов, например для исследования дуплекса в 223 пары оснований, представляющего собой ген 5S РНК пекарских дрожжей и имеющего промоторный и терминаторный участки транскрипции [24]. Другой прекрасный пример использования этого метода — установление полной первичной структуры β-глобиновой мРНК кролика, структура которой была «закреплена» получением с помощью транскриптазы соответствующей ей циклической ДНК [25]. В ходе амплификации этой циклической ДНК клонированием бактериальных плазмид (см. разд. 22.3.4) были потеряны 13 остатков с 5′-конца. К счастью, их последовательность удалось установить в результате исследований с использованием метода «плюс и минус»! [26]. Совместное применение этих методов позволило установить последовательность гена длиной в 589 пар нуклеотидов.

Поскольку наиболее ответственная часть методики определения последовательности ДНК заключается в избирательном использовании нуклеазных ферментов, необходимо дать краткую характеристику их свойств. Ранее уже были упомянуты *эндонуклеазы*, которые расщепляют цепи на меньшие по размеру цепи, и *экзонуклеазы*, которые отщепляют концевые остатки, не проявляя никакой избирательности по отношению к основаниям.

*Рестрикционные нуклеазы* являются бактериальными эндонуклеазами, которые узнают специфическую последовательность оснований, обычно от четырех до шести остатков длиной, обладающую центром симметрии [27]. Фермент действует таким образом, что разрывает обе цепи симметрично по отношению к этому центру (табл. 22.4.1). Состав различных узнаваемых последовательностей регулирует частоту, с которой они появляются в больших молекулах ДНК. Например, *Eco R1*, из *E. coli* делает один разрыв в молекуле ДНК вируса λ (5000 пар нуклеотидов), тогда как *Hae III*, из *Haemophilus aegyptius* расщепляет ту же ДНК в 17 местах.

Подбор подходящих ферментов дает, таким образом, фрагменты подходящего размера для использования в анализе последовательности ДНК, а также обеспечивает удобные возможности для перекрывания последовательностей. Кроме того, типы расщеплений, производимые ферментами типа *Hind III*, могут быть использованы для получения липких концов для соединения фрагментов ДНК путем связывания лигазами (см. разд. 22.5.4).



*Таблица 22.4.1. Последовательности, узнаваемые четырьмя ферментами рестрикции, и число «мишеней» в каждой из двух вирусных ДНК **

| Узнаваемая последовательность | ↓ GTPyPuAC<br>CAPuPyTG ↑ | ↓ GAATTC<br>CTTAAG ↓ | ↓ GGCC<br>CCGG ↑ | ↓ AAGCTT<br>TTCGAA ↑ |
|---|---|---|---|---|
| Фермент | Hind II | Eco R1 | Hae III | Hind III |
| ДНК мишени | | | | |
| λ (мол. масса $\sim 3{,}2 \times 10^7$) | 34 | 5 | 750 | 6 |
| SV 40 ($3 \cdot 10^6$) | 5 | 1 | 17 | 6 |

* Стрелками указаны точки разрывов.

### 22.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РНК

Относительная легкость очистки образцов тРНК и мРНК, наряду с доступностью эндонуклеаз для РНК, обладающих различной специфичностью к основаниям, позволили впервые определить последовательности оснований в таких молекулах в 1965 г. Ранние методы Холли [28] и Захау [29] были вскоре вытеснены методами, разработанными Сенджером для определения последовательности 5S РНК.

Существует три этапа в этом классическом методе анализа последовательности. Первоначально РНК расщепляют на фрагменты умеренной длины (примерно 50 пар оснований) частичным гидролизом РНазой. Затем анализируют общий состав оснований этих дискретных фрагментов с последующим их расщеплением до маленьких блоков, для которых можно непосредственно установить последовательность оснований. И наконец, бо́льшие по размеру фрагменты располагают в нужном порядке, используя частичное перекрывание последовательностей. Такие частичные перекрывания возникают в результате различных способов расщепления, получаемых при действии панкреатической РНазы (специфичной к пиримидинам) и такадиастазы $T_1$ (специфичной к гуанозину). Сложное разделение большого числа фрагментов, получаемых в результате частичного расщепления нуклеазами, удается наилучшим образом осуществить при использовании двумерного разделения («фингерпринт»), сочетая ионофорез на ацетате целлюлозы при pH 3,5 в одном направлении и ионофорез на ДЕАЕ-целлюлозной бумаге при кислых значениях pH [30]. Во всех случаях фрагменты детектируют без деструкции с использованием $^{32}$P-меченных нуклеотидов.

Эта особенность привела к очень хорошему преимуществу в *гомохроматографии*. Это метод, в котором радиоактивные олигонуклеотидные фрагменты обнаруживают на хроматограмме с помощью раствора, содержащего нерадиоактивную смесь фрагментов всех размеров, получаемую РНазным расщеплением неочищенной РНК. На пластинках для ТСХ с ДЕАЕ- или полиэтиленимин-целлюлозой меньшие по размеру полианионы располагаются вдоль бóльших, когда фаза катионной подложки насыщена фрагментами нуклеотидов. Таким образом, радиоактивный образец разделяется на серию фронтальных полос, которые четко детектируются авторадиографией [31].

Столь же ценным, как применение этого метода, было открытие в 1972 г. фермента *обратной транскриптазы*, который буквально произвел революцию в методологии определения последовательности РНК. Большинство мРНК эукариотов содержит на 3′-конце последовательность poly(A) (см. разд. 22.5.2.1), у которой после отжига с олигодезокситимидиловой кислотой poly(dT) создается последовательность праймера для инициирования синтеза ДНК этим ферментом. Таким образом, происходит транскрипция мРНК в циклическую ДНК, которая может быть использована либо непосредственно для анализа последовательности, либо может быть превращена в двунитевую ДНК в результате дальнейшего действия обратной транскриптазы. В настоящее время этот подход стал доминирующим в технике определения последовательностей РНК [32].

В свою очередь этот метод может быть заменен прямым определением последовательностей РНК способом, аналогичным разработанному Максамом-Гилбертом для ДНК. Можно осуществить раздельное картирование аденинов, гуанинов и пиримидинов в РНК с помощью электрофоретического фракционирования по размеру в полиакриламидных гелях [33] продуктов щелочного и эндонуклеазного гидролизов. Как только станет возможным отличать уридин от цитидина, метод станет столь же мощным и быстрым, как и используемый в настоящее время метод анализа последовательности ДНК.

Анализ последовательностей РНК важен с различных позиций. К настоящему моменту уже определены последовательности более 100 видов тРНК [34]. Выяснение последовательности дрожжевой $тРНК^{Phe}$ в сочетании с данными рентгеноструктурного анализа было важным как для определения пространственной структуры этой молекулы (см. рис. 22.1.6 и 22.1.7 в гл. 22.1), так и для подтверждения правильности определения структуры белков. Однако, возникающая возможность изучения взаимосвязи между структурой нуклеиновых кислот и их биологической функцией является даже более важной перспективой. Детальное знание механизмов транскрипции и трансляции во многом зависит от наличия информации о последовательностях разных видов РНК. Простым примером является получение молекул тРНК из их предшественников



путем вырезания частей молекулы в процессе созревания — процесс очень близкий образованию инсулина из препроинсулина (рис. 22.4.3).

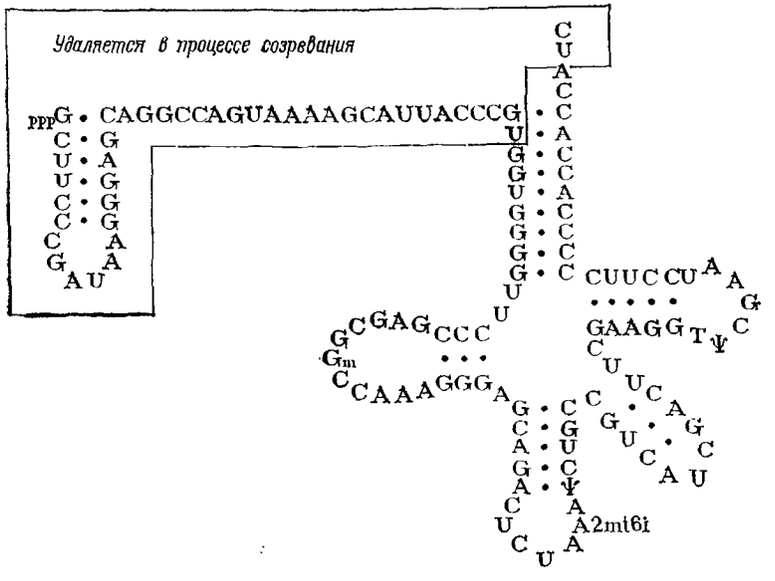



Рис. 22.4.3. Структура пре-$тРНК^{Tyr}$ из *E. coli*.

Показаны остатки, отщепляемые действием эндонуклеаз при образовании зрелой $тРНК^{Tyr}$. 5′-Концевой остаток pppG типичен для полной молекулы мРНК после транскрипции с ДНК.

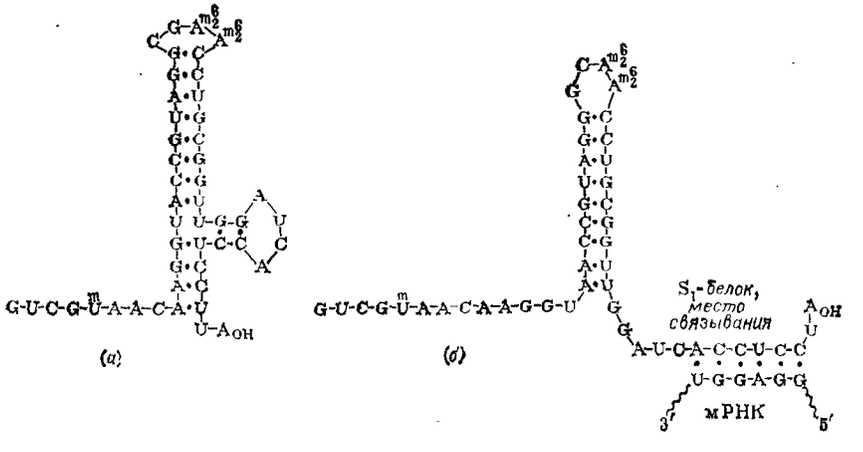



Рис. 22.4.4. Закрытая (а) и открытая (б) конформации 3′-конца 16S рРНК *E. coli*.

Показано возможное место присоединения мРНК.

В области рибосомальных РНК последовательности, определенные вблизи 3′-конца 16S РНК могут, возможно, принимать закрытую конформацию, которая перестраивается в открытую форму в присутствии матричной РНК, создавая возможность для спаривания с комплиментарной последовательностью РНК и идентификации на молекуле матрицы места инициирования синтеза белка (рис. 22.4.4).

Последовательность первой мРНК млекопитающих дала возможность осуществить прямое сравнение структуры генетического кода с его практическим использованием. Это позволило обнаружить неожиданное неравноправие в выборе между вырожденными кодонами для одной и той же аминокислоты. Анализы последовательностей гетерогенных РНК ядер клеток позволяют сделать первые шаги в понимании связи таких гетерогенных яРНК с мРНК [35]. Наконец, героическое определение полной последовательности остатков РНК вируса MS2 перекинуло мостик между структурной химией и жизнью как таковой [36].

Такие достижения предвещают новую эру в понимании взаимосвязи между структурой и функцией нуклеиновых кислот, что и составляет предмет обсуждения следующей главы 22.5.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *H. Kössel and H. Seliger*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1975, **32**, **297**.
2. *H. G. Khorana*, Biochem. J., 1968, **109**, 709.
3. *H. G. Khorana et al.*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 565 et seq.
4. *R. L. Letsinger and K. K. Ogilvie*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **91**, 3350.
5. *F. Eckstein and I. Rizk*, Chem. Ber., 1969, **102**, 2362.
6. *C. B. Reese*, Chim. Org. Phosphore (Colloq. Internat Centre Nat. Recherche Sci.), 1970, **182**, 319.
7. *R. H. Scheller, R. E. Dickerson, H. W. Boyer, A. D. Riggs, and K. Itakura*, Science, 1977, **196**, 177.
8. *M. J. Gait and R. C. Sheppard*, Nucleic Acids Res., 1977, **4**, 1135.
9. *F. Brandstetter, H. Schott, and E. Bayer*, Tetrahedron Letters, 1974, 2705.
10. *D. S. Jones, S. Nishimura, and H. G. Khorana*, J. Mol. Biol., 1966, **16**, 454.
11. *R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka, and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 819
12. *E. M. Ohtsuka, S. Ubasawa, S. Morioka, and M. Ikehara*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 4725.
13. *T. Neilson and E. S. Werstiuk*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, 96, 2295.
14. *J. Smrt*, Tetrahedron Letters, 1972, 3437.
15. *J. J. Sninsky, G. N. Bennett, and P. T. Gilham*, Nucleic Acids Res., 1974, **1**, 1665.
16. *G. C. Walker and O. C. Uhlenbeck*, Biochemistry, 1975, **14**, 817.
17. *G. C. Walker, O. C. Uhlenbeck, E. Bedows, and R. I. Gumport*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, **72**, 122.
18. *F. Sanger and A. R. Coulson*, J. Mol. Biol., 1975, **94**, 441.
19. *A. M. Maxam and W. Gilbert*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, **74**, 560.
20. *N. J. Proudfoot*, Cell., 1977, **10**, 559.
21. *F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchinson III, P. M. Slocombe, and M. Smith*, Nature, 1977, **265**, 687.
22. *P. D. Lawley and P. Brookes*, Biochem. J., 1963, **89**, 127.
23. *A. Temperli, H. Türler, P. Rust, A. Danon, and E. Chargaff*, Biochem. Biophys. Acta, 1964, **91**, 462.





24. *A. M. Maxam, R. Tizard, K. G. Skryabin, and W. Gilbert*, Nature, 1977, **267**, 643.
25. *A. Efstratiadis, F. C. Kafatos, and T. Maniatis*, Cell, 1977, **10**, 571.
26. *F. E. Baralle*, Cell, 1977, **10**, 549.
27. *H. O. Smith and D. Nathans*, J. Mol. Biol., 1973, **81**, 419.
28. *R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, N. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, and A. Zamir*, Science, 1965, **147**, 1462.
29. *H. G. Zachau, D. Dütting, and H. Feldmann*, Z. physiol. Chem., 1966, **347**, 212 et seq.
30. *B. G. Barrell*, «Procedures in Nucleic Acid Research», ed. G. L. Cantoni and D. R. Davies, Harper and Row, New York, 1971, vol. 2, p. 751.
31. *G. G. Brownlee and F. Sanger*, European J. Biochim., 1969, **11**, 395.
32. *N. J. Proudfoot, C. C. Cheng, and G. G. Brownlee*, Prog. Nucleic Acid Res., 1976, **19**, 123.
33. *H. Donis-Keller, A. M. Maxam, and W. Gilbert*, Nucleic Acids Res., 1977, **4**, 2527.
34. См. также: *B. G. Barrell and B. F. C. Clark*, «Handbook of Nucleic Acid Sequences», Joynson — Bruvvers, Oxford, 1974.
35. *V. M. Kish and T. Pederson*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, **74**, 1426.
36. *W. Fiers, R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert, and M. Ysebaert*, Nature, 1976, **260**, 500.


## 22.5. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ

*Г. М. Блекборн (University of Sheffield)*

Предыдущее обсуждение структуры и синтеза нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот можно было осуществить с тех позиций, что они сами являются ведущей частью химии природных соединений. Их более глубокое значение и внутренние связи между их отдельными частями могут быть оценены только при полном рассмотрении связи между структурой и функцией нуклеиновых кислот. Несмотря на претензии этой главы (в общем материале издания, посвященном природным продуктам) быть исчерпывающей, она должна быть, несомненно, выборочной, что по крайней мере проявляется в ее сконцентрированности на структурных аспектах рассматриваемых молекул.

Главное утверждение, относящееся к связи структуры и функции, таково:

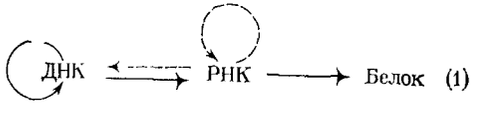
«ДНК производит ДНК, производит РНК, производит Белок».

Это утверждение говорит о том, что носителем наследственной информации является ДНК. В конечном счете этот молекулярный материал ответственен за точную передачу информации от родительских клеток к дочерним и за контроль над всей совокупностью химической активности в нормальной клетке, что осуществляется посредством каталитических белков. С точки зрения генетиков, хромосомы содержат дискретную линейную нуклеиновую кислоту, каждый из участков которой, называемых генами, ответственен за образование специфического клеточного продукта. Эти продукты генов являются либо полипептидами, либо структурными молеку-

лами РНК, рибосомальными и транспортными рибонуклеиновыми кислотами.

Эта простая картина остается в силе для большинства видов клеток, однако она должна быть модифицирована в случаях двух типов вирусов. Во-первых, некоторые вирусы, подобные полиовирусу и бактериофагу MS2, содержат хромосому, которая представляет собой цепь РНК. Потомство этих вирусов образуется без вмешательства ДНК [1]. Во-вторых, некоторые опухолевые вирусы также содержат в качестве генетического материала РНК, но в инфицированной клетке хозяина она транскрибируется в ДНК и с этого *провируса* в дальнейшем транскрибируются цепи РНК потомков. По очевидным причинам фермент, проявляющий эту специфическую активность, был назван обратной транскриптазой.

Эти взаимосвязи могут быть представлены схемой (1), которую теперь можно рассмотреть несколько детальней.

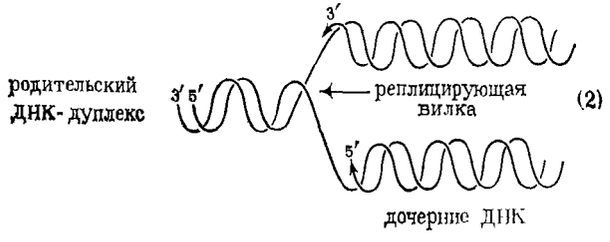


(1)

### 22.5.1. РЕПЛИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

#### 22.5.1.1. Репликация двутяжевых ДНК

При делении клетки образуются две дочерние клетки, каждая из которых содержит хромосомы, ДНК которых являются фактически точными копиями молекулы (молекул) родительской ДНК. Это простейший наблюдаемый процесс репликации. На практике, по одной из цепей родительского дуплекса оказывается в каждой дочерней клетке наряду с еще одной вновь синтезируемой комплиментарной цепью. Ферментом, который осуществляет этот новый синтез, является *ДНК-полимераза III*, которая подбирает подходящие дезоксинуклеотиды, в виде их 5′-трифосфатов, по принципу Уотсон-Криковского спаривания оснований к обеим раскрученным родительским цепям. Этот тип копирования известен под названием полуконсервативной репликации ДНК {схема (2)}.



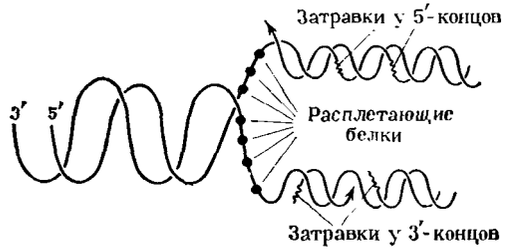
(2)

Простые геометрические соображения приводят к двум возражениям против такой модели. Прежде всего, цепи родительского



дуплекса расположены антипараллельно по отношению друг к другу, 5′ → 3′ и 3′ → 5′. Из этого следует, что две новые дочерние цепи должны расти в противоположных направлениях. Как это совместимо с их ростом в одной и той же реплицирующей вилке? Далее, родительские цепи скручены, один оборот на каждые 34 Å (3,4 нм). Тем не менее два дочерних дуплекса способны легко разделяться. Действительно, электронная микроскопия показывает, что они не скручены даже тогда, когда находятся в процессе образования из кольцевого родительского дуплекса! Какой вид вращательного процесса приводит в раскрученное состояние родительский дуплекс? *Он должен обеспечивать кажущуюся скорость вращения в E. coli около 100 оборотов в секунду.*

Имеются доказательства того, что происходит симметричный, но сложный процесс непрерывной репликации на обеих цепях. Раскручиванию двунитевой ДНК способствует связывание с многочисленными белковыми частицами, которые прикрепляются к родительской ДНК в выбранном месте инициации и им удается оставить разделенными комплиментарные цепи ДНК, готовые для нового синтеза. Далее определенная РНК-полимераза синтезирует короткую РНК, длиной от 20 до 25 нуклеотидов, которая комплиментарна родительской ДНК и связывается с ее цепью. Эта РНК действует как затравка для действия большого объемистого фермента ДНК-полимераза III, который теперь создает новую цепь ДНК длиной примерно в 1000 остатков, являющуюся продолжением этой РНК. Такой синтез идет в направлении 5′ → 3′ путем конденсации дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов с 3′-концевой гидроксильной группой на обеих цепях родительской ДНК {показано стрелками на схеме (3)}. Поскольку фермент работает в условиях, близких к обратимости, это обеспечивает максимальный термодинамический контроль за правильностью выбора встраиваемых дезоксирибонуклеозидов путем спаривания их оснований с соответствующими основаниями в существующей цепи. Таким путем на каждой родительской цепи располагается ряд блоков, называемых фрагментами Оказаки.



(3)

Для того, чтобы закрыть разрывы между вновь построенными блоками ДНК, ДНК-полимераза I выполняет две задачи. Во-первых, она продлевает синтез незавершенных фрагментов Оказаки на соседние РНК-сегменты и, во-вторых, она удаляет эти РНК-

сегменты, действуя как экзонуклеаза с их 5′-концов. В результате этих процессов обе дочерние цепи соединяются в новую ДНК с полной комплиментарностью оснований. Однако в этой новой ДНК существуют однонитевые разрывы. Именно эти дефекты устраняются лигазами — ферментами, которые делают новые цепи целыми.

Интригующей особенностью этого сложного процесса является полное удаление тех фрагментов РНК, которые, по-видимому, существенны для начала репликации ДНК. Почему? Высказано предположение, что это специальный механизм для исключения неприемлемой частоты ошибок в спаривании, которые могут быть существенно больше в начале процесса образования комплиментарных пар, чем на стадии установившегося процесса.

Меньше внимания было уделено проблеме раскручивания родительской ДНК перед реплицирующей вилкой. Одно предположение заключается в том, что одна родительская цепь «разрезается с тем, чтобы предоставить ДНК конформационную свободу для расплетания, и затем сшивается, прежде чем происходит разделение родительских цепей. До появления лучшего ответа на этот вопрос размышления над этой проблемой несколько облегчаются использованием модели «осциллирующей спирали», предложенной как альтернатива Уотсон-Криковской структуре для ДНК [15].

Предшествующее описание репликации в эукариотических системах также хорошо применимо к кольцевым ДНК бактерий с одним изменением. Различные результаты показывают, что репликация бактериальной и вирусной кольцевой двуспиральной ДНК начинается в некой точке хромосомы и протекает затем одновременно в обоих направлениях от этой точки. Таким образом начальный интермедиат в форме «глаза» (—O—) превращается в форму —[ ]— по достижении конца линейной молекулы. Однако в случае бактериальной хромосомы форма «глаза» превращается в два кольца.

### 22.5.1.2. Репликация вирусных нуклеиновых кислот

Существует четыре типа вирусных нуклеиновых кислот: одно- и двунитевые как РНК, так и ДНК. Двунитевая ДНК вирусов реплицируется в основном таким же способом, как бактериальная. Вирусы, содержащие однонитевую ДНК, типа бактериофага ФХ 174, начинают свой жизненный цикл впрыскиванием своей кольцевой ДНК в клетку хозяина, бактерии *E. coli*, в которой инфекционная «плюс»-цепь действует как матрица для построения комплиментарной «минус»-цепи, что приводит к образованию кольцевого дуплекса. После этого новая копия «плюс»-цепи постепенно сворачивается и разрезается на отрезки идентичной длины перед соединением 3′- и 5′-концов в замкнутое однонитевое кольцо.

Большинство РНК-содержащих вирусов содержат однонитевую нуклеиновую кислоту, например вирус табачной мозаики. Обычно,



процесс репликации этой РНК происходит аналогично описанному для бактериофага ФХ 174, с использованием (—)-цепи РНК. Меньшее число РНК-содержащих вирусов, такие как реовирусы, содержат двунитевую РНК, у которой соотношение оснований подчиняется правилам Чаргаффа. Их репликация протекает непосредственно с образованием РНК дочерних молекул, вероятно по полуконсервативной схеме без вмешательства ДНК. Для такой репликации необходимо присутствие специальной РНК-репликазы, которая обычно вырабатывается в клетке хозяина при использовании в качестве матрицы инфекционной РНК.

Небольшая группа РНК-содержащих опухолевых вирусов, таких как вирус саркомы Роуса, ведет себя особым образом. Когда нить инфекционной РНК проникает в клетку хозяина, она приносит с собой не менее одной копии фермента обратной транскриптазы. В результате первоначально синтезируется комплиментарная инфекционной РНК кольцевая ДНК. Затем последняя превращается в кольцевую двунитевую ДНК *провируса*. Провирус включается в клеточную хромосому, с участка которой, в результате процесса, сходного с нормальной транскрипцией, могут быть получены многочисленные копии нитей инфекционной РНК. Открытие этого удивительного фермента в 1970 г. привело к присуждению Давиду Балтимору и Говарду Темину Нобелевской премии [2, 3]. Хотя первоначальные надежды на то, что этот фермент может помочь в диагностике вирусных форм рака, в значительной степени не оправдались, его значение для общих вопросов молекулярной биологии по-прежнему велико.

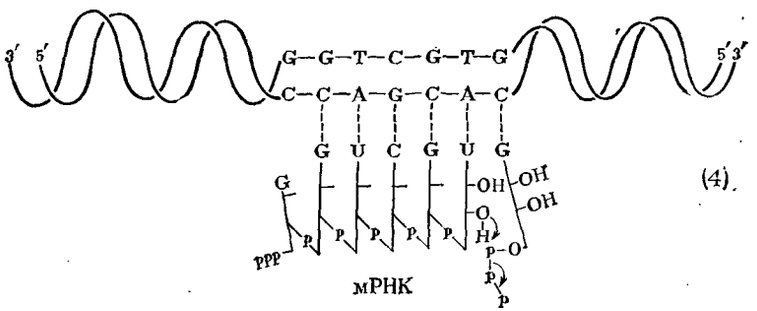
### 22.5.2. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК В РНК

Последовательность оснований ДНК предопределяет последовательность аминокислот в белке при его биосинтезе. Этот процесс контролируется на двух различных стадиях. Во-первых, в ядрах клеток происходит *транскрипция* информации с ДНК на мРНК. Во-вторых, в цитоплазме происходит *трансляция* мРНК в белок.

### 22.5.2.1. Биосинтез мРНК : транскрипция

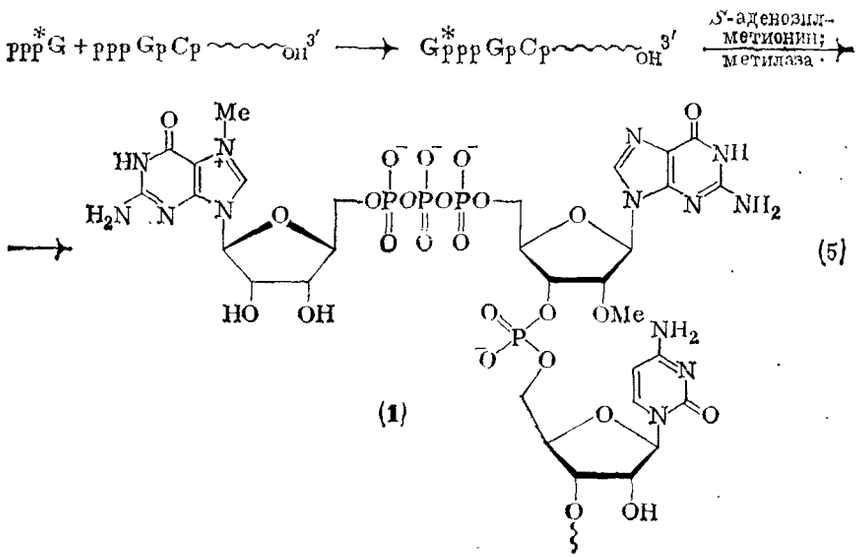
мРНК вырабатывается в клетке в результате конденсации рибонуклеозид-5′-трифосфатов со свободной 3′-гидроксильной группой образующейся цепи РНК. Таким образом, как и в случае ДНК, биосинтез мРНК протекает в направлении 5′ → 3′ {схема (4)}. Катализирует этот процесс единственный фермент, *РНК-полимераза*, для работы которой необходима ДНК-матрица. Матрица может быть одно- или двунитевой, и она одна диктует последовательность включаемых оснований в соответствии с нормальным типом комплиментации. В случае двунитевой ДНК РНК-полимераза использует в качестве матрицы только одну определенную цепь. Однако если ДНК повреждена или же ее цепи разделены, то они обе могут

действовать как матрицы. Возможная причина этой избирательности будет описана ниже (см. разд. 22.5.2.2)




(4)

После транскрипции с ДНК с молекулой мРНК эукариотов происходит три события. Прежде чем она покинет ядро клетки, к 5′-концу мРНК присоединяется концевой нуклеотид («кеп») в результате реакции конденсации между ней и гуанозин-5′-трифосфатом {схема (5)}. Затем это концевое звено метилируется с помощью *S*-аденозилметионина с введением метильных групп по *атому N-7* концевого гуанинового основания и по 2′-гидроксильной группе 5′-концевого остатка мРНК, что приводит к образованию характеристического концевого звена. На схеме (5) показана структура реовируса с концевым остатком $m^7GpppG_mC$ ... (1).




(5)

(1)

Затем к мРНК с концевым остатком присоединяется последовательность poly(A) длиной до 200 остатков и после этого полученный продукт $m^7GpppG_m \sim A_{200}$ удаляется из клеточного ядра в ци-



топлазму, где может происходить дальнейшее метилирование атомов N-6 внутренних адениновых остатков. Полные молекулы мРНК насчитывают около 1500 остатков, исключая вариабельный poly(A)-конец. Есть отдельные подтверждения того, что обнаруживаемые в ядрах клеток существенно бóльшие по размеру гетерогенные ядерные РНК, которые также могут иметь концевое звено («кеп») и poly(A)-последовательности, являются формальными предшественниками мРНК.

### 22.5.2.2. Контроль транскрипции

В хромосоме нормальной клетки существует значительно больше ДНК, чем *когда-либо* используется для транскрипции. Это, вероятно, обусловлено двумя уровнями контроля. Надо полагать, что хромосомные белки разрешают транскрипцию некоторого количества ДНК, но не всего запаса. Эта ситуация будет, вероятно, неизменной для всех клеток данного вида. С другой стороны, в клетках, выполняющих разные функции внутри вида, а также внутри той же самой клетки, но на разных стадиях ее жизненного цикла или в соответствии с изменениями в окружающей ее среде, используются различные гены. Этот процесс рассматривается как генная регуляция и, возможно, он осуществляется в результате контроля за доступом РНК-полимеразы к хромосомной ДНК.

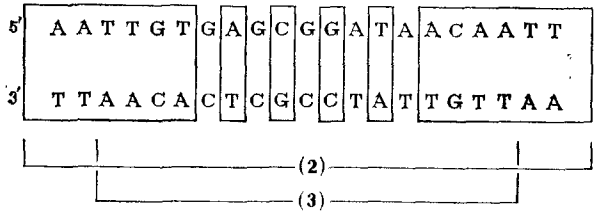
РНК-полимераза является очень большим ферментом (мол. масса $\approx 5 \cdot 10^6$), который может присоединять к себе дополнительные субъединицы для выполнения специфических задач: σ-субъединицу — для начала синтеза мРНК и ρ-субъединицу — для высвобождения мРНК в конце синтеза. Результаты изучения последовательности ДНК позволяют предположить, что РНК-полимераза узнает *промоторный участок*, который имеет последовательность, близкую к ... $TAT^A_GAT^A_G$ ..., с помощью σ-фактора. Затем начинается транскрипция ДНК в точке, удаленной от этого участка примерно на шесть остатков (2 нм) в длину. Соответствующая природа терминаторной последовательности и роль ρ-фактора до сих пор не ясны.

*По контролю* гены группируются в две четкие группы. *Оперон* является единицей транскрипции мРНК и может содержать один, два или несколько генов. Все они контролируются единственным промотором и выражаются в образовании единственной молекулы мРНК. Такие группы генов часто связаны с образованием продуктов, используемых для близко родственных биохимических задач. Например, десять белков, ответственных за биосинтез гистидина, сгруппированы *в его* оперон. В свою очередь, опероны могут быть объединены в кластеры. Кластер *str-spc* имеет дело примерно с 60 белками, которые все включаются в структуру рибосомы, а также с одной субъединицей РНК-полимеразы. Поскольку в настоящее время мало что известно о функции кластеров, изучение

бактерий и их вирусов должно дать убедительную информацию о природе оперонного контроля.

Два классических примера — это группа генов, использующие лактозу как питательное вещество для *E. coli*, а именно *lac*-оперон [4] и оперон бактериофага λ, который контролирует размножение фага после его включения в хромосому хозяина [5].

*lac*-Оперон содержит три гена, называемых *z*, *y* и *a*, которые кодируют β-галактозидазу, транспортный белок и фермент трансацетилазу соответственно. Им предшествует регулярный ген *i*, который кодирует белок-репрессор с мол. массой 38 000. Четыре субъединицы этого белка связываются с коротким сегментом ДНК, известным под названием *оператор*, который обладает исключительно высокой эффективностью. После того, как генетический анализ показал, что этот оператор располагается между генами *i* и *z*, изучение последовательности ДНК дало возможность его локализовать (рис. 22.5.1). С помощью химического синтеза было показано, что олигомеры **(2)** [6] и **(3)** {схема (6)} [7] (которые имеют практически палиндромные последовательности) связываются с белком репрессором с константой сродства около $10^{13}$ моль$^{-1}$·л.




Область *промотора* расположена между *z*-геном и оператором и выполняет две функции. Остатки с 53 по 84 образуют участок связывания комплекса, образуемого белком катаболитным активатором гена (CAP) и цикло-AMP. Когда бактерия испытывает недостаток в продуктах метаболизма, образующихся из глюкозы, уровень содержания цикло-AMP повышается. В результате этого уровень связывания комплекса цикло-AMP-CAP с областью промотора возрастает и неизвестным образом облегчается связывание РНК полимеразы с соседней областью (см. рис. 22.5.1). Таким образом, *положительный контроль* проявляет свое влияние путем увеличения частоты, с которой РНК-полимераза «запирает» область промотора, когда бактерия становится голодна!

Между РНК-полимеразой и локусом для инициации биосинтеза мРНК существует преграда в виде белка-репрессора. Последний не может быть удален с оператора ДНК, что позволило бы ее цепям разделиться и экспонировать участок инициации для фермента транскрипции. Когда же бактерия обнаруживает, что она снабжается лактозой, что определяется по присутствию продукта гидролиза последней — галактозы, ситуация немедленно изменяется. Эта гексоза эффективно связывается с белком репрессором



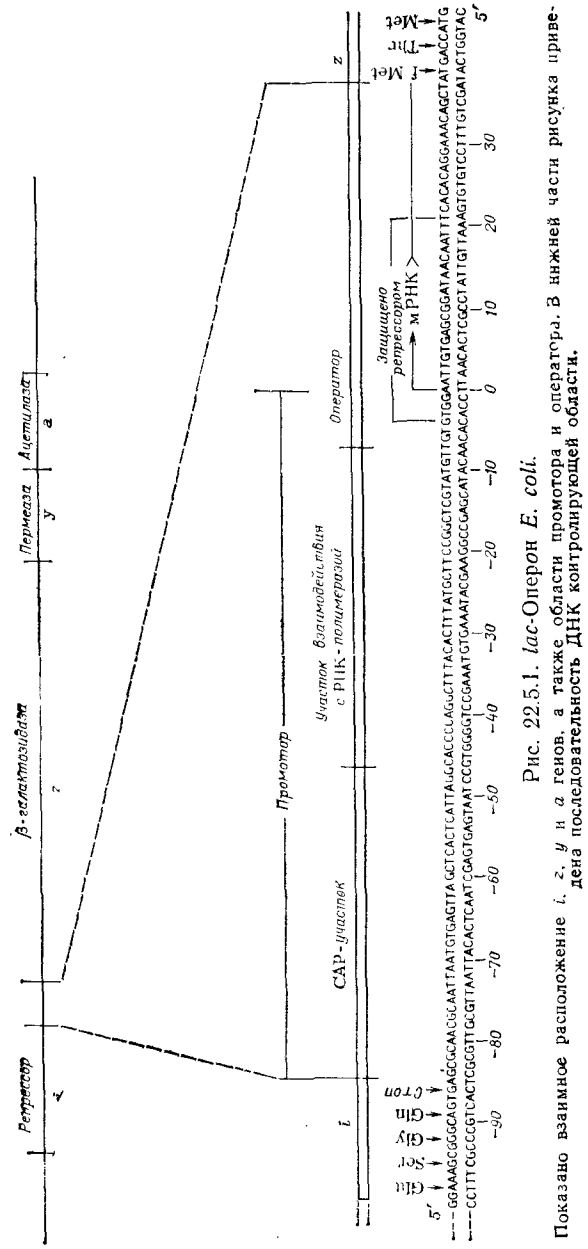



Рис. 22.5.1. *lac*-Оперон *E. coli*.

Показано взаимное расположение *i*, *z*, *y* и *a* генов, а также области промотора и оператора. В нижней части рисунка приведена последовательность ДНК контролирующей области.

таким образом, что сродство комплекса к оператору ДНК снижается в $10^4$ раз. Поскольку каждая клетка обладает лишь несколькими молекулами белка репрессора, малая концентрация галактозы действует как индуктор и связывается с репрессором, который отделяется от оператора ДНК. Теперь ДНК может расплестись в области оператора и позволить молекулам РНК-полимеразы подойти к области инициации мРНК.

Короче говоря, *биосинтез на генах лактозного оперона начинается только тогда, когда голодная бактерия находит источник лактозы*, которую могут утилизировать белки, синтезируемые этими генами.

Вышесказанное является описанием первой проанализированной системы. Этот процесс описывается как *отрицательный контроль*, поскольку биологическая активность подавляется присутствием специфической молекулы — белка-репрессора. В настоящее время известны примеры, когда белки осуществляют положительный контроль и даже положительный *или* отрицательный контроль. Несмотря на то, что этот процесс столь сложно контролируется, в клетке *E. coli* содержится одновременно от одной до двух тысяч молекул мРНК. Как они используются для получения белков?

### 22.5.3. ТРАНСЛЯЦИЯ мРНК В БЕЛОК

Основные закономерности управляемого мРНК биосинтеза белка были выяснены в течение сравнительно небольшого времени. Неослабная исследовательская активность не только оставила главную схему относительно неизменной, но также продемонстрировала ее универсальность для всех организмов от микробов до человека.

#### 22.5.3.1. Функция транспортной РНК и генетический код

Не существует непосредственной структурной связи между отдельными аминокислотами и основаниями нуклеиновых кислот. Более того, существует 20 видов аминокислот и только 4 типа оснований нуклеозидов. Сопоставление этих данных стимулировало ранние гипотезы о том, что должны существовать типы молекул-адапторов для того, чтобы осуществлять корреляцию между информацией, содержащейся в основаниях нуклеиновых кислот, взятых одновременно по три, и структурами индивидуальных аминокислот. Такие адапторы были вскоре обнаружены в виде маленьких относительно хорошо растворимых молекул РНК, получивших позднее название *транспортных рибонуклеиновых кислот*, тРНК.

Различные их виды оказались поддающимися очистке с помощью хроматографии и позднее — расшифровке последовательности. Обнаружено, что помимо большого сходства в последовательностях, все молекулы тРНК имеют общую структуру «клеверного листа» {см. главу 22.1, структура (50)}. Во всех без исключения случаях они содержат на 3′-конце последовательность



... $pCpCpA_{OH}$, предусматривающую наличие у концевого аденозина свободной гидроксильной группы (в положении 2′ или 3′, для различных типов молекул), которая может быть ацилирована карбоксильной группой аминокислоты. (Как будет видно далее, вопрос о том, какой именно аминокислотой будет ацилирована тРНК, всецело определяется ферментом, специфическим для единственного типа тРНК и соответствующей ему аминокислоты.) Петли и неспирализованные остатки в молекулах тРНК представляют собой богатый источник модифицированных нуклеозидов — неизменно получаемых в результате модификации аденозина, цитидина, гуанозина или уридина *после* биосинтеза молекулы тРНК (см. гл. 22.2). Центральная петля клеверного листа всегда имеет три основания *, комплиментарные трем основаниям молекулы мРНК, которые, в свою очередь, соответствуют одной определенной аминокислоте.

Проблема *генетического кода*, этого специального соотношения между индивидуальными аминокислотами и триплетами оснований, или *кодонами*, была решена с использованием 64 возможных тринуклеозиддифосфатов, синтезированных Кораной [8]. Молекула тРНК *заряжается* в результате ацилирования ее 3′-концевого аденозина правильной аминокислотой, которая может быть радиоактивно меченной. Такая заряженная тРНК будет связываться с *рибосомой* только в присутствии соответствующего кодона. Оказалось,

*Таблица 22.5.1. Генетический код*

| Первое положение | Второе положение | | | | Третье положение |
|---|---|---|---|---|---|
| (5′-конец) | U | C | A | G | (3′-конец) |
| U | Phe | Ser | Tyr | Cys | U |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | Стоп | Стоп | A |
| | Leu | Ser | Стоп | Trp | G |
| C | Leu | Pro | His | Arg | U |
| | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | A |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ile | Thr | Asn | Ser | U |
| | Ile | Thr | Asn | Ser | C |
| | Ile | Thr | Lys | Arg | A |
| | Met | Thr | Lys | Arg | G |
| G | Val | Ala | Asp | Gly | U |
| | Val | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | A |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

* Мутант со сдвигом рамки из *S. typhimurium* имеет антикодон из четырех оснований, CCCC.

что 61 кодон промотирует физическое связывание аминоацил-тРНК с рибосомальными частицами, а три кодона — нет. Позднее было установлено, что эти три кодона являются сигналами терминации (окончания синтеза) и для них не существует соответствующих тРНК.

Путем биосинтеза белка *in vitro* с применением синтетических рибонуклеозидных матриц, полученных из ДНК с повторяющейся последовательностью, таких как $dp(GpGpAp)_nGpGpA_{OH}$ {см. схему (2) в гл. 22.4}*, были проверены все 64 варианта триплетов (табл. 22.5.1).

Это позволило установить полную корреляцию между конкретным белком и соответствующей ему мРНК, как, например, между 3′-концом гена *i* и соответствующей ему аминокислотной последовательностью ...Glu-Ser-Gly-Gln — COOH (см. рис. 22.5.1).

### 22.5.3.2. Роль рибосомы

Рибосома является существенно важным аппаратом в биосинтезе белка. Она представляет собой комплекс более 50 белков и трех основных типов рРНК, которые объединены между собой в меньшую частицу (мол. масса $\approx 10^6$), называемую 30S-субъединицей в случае бактерий, и бóльшую частицу (мол. масса $\approx 2 \cdot 10^6$), известную для бактерий под названием 50S-субъединицы. Именно меньшая субъединица связывает разные мРНК и содержит 16S рРНК (мол. масса $\approx 5 \cdot 10^5$), последовательность 3′-конца которой, ...$CAUUA_{OH}$, по-видимому, комплиментарна последовательности молекул мРНК вблизи точки, в которой начинается синтез белка.

Биосинтез белка начинается тогда, когда 30S-субъединица образует тройной комплекс с мРНК, используя инициаторный кодон AUG, и с особой молекулой тРНК. Последняя должна быть заряжена метионином и затем формилирована по аминогруппе этой аминокислоты (*N*-формил-Met-тРНК$^{Met}_f$). Затем присоединяется бóльшая субъединица рибосомы (а также другие белковые факторы) и образуется инициаторный комплекс.

50S-рибосомальная частица имеет два участка связывания *L*-образных молекул тРНК. Один из них, называемый *A*-участком, принимает только молекулы тРНК, заряженные свободными аминокислотами. Другой, смежный с ним *P*-участок, принимает из *A*-участка молекулы тРНК, заряженные группировками, содержащими аминогруппу, которая является частью амидной связи — либо как результат формилирования, в начальном случае, либо, в общем случае, в виде пептидной связи (рис. 22.5.2).

*N*-Формил-Met-тРНК$^{Met}_f$ передвигается в *P*-участок, сдвигая вместе с собой мРНК, что открывает в *A*-участке второй триплет

* Такая ДНК должна давать матрицу $гррр(UpCpCp)_nUpCpC_{OH}$, которая приводит к включению серина, лейцина и пролина в три типа белков.



оснований. Заряженная тРНК с антикодоном из комплиментарных оснований (Thr-тРНК$^{Thr}$ в случае белка β-галактозидазы, на рис. 22.5.1) связывается с *A*-участком. Ее аминогруппа может теперь действовать как нуклеофил и атаковать активную эфирную связь {стадия (*а*) на рис. 22.5.2} заряженной тРНК, находящейся

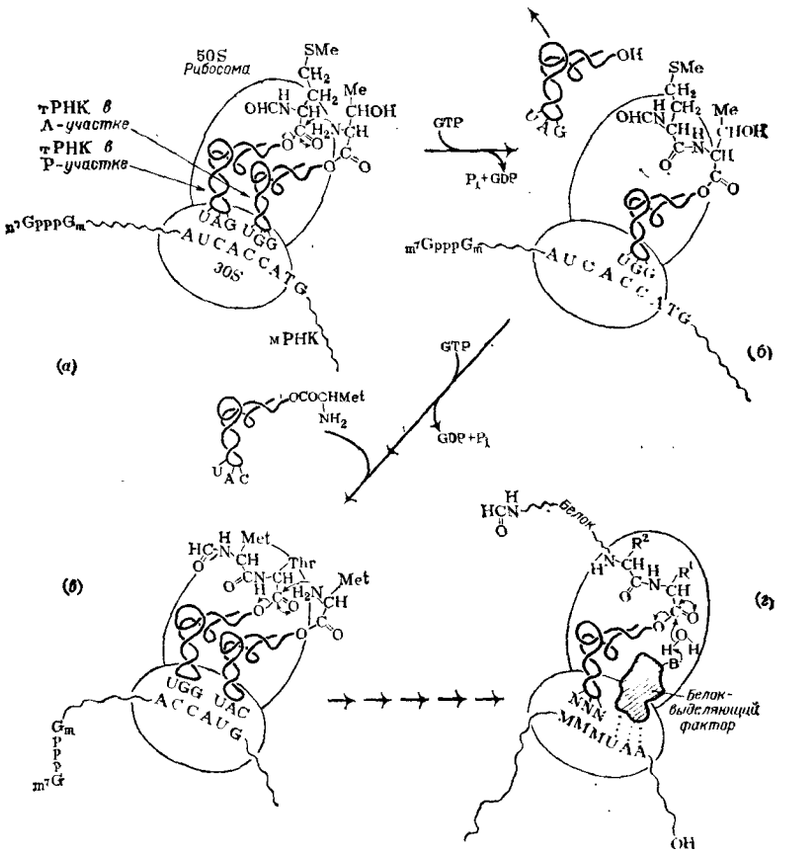



Рис. 22.5.2. Схема, демонстрирующая стадии инициации (а), удлинения (б — в) и терминации (г) в процессе биосинтеза белка.
Горизонтальными линиями изображены блоки мРНК с тРНК *L*-образной формы.

в *P*-участке, создавая первую пептидную связь нового белка. Освобожденная тРНК$^{Met}_f$ отделяется от рибосомы {стадия (*б*) на рис. 22.5.2}, так что пептидил-тРНК$^{Thr}$ может передвинуться на *P*-участок, вновь сдвигая за собой мРНК. Таким образом, мРНК продвигается точно на три остатка для образования каждой пептидной связи, соблюдая *фазу* (шаг) триплетного кода. Третья заряженная аминокислотой тРНК может теперь занять освободив-

шийся *A*-участок в соответствии с третьим кодоном (AUG и соответственно Met-тРНК$^{Met}_m$ для β-галактозидазы). Второй аминолиз {стадия (в) на рис. 22.5.2} создает вторую пептидную связь.

Этот процесс приводится в движение свободной энергией гидролиза двух молекул GTP на цикл (—60 кДж/моль). Он продолжается до тех пор, пока *A*-участок не сталкивается с одним из трех терминаторных кодонов: UAA, UAG или UGU {(г) на рис. 22.5.2}. Не существует разновидности тРНК, антикодон которой был бы комплиментарен этим кодонам, в результате чего синтез белка не может быть продолжен. Напротив, белковые факторы узнают эти последовательности, входящие в *A*-участок, и катализируют гидролиз активной эфирной связи пептидил-тРНК в *P*-участке. Таким образом, вновь созданный белок освобождается от тРНК по своему последнему остатку, рибосома сбрасывает мРНК и синтез этого белка заканчивается.

С помощью электронной микроскопии выявлено, что в силу экономности природы процессы трансляции ДНК в мРНК и транскрипция мРНК в белок протекают совместно. Удается также наблюдать структуры, похожие на еловое дерево. Полагают, что стволом этого дерева является ДНК, на вершине которого располагается первая молекула из серии РНК-полимераз и начинает синтезировать мРНК. По мере того, как молекулы РНК-полимераз продвигаются вниз по стволу, по сторонам отрастают ветви увеличивающейся длины, представляющие собой мРНК. Вдоль этих мРНК располагаются многочисленные рибосомальные частицы, все интенсивно производящие белок! В молекулярных терминах можно сказать, что синтез мРНК протекает в 5′ → 3′-направлении, а с интервалом в 25 нм рибосомы синтезируют белок в N → C-направлении.

### 22.5.3.3. Генетический код в работе

Изучение структуры и функции открывает три аспекта генетического кода: его вырожденность, его двойственность и его изменчивость.

*Вырожденность* кода является статистической необходимостью. Триплетов больше ($4^3 = 64$), чем аминокислот. Эта вырожденность распределена неоднородно (см. табл. 22.5.1). Аргинин, лейцин и серин обладают каждый шестью кодонами, в то время как триптофан обходится одним. Как мы уже видели, кодон AUG имеет двойное назначение, для инициации синтеза белка с использованием тРНК$^{Met}_f$ и для включения метионина во внутренние положения цепи с использованием тРНК$^{Met}_m$.

В мРНК бактериофага MS2, состоящей из 3569 остатков, транслируется около 90 % остатков с образованием трех белков. Использование кодона GUU значительно превышает частоту использования кодонов-троек GG {A или C, или G) для введения глицина, а кодон UAC явно предпочтительнее, чем кодон UAU (32 : 9) для тирозина. Такие предпочтения [9] могут свидетельствовать об аналогичном предпочтении этих кодонов в бактерии-хозяине *E. coli*. Еще более ярко выраженная ситуация в случае мРНК β-глобина человека, у которой транслируется 75 % нуклеотидов. Предпочтительность кодонов CUG (лейцин), GUG (валин) и AGG (аргинин) значительна, на уровне 0,001 % ($\chi^2$ тест). Вероятно, в этом случае существует корреляция с комплиментарными тРНК специализированных ретикулоцитов, где создается глобин.

В других случаях использование вырожденности кода более однородно. Вполне возможно, что свобода выбора, так часто доступная в третьей позиции кода (см. табл. 22.5.1), умело используется вирусными мРНК для достижения максимальной комплиментарности спаривания оснований в петлях шпилек и тем самым повышения стабильности вторичной и/или третичной структуры [10, 11].

*Двойственность* генетического кода предполагалась главным образом потому, что определенные вирусы, подобные ФХ 174, не обладают достаточным количеством нуклеотидных остатков для того, чтобы обеспечивать линейное соответствие для всех аминокислот, которые закодированы в их хромосомах. Девять белков ФХ 174 содержат около 1926 аминокислот, что примерно на 10 % превышает кодирующую способность 5375 нуклеотидов ее ДНК.

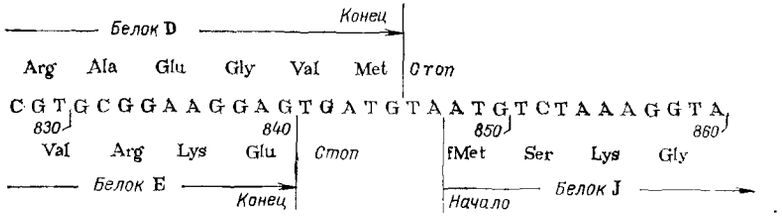



Рис. 22.5.3. Последовательность ДНК бактериофага ФХ 174.
Представлена последовательность остатков с 827 по 860 и показано их функциональное назначение.

Удивительный ответ заключается в том, что та же самая последовательность оснований используется в одной фазе для кодирования одного белка и во второй фазе — для кодирования второго белка! Таким образом, ген белка *B* лежит в пределах гена белка *A*, а ген *E* лежит всецело внутри гена *D*. Это проиллюстрировано на рис. 22.5.3 концевыми последовательностями двух последних белков [12]. Конец этих генов почти точно перекрывает место связывания с рибосомой для белка *J*, который находится вне фазы с обоими белками *D* и *E*.

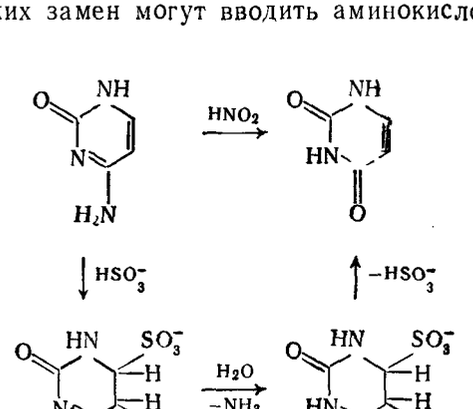
Это сверхсжатие информации может быть типичным для вирусов, может иметь место у бактерий, однако до сих пор не найдено в случае высших организмов. Многие виды эукариотов используют

лишь незначительную часть ДНК своих хромосом, и даже в таком случае многие гены повторяются в удивительной степени. Одна разновидность южноафриканской лягушки имеет на клетку не менее 20 000 идентичных генов для одной из своих тРНК.

Равновесие между созидательными возможностями выбора среди специфических оснований в ДНК (созидательные мутации) и точностью синтеза белков (поддерживающих жизнь организма) является основой эволюции. Ферменты, которые заряжают тРНК специфической аминокислотой, обладают очень низкой вероятностью ошибки, порядка $1:10^4$ для гомологичных аминокислот. При репликации точность даже выше, и величина ошибки редко превышает 1 на $10^7$.

Эта ситуация может существенно измениться под влиянием химических веществ — простых или сложных, действующих на ДНК до репликации или на РНК до трансляции. Одного примера будет достаточно.

Вещества, загрязняющие окружающую среду, азотистая кислота и $SO_2$ могут способствовать дезаминированию цитозина в урацил {схема (7)}. Такая модификация, как видно из рассмотрения генетического кода (см. табл. 22.5.1) может иметь три вида последствий на синтез белка. Во-первых, замены C на U в третьей позиции кодового слова не будут оказывать влияния на включение аминокислот во всех 16 случаях. Во-вторых, замена C на U в первой позиции кода может заменить кодон CAA (глутамин) на кодон UAA (Стоп) и, таким образом, привести к преждевременному окончанию синтеза отдельного белка. В равной мере, замена CAU (гистидин) на UAU (тирозин) может заменить каталитически активный остаток аминокислоты на неактивный. Для белка, играющего в клетке жизненноважную роль, обе такие замены будут летальными; нет потомков, которые могли бы пережить репликацию модифицированной таким образом цепи ДНК. В-третьих, некоторые из таких замен могут вводить аминокислоту с функциональной боковой группой, такую как цистеин ($UG^U_C$) или серин (UCX), на место, предназначенное для аминокислоты с совершенно другой функцией — аргинина ($CG^U_C$) или пролина (CCX) соответственно. В результате может создаваться новый тип белка с модифицированной структурой и потенциально существующими каталитическими свойствами.




(7)



Происходит ли развитие высших организмов в результате накопления многочисленных подобных точечных мутаций в течение веков или предпочтительным путем является массовая замена больших сегментов ДНК, это остается вопросом для будущего выяснения. Сейчас ясно, что мощное сочетание знаний о структуре и функции с химическим синтезом позволяет размышлять над проблемами генной инженерии.

### 22.5.4. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Две фундаментальные цели генной инженерии заключаются в исправлении генетических дефектов, таких как серповидно-клеточная анемия (точечная мутация в гемоглобине), и в добавлении нормальных генов к другим, например включение гена нитрогеназы в хромосомы пшеницы. Сейчас кажется, что реализация таких целей уже в руках исследователя; ген инсулина уже включен в бактерию *E. coli* [13].

Гормон инсулин имеет две пептидные цепи: *A* (20 остатков) и *B* (30 остатков). Они получаются из одного белкового предшественника, препроинсулина, в котором 23 из его 108 аминокислот предшествуют пептиду *B* и 35 соединяют *B*-пептид с *A*-пептидом. Молекула мРНК для этого белка имеет, таким образом, по крайней мере 327 нуклеотидов.

Руттер и коллеги [13] выделили смесь молекул мРНК, в которой в преобладающем количестве содержатся молекулы размером в 450 нуклеотидов, соответствующие препроинсулину и имеющие 3′-участок poly(A). Такая мРНК была использована (рис. 22.5.4) как матрица для обратной транскриптазы, что позволило получить кольцевую ДНК, связанную с РНК в форме шпильки. Щелочное расщепление РНК позволило вслед за этим превратить кольцевую ДНК с помощью обратной транскриптазы в дуплекс, петлеобразующий конец которого был расщеплен эндонуклеазой, специфичной к однонитевым ДНК. Затем этот дуплекс соединили встык с помощью ДНК-лигазы с декануклеотидным дуплексом, синтезированным химически [14] по способу, сходному с описанным для соединения (7) {см. схему (5) в гл. 22.4}. Выбранная последовательность декануклеотида является субстратом для фермента рестрикции *Hind III*, получаемого из *Haemophilus influenzae*.

Этот фермент рестрикции делает четыре разреза в идентичных палиндромных концах сконструированной таким образом ДНК, а также делает один идентичный разрез в кольцевой ДНК из бактериальной плазмиды *E. coli* (Плазмиды являются маленькими

кольцевыми хромосомными элементами, обнаруженными в бактериальной цитоплазме, которые реплицируются с бактериями.) Таким образом, плазмида и специальный фрагмент ДНК, содержащий ген инсулина, получают идентичные липкие концы.

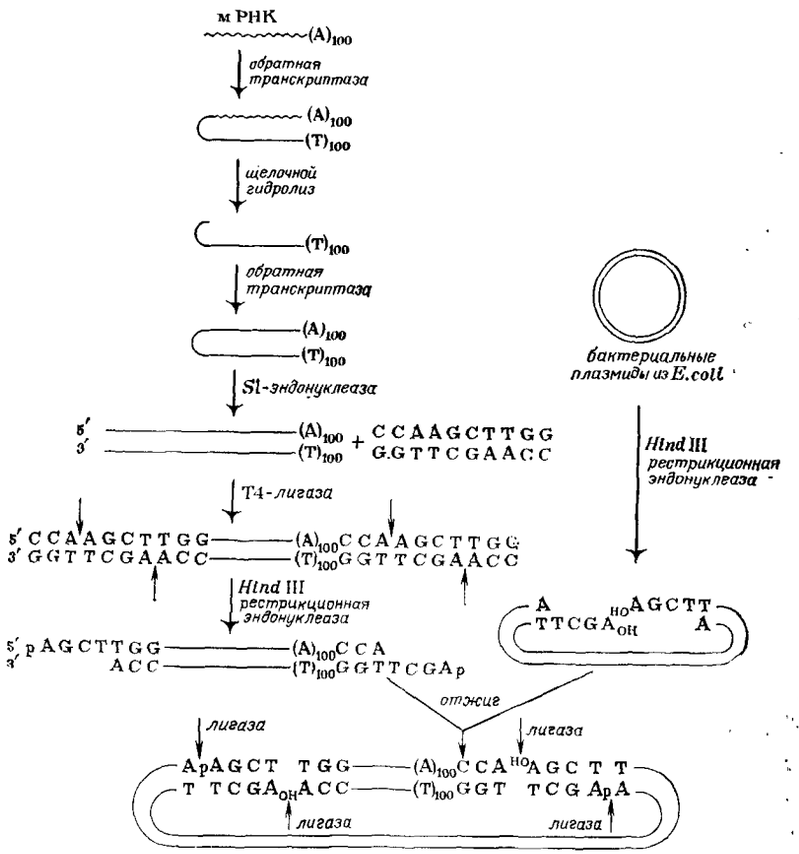



Рис. 22.5.4. Включение гена препроинсулина в бактериальную плазмиду из мРНК через кольцевую ДНК, связывание, рестрикционное расщепление, отжиг и лигазное сшивание.

Последняя стадия этого процесса заключается в отжиге плазмиды и гена инсулина с образованием кругового дуплекса, который имеет четыре однонитевых разрыва. Последние зашиваются ферментом лигазой, что приводит к образованию замкнутой кольцевой ДНК плазмиды. Она амплифицируется клонированием, давая достаточное количество копий для анализа последовательности ДНК. Проведенный анализ показал, что произошло включение 353 нуклеотидов гена препроинсулина.



После проведения еще небольшого объема работы должна быть получена первая бактерия *E. coli*, способная синтезировать препроинсулин. Возможно, что и сорта пшеницы, которые способны фиксировать свой собственный азот, еще не долго будут оставаться розовой мечтой.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *J. D. Watson*, «The Molecular Biology of the Gene», 3rd edn., Addison-Wesley, New York, 1975, p. 436.
2. *D. Baltimore*, Nature, 1970, **226**, 1209.
3. *H. M. Temin and S. Mizutani*, Nature, 1970, **226** 1211.
4. *M. Ptashne and W. Gilbert*, Sci. Amer., 1970, **222(6)**, 36.
5. *T. Maniatis and M. Ptashne*, Sci. Amer., 1976, **234(1)**, 64.
6. *R. Dickson, J. Abelson, W. M. Barnes, and W. S. Reznikoff*, Science, 1975, **187**, 27.
7. *C. P. Baht, R. Wu, J. Stawinsky, and S. A. Narang*, Proc. Nat. Acad. Sci. U S. A., 1977, **74**, 966.
8. *R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka, and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 819.
9. *W. Fiers, R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert, and M. Ysebaert*, Nature, 1976, **260**, 500
10. *G. M. Blackburn*, Ann. Reports Chem. Soc., 1970, **67B**, 514.
11. *W. Min Jou, G. Haegeman, and W. Fiers*. F. E. B. S. Letters, 1971, **13**, 105.
12. *F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchinson III, P. M. Slocombe, and M. Smith*, Nature, 1977, **265**, 687.
13. *A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter, and H. M. Goodman*, Science, 1977, **196**, 1313.
14. *R. H. Scheller, R. E. Dickerson, H. W Boyer, A. D. Riggs, and K. Itakura*, Science, 1977, **196**, 180.
15. *G. A. Rodley, R. S. Scobie, R. H. T. Bates, and R. M. Lewitt*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 2959.

ЧАСТЬ 23

# БЕЛКИ: АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ

## 23.1. ВВЕДЕНИЕ

*Е. Хаслем (University of Sheffield)*

### 23.1.1. ПРИРОДА БЕЛКОВ

«Поскольку белки так или иначе участвуют во всех химических процессах живых организмов, можно ожидать, что исследование их структуры и превращений приведет к важным открытиям для биологической химии...
На самом деле никто не знает точно, когда биология и химия будут успешно взаимодействовать. На этот счет существуют различные мнения» [1].
«Предполагали поэтому, что гигантские молекулы не существуют, а есть только скопления небольших исходных малых молекул, образующих частицы неопределенной массы.
В настоящее время, я думаю, у нас есть неопровержимое доказательство ложности этого взгляда. Результатом многосторонних исследований явилось то, что белки построены из частиц, обладающих признаком индивидуальности и, следовательно, в действительности являются гигантскими молекулами» [1а].

Авторство на слово белок (протеин) и его введение в словарь науки в 1838 г. обычно приписывают голландскому химику Герхарду Иоганну Мульдеру:

«Как в растениях, так и в животных присутствует вещество, которое... выполняет важную функцию. Оно без сомнения является важнейшей из известных компонент живой материи, и, по-видимому, без него жизнь была бы невозможна. Это вещество следует назвать белком (протеином, от греч. proteios — первый)».

Тем не менее есть некоторое сомнение в авторстве Мульдера на это слово — он воспользовался советом, данным ему великим шведским химиком Берцелиусом, без какой-либо особой признательности последнему [1б]. Сам Мульдер был заинтересован в изучении альбуминовых веществ и предположил, что белки — это соединения фосфора и серы с органическим радикалом $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$. Хотя Либих и другие вскоре привели доказательство, которое разрушило мульдеровскую теорию строения белков, никакие последующие попытки, которые предпринимались в течение многих лет, не привели к успеху в понимании структуры белков.



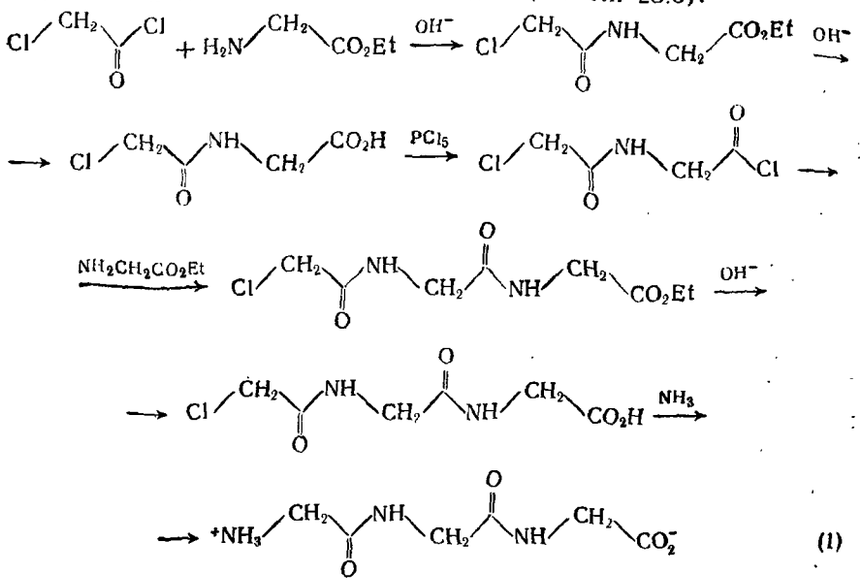
Белки относятся к числу наиболее сложных и больших молекул, созданных природой; кроме того, они остаются в числе наименее устойчивых и трудно поддающихся очистке. Эти свойства преподносили почти непреодолимые технические трудности первым исследователям в данной области и добавляли к этому нежелательное сходство химии белков с коллоидами. Долгое время белки относили к неопределенным коллоидам, молекулы которых трудно выделить и охарактеризовать. Однако по мере того, как совершенствовались критерии чистоты белков, возникал вопрос о молекулярной концепции в белковой химии; в конце концов пришли к тому, что белки представляют собой только большие сложные молекулы, растворы которых не менее молекулярны, чем растворы их компонент — аминокислот. Признанию этой точки зрения в большой мере способствовали работы Сведберга, Серенсена и других.

На этом фоне многочисленных экспериментальных трудностей и теоретических неясностей в 1899 г. выступил Фишер [2] со своей классической работой, которая решающим образом повлияла на все последующие работы в области химии белков. Он поставил перед собой дерзкую цель — синтез белковоподобных органических соединений. Его подход был характерно прямым и несложным:

«Пока осторожные коллеги боятся, что рациональное изучение этого класса соединений натолкнется на непреодолимые трудности в силу сложных физических свойств этих веществ, другие, оптимистически настроенные исследователи, к числу которых я отношу себя, полагают, что можно, по крайней мере, окружить неприступную крепость с помощью всего арсенала имеющихся средств, ибо только дерзостью можно определить границы возможностей наших методов».

К началу работы Фишера была известна примерно дюжина аминокислот, как продуктов расщепления белков, другие были открыты немного позже. Фишер начал работать по нескольким направлениям: синтез аминокислот и расщепление их рацемических форм; исследования производных аминокислот для того, чтобы ускорить разделение смесей аминокислот и, что особенно важно, рекомбинация двух или более аминокислот в вещества, которые он назвал «полипептидами». Величие фишеровского подхода к проблеме полипептидного синтеза произвело прямое воздействие и было склонно затмить другие пионерские работы в этой области, такие как работы Курциуса. В 1901 г. он объявил о синтезе глицил-глицина — простейшего дипептида, а в 1907 г. — о 18-ти членном полипептиде лейцил-триглицил-лейцил-триглицил-лейцил-октаглицил-глицина. Даже по современным стандартам это было значительным достижением в синтезе. Синтез глицил-глицил-глицина иллюстрирует общий подход, примененный Фишером {схема (1)}; его стратегия и принципы — замечательный предшественник

современных методов синтеза пептидов (см. гл. 23.6).



(I)

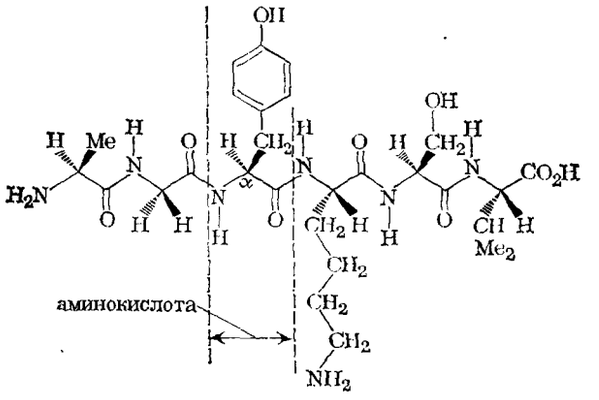
глицил-глицил-глицин

Большое сходство в химических и физических свойствах между синтетическими полипептидами Фишера и некоторыми белками (протеинами) оказало дальнейшую поддержку предположению, ранее выдвинутому Фишером и независимо от него Хофмейстером в 1902 г. о пептидном строении белков (протеинов). Эта теория предполагала, что молекула белка (протеина) построена только из цепей α-аминокислот (и позже, конечно, были включены α-иминокислоты), связанных друг с другом пептидными (амидными) связями между α-амино- и α-карбоксильными группами [см. формулу (I)]. Сам Фишер учел, что возможны и другие способы соединения между аминокислотами в молекуле белка (протеина) и добавил к имеющимся сомнениям вопросы о размере и сложности природных белков, что вызвало в период 1920—1940 гг. различные предположения [3] об альтернативных способах связи между остатками аминокислот. Сэнджер [4] писал в 1952 г., что самым убедительным доводом в поддержку пептидной теории строения белков (протеинов) в действительности было то, что с 1902 г. — со времени ее возникновения, не были найдены опровергающие ее факты; сам Сэнджер привел одно из первых убедительных доказательств этой теории, установив полную структуру белкового гормона инсулина.

Ни Фишер, ни многие исследователи белков в течение последующих 20 лет не смогли удовлетворительно решить одну из важнейших проблем белковой химии. Она заключалась в том, как



получить из протеиновых экстрактов гомогенные химические вещества. Ответы на эти вопросы не были получены до тех пор, пока в 1940 годах не появились [5] хроматографические методы. После их введения в практику резко повысились качество белковых препаратов и надежность данных, получаемых при анализе этих веществ. Это послужило толчком для соответствующего взрыва в наших знаниях о структуре и функциях белков, который произошел после 1950 г. Информацию об этих методах и их применении можно найти в большом количестве работ [6—8]. По-видимому, выдающимся техническим достижением здесь явилось усовершенствование прибора Спакмана-Стейна-Мура для полного автоматизированного аминокислотного анализа белков (протеинов) и использование сложных физических методов, таких как рентгеноструктурный анализ и ядерный магнитный резонанс для оценки их трехмерной структуры.




(1) структура полипептида

Понятно, что первые исследователи были приведены в замешательство открытием, каких размеров может достигать полипептидная цепь в некоторых белках, согласно оценкам их молекулярной массы. Некоторые авторы [3] пришли к заключению, «что имеющаяся конфигурация действует таким образом, что помогает молекуле гораздо сильней уплотниться, чем это можно было ожидать на основании простейших и наиболее очевидных предположений». Большие успехи в исследовании биополимеров, таких как белки и нуклеиновые кислоты, а также становление молекулярной биологии в значительной степени произошли в результате понимания того факта, что такие ограничения, накладываемые на форму и размер частиц, действительно существуют. Определение точной пространственной структуры белков с помощью кристаллографической техники и в ряде случаев исследования, которые показали дискретные изменения в конформации белков, когда они вступали в

биологические реакции, указали на путь решения самой главной задачи в биологической химии, а именно установления соответствия между структурой и функцией, о чем Фишер упоминал еще в 1906 г.

### 23.1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ, ФУНКЦИЯ И СТРУКТУРА

Белки представлены значительным множеством форм и обладают соответственно большим разнообразием физических свойств. Ранние классификации основывались на одном из физических критериев — их растворимости в водных средах. Одна такого рода классификация (Британское физиологическое общество, 1907 г.) показывает (табл. 23.1.1), как изменяется растворимость от хорошо растворимых глобулинов и альбуминов до фактически нерастворимых склеропротеинов, таких как α-кератин и склеротин. Такая форма классификации является, в сущности, чисто эмпирической, хотя некоторые из названий, связанные с ее важнейшими категориями, все еще используются в современной литературе. Неудивительно, что из-за довольно произвольной формы такой классификации многие исследователи этого раннего периода столкнулись с серьезными трудностями — насколько обоснован такой способ характеристики [9]:

«... можно одинаково хорошо различать яблоки, растущие на отдельном дереве, и называть их по-разному в зависимости от того, упали ли они после первого, второго или третьего встряхивания. Конечно они должны различаться по червивости, а также по размеру от большого к малому, в указанном порядке встряхивания, но это может быть установлено только в результате детального анализа упавшего материала».

Другая использовавшаяся классификация была основана на продуктах гидролиза. Простыми белками, или протеинами называют белки, дающие при гидролизе только аминокислоты (или продукты их деградации). С другой стороны, сложные (коньюгированные) белки дают при расщеплении не только аминокислоты, но и другие органические или неорганические молекулы (простетические группы). Классификация, основанная на химической природе различных простетических групп, приводит к типичным

*Таблица 23.1.1. Классификация белков по растворимости в водных средах*

| | |
|---|---|
| 1. Альбумины | Растворимы в воде и разбавленных растворах солей |
| 2. Глобулины | Умеренная растворимость в воде; растворимы в разбавленных растворах солей |
| 3. Проламины | Не растворимы в воде; растворимы в 50—90 %-ном этаноле |
| 4. Глутелины | Не растворимы в воде, разбавленных растворах солей и водном этаноле; растворимы в разбавленных кислотах и щелочах |
| 5. Склеропротеины | Не растворимы в водных средах |



представителям: нуклеопротеинам, гликопротеинам, мукопротеинам, фосфопротеинам, флавопротеинам и металлопротеинам. Таким образом, нуклеопротеины в рибосомах соединены с нуклеиновыми кислотами многочисленными ионными связями, гликопротеины ковалентно связаны с углеводами, липопротеины связаны с липидами и холестерином за счет различных нековалентных сил, а ионы металлов соединены с металлопротеинами посредством ионных или дативных ковалентных связей. Эта классификация тем не менее служит иллюстрацией того, насколько сложны многие белки, встречающиеся в живой материи.

Однако по мере изучения природы белков и биологической роли каждого из них классификация сильно изменялась и стала основываться на свойствах, которые связаны с их большим функциональным разнообразием и распространенностью. Белки организма в целом представлены широким спектром веществ; на долю белков, входящих в состав клеток, обычно приходится более половины сухой массы. Можно выделить некоторые отдельные группы: ферменты, которые обеспечивают катализ биохимических реакций в клетке; резервные белки; структурные белки; транспортные белки; мышечные белки; антитела; токсины; гормоны и регуляторные белки. Возможно также несколько более широкое понимание биологических функций белков для того, чтобы их классифицировать на три основные категории (табл. 23.1.2) — резервные белки, структурные, или механические белки и белки, проявляющие свои различные биологические свойства при комбинации или связывании с ионами или другими молекулами.

Белки, помимо большого разнообразия физических и биологических свойств, очень сильно варьируют по своей молекулярной

*Таблица 23.1.2. Классификация белков по их функции в организме*

1. *Резервные белки*

   Альбумин (белок яйца), казеин (молоко)
   Зеин (зерно), глиадин (пшеница)
   Ферритин (селезенка)

2. *Структурные или механические белки*

   α-Кератин или его производные (волосы, копыта, рога)
   Коллаген (кости и сухожилия), фиброин (шелк)
   Эластин (связки), склеротин (насекомые)
   Гликопротеины (клеточные стенки)
   Миозин (мускулы), фибриноген-фибрин (кровь)

3. *Белки, соединяющиеся с другими молекулами или ионами*

   (а) Ферменты (например, химотрипсин, рибонуклеаза, лизоцим)
   (б) Гормоны и регуляторные белки (например, инсулин, глюкагон, гастрин, адренокортикотропный гормон, гистоны и белки ядра)
   (в) Иммунопротеины (например, IgG глобулины)
   (г) Транспортные белки (например, миоглобин, гемоглобин, цитохромы, белки-переносчики через мембраны)
   (д) Фото- и хеморецепторы (например, опсин)

массе. Инсулин, белковый гормон, имеет молекулярную массу около 6000, ферменты рибонуклеаза и лизоцим имеют молекулярные массы в области 12 000—14 000. Эти молекулы белков стоят на нижней границе области, которая увеличивается от гемоглобина (64 500), гексокиназы (96 000), триптофан-синтетазы (117 000) и γ-глобулина лошади (150 000) до белковой компоненты вируса табачной мозаики с молекулярной массой около 4 000 000. Большинство белков с молекулярной массой более 20 000—30 000 обладает, однако, четвертичной структурой и состоит из нескольких индивидуальных субъединиц, которые связаны между собой за счет нековалентных сил. Гемоглобин, например, состоит из четырех единиц, каждая из которых состоит из отдельной полипептидной цепи, а вирус табачной мозаики имеет более 2000 отдельных полипептидных цепей. Наконец, отметим, что хотя такие субъединицы из различных источников сильно варьируют по размеру, многие из них, например из гемоглобина человека, соответствуют примерно размеру субъединицы в 17 600 (полипептидная цепь из $\approx 150$ аминокислотных остатков), как это впервые предположил Сведберг [10], и они подчиняются сведберговскому закону кратности. Объединение таких белковых субъединиц с воссозданием полностью активного биологического комплекса обычно называют *четвертичной структурой* белка. Изучение взаимодействия субъединиц является чрезвычайно важным аспектом современной молекулярной биологии, так как эти взаимодействия несомненно играют важную роль *во многих биологических реакциях*. Современными классическими примерами влияния таких свойств на биологические явления служат аллостерическое поведение ферментов и кооперативность связывания кислорода в гемоглобине. Тетрамерная структура гемоглобина содержит четыре участка, связывающих кислород, и эта структура такова, что когда один из участков связывает кислород, то небольшие изменения в конформации полипептидной цепи вокруг этого участка передаются на следующий участок с тем, чтобы увеличить его сродство к кислороду. Как только произойдет связывание кислорода каждым из первых трех участков, аналогичный эффект наблюдается на следующем участке. Такое поведение чрезвычайно важно для характеристики гемоглобина как переносчика кислорода.

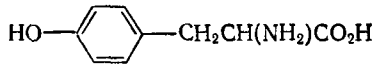
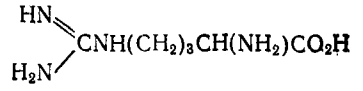
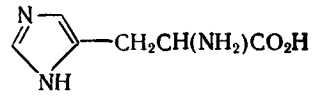
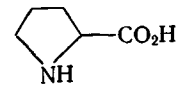
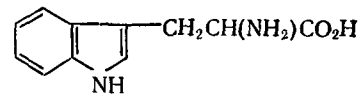
Исследование структурных и конформационных свойств индивидуальной полипептидной субъединицы обычно ведется по трем аспектам: рассматриваются первичная, вторичная и третичная структуры, как это было предложено Линдерстрем-Лангом [11]. Организмы используют для синтеза белков основной набор из 20 аминокислот (см. гл. 23.2). Необычные аминокислоты, которые эпизодически встречаются в белковых структурах, часто являются результатом химической модификации простетической группы гема (остатки 70—80); они остались неизменными в процессе эволюции, тогда как другие части молекулы играют, по-видимому, меньшую роль для спецификаций, особенно остатки, не участвующие в агрегации (образовании суперструктуры). Например, остатки гидроксипролина и гидроксилизина в коллагене являются производными пролина и лизина, входивших в первоначально созданные полипептидные цепи. Определенную последовательность аминокислот, входящих в данную полипептидную цепь, называют *первичной структурой*, она задана генетически. Число возможных сочетаний только из 20 различных аминокислот является астрономическим. Так, для полипептидной цепи из 300 аминокислотных остатков возможно примерно $10^{500}$ структур, а для гемоглобина существует примерно $1{,}35 \cdot 10^{167}$ возможных перестановок аминокислот в его четырех полипептидных цепях. Полипептидная цепь в своем биологически активном состоянии может существовать в сложной сильно скрученной (но высоко упорядоченной) форме, в которой боковые группы аминокислотных остатков, далеко отстоящих друг от друга в первичной структуре (полипептидной последовательности), приходят в близкое пространственное расположение. Существует, однако, точка зрения, что первичная структура окончательно определяет (в результате взаимодействий как внутри молекулы, так и с окружающей ее водной средой) общую форму (*третичную структуру*) молекулы белка. Согласно этой точке зрения, первичная структура и, следовательно, ее определение с помощью химических и физических средств разрешает все вопросы (см. гл. 23.3).

Поразительные изменения свойств могут проистекать в результате замены всего лишь одной аминокислоты на другую в молекуле белка. Так, замена остатка глутаминовой кислоты на валин в одной из четырех полипептидных цепей гемоглобина резко изменяет его свойства и приводит к болезни — серповидной анемии. Изменение других аминокислотных остатков может, однако, давать незначительный эффект или вовсе не влиять на биологическую активность. Интересный пример такого рода эффектов можно наблюдать среди различных молекул цитохрома *c*, выделенных из организмов, которые находятся на очень различных стадиях эволюционного статуса [12]. Цитохромы действуют при биологическом окислении как переносчики электронов и один из них, цитохром *c*, может быть легко растворен и выделен. Полная аминокислотная последовательность цитохрома *c* была определена для белков из примерно 40 видов; проведено сопоставление между различными последовательностями, а также с трехмерной (по данным рентгенографии) моделью цитохрома *c* сердца лошади. По-видимому, цитохром *c* не подвержен радикальным эволюционным изменениям, однако отдельные участки (особенно положения 70—80 в последовательности из 104 аминокислот) совершенно неизменны, тогда как другие допускают изменения в довольно широких пределах. Важно, что участок аминокислотной последовательности, ответственный за перенос электронов, содержит шесть или более остатков различных аминокислот в различных видах.

Одни из самых примечательных достижений в науке за последние двадцать пять лет стали возможны после того, как с помощью

*Таблица 23.2.1. Генетически кодируемые аминокислоты, перечисленные в хронологическом порядке их выделения*

Латинские трехбуквенные обозначения отвечают правилам для авторов Biochemical Jornal, 1978

| Название | Формула | Трехбуквенное обозначение |
|---|---|---|
| 1. Глицин | $CH_2(NH_2)CO_2H$ | Gly |
| 2. Лейцин | $Me_2CHCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Leu |
| 3. Тирозин |  | Tyr |
| 4. Серин | $HOCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Ser |
| 5. Глутаминовая кислота | $HO_2CCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Glu |
| 6. Аспарагиновая кислота | $HO_2CCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Asp |
| 7. Фенилаланин | $PhCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Phe |
| 8. Аланин | $MeCH(NH_2)CO_2H$ | Ala |
| 9. Лизин | $H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)CO_2H$ | Lys |
| 10. Аргинин |  | Arg |
| 11. Гистидин |  | His |
| 12. Цистеин | $HSCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Cys |
| 13. Валин | $Me_2CHCH(NH_2)CO_2H$ | Val |
| 14. Пролин |  | Pro |
| 15. Триптофан |  | Trp |
| 16. Изолейцин | $EtMeCHCH(NH_2)CO_2H$ | Ile |
| 17. Метионин | $MeSCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Met |
| 18. Аспарагин | $H_2NCOCH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Asn или Asx |
| 19. Глутамин | $H_2NCOCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$ | Gln или Glx |
| 20. Треонин | $MeCH(OH)CH(NH_2)CO_2H$ | Thr |



Следует, однако, отметить, что можно индуцировать биосинтез белка у бактерий и по иным механизмам, приводящим, по крайней мере в небольшой части, к включению аналога аминокислоты вместо нормальной аминокислоты. Например, низший гомолог пролина (азетидин-2-карбоновая кислота) был введен в белок *E. coli* с замещением одной четверти пролина [4]. Однако замещения такого рода происходят только в отсутствие достаточного количества нормальной аминокислоты.

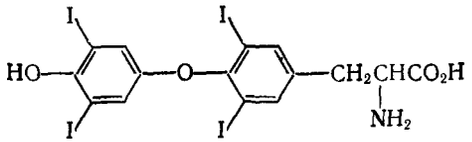
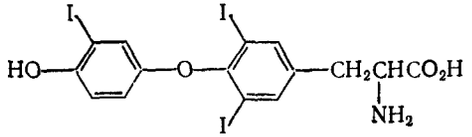
Структуры всех 20 нормальных аминокислот (компонентов, выделенных из гидролизатов белков) были установлены к 1935 г.; самым первым Браконно в 1820 г. был охарактеризован глицин, самым последним — треонин. Хотя цистеин входит в состав многих пептидов и белков как таковой, однако их функционирующие формы содержат окисленный продукт — цистин, дисульфидные мостики которого могут образовываться как внутри-, так и межмолекулярно. За исключением глицина, все кодируемые аминокислоты белков оптически активны и одинаково хиральны при асимметрическом α-углеродном атоме. По аналогии, с обычной номенклатурой для углеводов, их обычно рассматривают как соединения, обладающие *L*-конфигурацией, при этом *L*-серин считают родоначальным соединением. За исключением цистеина, конфигурация всех аминокислот соответствует *S*-конфигурации по системе Кана-Ингольда-Прелога; положение серы в цистеине таково, что *L*-цистеин имеет *R*-конфигурацию. Изолейцин и треонин имеют по второму центру асимметрии при β-углеродных атомах; найденные в белках (2*S*, 3*S*)-2-амино-3-метилвалериановая и (2*S*, 3*R*)-2-амино-3-гидроксимасляная кислоты являются стереоизомерами.

### 23.2.1.2. Другие аминокислоты, найденные в кислотных гидролизатах белков

Состав белковых гидролизатов не всегда ограничивается генетически кодированными аминокислотами: теперь точно установлено, что тироксин и 3,3′,5-триодтиронин являются двумя тироидными гормонами, а химическая или тепловая обработка, предшествующая гидролизу, могут приводить к артефактам. Необычные аминокислоты, возникающие в физиологических условиях, могут быть разделены на две группы. Первая группа объединяет соединения, полученные путем замещения относительно небольших групп в нормальных белковых компонентах (табл. 23.2.2). Все изменения, по-видимому, являются следствием индуцируемых ферментами реакций, а введенными заместителями, в основном, оказываются С-гидроксил, *N*-метил боковой цепи или галоген в ароматическом ядре тирозина.

Аминокислоты тироксин и 3,3′,5-триодтиронин являются двумя тироидными гормонами и, по-видимому, образуются в результате окислительного сочетания и иодирования двух молекул тирозина (см. гл. 30.3). Тироглобулин — гликопротеин с молекулярной

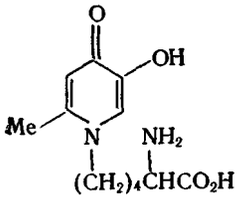
*Таблица 23.2.2. Замещенные аминокислоты, найденные в кислотных гидролизатах белков [5]*

| Дата выделения, г | Аминокислота | Источник |
|---|---|---|
| 1962 | 3-Гидроксипролин | Коллаген |
| 1940 | δ-Гидроксилизин | Желатин |
| 1969 | 3,4-Дигидроксипролин | Клеточная стенка диатомовых водорослей [5а] |
| 1902 | 4-Гидроксипролин | Желатин |
| 1959 | ε-*N*-Метиллизин | Флагеллин из *Salmonella*<br>Гистон тимуса теленка |
| 1967 | ε-(*N*,*N*)-Диметиллизин | Гистон тимуса теленка |
| 1968 | ε-(*N*,*N*,*N*)-Триметиллизин | Некоторые гистоны |
| 1967 | 3-Метилгистидин | Актин мускула кролика |
| 1968 | $N^G$-Метиларгинин | Гистон тимуса теленка |
| 1971 | $N^G$,$N'^G$-Диметиларгинин<br>$N^G$,$N^G$-Диметиларгинин | Энцефалитогенный белок быка |
| 1970 | ε-(*N*,*N*,*N*)-Триметил-δ-гидроксилизин | Клеточная стенка диатомовых водорослей [5б] |
| 1948 | 3-Иодтирозин | Тироглобулин |
| 1931 | 3,5-Дииодтирозин | Тироглобулин |
| 1951 | 3-Бромтирозин | Склеропротеин горгонии |
| 1972 | 3-Хлортирозин | Склеропротеин волнистого рожка [5в]<br>Кутикулярный белок саранчи обыкновенной |
| 1972 | 3,5-Дихлортирозин | Кутикулы *Limulus* [5г] |
| 1971 | 3-Бром-5-хлортирозин | Склеропротеин волнистого рожка [5д] |
| 1972 | Тироксин  | Тироглобулин |
| 1953 | 3,3′,5-Трииодтиронин  | Тироглобулин |

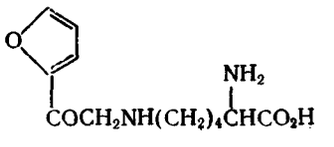


массой 660 000 является основной частью коллоида в тироидных фолликулах и служит средой для накопления этих двух гормонов, а также является носителем для их синтеза. Тироглобулин кролика содержит иодированные аминокислоты в следующих количествах (остатки на молекулу): 3-иодтирозин 9,6; 3,5-дииодтирозин 9,5; тироксин 2,3 и трииодтиронин 0,6 [6]. Хотя хлортирозины могут получаться при определенных условиях гидролиза протеинов хлороводородной кислотой, 3,5-дихлортирозин был выделен после щелочного гидролиза, а 3-хлортирозин — после ферментативного гидролиза, что ясно доказывает их присутствие в нативном белке. Присутствие гидроксильных заместителей связывают в основном со структурными белками коллагеном и эластином, тогда как *N*-метилирование является характерным для гистонов.

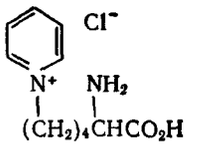
Здесь мы не будем рассматривать преднамеренную модификацию аминокислотных остатков в белках, которая, разумеется, широко используется для изучения их структуры. Артефакты, образующиеся в результате нагревания белков или при обработке химическими препаратами для других целей, также не столь редки. Например, термическая обработка протеинов молока в результате взаимодействия глюкозы с ε-аминогруппой лизина приводит к образованию кислотоустойчивых соединений: пиридозина (1) и фуранозина (2) [7]. Использование глутарового альдегида для сшивания цепей белка также вовлекает в реакцию лизин, при этом образуется [8] пиридиниевое производное (3).



(1)



(2)

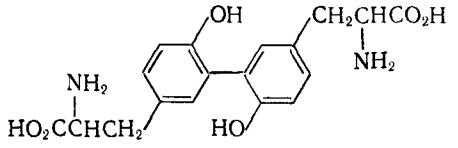
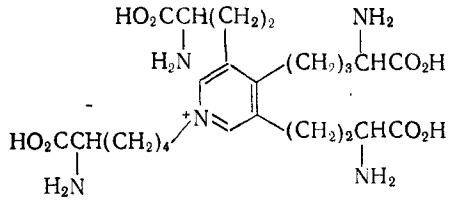
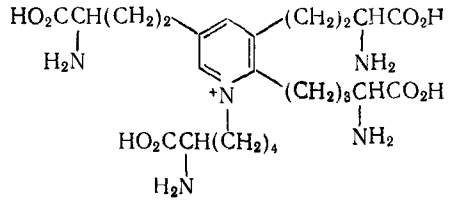


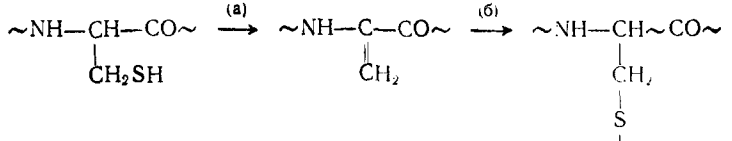
(3)

Вторая, существенно отличная группа кислотоустойчивых, природно модифицированных аминокислот представлена такими аминокислотами, в которых два обычных остатка оказались связанными между собой (см. табл. 23.2.3). После их образования белки становятся менее растворимыми. Первая стадия в процессе, приводящем к десмозину и изодесмозину, состоит в ферментативном окислении лизина в аллизин (α-аминоадипиновый полуальдегид), три остатка которого конденсируются с непрореагировавшим остатком лизина, образуя восстановленное ядро пиридина, которое далее претерпевает окисление в конечный продукт. Дитирозин, первоначально выделенный из каучукоподобного белка связок крыльев саранчи обыкновенной, был выделен также из эластина [9]; его можно синтезировать из тирозина реакцией с пероксидазой из хрена и пероксидом водорода. Обработка белков щелочью может приводить к образованию дегидроаланина из цистеина;

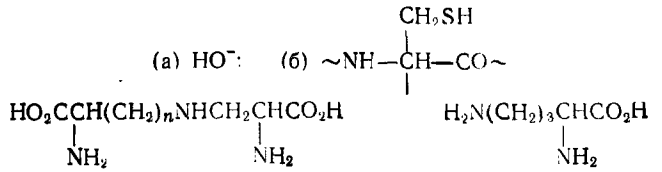
присоединение тиольной группы другого цистеинового остатка приводит к кислотоустойчивой бифункциональной аминокислоте — лантионину {схема (1)}. Последний был первоначально выделен из шерсти, обработанной щелочью, а также найден в овокератине мембран яичной скорлупы после выдерживания с основанием.

*Таблица 23.2.3. Связанные между собой аминокислоты, найденные в белковых гидролизатах*

| Аминокислота | Формула | Источник |
|---|---|---|
| Дитирозин |  | Резилин [9] |
| Десмозин |  | Эластин [9а] |
| Изодесмозин |  | Эластин [9а] |



(1)



(4) (а, $n=4$) (б, $n=3$) (5)



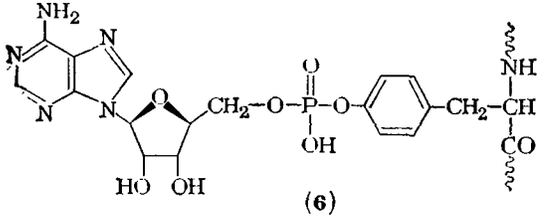
Нуклеофильная атака лизина или орнитина (5) (который, в свою очередь, является продуктом деградации аргинина под действием щелочи) на дегидроаланин сходным образом приводит к лизиноаланину (4а) и орнитоаланину (4б) [10].

### 23.2.2. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ДО АМИНОКИСЛОТ

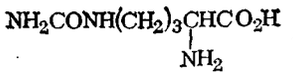
Для гидролиза белков до составляющих их аминокислот обычно используют хлороводородную кислоту (6*M*, 24 ч, 120 °C, эвакуированные запаянные ампулы). Однако этот метод не лишен побочных реакций. Из генетически кодированных аминокислот интенсивно распадается триптофан, в то время как выходы серина и треонина составляют только 90—95%. Может происходить также хлорирование тирозина и образование орнитина из аргинина. Нередко метионин частично превращается в соответствующий сульфоксид, а цистеин полностью окисляется в цистин. Глутамин и аспарагин, естественно, гидролизуются до глутаминовой и аспарагиновой кислот. Использование *п*-толуолсульфокислоты может повысить выход триптофана [11], однако эту аминокислоту обычно определяют после гидролиза с помощью гидроксида бария. С другой стороны, щелочной гидролиз, помимо того, что вызывает рацемизацию, приводит к большим потерям серина, треонина, цистеина и аргинина.

Многие производные аминокислот нельзя подвергать ни кислотному, ни щелочному гидролизу. *N*-ацильные группы, найденные в некоторых белках, расщепляются наряду с остальными амидными связями. Белок вируса табачной мозаики, например, содержит α-*N*-ацетилсерин с *N*-конца, ε-*N*-ацетиллизин встречается в гистоне тимуса теленка. *N*-Формилметионин обнаружен в некоторых белках бактерий; известно, что для начала биосинтеза белка в этих организмах аминокислота должна быть формилирована, после чего она прикрепляется к транспортной РНК. К концу синтеза эта формильная группа в остатке метионина не всегда снимается [12]. Ряд пептидных гормонов содержит пироглутаминовый остаток (пирролидонкарбоновую кислоту) в качестве *N*-концевого (к этому приводит самопроизвольная циклизация *N*-концевого остатка глутамина), который раскрывается в условиях гидролиза, давая глутаминовую кислоту. Тирозин-*O*-сульфат, обнаруженный впервые в пептидах, полученных при свертывании фибриногена быка, и образующийся из тирозина ферментативно, распадается при кислотном гидролизе, хотя устойчив при щелочном. Фосфопротеины содержат *O*-фосфосерин и *O*-фосфотреонин; они теряют фосфорную группировку в условиях нормального кислотного гидролиза, тогда как в более мягких условиях можно избирательно расщепить пептидные связи и обнаружить эти остатки в гидролизатах. Глутаминсинтетаза из *E. coli* содержит фосфотирозин — это единственный известный пример; в условиях избытка азота происходит биосинтез белка, содержащего один остаток тирозина, *O*-замещен-

ного адениловой кислотой (6) [13].



(6)



(7)

В гликопротеинах гликозидная связь осуществляется либо за счет гидроксильных групп боковых групп, либо с участием азота аспарагина, хотя известен один пример *S*-замещения в белке мочи, из которого был выделен дигалактозилцистеин [14]. Однако во всех случаях углевод теряется при мягком кислотном гидролизе. Лучшим является способ, когда кислотному гидролизу предшествует ферментативное удаление углеводных остатков, так как присутствие последних может приводить к деструкции аминокислот в процессе гидролиза.

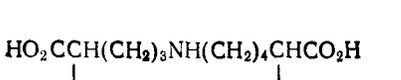
Найдено, что кальций-связывающие участки некоторых белков относительно богаты остатками γ-карбоксиглутаминовой кислоты. Она встречается, например, 10 раз в первых 33-х остатках последовательности из 582-х остатков протромбина, причем каждый раз в виде близко расположенных дублетов. Карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в этом белке, по-видимому, осуществляется в присутствии витамина К [15]. Как производное малоновой кислоты, она декарбоксилируется в процессе кислотного гидролиза, но может быть выделена после щелочного гидролиза [16], однако она дает крайне слабую реакцию с нингидрином. Установлено, что цитруллин (7), который долгое время считали промежуточным продуктом щелочной деградации аргинина в орнитин, входит в состав белка клеток сердцевины волос млекопитающих и игл дикобраза [17].

Он, по-видимому, образуется из связанного с белком аргинина и обнаруживается в кислотных гидролизатах как орнитин. Нерастворимость этих белков относят за счет присутствия ε-(γ-глутамил)лизиновых мостиков, которые также не выдерживают условий разрыва пептидных связей [18].

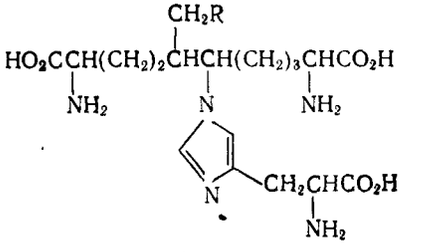
Мостики коллагена, которые важны для проявления его физических свойств, являются следствием взаимодействия α-аминоадипинового полуальдегида, получающегося из лизина под действием лизилоксидазы, с другими аминокислотными остатками. Ни один из этих продуктов не устойчив по отношению к кислоте, так как они являются основаниями Шиффа. Однако после восстановления боргидридом натрия выделены некоторые бифункциональные продукты, например лизинонорлейцин (8), трифункциональный альдоль-гистидин (**9а**) и тетрафункциональный гистидино-гидроксимеродесмозин (**9б**) [19]. Сходный ряд продуктов образуется из



δ-гидроксилизина. В большинстве случаев выделение аминокислотных остатков, не устойчивых при экстремальных значениях pH, осуществлено после ферментативного гидролиза. Бактериальные протеазы, обладающие достаточно широкой специфичностью, могут сами вызывать почти полное расщепление пептидов на аминокислотные компоненты. Найдено, что смесь четырех очень специфичных ферментов (химотрипсин, пролидаза, трипсин и аминопептидаза *M*), ковалентно связанных с Сефарозой, представляет собой удобную (мягкие условия) альтернативу кислотному гидролизу [20].



(8)



(9) **а** (R = OH)
**б** (R = NHCH₂CH(OH)(CH₂)₂CHCO₂H, NH₂)

### 23.2.3. ОБЩИЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА РАЦЕМИЧЕСКИХ *C*-АЛКИЛ-α-АМИНОКИСЛОТ

В этой главе реакции, приводящие к *C*-алкил-α-аминокислотам, классифицированы в соответствии с тем, какая из трех связей α-CH-группы образуется в последнюю очередь, т. е. аминирование, *C*-алкилирование или карбоксилирование. Четвертая группа реакций необходима для того, чтобы охватить методы, в которых производное аминокислоты образуется либо посредством перегруппировки, либо когда трудно определить последовательность образования связей. Сделанные заключения не претендуют на полноту охвата; рассматриваемые реакции выбраны на основании их практической значимости или, если они иллюстрируют разнообразие синтетических подходов к α-аминокислотам.

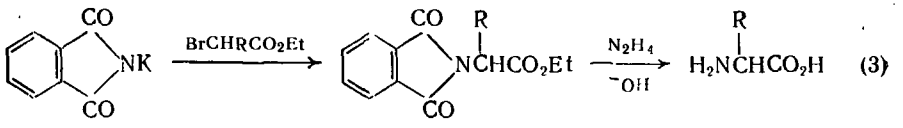
#### 23.2.3.1. Аминирование карбоксильных компонент

Восстановительное аминирование α-кетокислот (асимметрическое аминирование при гидрогенолизе) является важнейшим общим методом, попадающим в эту категорию реакций, однако поскольку эти синтезы включают прохиральные интермедиаты, они будут рассмотрены в разд. 23.2.4.1. Другой классический метод состоит в прямой нуклеофильной атаке аминокомпоненты на α-галогенпроизводное карбоновой кислоты. В простейшем случае

α-хлор- или α-бромкарбоновую кислоту обрабатывают избытком

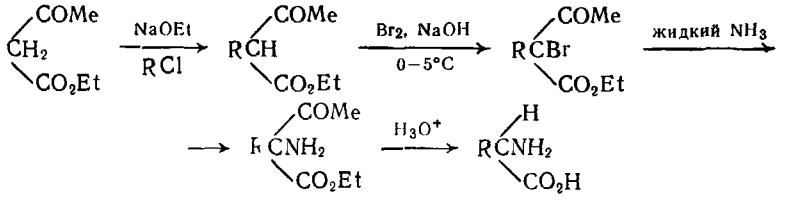
$$BrCHRCO_2H + NH_3 \longrightarrow H_2NCHRCO_2H \quad (2)$$

аммиака {схема (2)}. Аммиак можно заменить гексаметилентетрамином (с последующим гидролизом продукта) для того, чтобы предотвратить диалкилирование. Для получения α,ω-диаминокислот применяют вариацию с использованием α-галогеноэфира и фталимида калия {схема (3)}.



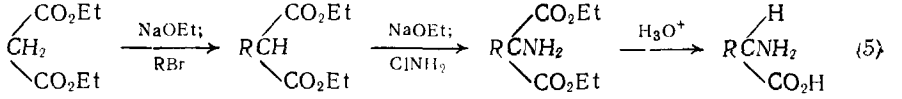
(3)

В качестве альтернативы прямому α-галогенированию карбоновой кислоты, необходимому для получения исходного, может быть использован алкилгалогенид в сочетании с ацетоуксусным эфиром {схема (4)}.



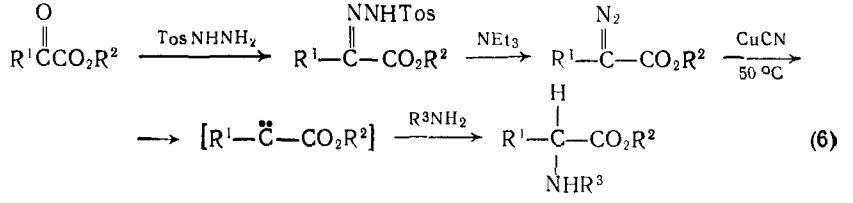
(4)

Позднее для синтеза аминокислот были разработаны реакции аминирования производных натриймалонового эфира с помощью



(5)

хлорамина {схема (5)} [21] и аминирования карбенов сложных эфиров с помощью аминов {схема (6)} [22]. В последнем методе боковая группа происходит из α-кетоэфира и, если присутствует оптически активная группа ($R^1$ и $R^2$), то наблюдается умеренная асимметрическая индукция.



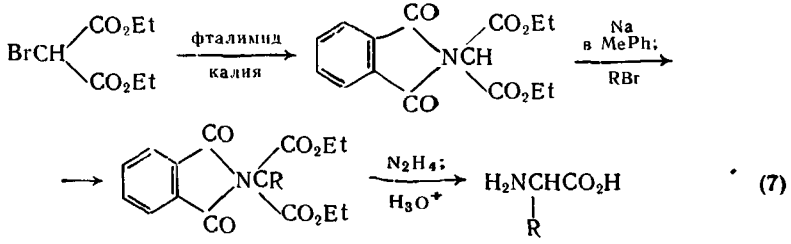
(6)

### 23.2.3.2. *C*-алкилирование производных α-аминокислот

Два классических метода основаны на введении боковой группы в производные глицина. Первый, предложенный Соренсеном в 1903 г., в его первоначальном виде включал алкилирование

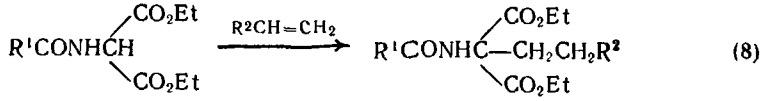


этил-N-фталимидомалоната {схема (7)}, однако к настоящему времени этот реагент вытеснен благодаря использованию ациламидомалонатов и ациламидоцианоацетатов (главным образом это *N*-формильные и *N*-ацетильные производные — защиты, легко удаляемые гидролитически в конце синтеза).



(7)

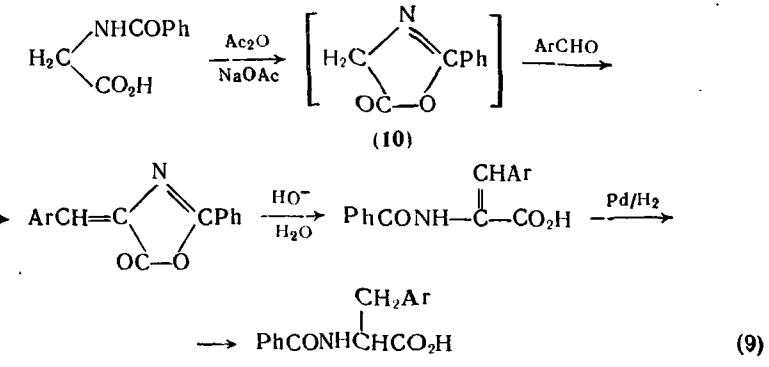
Этот метод широко применяется до сих пор, и, как правило, дает хорошие выходы. Присоединение по Михаэлю к акриловым производным {схема (8)} представляет собой вариант, приводящий к интермедиатам, функциональная группа боковой цепи которых может быть превращена далее в различные аминокислоты.



(8)

$R^1 = H$ или Me; $R^2 = CHO$, CN, $CO_2Et$

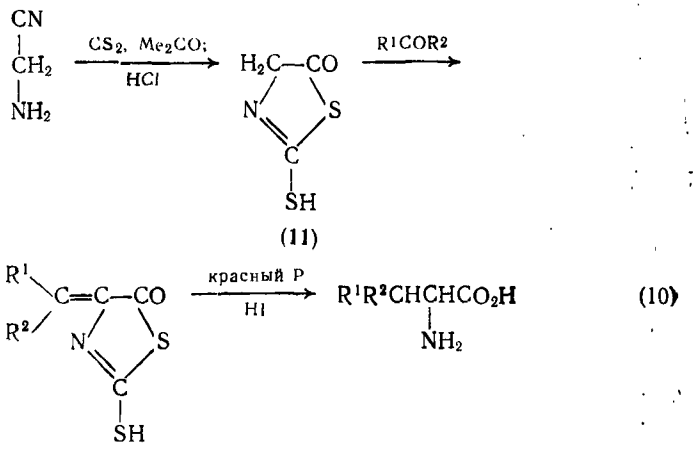
Классический азлактонный синтез {схема (9)} в последние годы используется реже. Он хорош для ароматических альдегидов, но до недавнего времени были необходимы две гидролитические стадии, так как ненасыщенный азлактон непосредственно не восстанавливается прямо ни гидрированием над платиной или палладием, ни красным фосфором и иодоводородной кислотой.



(9)

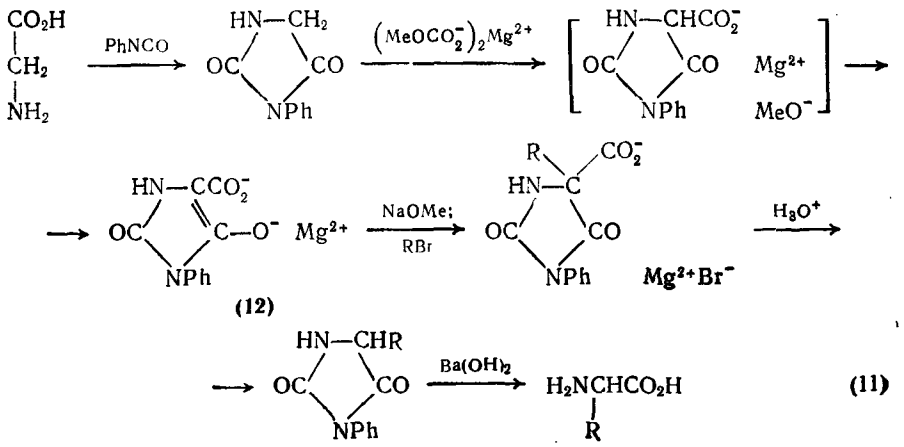
В 1972 г., однако, было показано, что обработка никелем Ренея и водородом (2—4 атм) в аммиачном спирте приводит к одностадийному восстановительному сольволизу азлактона в амид ацил-

аминокислоты [23]. Азлактон (**10**) обычно не выделяют, однако это необходимо в случае алифатических альдегидов и кетонов, иначе выходы сильно падают; в этих случаях часто предпочитают для катализа последующей конденсации [24] ацетат свинца вместо ацетата натрия. Гетероцикл 2-меркаптотиазолон-5 (**11**) хорошо конденсируется как с кетонами, так и с алифатическими и ароматическими альдегидами, причем продукт можно прямо превратить в свободную аминокислоту с помощью красного фосфора и иодоводородной кислоты {схема (10)}.




(10)

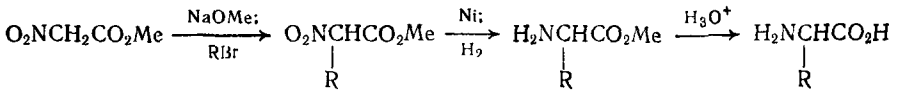
С другой стороны, гидантоин и 2,5-диоксопиперазин могут вступать в конденсацию только с ароматическими альдегидами; продукты конденсации превращают в свободные аминокислоты восстановлением с последующим гидролизом. Однако 3-фенилгидантоин можно использовать в общем синтезе аминокислот, в котором боковая группа вводится алкилированием енолята (**12**), стабилизованного в виде хелата с магнием {схема (11)} [25].




(11)

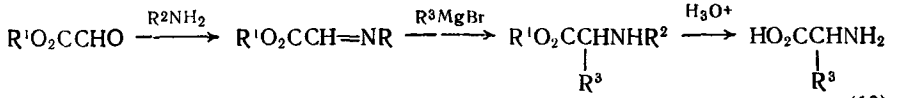


Два современных общих метода *C*-алкилирования не включают образование гетероциклических интермедиатов. Метилнитроацетат в присутствии метилата натрия может подвергаться нуклеофильной атаке алкилгалогенидами, и получающийся нитроэфир после восстановления никелем Ренея и водородом гидролизуют в соответствующую свободную аминокислоту {схема (12)} [26].




(12)

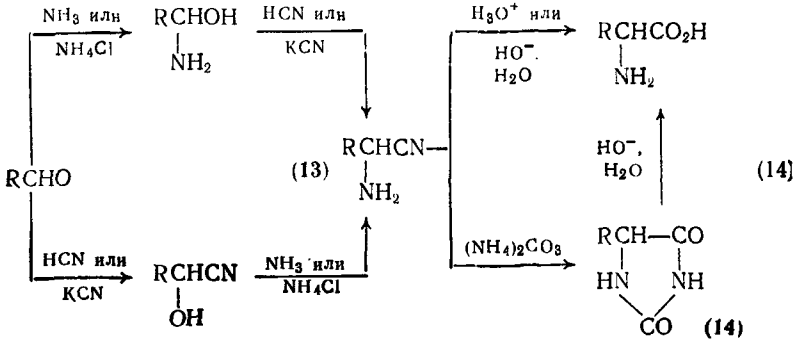
Этиловый эфир *N*,*N*-бис(триметилсилил)глицина можно превратить в натриевое производное с помощью натрий *N*,*N*-бистриметилсилиламида. После реакции с алкилгалогенидом и гидролиза получается свободная аминокислота; триметилсилильная группа легко удаляется с помощью разбавленного водного или эфирного раствора хлороводорода [27]. Последнюю реакцию, которую необходимо упомянуть, это присоединение реактива Гриньяра к иминам глиоксилатов {схема (13)}. При использовании оптически активных защитных групп, например $R^1 = PhCH(Me)-$ и $R^2 = (-)$-ментил, наблюдается небольшая асимметрическая индукция. Таким путем был получен *L*-аланин с оптической чистотой 63,5% и выходом 45% [28].




(13)

### 23.2.3.3. Карбоксилирование аминокомпонент

Эффективный и гибкий синтез Штреккера {схема (14)} с таким же успехом мог быть представлен в разд. 23.2.3.1, так как ключевой интермедиат — аминонитрил (**13**) может быть получен в две стадии. Однако эти примеры следует рассмотреть здесь, так как карбоксильная группа или ее нитрильный предшественник вводятся

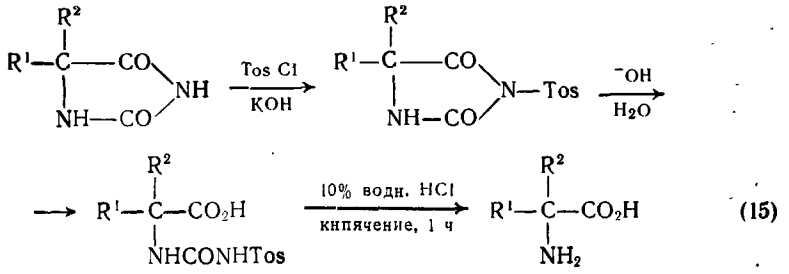



(14)

(14)

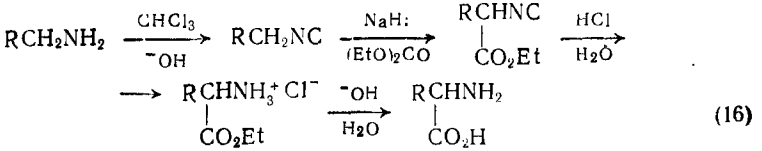
позже, и эти примеры носят не столь общий характер, как те типы реакций, которые уже обсуждались. Наиболее часто используемые модификации основной схемы состоят в синтезе цианогидрина через бисульфитное производное альдегида и его прямое превращение в 5-алкилгидантоин (**14**) с помощью карбоната аммония. Дополнительные стадии, необходимые в этом синтезе, окупаются его общей экономичностью.

5,5-Диалкилгидантоины, получаемые при синтезе *C*-алкил-α-аминокислот, обычно устойчивы к гидролизу. Однако тозилирование этих интермедиатов приводит к продуктам, из которых легко можно выделить желаемые аминокислоты {схема (15)} [30].



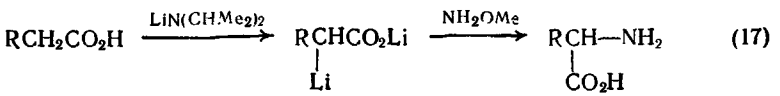
(15)

Недавно разработаны две новые реакции карбоксилирования. Изоцианиды, доступные по усовершенствованной реакции Гофмана с карбиламином или путем дегидратации *N*-монозамещенных формамидов с помощью фосгена, в присутствии сильных оснований приводят к карбанионам, которые можно карбоксилировать диэтилкарбонатом. Последняя гидролитическая стадия, как это обычно в большинстве методов, приводит к свободной аминокислоте {схема (16)} [29]. Неприятные физические свойства изоциани-



(16)

дов не позволяют, однако, этому подходу стать популярным. Свободная карбоновая кислота может быть непосредственно превращена в α-аминокислоту (одностадийный процесс) аминированием α-литиевых солей {схема (17)}. Наилучшие, хотя и весьма умеренные выходы были получены при использовании *O*-метилгидроксиламина, например изовалериановая кислота приводит к валину с выходом 33,9% [31].

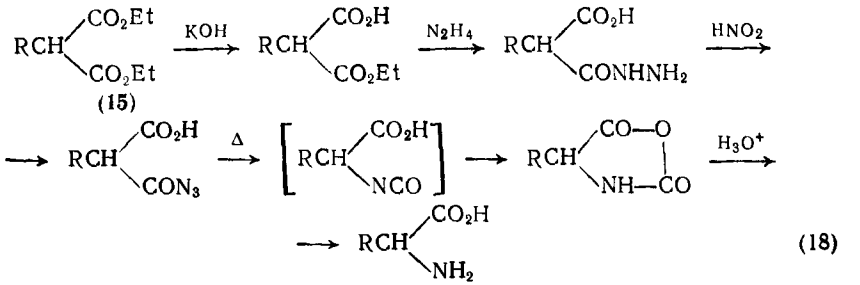


(17)

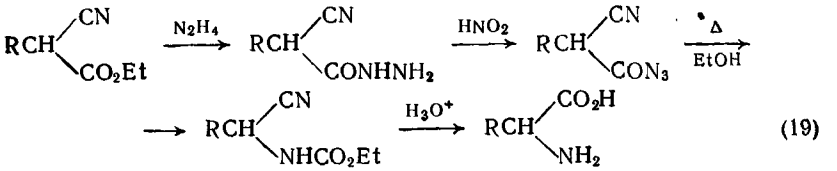


### 23.2.3.4. Методы, основанные на перегруппировках

Перегруппировка Курциуса используется для синтеза аминокислот с 1921 г., однако в первоначальном виде {схема (18)} с частичным гидролизом диэфира (**15**) она, как правило, трудно осуществима. Этот вариант все больше вытесняется методикой Дарапского {схема (19)}.

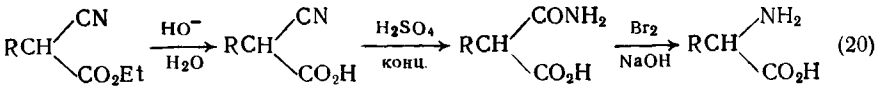


(18)



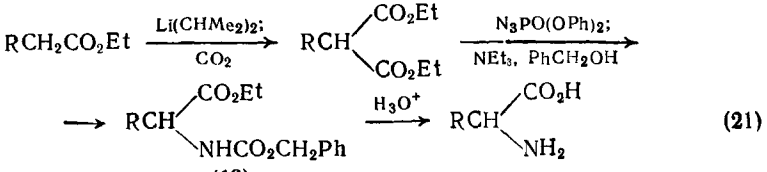
(19)

Алкилированный цианоуксусный эфир можно превратить альтернативно, используя перегруппировку Гофмана {схема (20)}.



(20)

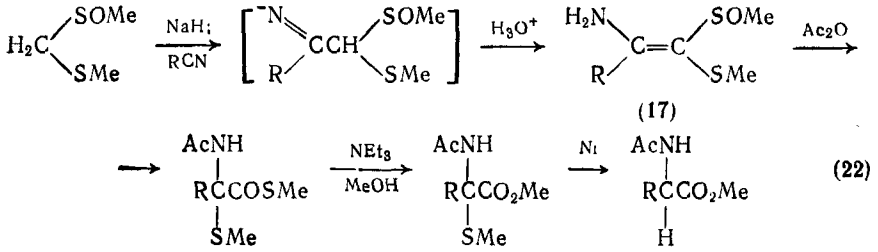
Две новые модификации первоначального синтеза по Курциусу имеют много практических преимуществ. Полуэфиры малоновой кислоты можно легко получить α-карбоксилированием сложных эфиров; эфир добавляют к *н*-бутиллитию и диизопропиламину в тетрагидрофуране, получившуюся смесь обрабатывают диоксидом углерода [32]. С другой стороны, превращение полуэфира в уретан (**16**) может быть достигнуто с помощью дифенилфосфоразида, однако спирт необходимо добавлять через час, иначе диэфир окажется единственным продуктом {схема (21)} [33]. Несмотря на то, что карбоновые кислоты можно аминировать непосредственно {схема (17)}, этот метод, хотя и более длинный, остается жизнеспособной альтернативой.



(16)

(21)

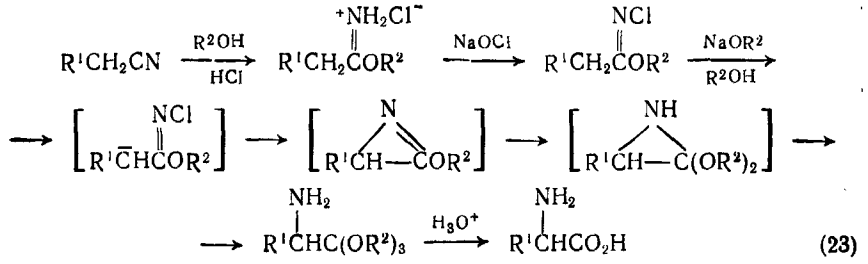
Недавно предложено два новых типа перегруппировок для синтеза аминокислот. Один включает енаминосульфоксид (17), генерируемый из алкилцианида и метилтиометилсульфоксида {схема (22)}, причем стадия обессеривания должна предшествовать заключительной гидролитической стадии [34].



(17)

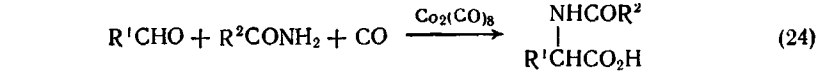
(22)

Другой метод заключается в перегруппировке *N*-хлоримидата в аминоортоэфир; предполагают, что на этой стадии образуется алкоксиазириновый интермедиат, механизм реакции напоминает

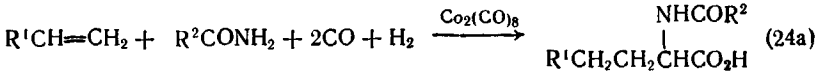


(23)

механизм реакции Небера {схема (23)} [35]. В нескольких синтезах аминокислот трудно различить порядок, в котором образуются связи при α-углеродном атоме. Примерами их являются реакции, катализируемые карбонилом кобальта {схемы (24), (24а)}, где карбоксильная и аминная функции вводятся в одной и той же реакции [36].



(24)

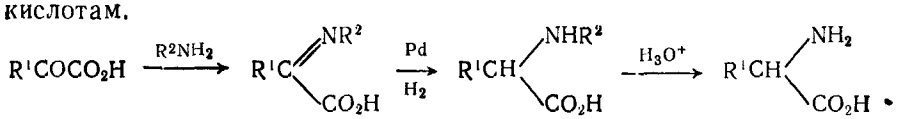


(24a)

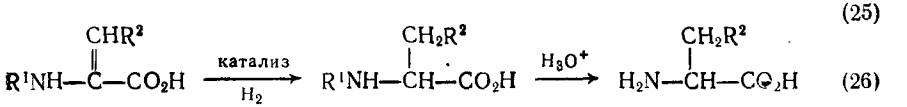
### 23.2.4. ПОЛУЧЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ *C*-АЛКИЛ-α-АМИНОКИСЛОТ

#### 23.2.4.1. Асимметрический синтез

Энантиомеры аминокислот необходимы для многих синтетических задач. Несмотря на то, что разделение рацемических продуктов все еще остается основным направлением для получения стереоизомеров, большой прогресс достигнут в области асимметрических синтезов, которые могут конкурировать с уже имеющимися методами. Наиболее широко изучены реакции, в которых α-*C*-асимметрический центр образуется в процессе восстановления двойной связи. Это может быть либо связь C=N в основании Шиффа α-кетокислоты {схема (25); асимметрическое трансаминирование при гидрогенолизе}, либо связь C=C в енамине {схема (26)}, который обычно получают через азлактон. В случае восстановления имина асимметрический индуктор, как правило, сосредоточен в исходном амине, в то время как при каталитическом асимметрическом гидрировании индукция происходит главным образом в процессе превращения; это относится и к ациламидоакриловым кислотам.

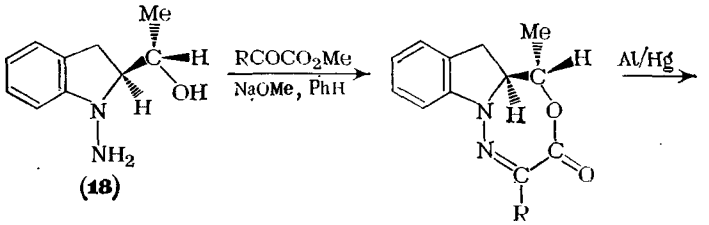


(25)



(26)

Интенсивные исследования выявили ограничения, присущие простым аминам как асимметрическим индукторам в восстановлении иминов. Используя хиральные α-алкилбензиламины, можно синтезировать *L*-аланин 60%-ной оптической чистоты, однако каталитическое восстановление необходимо проводить при низкой температуре. При 17 °C продукт полностью рацемический, при более высокой температуре — выше 50 °C, происходит инверсия, что приводит к *D*-аланину 45%-ной оптической чистоты. Степень ин-



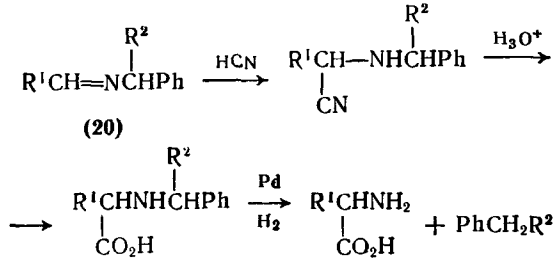
(18)

(27)

(19)

дуцируемой асимметрии падает также и с увеличением размера боковой группы [37]. Проблема конформационной подвижности в субстрате блестяще решена Кори с сотр. с помощью циклических иминов {схема (27)}. Таким способом получен *D*-аланин с оптической чистотой 96% — это первый пример настоящего практического асимметрического синтеза. *N*-Аминоиндолениниевый индуктор (18) можно регенерировать из (19) и снова ввести в реакцию [38].

Использование оптически активных α-алкилбензиламинов в синтезе Штрекера, исходя из имина (20) {схема (28)}, приводит к аминокислотам лишь 58%-ной оптической чистоты [39].

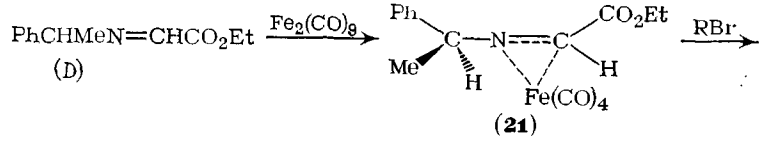


(20)



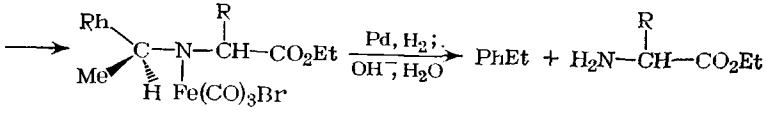
(28)

В то же время алкилирование подобных иминов этилглоксилата {схема (29)} протекает с оптическими выходами выше 95%, если имин образует комплекс с карбонилом железа. Комплексообразование приводит к смеси диастереомеров, из которой выделяют преобладающий изомер (21) и обрабатывают его алкилбромидом [40]. Как и во всех реакциях трансаминирования, ведущих свое начало от остроумной схемы, предложенной Кори, оптический индуктор не регенерируется. Асимметрия получающейся аминокислоты достигается в результате его разрушения.



(21)

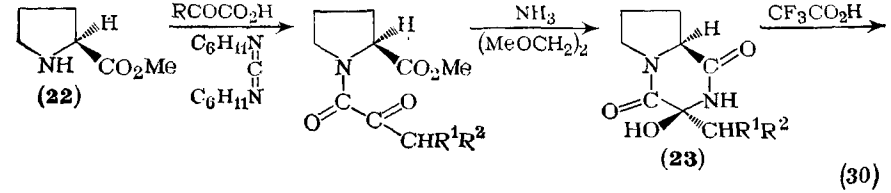
(29)



Что касается α-ациламиноакриловых кислот, то обнаружено много хиральных катализаторов (гомогенный вариант) на основе родия. С 95%-ной оптической чистотой получены продукты при использовании катализатора на основе $[Rh(\text{циклооктадиена-1,5})Cl]_2$ и 1,2-бис-(*O*-анизилфенилфосфино)этана, где атом фосфора является хиральным центром. Оптические выходы не зависят от температуры и давления [41]. Сами азлактоны, обычно используемые



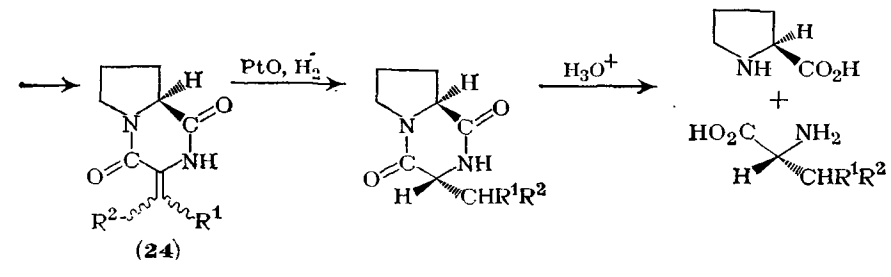
для синтеза α-аминоакриловых кислот, не восстанавливаются катализаторами этого типа. В случае, когда аминоакриловая кислота является частью диоксопиперазинового кольца, содержащего в качестве другой компоненты оптически активную аминокислоту, оптически неактивный гетерогенный катализатор способен к асимметрическому гидрированию с высокой стереоспецифичностью. Использование (*S*)-пролина (22) в этом синтезе приводит примерно к 90%-ной оптической чистоте {схема (30)}; хиральный индуктор



(22)

(23)

(30)



(24)

можно регенерировать. Необходимая боковая группа вводится как α-кетокислота, а диоксопиперазин (24) получают из 5-гидроксидиоксопиперазина (23); восстановление в присутствии катализатора Адамса дает (*S,S*)-циклодипептид с практически количественным выходом. Таким способом был получен *L*-аланин из пировиноградной кислоты с ≈60%-ным выходом [42]. Замещение по азоту заметно понижает эффективность стадии гидрогенизации, в особенности для неароматических аминокислот [43]. Таким образом, азлактоны как предшественники в синтезе ненасыщенных диоксопиперазинов исключаются.

Асимметрический синтез путем алкилирования ациламидомалонового эфира {см. схему (7)} с необходимостью включает хиральный индуктор либо на стадии декарбоксилирования, либо на стадии частичного гидролиза диэфира, перед декарбоксилированием. Хорошо известны ферментативные реакции такого типа: *L*-аспартатдекарбоксилаза стереоспецифически декарбоксилирует аминомалоновую кислоту, имеющую метку в одной из карбоксильных групп, в то время как химотрипсин стереоспецифически гидролизует одну сложноэфирную группу диэтилацетамидомалоната. Комплекс кобальта с α-амино-α-метилмалоновой кислотой, содержащий дихлорид $\lambda(-)_{436}$-α-(2*S*,9*S*)-2,9-диамино-4,7-диазодеканкобальта (III), декарбоксилирует при нагревании один энантиомер аланина на 30% лучше другого [44]. Так как α-алкил-α-аминомалоновые кис-

лоты могут быть получены из их *N*-формилдиэтиловых эфиров путем осторожного гидролиза [45], то первая стадия по хорошо зарекомендовавшему себя синтетическому пути получения рацемических аминокислот может быть использована и для стереоспецифического синтеза.

### 23.2.4.2. Разделение рацематов

Ранние методы разделения рацематов аминокислот основывались на избирательной кристаллизации, однако доступность относительно чистых ферментов, а именно ацилаз, привела к тому, что ферментативные методы по существу их вытеснили. В последние годы наблюдается дальнейший крен в сторону развития хроматографических методов, так как они практически более удобны. В данном разделе акцент будет сделан на методы, имеющие препаративное значение, а не на те, которые пригодны лишь для аналитического масштаба.

Большинство кристаллизационных методов включает получение диастереомерных солей, обычно из *N*-ацил-*DL*-аминокислот и оптически активных оснований. Синтетическую смесь энантиомеров обрабатывают оптически активным основанием, таким как бруцин, стрихнин или 1-фенилэтиламин, в растворителе и концентрируют до тех пор, пока одна из диастереомерных солей не начнет выкристаллизовываться из смеси. При необходимости продукт можно перекристаллизовать до необходимой оптической чистоты. Более растворимый диастереомер можно концентрировать в растворе. Выделенные соли необходимо далее разложить до аминокислот. Продукт можно использовать непосредственно в синтезе, если ацильная группа подобрана соответствующим образом. Например, *N*-бензилоксикарбонил-*DL*-аминокислоты во многих случаях можно разделить с помощью природного (—)-эфедрина. Когда нет β-метильной группы в боковом радикале, выпадает соль *D*-изомера; когда такая группа присутствует, из раствора выпадает преимущественно *L*-изомер (исключением является фенилаланин) [46]. Однако несмотря на множество имеющихся методов разделения, нет универсального метода, и нельзя разделить тирозин, триптофан или глутаминовую кислоту. Методы, основанные на кристаллизации, разумеется, сильно зависят от природы аминокислоты — в каждом конкретном случае требуется подбор условий.

Аминокислоты с основными боковыми радикалами, например гистидин и лизин, можно разделить без ацилирования с помощью солеобразования с оптически активной камфорной или камфорсульфоновой кислотами. *DL*-Лизин можно также разделить, используя оптически активный металлокомплекс. Если медленно добавлять додекавольфрамофосфорную кислоту к концентрированному раствору $K(-)_{5461}[Co(ЭДТА)]$ (1 моль) и гидрохлорид рацемической кислоты (2 моль), то первым выпадает вольфрамофосфат *D*-лизина. Если добавить достаточное количество соли, то в конце концов выпадет соль антипода [47].



Производные рацемических аминокислот можно разделять предпочтительной кристаллизацией из пересыщенных растворов, добавлением затравки одного из антиподов. Одним из наиболее общих таких методов является использование ароматических сульфонатов. Таким образом можно выделить оба стереоизомера [48].

Наиболее широко используемым ферментативным методом разделения является гидролиз *L*-энантиомеров *N*-ацетил- или *N*-хлорацетил-*DL*-аминокислот с помощью ацилазы из почек млекопитающих. Получающуюся свободную *L*-аминокислоту можно легко отделить от *N*-ацил-*D*-антипода с помощью экстракции или ионообменной хроматографии. Ацилаза I специфична для нейтральных неароматических аминокислот и глутаминовой кислоты, ацилаза II — для аспарагиновой кислоты, ацилаза III — для ароматических аминокислот. Пролин не восприимчив к ацилазам, но его можно разделить с использованием амидазы. Описано [49] разделение в потоке с использованием колонки, заполненной DEAE-целлюлозой, с которой связана ацилаза почки. *N*-Ацетил-*DL*-метионин (0,02 *M* раствор, pH 7,0) можно полностью разделить этим ферментом, связанным с полимером на колонке 1X4 см при 37 °C и скорости потока 3 мл/ч. Этот метод свободен также от ингибирования фермента, что происходит с появлением свободной аминокислоты при проведении реакции в растворе.

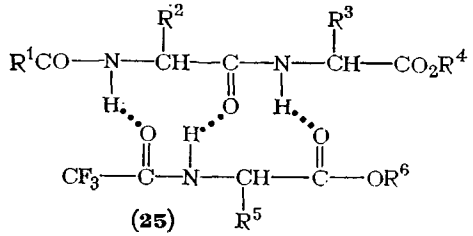
Широко использовавшееся прежде разложение одного из энантиомеров до α-кетокислоты с помощью аминоксидаз {схема (31)} ограничивается лишь аналитическими масштабами.

$$DL\text{-}NH_2CHRCO_2H \xrightarrow[O_2]{\text{D- или L-аминоксидаза.}} RCOCO_2H + NH_3 + H_2O_2 + \text{Незатронутый энантиомер} \qquad (31)$$

Преимущество этого метода в том, что нет необходимости получать производные, однако чувствительный к окислению энантиомер разрушается, а некоторые аминокислоты невосприимчивы к атаке. Оксидазы *L*-аминокислот найдены в некоторых змеиных ядах, а их *D*-аналоги — в почках млекопитающих. Разумеется, ферменты можно использовать как для получения производных, так и для фрагментации субстратов. В 1937 г. Бергман и Френкель-Конрат обнаружили, что папаин катализирует образование пептидной связи: первым примером явилось образование анилида из *N*-бензилоксикарбонилглицина. Этот фермент специфичен для *L*-аминокислот, было обстоятельно изучено образование арилгидразидов из рацемических *N*-ациламинокислот. Одна из трудностей состояла в том, что в некоторой степени затрагивался и *D*-энантиомер, однако в результате исследования множества замещенных арилгидразидов в настоящее время установлено, что *o*-фторфенилгидразин приводит к гидразидам, содержащим 99,9 % аминокислот; в качестве стандартной аминокислоты используется аланин [50]. (Для сравнения, фенилгидразин дает только 88,2 % *L*-фенилгидразида.) Этот метод сейчас используется для практического раз-

деления аминокислот; у него есть и дополнительное преимущество — производное кристаллизуется из водного раствора по мере того, как происходит реакция.

Наибольшее внимание следует уделить методам ГЖХ, разделению с помощью колоночной хроматографии. Аминокислоты можно разделять, используя как оптически активные стационарные фазы, так и путем образования диастереометричных производных. Что касается последнего способа, то подробно изучены алкиловые эфиры *N*-трифторацетил-*L*-пролил-*DL*-аминокислот; *N*-трифторацетил-*L*-пролин обладает тем преимуществом, что он устойчив к рацемизации в процессе образования дипептида [51]. Наиболее удачными оптически активными стационарными фазами являются дипептидные производные, такие как циклогексиловый эфир *N*-трифторацетил-*L*-α-аминобутирил-*L*-α-аминобутановой кислоты [52], и *N*-лаурил-*L*-валин-*трет*-бутиламид [53]; они дают сопоставимые результаты. По-видимому, лучшие результаты достигаются, когда между стационарной фазой и производным аминокислоты (25) могут возникать три водородные связи, что определяет конформацию «растворенного вещества», удерживание которого определяется конфигурацией аминокислот в неподвижной фазе. Растворенные вещества зеркальных изомеров становятся «конформационными» диастереомерами [54]. Неподвижные фазы, содержащие *N*-ацилпролин, в этом случае должны быть менее эффективными, так как у них нет NH-групп, которые образуют водородные связи.




стационарная фаза

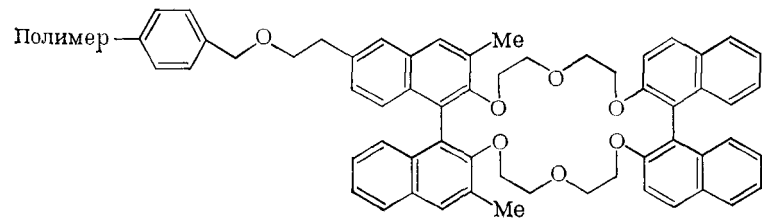
производное DL-аминокислоты

(25)

Однако методы ГЖХ, как можно полагать, находят применение только в аналитических целях. Колоночная жидкостная хроматография при пониженном давлении представляется более предпочтительной для препаративного варианта, но до сих пор еще ни одна система не применена для разделения аминокислот. Найдено, что оптически активные аминокислоты в виде металлокомплексов являются хорошо разделяющими агентами, хотя испытано лишь несколько субстратов. Присоединение *L*-пролина к сополимеру хлорметилированного стирола с дивинилбензолом с последующей обработкой сульфатом меди приводит к сорбенту, который легко разделяет *DL*-пролин. Если рацемат вводить из воды, то *L*-пролин элюируется этим же растворителем, тогда как *D*-пролин выходит только после элюции 1 *M* гидроксидом аммония [55]. Разумеется, использование энантиомера для разделения аминокислот неудобно, однако это не всегда обязательно. При использовании *DL*-сульфоксида *D*-метионина в качестве связанного с полимером асимметрического агента аналогичным образом можно разделить *DL*-лейцин: *D*-изомер элюируют водой, а *L*-изомер 1 *M* раствором аммиака [56].



Хиральные циклические полиэфирные ионофоры, ковалентно присоединенные к макросетчатому полистиролу (26), сшитому дивинилбензолом, также применимы в качестве сорбентов для разделения аминокислот на колонках. Они образуют более стабильные




(26) *R* *R*

комплексы с (*R*)-энантиомерами всех изученных аминокислот кроме фенилаланина. Ряд рацемических аминокислот в виде солей (перхлоратов или гексафторфосфатов) удалось успешно разделить на этом сорбенте, используя в качестве растворителя смеси хлороформа с ацетонитрилом. Деление, однако, необходимо проводить при 0 °C, так как эффективность хирального сорбента падает с повышением температуры [57]. Известен один пример применения афинной хроматографии для разделения аминокислот. Триптофан удалось разделить на колонке с агарозой, к которой с помощью сукциноиламиноэтильного мостика присоединен сывороточный альбумин быка. Используя боратный буфер (pH 2,0), содержащий 1 % диметилсульфоксида удается элюировать *D*-триптофан; *L*-антипод выходит только после замены растворителя 0,1 *M* уксусной кислотой [58].

## 23.2.5. АМИНОКИСЛОТЫ, МЕЧЕННЫЕ ИЗОТОПАМИ

### 23.2.5.1. Изотопы водорода

Широко изучены меченные тритием аминокислоты. По сравнению с другими радиоизотопами тритий относительно дешев и с его помощью можно добиться высокой удельной активности. Однако положение тритиевой метки не столь определенно по сравнению с изотопами углерода и азота, и в некоторых группах молекулы тритиевая метка может быть относительно лабильной. Тритий обладает только мягким β-излучением. Введение тритиевой метки рассмотрено недавно в исчерпывающей монографии [59], и мы отсылаем читателя к этому прекрасному источнику информации.

Введение метки в аминокислоту прямой обменной реакцией в последнее время применяют редко, так как это приводит к хао-

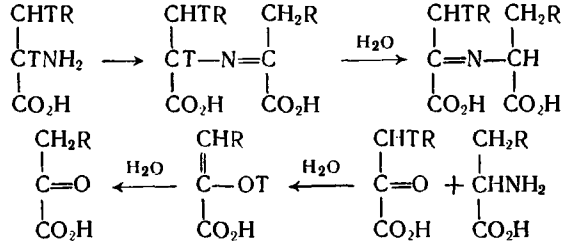
тическому распределению метки и сопутствующей рацемизации. Первоначальная методика, предложенная Вильсбахом в 1956 г. состоит в простом контакте органического соединения и газообразного трития в течение различного времени — от нескольких дней до недель. Излучение трития индуцирует обмен между $^1H$ и $^3H$, однако при этом достигается малая удельная активность, а протекание побочных реакций требует тщательной очистки продукта. Лучший результат достигается при добавлении металлов, катализирующих гидрирование. Природа металла и условия применения определяются в основном образцом, куда необходимо ввести метку. Например, если фенилаланин обработать Pt—$^3H_2O$ при 135 °C, то в ароматическое ядро входит 73 %, в боковую цепь соответственно 27 % метки [60]. Если же использовать Pd—$BaSO_4$—$^3H_2$ в ледяной уксусной кислоте или в основном водном растворе, то 92 % метки входит в бензильное положение [61].

Ароматические ядра таких аминокислот, как фенилаланин, тирозин и триптофан можно специфически метить с помощью галоген-тритиевого каталитического замещения в присутствии основания. Остатки тирозина, которые могут входить в пептиды, сперва иодируют (3,5-замещение) и далее иод замещают на тритий. Например, 23-[3,5-$^3H_2$-Tyr]-β-кортикотропин-(1—24)-тетракозапептид синтезирован последовательным иодированием замещенного (11—24) фрагмента, содержащего свободную α-аминогруппу, присоединенную к производному (1—10) фрагмента, и введением трития с помощью смеси Pd/C—Rh/$CaCO_3$ в качестве катализатора, где карбонат играет роль необходимого основания [62]. Следует заметить, однако, что в кислых растворах [3,5-$^3H_2$]-тирозин теряет тритий в результате обмена. Меченный в ядро фенилаланин устойчив при кипячении в 5 %-ной хлороводородной (соляной) кислоте, однако теряет тритий при нагревании в >80 %-ной серной кислоте.

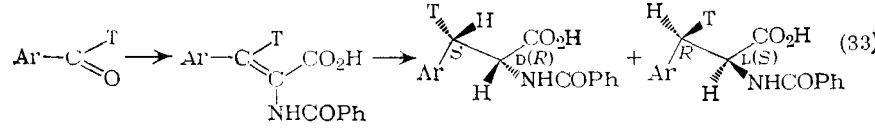
Наиболее часто вводят тритий в свободную аминокислоту, используя восстановление ненасыщенных предшественников в присутствии трития. Если дегидроаминокислота представляет собой α,β-ненасыщенное соединение, как в азлактонном синтезе аминокислот {см. схему (9)}, то образуется [2,3-$^3H_2$]аминокислота. Однако, как правило, более стабильные меченные радиоактивными изотопами аминокислоты получают восстановлением двойной связи, находящейся в боковом радикале и удаленной от α-асимметричного центра. Например, из 2-метил-1-хлорпропена-2 можно получить [4,5-$^3H_2$]лейцин и из 3,4-дегидропролина — [3,4-$^3H_2$]пролин. Поскольку тритийсодержащие соединения при стоянии саморазлагаются, целесообразно синтезировать нужный немеченый интермедиат, который следует гидрировать тритием непосредственно перед употреблением; в особенности это относится к пептидам. Примером такого подхода может служить использование *трет*-бутоксикарбонил-*L*-триптофил-*L*-4-дегидронорлейцил-*L*-аспарагил-*L*-фенилаланинамида в качестве предшественника при синтезе аналога пептида гастрина BOC-Trp-NorLeu-Asp-Phe-$NH_2$ [63].



Можно вводить метку в α-положение аминокислоты путем декарбоксилирования производных α-ацетиламиномалоновой кислоты {см. схему (7)} в кислых растворах тритийсодержащего растворителя. Альтернативно, можно вводить метку в α-положение аминокислоты непосредственно в условиях, которые вызывают рацемизацию при α-С атоме, т. е. в сильно щелочных средах или при кипячении с уксусным ангидридом в уксусной кислоте. Однако для проведения многих биологических исследований лучше избегать применения [α- или β-$^3H$] меченных аминокислот. Обмен трития в этих положениях происходит через реакции трансаминирования {схема (32)}; потеря трития, находящегося в β-положении аминокислот, используется в методе анализа трансаминаз. Обработка α,β-тритированных α-аминокислот с помощью оксидаз аминокислот или почечной ацилазы может приводить к существенной потере активности; осторожность следует соблюдать и при использовании ферментов для разделения рацемических аминокислот, меченных радиоактивными изотопами.


(32)

Разработано стереоселективное введение метки в β-метиленовые группы ароматических аминокислот в связи с изучением механизма биохимических реакций, затрагивающих β-положение. Азлактонный синтез {см. схему (9)} приводит к (*Z*)-оксазолинону из [α-$^3H$] ароматического альдегида, и после гидролиза в соответствующую (*Z*)-α-бензоиламинокоричную кислоту эти соединения при каталитическом гидрировании претерпевают *цис*-присоединение, что приводит к смеси (β*R*)-*L*- и (β*S*)-*D*-[β-$^3H$]аминокислот {схема (33)}. Их можно рацемизовать по α-положению обработкой 10 *M* хлороводородной кислотой при 180 °C без потери трития. Разделение *N*-хлорацетильных производных с помощью карбоксипептидазы [атакуется только α-(*S*)-изомер] дает возможность вы-


(33)

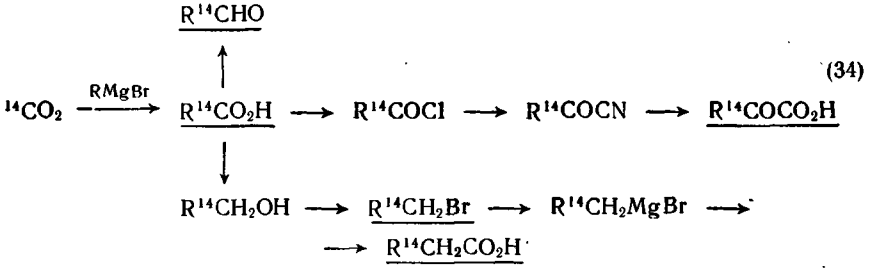
делить все четыре стереоизомера [64]. Введение трития в функциональные группы боковых радикалов предшественников следует производить по возможности на наиболее поздней стадии синтеза.

Например, [6-$^3$H]лизин и [5-$^3$H]орнитин можно получить восстановлением боротритидом натрия соответственно δ-цианонорвалина и γ-циано-α-аминомасляной кислоты [65].

Методы введения дейтериевой метки очень близки к таковым для введения тритиевой метки за исключением того, что дейтерий — стабильный изотоп, и, следовательно, для его введения не может быть использован обмен, индуцируемый облучением. Ограничения для дейтериевой метки аналогичны таковым для трития, но отсутствие радиоактивности упрощает эксперимент и укорачивает синтетические методики.

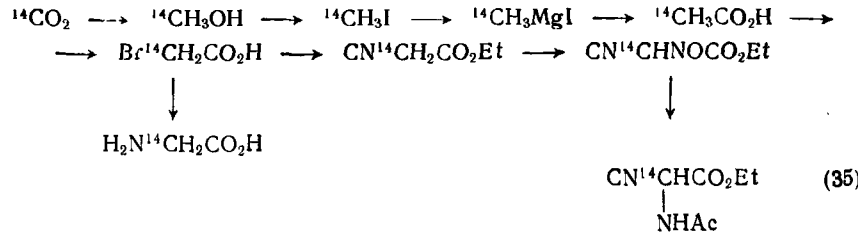
### 23.2.5.2. Изотопы углерода и азота

Подобно тритию, широкое применение находит долгоживущий радиоактивный изотоп углерода-14. Основным источником этого радиоактивного изотопа является $^{14}CO_2$ и для коротких химических синтезов $^{14}$C-меченных аминокислот генерируют производные путем изотопного замещения либо в функциональных группах, либо в близких к ним положениях. На схеме (34) представлены пути синтеза большинства широко используемых аминокислот через [1-$^{14}$C] и [2-$^{14}$C] меченные алкилгалогениды, α-кетокислоты и альдегиды (подчеркнуты интермедиаты синтеза аминокислоты). Пути



(34)

синтеза [2-$^{14}$C]глицина и [2-$^{14}$C]ацетамидоцианоуксусного эфира представлены на схеме (35).

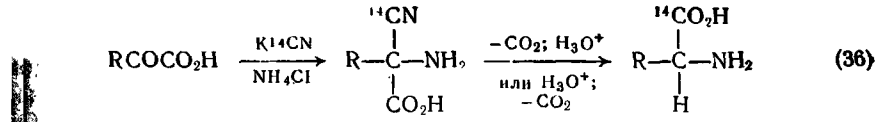


(35)

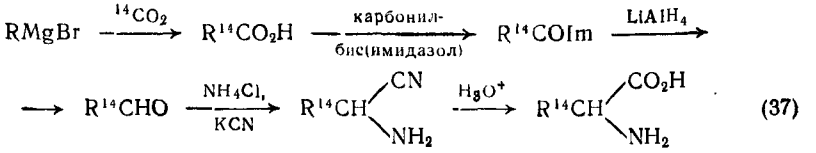
В популярном и коротком синтезе [1-$^{14}$C]меченных аминокислот используют синтез Штрекера {схема (14)} в присутствии K$^{14}$CN. В некоторых случаях для этой цели α-кетокислоты предпочитают



альдегидам {схема (36)} [66].

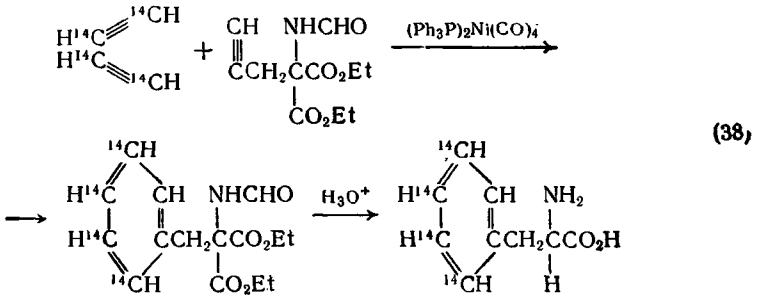


(36)



(37)

Синтез Штрекера можно использовать также для получения [2-$^{14}$C]аминокислот из $^{14}CO_2$ в пять стадий, правда в одном реакционном сосуде без выделения интермедиатов {схема (37)} [67]. Изотопное замещение в положение 3 часто можно достичь, исходя из [1-$^{14}$C]меченных альдегидов в синтезе азлактонов {см. схему (9)}. Введение метки в γ и более отдаленные положения бокового радикала необходимо производить на ранней стадии зачастую довольно длинного синтеза. Исключение составляют случаи, когда можно использовать предшественник функциональной группы боковой цепи, либо когда возможен остроумный короткий путь синтеза. В качестве последнего приведем двухстадийный синтез [2′,3′,4′,5′-$^{14}C_4$] фенилаланина из [1,2-$^{14}C_2$]ацетилена {схема (38)} [68].

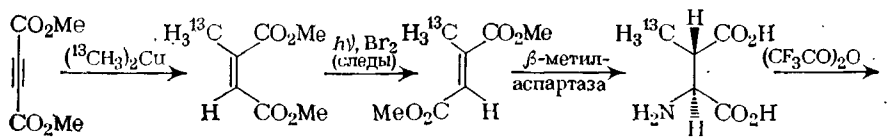


(38)

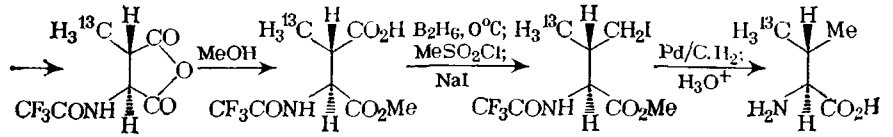
Равномерно меченные аминокислоты можно получить биосинтетически с помощью превращения $^{14}CO_2$ в равномерно меченую глюкозу (через крахмал), используя ее в качестве питательной среды для дрожжевых клеток; гидролиз полученного белка приводит к смеси равномерно меченных составляющих аминокислот.

Углерод-13 нерадиоактивен, но в отличие от $^{12}$C и $^{14}$C свойства его ядер таковы, что их можно обнаружить с помощью спектроскопии ЯМР. С помощью новейшей техники Фурье-преобразования можно получить химические сдвиги $^{13}$C образцов без их изотопного обогащения; природное содержание изотопа $^{13}$C (1,1 %) оказывается вполне достаточным для современных чувствительных приборов [69]. Однако введение метки становится эффективным

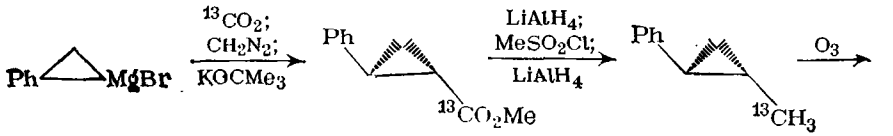
в тех случаях, когда необходимы количественные измерения, что важно для биологических исследований или требуются углеродные константы спин-спинового взаимодействия, так как нужны сильно обогащенные образцы. Равномерно меченные углеродом $^{13}C$ аминокислоты можно получить биосинтетически, выращивая морскую водоросль *Spirulina maxima* в присутствии $NaH^{13}CO_3$. Белок водоросли гидролизуют сперва ферментом проназой, далее 2 *M* серной кислотой и полученную смесь аминокислот, обогащенную на 85 % изотопом $^{13}C$ фракционируют на ионообменной колонке [70]. Специфически меченные изотопом $^{13}C$ аминокислоты синтезированы также для решения вопросов, связанных с выяснением механизмов реакций. Заслуживает внимания пример синтеза валина, содержащего $^{13}CH_3$-группу вместо одной из его метильных групп изопропильной группировки в боковом радикале. Это дает возможность изучать с помощью ЯМР включение валина в пенициллин. Синтез (2*S*)-[4-$^{13}$C]валина интересен еще и потому, что его независимо осуществили три группы ученых. Эти синтезы представлены на схемах (39)—(41) [71—73] и дают представление о количестве стадий, необходимых для замещения определенного атома углерода в алкильной боковой группе, отдаленной от функциональной группы. Два из этих продуктов являются рацематами по α-С-атому. В третьем случае этот центр генерируется стереоспецифически с помощью фермента β-метиласпартазы.



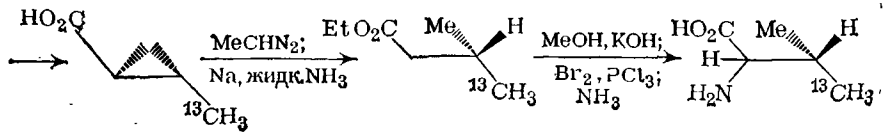

(39)



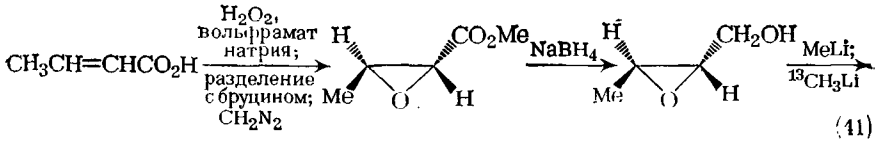

(2*S*, 3*S*)




(40)

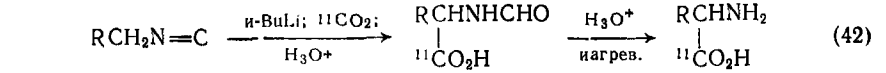





(41)

Углерод-11 обладает малым периодом полураспада (20,3 минуты), но его в отличие от $^{14}C$ можно обнаружить *in vivo*. Этот изотоп, например, использовали в синтезе [1-$^{11}$C]-DL-α-фенилаланина карбоксилированием изоцианида {схема (42)}. Продукт был выделен с хорошим выходом спустя 40 мин после введения $^{11}CO_2$ в реакцию [74].




(42)

Наиболее долгоживущим изотопом азота является азот-13 (период полураспада 10 мин). Аминокислоты, содержащие эту метку, синтезированы из $^{13}NH_3$ с использованием ферментов, иммобилизованных на пористых шариках из кремнезема [75]. Стабильный изотоп азот-15 изучен гораздо лучше; реакции одностадийного аминирования дают возможность осуществлять наиболее короткие синтезы. Широко используется восстановительное аминирование α-кетокислоты как химическими, так и биохимическими методами. С помощью цианоборогидрида натрия в присутствии $^{15}NH_3$ можно восстановить, например, индолил-3-пировиноградную кислоту в [2-$^{15}$N]триптофан с выходом 23 % (pH 6—8, в MeOH, 25 °C) [76]. Ферментативные синтезы, например превращение 2-оксоглутаровой кислоты в глутаминовую в присутствии $^{15}NH_4Cl$ и восстановленного фосфата NAD, представляются удобными для синтеза скорее *L*-аминокислот, чем рацематов. В этом последнем случае NADPH можно последовательно регенерировать, проводя вначале реакцию окисления глюкозо-6-фосфата, чем заканчивается синтез *L*-глутаминовой кислоты [77]. Прямое аминирование α-галогенкарбоновых кислот менее привлекательно, так как оно требует большого избытка аммиака, содержащего дорогостоящий изотоп азота. Некоторое применение в синтезе аминокислот находит [$^{15}$N]фталимид, например, при получении [2-$^{15}$N]лизина [78].

## ЛИТЕРАТУРА

1. *J. F. Thompson, C. J. Morris and I. K. Smith*, «New Naturally Occurring Amino-acids», in Ann. Rev. Biochem., 1969, **38**, 137.
2. «Amino-acids, Peptides, and Proteins», Specialist Periodical Reports, The Chemical Society London, 1969 и последующие года.

3. *J. P. Greenstein and M Winitz*, «Chemistry of the Amino-acids», Wiley, New York, 1961, vols. 1—3 (имеется русский перевод избранных глав: *Дж. Гринштейн, М. Виниц.* Химия аминокислот и пептидов. М., Мир, 1965).
4. *L. Fowden and M. H. Richmond*, Biochim. Biophys. Acta, 1963, **71**, 459; см. также: Bacteriol. Rev., 1962, **26**, 398
5. См., например: H. B. Vickery, «A Review of Amino-acids described since 1931 as Components of Native Proteins», in Adv. Protein Chem., 1972, **26**, 81.

5а. *T. Nakajima and B. E. Volcani*, Science, 1969, **164**, 1400.

5б. *T. Nakajima and B. E. Volcani*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, **39**, 28.

5в. *S. Hunt*, FEBS Letters, 1972, 24, 109; *S. D. Anderson*, Acta Chem. Scand., 1972, **26**, 3097.

5е. *S. Welinder*, Biochim. Biophys. Acta, 1972, **297**, 491.

5д. *S. Hunt*, Biochim. Biophys. Acta, 1971, **252**, 301.

6. *J. T. Dunn*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 5954.
7. *P. A. Finot, R. Viani, J. Bricout, and J. Mauron*, Experientia, 1969, **25**, 134; *K. Heyns, J. Heukeshoven, and K.-H. Brose*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1968, 7, 628.
8. *P. M. Hardy, G. J. Hughes, and H. N. Rydon*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 157.
9. *F. W. Keeley and F. S. Labella*, Biochim. Biophys. Acta, 1972, **263**, 52.

9а. *J. Thomas, D. F. Elsden, and S. M. Partridge*, Nature, 1963, **200**, 651.

10. *K. Ziegler, I. Melchert, and C. Lürken*, Nature, 1967, **214**, 404.
11. *T.-Y. Liu and Y H. Chang*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 2842; для триптофана см.: *A. Fontana, and C. Toniolo*, in «Progress in the Organic Chemistry of Natural Products», Springer-Verlag, New York, 1976, vol. 33, p. 309.
12. *R. Haselkorn and L. B. Rothman-Denes*, Ann. Rev. Biochem., 1971, **40**, 411.
13. *R. L. Heinrikson and H. S. Kingdon*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 1099.
14. *C. I. Lote and J B. Weiss*, FEBS Letters, 1971, **16**, 81.
15. *H. R. Morris, A. Dell, T. E. Petersen, L. Sottrup-Jensen, and S. Magnusson*, Biochem. J., 1976, **153**, 663.
16. *P. A. Price, A. S. Otsuka, J. W. Poser, J. Kristaponis, and N. Raman*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 1447.
17. *P. M. Steinert, H. W. J Harding, and G. E. Rogers*, Biochim. Biophys. Acta, 1969, **175**, 1.
18. *H. W. J. Harding and G. E. Rogers*, Biochim. Biophys. Acta, 1972, **257**, 37.
19. *M. L. Tanzer, T. Housley, L. Berube, R. Fairweather, C. Franzblau, and P. M. Gallop*, J. Biol. Chem., 1973, **248**, 393; см. также: *W. Traub and K. Piez*, Adv. Protein Chem., 1971, **25**, 243.
20. *H. P. J. Bennett, D. F. Elliott, B. E. Evans, P. J. Lowry, and C. McMartin*, Biochem. J., 1972, **129**, 695.
21. *M. Horiike, J. Oda, Y. Inouye, and M.* Ohno, Agric. Biol. Chem. (Japan), 1969, **33**, 292.
22. *J.-F. Nicoud and H. B. Kagan*, Tetrahedron Letters, 1971, 2065.
23. *A. Badshah, N. H. Khan, and A. R. Kidwai*, J. Org. Chem., 1972, **37**, 2916.
24. *M. Crawford and W. T. Little*, J. Chem. Soc., 1959, 729.
25. *H. L. Finkbeiner*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 961.
26. *E. Kaji and S. Zen*, Buil. Chem. Soc. Japan, 1973, **46**, 337.
27. *K. Rühlmann and G. Kuhrt*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1968, **7**, 809.
28. *J.-C. Fiaud and H. B. Kagan*, Tetrahedron Letters, 1970, **1813**.
29. *K. Hiroi, K. Achiwa, and S.-I. Yamada*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1968, **16**, 444.
30. *K. Matsumoto M. Suzuki, and M. Miyoshi*, J. Org. Chem., 1973, **38**, 2094.
31. *S.-I. Yamada, T. Oguri, and T. Shiori*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 623.
32. *M. W. Rathke and A. Lindert*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 2318.
33. *K. Ninomiya, T. Shioiri, and S.-I. Yamada*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1974, **22**, 1398.
34. *K. Ogura and G.-I. Tsuchihashi*, J. Amer. Chem Soc., 1974, **96**, 1960.
35. *W. H. Graham*, Tetrahedron Letters, 1969, 2223.
36. *H. Wakamatsu, J. Uda, and N. Yamakami*, Chem. Comm., 1971, **1540**.





37. *K. Harada and K. Matsumoto*, J. Org. Chem., 1969, **33**, 4467; 1968, **32**, 1794; *K. Harada and T. Yoshida*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1970, **43**, 921; Chem. Comm., 1970, 1071.
38. *E. J. Corey, H. S. Sachdev, J. Z. Gougoutas, and W. Saenger*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 2488.
39. *K. Harada and T. Okawara*. J. Org. Chem., 1973, **38**, 707; *K. Harada, T. Okawara, and K. Matsumoto*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1973; **46**, 1865.
40. *J. Y. Chenard, D. Commereuc, and Y. Chauvin*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 750.
41. *W. S. Knowles, M. J. Sabacky, B. D. Vineyard, and D. J. Weinkauff*, J. Amer Chem. Soc., 1975, **97**, 2567.
42. *B. W. Bycroft and G. R. Lee*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 988.
43. *H. Poisel and U. Schmidt*, Chem. Ber., 1973, **106**, 3408.
44. *R. C. Job and T. C. Bruice*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 809.
45. *J. Thanassi and J. S. Fruton*, Biochemistry, 1962, **1**, 975.
46. *K. Oki, K. Suzuki, S. Tuchida, T. Saito, and H. Kotake*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1970, **43**, 2554.
47. *R. D. Gillard, P. R. Mitchell, and H. L. Roberts*, Nature, 1968, **217**, 949.
48. *S. Yamada, M. Yamamoto, and I. Chibata*, J. Org. Chem., 1973, **38**, 4408.
49. *T. Barth and H. Maskova*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1971, **36**, 2398.
50. *J. L. Abernethy, E. Albano, and J. Comyns*, J. Org. Chem., 1971, **36**, 1580.
51. *B. Halpern and J. W. Westley*. Tetrahedron Letters, 1966, 2283; *H. Iwase*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1974, **22**, 2075.
52. *W. Parr and P. Y. Howard*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1972, **11**, 529.
53. *B. Feibush*, Chem. Comm., 1971, 544.
54. *B. Feibush*, Tetrahedron, 1970, **26**, 1361.
55. *S. V. Rogozhin, and V. A. Davankov*, Chem. Comm., 1971, 490.
56. *С. В. Рогожин, В. А. Даванков, И. А. Ямсков, В. П. Кабанов*, ЖФХ, 1972, **42**, 1614.
57. *G. D. Y. Sogah and D J. Cram*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3038.
58. *K. K. Stewart and R. F. Doherty*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, **70**, 2850.
59. *E. A. Evans*, «Tritium and its Compounds», Wiley, New York, 2nd edn., 1974.
60. *M. C. Clifford, E. A. Evans, A. E. Kilner, and D. C. Warrell*, J. Labelled Compounds, 1975, **11**, 435.
61. *E. A. Evans, H. C. Sheppard, J. C. Turner, and D. C. Warrell*, J. Labelled Compounds, 1974, **10**, 569.
62. *D. E. Brundish and R. Wade*, J. C. S. Perkin I, 1973, 2875.
63. *C. S. Pande, J. Rudick, L. Ornstein, I. L. Schwartz, and R Walter*, Mol. Pharmacol., 1969, **5**, 227.
64. *G. W. Kirby and M. J. Varley*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 833; *G. W. Kirby and J. Michael*, J C. S. Perkin I, 1973, 115
65. *I. Mezo, M Havranek, I. Teplan, J. Benes, and B. Tanacs*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 1975, **85**, 201.
66. *I. Teplan, I. Mezo, L. Bursics, and J. Marton*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung, 1969, **60**, 301.
67. *L. Pichat, P. N. Liem, and J.-P. Guermont*, Bull. Soc. chim. France, 1971, 837.
68. *L. Pichat, P. N. Liem, and J.-P. Guermont*, Bull. Soc. chim. France, 1972, 4224.
69. *J. B. Stothers*, «Carbon-13 n. m. r. spectroscopy», Academic Press, New York, 1972.
70. *S. Fermandjian, S. Tran-Dinh, J. Savrda, E. Sala, R. Mermet-Bouvier, E. Bricas, and P. Fromageot*, Biochim. Biophys. Acta, 1975, **399**, 313.
71. *H. Kelunder, C. H. Bradley, C. J. Sih, P. Fawcett, and E. P. Abraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, 95, 6149.
72. *D. J. Aberhart and L. J. Lin*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2320.
73. *N. Neuss, C. H. Nash, J. E. Baldwin. P. A. Lemke, and J. B. Grutzner*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 3797.
74. *W. Vaalburg, H. D. Beerling-van der Molen, and M. G. Woldring*, Nuclear Medicine, 1975, **14**, 60.

75. *M. B. Cohen, L. Spolter, C. C Chang, N. S. MacDonald, J. Takahashi, and D. D. Bobinet*, J. Nuclear Medicine, 1974, **15**, 1192.
76. *R. F. Borch, M D. Bernstein, and H. D. Durst*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 2877.
77. *W. Greenaway and F. R. Wharley*, J. Labelled Compounds, 1975, **11**, 395.
78. *J. Mizon and Ch Mizon*, J. Labelled Compounds, 1974, **10**, 229.

## 23.3. ПЕПТИДЫ И ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

*Д. Т. Элмор (The Queen's University of Belfast)*

### 23.3.1. ОБЩАЯ СТРАТЕГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

В общем белки построены из 20 аминокислот — см. табл. 23.2.1. В этой таблице представлены только аминокислоты, которые могут кодироваться триплетами оснований матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК). Другие аминокислоты, присутствующие в белках (например, цистин, гидроксипролин), образуются с помощью посттрансляционной модификации (например, окислением двух остатков цистеина, гидроксилированием пролина).

Общая стратегия определения первичной структуры белка включает несколько этапов. Необходимо: (а) провести количественный анализ гидролизата для того, чтобы определить мольное соотношение имеющихся аминокислот (см. разд. 23.3.2); (б) определить молекулярную массу с помощью подходящего физического метода для того, чтобы вычислить количество всех присутствующих аминокислотных остатков [1—3]; (в) определить количество входящих в молекулу полипептидных цепей либо с помощью хроматографического или электрофоретического разделения, либо посредством количественного анализа остатков, содержащих аминогруппу (*N*-конец) и карбоксильную группу (*C*-конец) (см. разд. 23.3.4); (г) разделить цепи, если их более одной входит в молекулу, помня при этом, что эти цепи могут быть связаны либо ковалентно — посредством дисульфидных мостиков (см. разд. 23.3.3), либо нековалентно, образуя четвертичную структуру (см. разд. 23.3.7); (д) расщепить каждую цепь, желательно специфическими методами (см. разд. 23.3.5 и 23.3.6), на фрагменты, в которых удобно анализировать последовательность, например с помощью ступенчатой деградации по Эдману (см. разд. 23.3.4). Необходимо отметить, что на стадии (в) *N*-конец(ы) может быть ацетилирован, а *C*-конец(ы) может присутствовать в виде амида. В этих случаях анализ концевых групп (см. разд. 23.3.4) приведет к неверным результатам. Дополнительная трудность возникает для белков, содержащих ковалентно связанную группу (простетическую группу), непептидной структуры. В этом случае необходимо определить место и способ присоединения простетической группы.

Сэнджер с сотр. определили структуру инсулина — первого белка, последовательность которого была расшифрована до того, как был опубликован метод последовательной деградации Эдмана. Сэнджер существенно облегчил себе задачу тем, что использовал частичный кислотный гидролиз для расщепления двух цепей инсулина на достаточно малые фрагменты, которые уже можно было охарактеризовать с помощью имеющейся техники. Несмотря на то, что эти две цепи содержат лишь 21 и 30 остатков аминокислот соответственно, в результате гидролиза образовалось много фрагментов и объем экспериментальной работы, включая их разделение, идентификацию и определение последовательности, занял у Сэнджера несколько лет; за эту работу ему была присуждена Нобелевская премия. С помощью современной техники эту же работу можно осуществить, самое большое, за несколько недель. Современная стратегия состоит в расщеплении белков на небольшое число относительно крупных фрагментов, что можно осуществить либо химически (см. раздел 23.3.5), либо ферментативно (см. разд. 23.3.6). Использование более одного метода расщепления обычно приводит к различным фрагментам, последовательности которых перекрываются. После разделения небольшого количества фрагментов их можно подвергнуть последующему расщеплению с помощью подходящего метода, а меньшие фрагменты разделить перед тем, как определять последовательность методом Эдмана. Если же начальные фрагменты достаточно малы, то последовательность можно определить без дополнительных реакций расщепления. Такого рода стратегия удается благодаря наличию нескольких совершенных методов разделения пептидов и тому, что с помощью метода Эдмана можно провести около 40 стадий последовательного расщепления полипептида.

Значение вышеизложенного подхода определения первичной структуры белков может быть проиллюстрировано несколькими гипотетическими примерами. Предположим, что белок можно расщепить на три фрагмента (A, B, C).

| Gly-Lys | Ala-Arg | Ser-Asp |
|---|---|---|
| A | B | C |

После того, как определены *N*- и *C*-концы исходного белка и трех его фрагментов, становится ясной структура исходной молекулы при условии, если концевые остатки ее различны. Если исходный белок, дающий фрагменты A, B и C, имеет на *N*-конце Gly, а на *C*-конце Asp, то его частичная структура:

Gly-Lys-Ala-Arg-Ser-Asp
← A → ← B → ← C →

Задача лишь несколько усложняется, если два фрагмента имеют тот же *N*- или *C*-конец, что и у исходного белка. Определение частичной (два или три остатка) последовательности с *N*- или *C*-конца исходного белка и сравнение с соответствующими последовательностями фрагментов дает возможность определить образовавшиеся концевые фрагменты). Если же из белка образуется

более трех фрагментов, можно определить два концевых фрагмента, однако последовательность фрагментов, находящихся внутри цепи останется неизвестной. В этом более распространенном случае необходимо провести другую фрагментацию с помощью альтернативного метода для того, чтобы определить частичные совпадения. Рассмотрим гипотетический пептид с *N*-концевым остатком Val и *C*-концевым Leu, расщепление которого приводит к четырем фрагментам E, F, G, H, имеющим показанную аминокислотную последовательность.

| | |
|---|---|
| Val-Gly-Ser-Lys | E |
| Ala-Ser-Phe-Gly-Lys | F |
| Asp-Gly-Tyr-Ala | G |
| Tyr-Gly-Leu | H |

Поскольку только E-фрагмент имеет *N*-концевой Val и только H-фрагмент имеет концевой Leu, ясно, что эти пептиды являются концевыми фрагментами исходного белка. Порядок расположения F и G в исходном белке на этой стадии исследования структуры определить невозможно, и тогда структуру этого белка можно представить формулой E(F, G)H, где запятая и скобки означают, что порядок связи заключенных в них фрагментов неизвестен. Предположим, что исходный белок можно расщепить другим способом на четыре других фрагмента W, X, Y, Z, с показанной структурой.

| | |
|---|---|
| Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Ser-Phe | W |
| Gly-Lys-Asp-Glu-Tyr | X |
| Ala-Arg-Tyr | Y |
| Glu-Leu | Z |

Последовательность -Lys-Ala- во фрагменте W показывает, что F следует за E. Аналогично, последовательность -Lys-Asp- во фрагменте Y показывает, что G следует за E. Таким образом, исходный белок имеет последовательность (1). Этот простой пример показывает, насколько важно иметь фрагменты с перекрывающимися последовательностями, что может быть достигнуто с помощью различных методов расщепления.

Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Ser-Phe-Gly-Lys-Asp-Glu-Tyr-Ala-Arg-Tyr-Gly-Leu (1)

Как отмечалось выше, для некоторых аминокислотных остатков может наблюдаться пост-трансляционная модификация. В некоторых случаях это не вызывает особых трудностей; действительно, если один или два остатка модифицированы, их положение(я) среди соседних остатков последовательности можно легко определить. В других случаях пост-трансляционная модификация может создавать трудности при определении первичной структуры белков. Самым обычным примером является окисление двух остатков цистеина, приводящее к цистеиновому остатку, который содержит



либо внутримолекулярную, либо межмолекулярную дисульфидную связь. Методы, используемые для решения этой проблемы, описаны в разд. 23.3.8. Другой интересный случай относится к зависимому от витамина K карбоксиметилированию остатков глутаминовой кислоты в некоторых факторах, определяющих свертываемость крови. Возникающие при этом карбоксильные группы расположены на γ-углеродном атоме. Следовательно, при кислотном гидролизе происходит декарбоксилирование и не удивительно, что в протромбине вплоть до 1973 г. не удалось обнаружить γ-карбоксиглутаминовую кислоту. В гликопротеинах углеводные остатки обычно присоединены к боковым группам аспарагина или серина и их присутствие может быть помехой при определении первичной структуры с помощью протеиназ. Кроме того, количество гексозных остатков, присоединенных к белку, может меняться от молекулы к молекуле, многократно увеличивая число фрагментов, содержащих одну и ту же последовательность аминокислотных остатков.

### 23.3.2. АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ

Некоторые аминокислоты можно анализировать, не подвергая белки гидролизу. Например, содержание триптофана можно определить с помощью метода магнитного кругового дихроизма [4], спектрофотометрическими измерениями восстановленного белка в присутствии додецилсульфата натрия [5], или спектрофотометрически в 6 *M* гидрохлориде гуанидина [6]. Такого рода технике определения триптофана следует отдать предпочтение, если учесть, что он разлагается в процессе гидролиза белков с помощью HCl. Недавно описаны усовершенствованные методы гидролиза белков, которые вызывают минимальную деструкцию аминокислот, однако имеющиеся быстрые, механизированные и мягкие методы определения всех аминокислот, входящих в белки, по-видимому, найдут самое широкое применение.

Обработка белков 6 *M* HCl при 110 °C в вакууме приводит к гидролизу пептидных связей, но одновременно с этим происходит разложение триптофана, гидролиз аспарагина и глутамина соответственно до аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также частичное разложение серина, треонина, цист(е)ина. Пептидные связи между аминокислотами с объемистыми боковыми группами, такими как Ile и Val, более устойчивы к гидролизу. Хорошо известно, что гидролизуя образцы белков в течение 1, 2 и 3 дней, необходимо экстраполировать количество таких аминокислот, как Ser и Thr к нулевому времени, а Ile и Val — к бесконечному. В случае цист(е)ина целесообразно перед гидролизом либо окислить его в цистеиновую кислоту, либо превратить в *S*-карбоксиметилцистеин или 4-пиридилэтилцистеин (см. разд. 23.3.3), так как все эти соединения стабильны. Обычно, в особенности если белок содержит углеводы, образуются продукты осмоления. После гидролиза соляную кислоту лучше удалить, так как она мешает при последующем разделении аминокислот.

Гидролиз белков 3 *M* *n*-толуолсульфокислотой или 4 *M* метансульфокислотой [7, 8], содержащей 0,2 % триптамина, в вакууме при 110 °C, в течение 3 суток с хорошим выходом приводит к аминокислотам, включая триптофан, однако углеводы могут мешать. Триптофан можно определять также после щелочного гидролиза, но при этом разрушаются полностью аргинин, цист(е)ин, серин и треонин. Общее содержание амидов, обусловленное наличием аспарагина и глутамина, можно определить после гидролиза 10 *M* HCl при 37 °C в течение 10 суток и последующего анализа на аммиак с помощью микродиффузионной техники. Раздельное определение аспарагина и глутамина можно провести с помощью предварительной этерификации (метанол-уксусный ангидрид) свободных карбоксильных групп, последующего восстановления (борогидрид лития) образовавшихся сложноэфирных групп и определения аспарагиновой и глутаминовой кислоты после кислотного гидролиза соответственно в виде γ-гидрокси-α-аминомасляной кислоты и δ-гидрокси-α-аминовалериановой кислоты. Содержание аспарагина и глутамина получают путем вычитания этих величин из содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот после полного гидролиза немодифицированного белка. Полный ферментативный гидролиз белков без деструкции аминокислот можно осуществить, используя смешанные конъюгаты Сефарозы с трипсином, химотрипсином, пролидазой и аминопептидазой М [9].

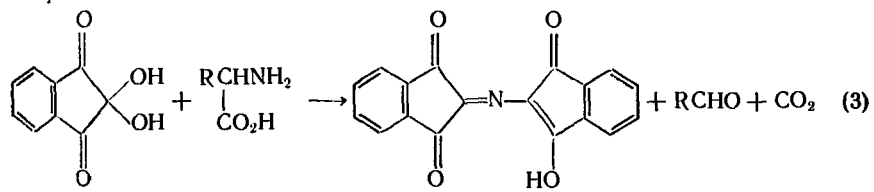
После проведения гидролиза белка полученную смесь аминокислот необходимо разделить и количественно проанализировать. Метод газо-жидкостной хроматографии привлекает своей быстротой и чувствительностью, в особенности метод хромато-масс-спектрометрии [10]. Разумеется, необходимо перевести свободные аминокислоты в более летучие для ГЖХ производные и в этом состоит трудность. Большинство известных методов включает две реакции: образование сложного эфира по карбоксильной группе и ацилирование аминогруппы. Крайне важно, чтобы обе реакции протекали практически нацело, а образовавшиеся производные можно было бы разделить. Несколько сотен опубликованных за последние 25 лет работ свидетельствуют о трудностях, которые при этом возникают. Карбоксильную группу обычно переводят в сложноэфирную, используя простые радикалы от метила до пентила, в то время как для защиты амино- или иминогруппы популярны *N*-трифторацетильная и *N*-гептафторомасляная группы, так как они позволяют проводить ГЖХ-анализ с высокой чувствительностью при использовании детектора электронного захвата. Трудности связаны с ацилированием гуанидиновой группировки аргинина и термолабильностью производных цистеина из-за реакций β-элиминации. Обсуждаемая техника и соответствующая литература коротко изложены в обзоре [11].

Чрезвычайно широко используется разделение аминокислот в белковых гидролизатах с помощью ионообменной хроматографии. Для этих целей, как правило, предпочитают ионообменные смолы из сульфированного полистирола, сшитого дивинилбензолом. При низких значениях pH аминокислоты существуют в растворе в виде катионов {схема (2)}.

$$^{+}NH_3CHRCOO^{-} \overset{H^+}{\rightleftharpoons} {}^{+}NH_3CHRCOOH \qquad (2)$$

В этой форме они связываются с анионной группой сульфированной смолы. Элюция аминокислоты достигается либо повышением pH и, таким образом, смещением равновесия (2) влево, либо увеличением ионной силы, что приводит к конкурентному связыванию со смолой аминокислот и катионов элюата. Аспарагиновая, глутаминовая и цистеиновая кислоты [последняя образуется в результате окисления цист(е)иновых остатков (см. разд. 23.3.3)] элюируются легче всего, ибо это двухосновные кислоты. Лизин и аргинин, напротив, элюируются с трудом в силу того, что каждый из них несет в боковой группе протонированную группу. Между этими крайними случаями располагаются остальные аминокислоты по мере того как увеличивается гидрофобное взаимодействие их боковых групп с ароматической структурой ионообменной смолы. Не удивительно, что ароматические аминокислоты обладают наибольшим гидрофобным связыванием и выходят лишь перед лизином и аргинином. С другой стороны, присутствие нейтральной полярной группы, такой как гидроксильная или амидная, уменьшает силу гидрофобного взаимодействия, так что серин, треонин, аспарагин и глутамин элюируются раньше лейцина, изолейцина и валина.

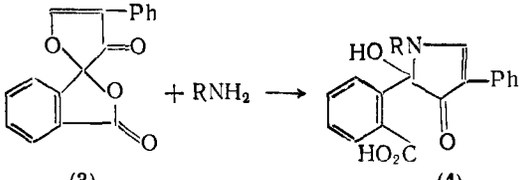
Разделение аминокислот характеризуют величиной $R$, зависящей от диаметра частицы ионообменной смолы, длины колонки и линейной скорости элюата [12] $R \approx 1/d(Z/2U)^{1/2}$, где $d$ — диаметр частицы, $Z$ — длина колонки и $U$ — скорость потока. Для высокого разрешения необходимы длинные колонки с мелкой смолой, но такая колонка оказывает большое сопротивление потоку элюента. Это обстоятельство наряду с необходимостью элюировать аминокислоты с воспроизводимым временем удерживания после начала хроматографии требует использования насоса постоянного давления для контроля за потоком элюента с необходимой постоянной скоростью.




(1) (2) (3)

Для обнаружения и количественного определения аминокислот элюат смешивают с раствором нингидрина (1) и эту смесь пропускают через нагреваемую спираль для проведения реакции по схеме (3). Продукт (пурпурный Руэмана) (2) анализируют спектро-

фотометрически при 570 нм; поглощение необходимо фиксировать на двухканальном самописце. Каждая аминокислота дает пик, близкий к гауссову распределению. Иминокислоты (пролин, гидроксипролин) дают производные, у которых максимум поглощения лежит при 440 нм; следовательно, необходим дополнительный спектрофотометр с выходом на второй конец самописца. Площади пиков можно определять вручную или же вводить данные либо в интегратор, либо в небольшую вычислительную машину. Раствор нингидрина готовят в смеси таких органических растворителей как диметилсульфоксид или 2-метоксиэтанол с ацетатным буфером при pH 5,2. Кроме того, раствор содержит восстанавливающий агент, такой как хлорид олова(II) или гидриндантин. Последний предотвращает побочные окислительные процессы, которые влияют на точность анализа. Аминокислоты дают несколько различающиеся спектрофотометрические выходы, поэтому для проверки точности анализа всегда используют стандартную смесь аминокислот. Чувствительность анализа примерно 1 нмоль. Сделаны попытки повысить чувствительность с помощью спектрофлуорометрических методов анализа. Одним же из потенциальных реагентов является 4-фенилспиро[фуран-2(3*H*),1′-фталан]дион-3,3′(3) («флуорескамин»), который не флуоресцирует. Он реагирует с аминами и аминокислотами при pH 9—11, давая *N*-замещенные производные 5-гидрокси-3,5-дифенилпирролин-2-она-4 {схема (4)}. Последние возбуждаются при 390 нм и имеют максимум поглощения при 475 нм. Несмотря на то, что относительное повышение чувствительности по сравнению со спектрофотометрическими методами на первый взгляд выглядит привлекательным, реагент (3) весьма дорог, а аминокислоты не дают флуоресцирующих продуктов до тех пор, пока величина pH кислого элюата не будет доведена до необходимого значения. Альтернативным реагентом для спектрофлуорометрии является *o*-фталевый ангидрид, однако он также обладает двумя упомянутыми недостатками.




(4)

(3) (4)

Более полное рассмотрение техники и коммерческого оборудования, необходимого для аминокислотного анализа, дано Бенсоном [13].

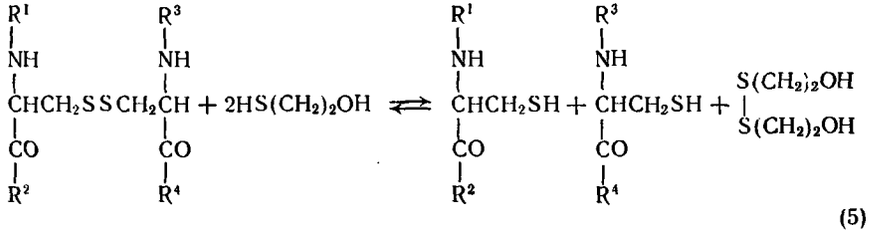
### 23.3.3. РАСЩЕПЛЕНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Прежде чем пытаться определить первичную структуру белка, необходимо провести расщепление дисульфидных связей, если присутствует цистин. Дисульфидные связи могут образовывать мостики в пределах одной цепи или могут соединять между собой две



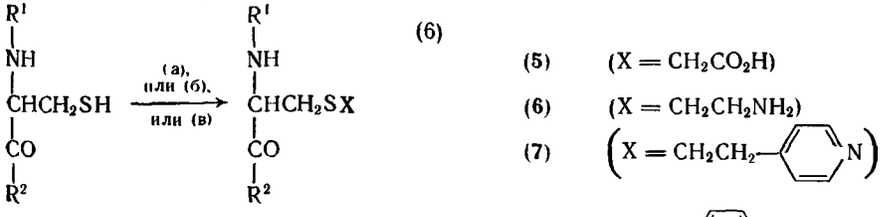
цепи. Выбор между этими двумя возможностями можно сделать на основании анализа концевых групп (см. разд. 23.3.4). Если присутствуют межмолекулярные дисульфидные связи, то необходимо выделить индивидуальные цепи и определить первичную структуру каждой из них. Наконец, необходимо определить локализацию дисульфидных связей — эта проблема обсуждается в разд. 23.3.8.

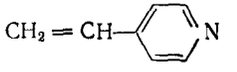
Дисульфидные связи можно разрывать гомолитически, с помощью электрофильной или нуклеофильной атаки и окислением [14]. Для определения первичной структуры белков наибольшее значение имеют два последних метода. Например, обработка белка большим избытком тиола, таким как этантиол или 1,4-дитиотреит, часто в присутствии гидрохлорида гуанидина, переводит дисульфидные группы белка в тиольные группы, как показано на




(5)

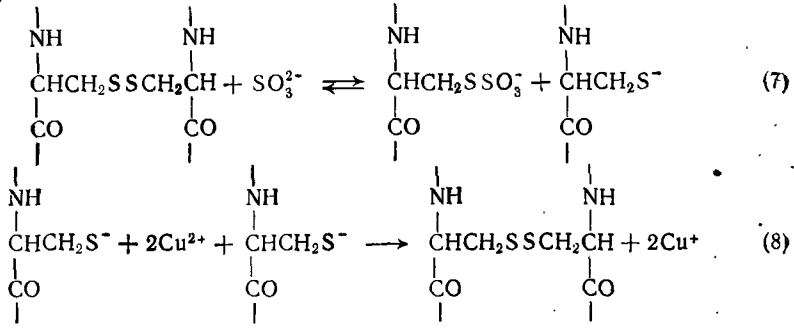
схеме (5). Полное восстановление белка достигается большим избытком используемого тиола. Для того чтобы предотвратить окисление тиольных групп белка воздухом, их обычно защищают обработкой иодуксусной кислотой, 4-винилпиридином или азиридином {схема (6)}. После гидролиза до аминокислот для количественного анализа модифицированные остатки дают соответственно *S*-карбоксиметилцистеин (5), *S*-2-аминоэтилцистеин (6) или *S*-2-(пиридил-4)этилцистеин (7).




(а) $ICH_2CO_2H$; (б)  ; (в) 

Нуклеофильный разрыв дисульфидных связей можно осуществить с помощью сульфит-ионов {схема (7)}. Этому разрыву способствуют добавление $Hg^{2+}$ или $Ag^{+}$, которые удаляют образующиеся тиолат-ионы. Однако чаще всего превращение остатков цистина в *S*-сульфоцистеиновые осуществляют добавками ионов $Cu^{2+}$, которые вновь окисляют образующиеся тиольные группы в дисульфидные, способные к дальнейшему разрыву сульфит-ионом

по схеме (8). Эти процессы можно представить обобщенной схемой (9).



(7)

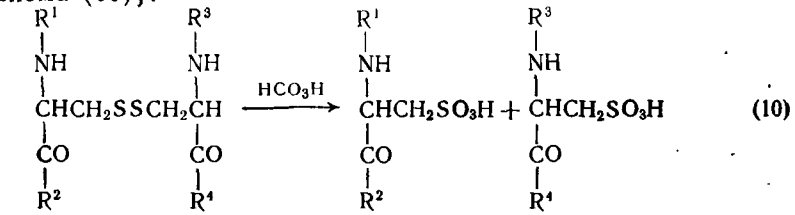


(8)



(9)

Наконец, окислительное расщепление дисульфидных связей можно осуществить обработкой пероксимуравьиной кислотой (муравьиная кислота + пероксид водорода); при этом каждая половина цистинового остатка превращается в остаток цистеиновой кислоты {схема (10)}.



(10)

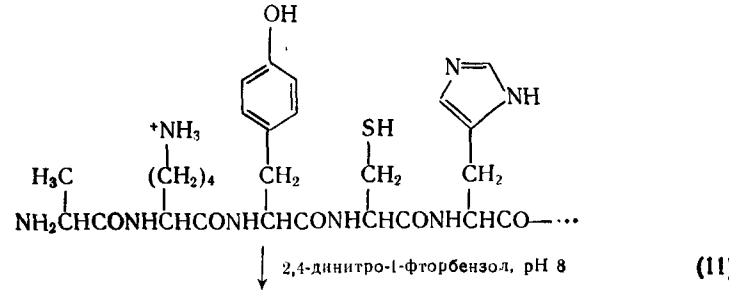
### 23.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕВЫХ ГРУПП

Идентификация *N*- и *C*-концевых остатков пептидных фрагментов является важнейшим этапом в определении первичной структуры белка. Когда эту процедуру можно совместить с методом последовательной деградации с одного конца молекулы, как описано ниже, становится понятным экспоненциальный взлет наших знаний о белковых последовательностях за последние 25 лет.

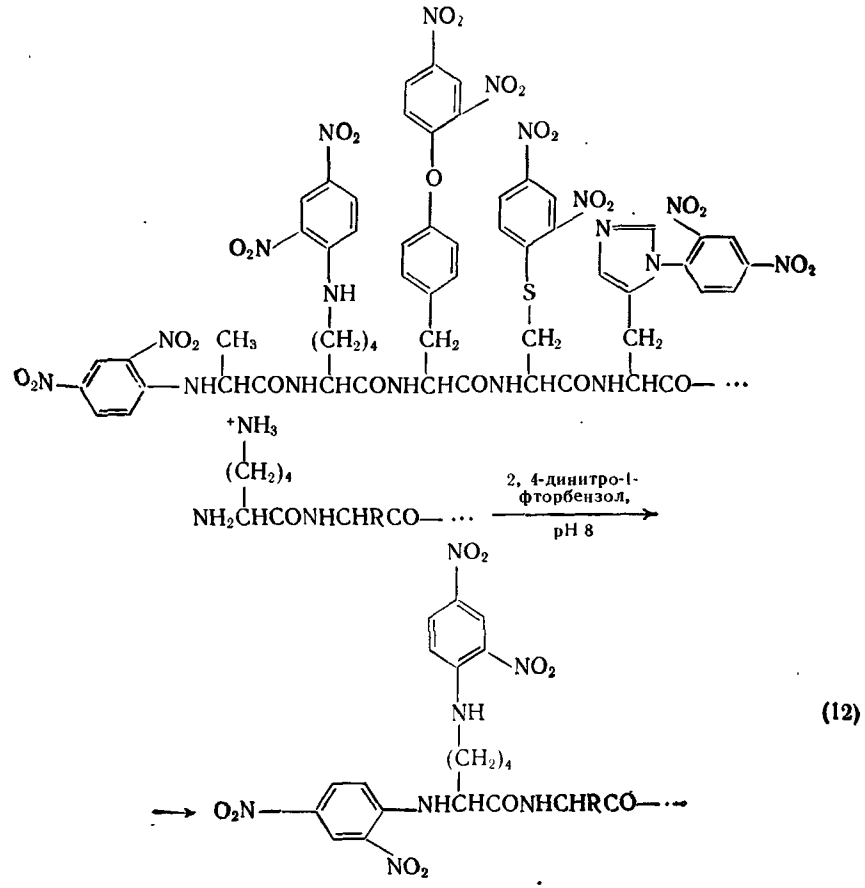
#### 23.3.4.1. Определение *N*-концевых групп

Один из методов идентификации *N*-концевой аминокислоты пептида или белка состоит в замещении α-аминогруппы на такую группу, которая выдерживает гидролиз, и таким образом, после кислотного или ферментативного гидролиза меченую аминокислоту можно обнаружить спектрофотометрически, спектрофлуорометрически или по радиоактивности и идентифицировать с помощью хроматографии.

Классическую метку — *N*-2,4-динитрофенильную (ДНФ), введение которой было разработано Сэнджером [15] во время исследования структуры инсулина, можно вводить реакцией пептида с 2,4-динитро-1-фторбензолом в буфере при pH около 8. Наряду с реакцией α-аминогруппы *N*-концевого остатка идет замещение по ε-аминогруппе лизина, фенольной гидроксигруппе тирозина, тиольной группе цистеина и имидазольному ядру гистидина {схемы (11), (12)}. Наконец, если одна из этих аминокислот является *N*-концевой, то образуется бис-ДНФ-производное.



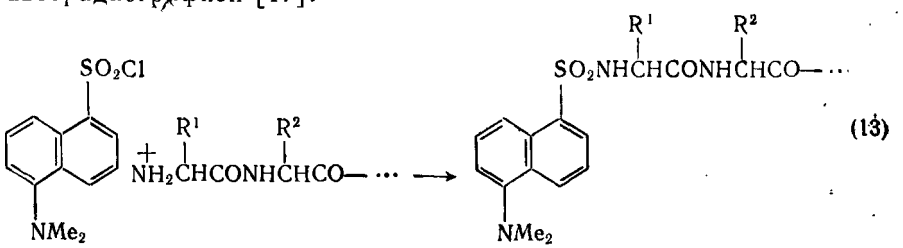
(11)



(12)

Полный кислотный гидролиз ДНФ-пептида приводит к желтому ДНФ-производному *N*-концевого остатка вместе со свободными аминокислотами и аминокислотами, меченными только в боковую цепь, такими продуктами как ε-ДНФ-лизин и *O*-ДНФ-тирозин. За исключением α-ДНФ-аргинина, α-ДНФ- (или бис-ДНФ)производные *N*-концевого остатка можно экстрагировать из подкисленного водного раствора подходящим органическим растворителем, например этилацетатом, и идентифицировать с помощью тонкослойной хроматографии.

ДНФ-группу вытеснила *N*-(1-диметиламинонафтил-5-сульфонильная) или «дансильная» группа, которую можно вводить при реакции пептида или белка с 1-диметиламинонафтил-5-сульфонилхлоридом (8) при pH 8 {схема (13)}. «Дансильные» производные аминокислот и пептидов сильно флуоресцируют; их можно отделить и идентифицировать с помощью тонкослойной хроматографии, например на ε-поликапролактаме [16]. Обычная чувствительность (примерно 100 пикомоль) может быть повышена до 25 фемтомоль при использовании [$^3$H]-меченного дансилхлорида с последующей авторадиографией [17].

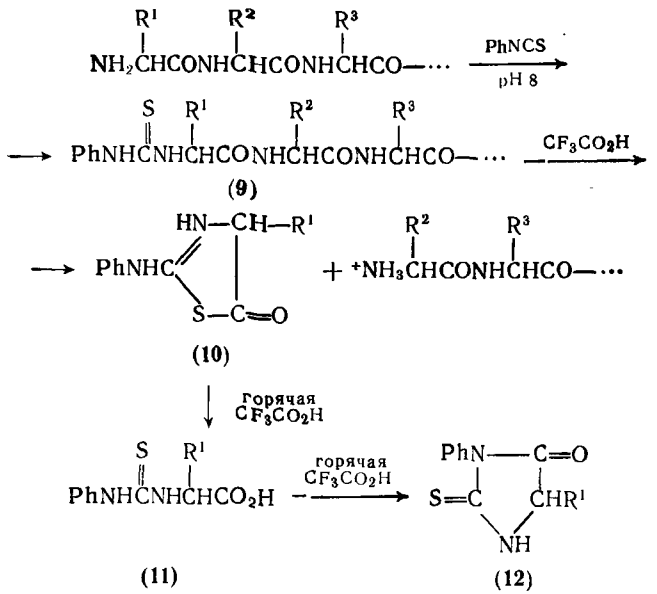


(13)

До развития методов последовательной дегидратации пептидов и белков, ДНФ-метка *N*-конца с последующим частичным гидролизом широко использовалась. Зоны, отвечающие пептидам, содержащим концевой ДНФ-остаток, можно выделить, разделить и анализировать аминокислоты после полного кислотного гидролиза. Таким путем можно устанавливать короткие последовательности.

В 1950 г. Эдман опубликовал метод определения последовательности с *N*-конца, и это явилось базисом современной методологии. Проводят реакцию α-аминогруппы пептида с фенилизотиоцианатом, и образовавшийся *N*-фенилтиокарбамоилпептид (9) после удаления избытка реагента претерпевает циклизацию и кислотно-катализируемый распад, например с помощью трифторуксусной кислоты {схема (14)}. Образовавшиеся 2-анилинотиазолиноны-5 (10) в горячей трифторуксусной кислоте перегруппировываются в изомерные 3-фенил-2-тиогидантоины (12), по-видимому, через промежуточные *N*-фенилтиокарбамоиламинокислоты (11).

Значение метода Эдмана последовательной деградации пептидов и белков существенно возросло с развитием приборов [18], позволяющих автоматически проводить различные стадии обра-

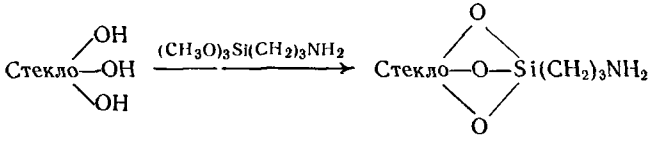


(14)

ботки (добавление фенилизотиоцианата, реакция с пептидом и белком, экстракция избытка реагента и так далее) в циклическом исполнении. Разумеется, число циклов деградации белка, еще дающих достоверные результаты, зависит от выхода на каждой стадии. Однако идентификация 40 остатков уже оправдывает цель. Белок распыляют (с помощью центробежных сил) в виде тонкой пленки на внутренней поверхности стенки вращающегося сосуда. Это обеспечивает большую поверхность для реакции или экстракции растворителем. Все жидкости хранятся в резервуарах и передавливаются на дно вращающегося сосуда азотом под давлением. Получающиеся после каждой стадии деградации 2-анилинотиазолиноны-5 собираются отдельно с помощью коллектора фракций для дальнейшей идентификации. Для такого рода анализа достаточно 1—2 мг белка или пептида в виде стабильной пленки во вращающемся сосуде. Метод уже описан в деталях [19].

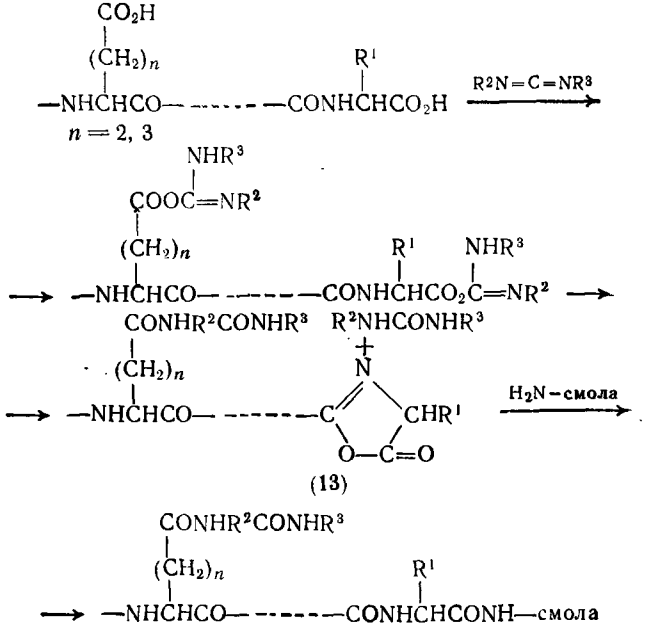
Разработка твердофазного метода синтеза пептидов (см. гл. 23.6) привела к усовершенствованию некоторых стадий в процессе последовательной деградации. Так, стало чрезвычайно просто отделять 2-анилинотиазолиноны-5 от остального пептида или белка. После разработки автоматического секвинатора с использованием твердой фазы [20] появились промышленные приборы [21] и была проделана большая работа по подбору различных твердых носителей для развития метода химического связывания с ними пептидов, последовательность которых анализируется. В ранних работах в качестве носителя использовали полиаминостирол, однако он не набухает в водной среде, и поэтому связывание анализируемого пептида необходимо было проводить в присутствии

органического растворителя, в котором плохо растворим уже пептид. Кроме того, связывание больших пептидов или белков с носителем часто протекает с весьма малым выходом. Другим инертным носителем является пористое стекло, которое необходимо обработать 3-аминопропилтриалкоксисиланом {схема (15)}. Связи Si—O сравнительно кислотолабильны, поэтому потери пептидов на каждой стадии деградации значительны. Смолы на основе полидиметилакриламида с β-аланильными заместителями, которые были разработаны для твердофазного синтеза пептидов, по-видимому, обладают некоторыми преимуществами по сравнению с носителями, упомянутыми выше [22]. Посадка пептида на полимер и его последующая деградация проходят с высокими выходами.



(15)

Все перечисленные выше твердые носители содержат свободные аминогруппы, за которые и прикрепляются пептиды или белки для анализа последовательности. Используются три основных метода связывания. В первом пептид обрабатывают *N*-(3-диметиламино)-*N'*-этоксипропилкарбодиимидом в отсутствие нуклеофилов. Карбоксильные группы пептида сначала образуют *O*-ацилизомочевины; аналогичные производные, расположенные в боковых радикалах аспарагиновой и глутаминовой кислот, легко перегруппи-



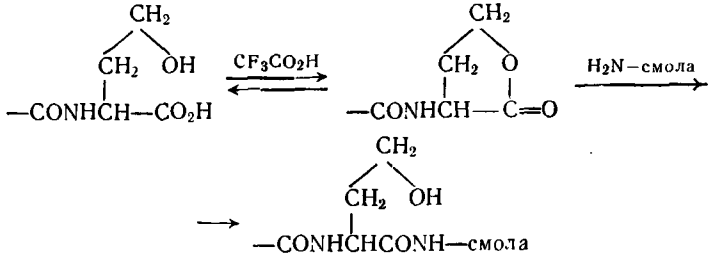
(16)



ровываются в стабильные *N*-ацилмочевины. Однако *O*-ацилизомочевины *C*-концевых остатков преимущественно претерпевают циклизацию, давая оксазолиноны-5 (13). Последние представляют собой единственную группировку, которая может быть нуклеофильно атакована аминогруппами, содержащимися в смоле {схема (16)}.

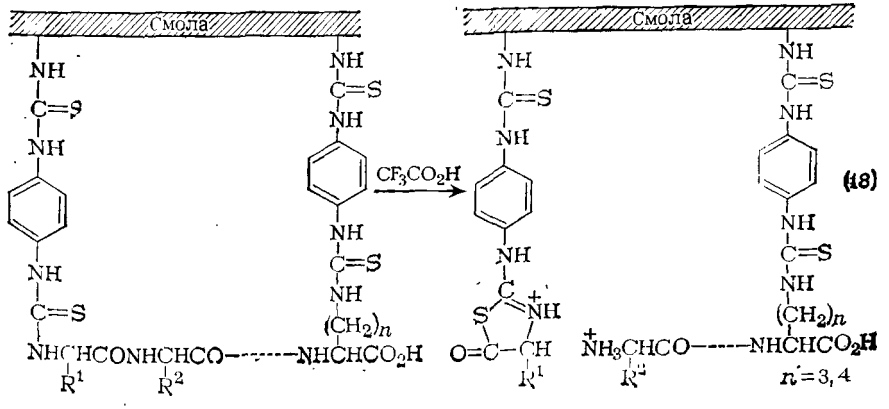
Помимо непостоянных выходов, остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот также дают производные при последовательной деградации по Эдману.

Согласно второму методу, после расщепления белка с помощью бромциана (см. разд. 23.3.5) все пептиды, за исключением *C*-концевого, оканчиваются остатками гомосерина или его лактона. Полнота лактонизации может быть достигнута обработкой трифторуксусной кислотой; далее пептиды ковалентно присоединяют к смоле, содержащей аминогруппы {схема (17)}.



(17)

Наконец, в наиболее распространенном методе, в особенности для пептидов, которые получаются после гидролиза, катализируемого трипсином, в качестве конденсирующего агента используют *n*-фенилендиизотиоцианат. ε-Аминогруппы лизина или *S*-(2-аминоэтил)цистеин, а также α-аминогруппа *N*-концевого остатка реагируют с одной изотиоцианатной группой *n*-фенилендиизотиоцианата, если к пептиду добавляют 50—100 кратный избыток реагента. Процесс заканчивается добавлением смолы, содержащей аминогруппу {схема (18)}.



(18)

Некоторые пептиды из трипсиновых гидролизатов содержат больше аргининовых, чем лизиновых концевых групп; обработка 50 %-ным гидразином при 75 °С в течение 15 мин приводит к удалению гуанидиновой группы и превращению в орнитин. После этого присоединение к смоле с помощью фенилендиизотиоцианата протекает так же, как и для пептидов, содержащих лизин. Поскольку α-аминогруппы подвергаются тиокарбамоилированию, первую обработку фенилизотиоцианатом опускают. Обработка кислотой вызывает первый разрыв, однако 2-анилинотиазолинон-5, соответствующий первому остатку, остается присоединенным к смоле. Таким образом, *N*-концевой остаток необходимо идентифицировать каким-либо другим методом, например, с помощью методики Эдмана. Никакие тиогидантоиновые производные лизина не могут быть определены этим методом. Если этот метод используют для пептидов из трипсиновых гидролизатов, где лизин или орнитин являются *C*-концевыми, то никаких пробелов в определении последовательности после *N*-концевого остатка не происходит. Пептиды, образующиеся из белков в результате разрывов другого типа, могут содержать некоторое количество лизиновых остатков в цепи, а не на *C*-концах. Присоединение к смоле включает все или большинство остатков лизина, и в итоге при определении последовательности по Эдману могут возникнуть трудности. Когда последовательная деградация доходит до последнего остатка лизина, весь оставшийся пептид отделяется от смолы и теряется.

Независимо от того, какая модификация метода Эдмана используется, после каждого цикла необходимо собирать производные 2-анилинотиазолона-5 *N*-концевых аминокислот и превращать их в 2-тио-3-фенилгидантоины (**12**) нагреванием с трифторуксусной кислотой. Известно несколько методов [23] идентификации 2-тиогидантоинов. До того, как были разработаны удобные способы отделения 2-тиогидантоинов, широко использовали их гидролиз до аминокислот, так как для идентификации и количественного определения можно использовать аминокислотный анализатор. При гидролизе, однако, неизбежно разрушаются некоторые гидантоины (например, гидантоиновые производные серина и треонина), и в настоящее время предпочитают методы прямого их определения.

Почти все 2-тио-3-фенилгидантоины можно разделить, используя двумерную тонкослойную хроматографию на силикагеле. Используют две системы растворителей: хлороформ — этанол (98 : 2, по объему) и хлороформ — этанол — метанол (88,2 : 1,8 : 10, по объему). Если силикагель содержит флуорофор, можно наблюдать зоны в УФ-свете (254 нм). Альтернативно, пластинки можно опрыскать раствором нингидрина или раствором иод-азида. Тонкослойная хроматография — дешевый метод, однако ему присущи два недостатка: малая чувствительность и невозможность количественной оценки. Эти недостатки устраняются использованием для ступенчатой деградации фенил[$^{35}$S]изотиоцианата. В этом случае обнаружение проводят либо авторадиографически, либо одним из вышеуказанных методов после добавления достаточного количества соответствующих немеченых 2-тиогидантоинов. Вещества выделяют из обнаруженных зон и анализируют на сцинтилляционном счетчике.

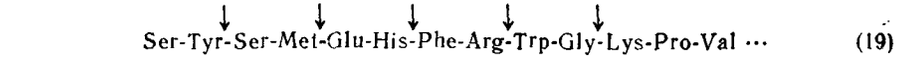
Газо-жидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектором и интегратором позволяет проводить анализ количественно и с высокой точностью. Можно разделять как свободные 2-тио-3-фенилгидантоины, так и их силилированные производные. К сожалению, с помощью этой техники нельзя идентифицировать производные аргинина и цистеиновой кислоты. Если в деградации по Эдману вместо фенилизотиоцианата использовать метилизотиоцианат, то получающиеся 3-метил-2-тиогидантоины, а также их силированные производные можно еще легче разделить с помощью ГЖХ.

Быстрое развитие жидкостной хроматографии высокого разрешения (ЖХВР) при биохимических анализах привело к значительным успехам и в применении к разделению 2-тио-3-фенилгидантоинов. Значительные расходы на оборудование компенсируются удобством непрерывного и количественного детектирования с помощью поглощения в УФ-области. Полное разделение на одной колонке, однако, весьма затруднительно, так как большинство тиогидантоинов необходимо делить в условиях ЖХВР на колонке с силикагелем в градиенте от смеси гептан-хлороформ (1 : 1, по объему) к метанолу, тогда как производные кислых аминокислот в этих условиях трудно элюировать. Одним из решений является применение второй колонки, содержащей гидрофобный адсорбент для обращенно-фазовой ЖХВР.

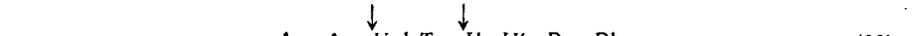
Короткие последовательности с *N*-конца белков часто идентифицируют, используя ферментативную деградацию. Промышленность производит несколько аминопептидаз, отличающихся специфичностью. Лейцинаминопептидаза из почек свиньи, как следует из ее названия, гидролизует преимущественно лейцин и сходные аминокислоты с гидрофобными боковыми группами. Несмотря на то, что скорости расщепления *N*-концевых аминокислот лежат в широких пределах, гидролиз желательно продолжать до конца, за исключением аминокислоты, предшествующей пролину. Вследствие столь широкого изменения скоростей расщепления следует соблюдать осторожность при интерпретации результатов анализа деградации, катализируемой этим ферментом. Чрезвычайно важно отбирать пробы для анализа в течение деградации. Например, при анализе белка с *N*-концевой последовательностью Ala-Leu-Leu ... на ранних стадиях деградации выход аланина превышает выход лизина, однако при большом времени гидролиза соотношение меняется на обратное [24]. Другой фермент, выделенный из почек свиньи, аминопептидаза М, гораздо менее специфичен и, по-видимому, более пригоден для расщепления белков.

Дипептидиламинопептидаза, или катепсин С, обладает редкой специфичностью — отщепляет дипептидные фрагменты с *N*-конца

белка. Гидролиз продолжается до тех пор, пока *N*-концевыми не окажутся Lys или Arg, либо Pro в положении 2 или 3 пептидной цепи. Таким образом из β-кортикотропина возникает пять дипептидов {схема (19)}, а из ангиотензина II — два дипептида {схема (20)}.

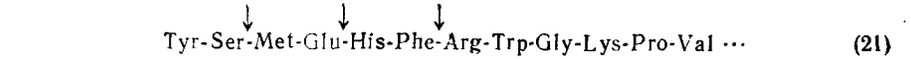



(19)




(20)

Получающиеся дипептиды можно разделить с помощью ионообменной хроматографии подобно тому, как это делают при аминокислотном анализе, однако при поточном расщеплении необходимо собирать фракции для дальнейшего анализа. Другой набор дипептидов можно получить, если перед обработкой дипептидиламинопептидазой провести удаление *N*-концевого остатка по методу Эдмана (один цикл). Так, если удалить *N*-концевой Ser в β-кортикотропине, то должны образоваться другие дипептиды {схема (21)}.




(21)

Достаточно выделить Ser-Tyr, Ser-Met, Glu-His и Phe-Arg после первой деградации и Tyr-Ser, Met-Glu и His-Phe после второй, чтобы дать полную последовательность первых восьми остатков. В случае устойчивой к гидролизу связи необходимо отщепить один или два остатка по методу Эдмана с тем, чтобы получить продукт, необходимый для последующего ферментативного гидролиза.

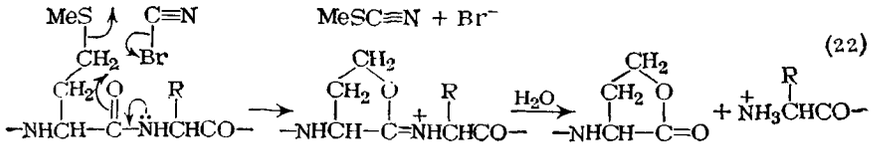
### 23.3.4.2. Определение *C*-концевых групп

Определение *C*-концевых остатков в пептидах и белках разработано менее удовлетворительно, нежели определение *N*-концевых. Предлагались многочисленные химические методы, но ни один из них не выдержал проверку временем. К счастью, с помощью двух панкреатических ферментов — карбоксипептидазы А и карбоксипептидазы В — можно получить некоторую информацию о *C*-концевой последовательности. Карбоксипептидаза А преимущественно отщепляет аминокислоты с ароматическими боковыми группами, а большинство остальных аминокислот отщепляет гораздо медленнее. *C*-концевой Pro устойчив. Этот фермент хорош при идентификации *C*-концевых последовательностей у пептидов, образующихся в результате расщепления с помощью α-химотрипсина (см. разд. 23.3.6), так как такие пептиды на *C*-конце имеют ароматические аминокислоты. При обработке пептида или белка карбоксипептидазой А возникают те же трудности, что и при использовании аминопептидаз для анализа *N*-концевых последовательностей (см. разд. 23.3.4.1). Карбоксипептидаза В гораздо более специфична, нежели карбоксипептидаза А, и отрывает только остатки Lys или Arg. Такие остатки находятся на *C*-конце пептидов, получающихся в результате гидролиза белка с помощью трипсина. Для достижения более интенсивной деградации эти ферменты необходимо использовать поочередно или в сочетании друг с другом. Про остальные карбоксипептидазы известно, что они менее специфичны, одну из них — карбоксипептидазу Y из дрожжей недавно стали применять для определения *C*-концевой последовательности.



### 23.3.5. СЕЛЕКТИВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

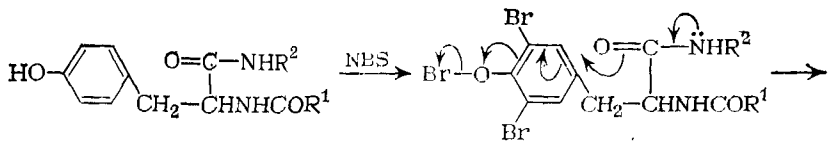
Хотя описан ряд методов селективного расщепления определенных пептидных связей белковой цепи на такие фрагменты, которые можно анализировать по методу Эдмана, широкое использование нашли всего несколько из них. Наиболее популярным методом является использование бромциана для расщепления пептидных связей по остаткам метионина {схема (22)}. Остаток метионина превращается в гомосерин и его лактон, которые становятся *C*-концевыми остатками всех фрагментов, за исключением *C*-концевого фрагмента исходного белка. Так как Met встречается относительно редко, фрагменты, получающиеся после подобного расщепления, довольно крупны, но с помощью современных вариантов анализа по Эдману можно проводить анализ их последовательности. Более того, лактон гомосерина на *C*-конце является подходящим участком для ковалентного связывания таких фрагментов с нерастворимым носителем при твердофазном секвентном анализе {см. схему (17)}.



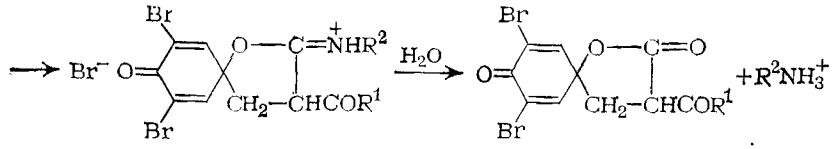

(22)

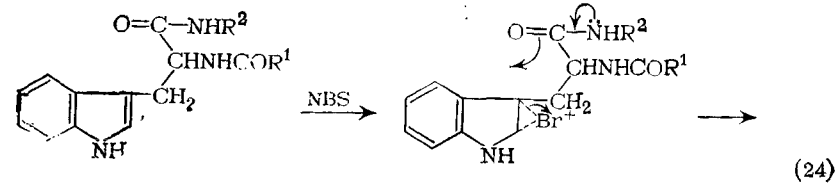
Пептидные связи, образованные триптофаном, разрываются *N*-бромсукцинимидом; несколько хуже аналогичная реакция протекает по остаткам тирозина. В обоих случаях бромирование сопровождается нуклеофильной атакой карбонильного кислорода с образованием спиролактона и бромид-иона {схемы (23) и (24)}.

Разработаны химические методы специфического расщепления пептидных связей и по остаткам других аминокислот, однако они не нашли столь широкого применения. В настоящее время, когда по методу Эдмана можно анализировать крупные белковые фрагменты, наиболее целесообразными представляются методы расщепления по относительно редко встречающимся аминокислотным остаткам, таким как Trp и Met.

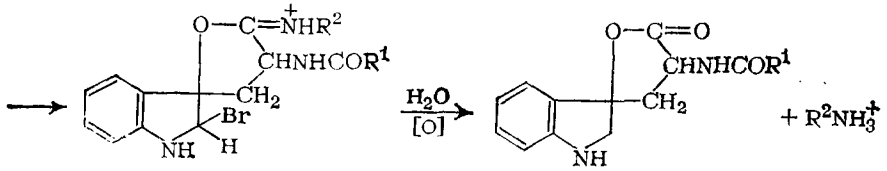


(23)



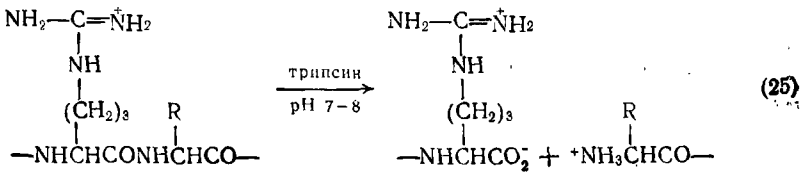


(24)



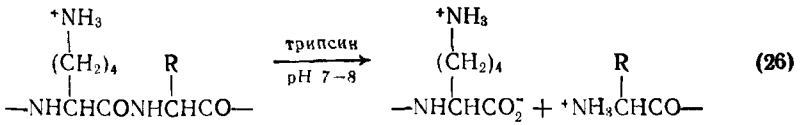
### 23.3.6. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Об использовании экзопептидаз, таких как аминопептидаза и карбоксипептидаза, для определения аминокислотной последовательности вблизи *N*- и *C*-концов белков говорилось в разд. 23.3.4. Эндопептидазы являются протеолитическими ферментами, которые избирательно расщепляют пептидные связи в точках, удаленных от концов белковой молекулы. Эндопептидазы сильно различаются по своей специфичности. Обычно сами аминокислотные остатки с любой стороны расщепляющейся пептидной связи являются наиболее важными детерминантами специфичности протеолитических ферментов. Так, трипсин разрывает пептидные связи, в образовании которых участвует карбонильная группа остатков Arg или Lys {схемы (25), (26)}.



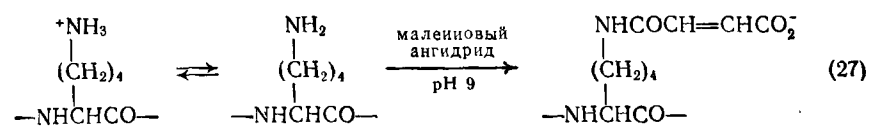
(25)





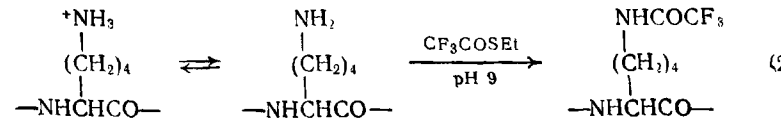
(26)

Тиализильная пептидная связь, получающаяся в результате восстановления дисульфидных связей и *S*-аминоэтилирования образовавшегося остатка цистеина, также расщепляется трипсином (см. разд. 23.3.3), так как ее боковая группа является изостерической боковой группе Lys. Природа R имеет второстепенное значение, хотя связи Arg-Pro и Lys-Pro не разрываются. Известны и многие другие протеиназы, которые по своей специфичности напоминают трипсин. Например, известно, что тромбин разрывает участки Arg-Gly и Arg-Ser в фибриногене — одном из своих природных субстратов, однако для эффективного катализа необходима еще и связь фермента со вторым участком молекулы субстрата. Поэтому тромбин находит лишь ограниченное применение при расщеплении пептидных связей с целью изучения последовательности, хотя в случае секретина он разрывает связь Arg-Asp, в то время как три связи Arg-Leu остаются незатронутыми. Действие трипсина можно ограничить так, чтобы он разрывал либо по остаткам аргинина, либо по остаткам лизина. Модификация белка малеиновым ангидридом приводит к защищенным ε-аминогруппам лизиновых остатков {схема (27)}.



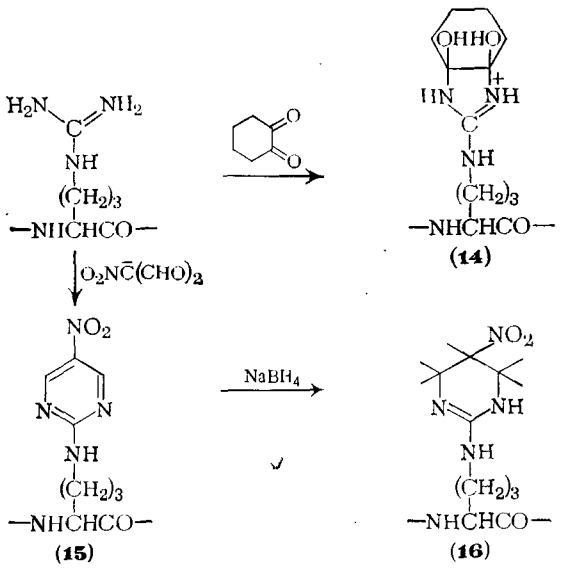
(27)

Такая модификация ограничивает действие трипсина расщеплением по остаткам аргинина, что приводит к бо́льшим фрагментам, чем те, которые образуются после действия фермента на немодифицированный белок. Малеильную группировку можно удалить при pH 2—3 при комнатной температуре для того, чтобы выделенные в результате первого расщепления фрагменты можно было гидролизовать на более мелкие с помощью того же фермента. Такая процедура помогает при определении порядка связи пептидов в исходном белке. Альтернативно, ε-аминогруппу лизиновых остатков можно модифицировать *S*-этилтрифторацетатом, что приводит к *N*-трифторацетильным производным {схема (28)}. После расщепления по остаткам аргинина *N*-трифторацетильную группу можно удалить обработкой водным пиперидином при 0 °C.



(28)

С другой стороны, боковые группы аргинина можно защитить с помощью различных 1,2- или 1,3-дикарбонильных соединений, например действием циклогександиона-1,2 или карбаниона нитромалондиальдегида {схема (29)}. Производные (**14**) и (**15**) не гидролизуются трипсином. Защитную группу в производном (**14**) удаляют обработкой гидроксиламином при pH 7,0 в течение 7—8 ч при 37 °C. Восстановление производного (**15**) борогидридом натрия приводит к (**16**), которое гидролизуется трипсином, несмотря на заместитель в боковой группе.




(29)

После того как установлена первичная структура какого-либо белка, обычно нет необходимости проводить полное изучение аминокислотной последовательности у гомологичных белков из близких (соответствующих) источников. Быстрый ответ можно получить, используя технику трипсинового «фингерпринта». Для этого подвергают гидролизу трипсином белок с известной структурой и параллельно ему гомологичный белок; полученные в результате гидролиза пептиды разделяют обычно с помощью двумерного электрофореза или хроматографии. Если разница в последовательностях невелика, то большинство пептидов должны занимать идентичное положение на двумерном фингерпринте. Те немногие пептиды, которые отличаются по подвижности, необходимо элюировать и подвергнуть аминокислотному анализу по Эдману. Эта техника особенно полезна при изучении аномальных гемоглобинов, которые отличаются от нормального природой только одного участка.

α-Химотрипсин также широко применяют для исследования аминокислотной последовательности в белках. Его субстратная



специфичность отличается от таковой для трипсина и менее ограничена. Пептидные связи, включающие карбонильные группы Trp, Tyr и Phe, разрываются быстро, в то время как пептидные связи с карбонильными группами от меньших гидрофобных аминокислот (Leu, Ile, Met, Val) разрываются более медленно. Иногда встречаются непредсказуемые расщепления, например гидролиз $Asn^{148}$-$Ala^{149}$ при автокаталитической активации химотрипсиногена α-химотрипсином. В особенности важен α-химотрипсин для получения других фрагментов, чем те, которые получаются в результате расщепления под действием трипсина или бромциана, с тем, чтобы получить перекрывающиеся последовательности.

Микробные протеиназы сильно различаются по специфичности: одни приводят к пептидам, которые можно анализировать по Эдману, тогда как другие, обладающие низкой специфичностью, пригодны для получения коротких пептидов при определении положения дисульфидных связей (см. разд. 23.3.8) или места ковалентной связи с коферментом или углеводом. Протеиназы из *Myxobacter AL-1* (протеиназа II) или *Armillaria mellea* разрывают пептидные связи, содержащие группы —NH— лизильных остатков [25, 26]. Их использование — возможный путь для определения перекрывающихся последовательностей, когда основным инструментом при получении фрагментов для анализа последовательности является трипсин. Другая протеиназа из *Staphylococcus aureus* расщепляет пептидные связи, содержащие карбонильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот [27]. Ни один из этих ферментов не нашел широкого применения при изучении последовательности в белках в основном из-за того, что они не производятся промышленностью. Термолизин, который является термостабильной протеиназой из *B. thermoproteolyticum*, производится и поэтому широко используется. Он представляет собой эндопептидазу со специфичностью, близкой к карбоксипептидазе А — расщепляются пептидные связи, содержащие группы —NH— аминокислот с ароматическими или гидрофобными алифатическими боковыми группами. Поскольку этот фермент является эндопептидазой, то он не гидролизует концевые и близкие к концу полипептидной цепи остатки. Этот фермент хорош, когда необходимо идентифицировать перекрывающиеся фрагменты после того, как с помощью химотрипсина получены главные фрагменты для анализа последовательности.

Другие протеиназы — пепсин, папаин и некоторые ферменты микробов, обладают низкой специфичностью и, как правило, дают слишком много фрагментов, чтобы их можно было использовать при анализе последовательности аминокислот. Однако как отмечалось выше, эти ферменты хороши для получения малых пептидов, содержащих характерные особенности, например дисульфидную связь.

### 23.3.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

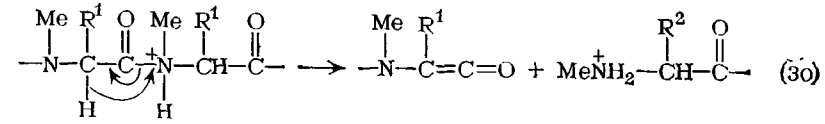
Пептиды недостаточно летучи, чтобы их можно было изучать непосредственно с помощью масс-спектрометрии электронного удара. Первые попытки применения масс-спектрометрии для определения последовательности включали предварительное ацилирование аминогрупп и этерификацию карбоксильных групп. Масс-спектры таких производных показали, что расщепление происходит с обеих сторон карбонильных групп. Расщепление связи C—N приводит к ионам ацилия $—NHCHRC{\equiv}O^+$, в то время как расщепление связи C—C дает альдиминиевые ионы $—^+NH{=}CHR$. Это основная тенденция; кроме того, происходит дополнительная фрагментация боковых групп некоторых аминокислот, включая валин, лейцин, аспарагин, серин, треонин и цистеин.

Ситуация существенно изменилась после того, как стали метилировать *N*-ацетилированные пептиды. Такая обработка не только увеличивает летучесть образцов, но и значительно упрощает масс-спектр, так как в нем обычно преобладают ионы ацилия. Из нескольких методов полного метилирования, как правило, выбирают смесь метилиодида, гидрида натрия и диметилсульфоксида [28, 29]. При малом времени реакции (1—3 мин) и небольшом избытке метилиодида достигается метилирование амидного азота как в пептидной цепи, так и в боковых группах аспарагиновых и глутаминовых остатков, при минимальном образовании ониевых производных атомов азота (кватернизация) и серы в боковых группах гистидина, аргинина, метионина и цистеина. Образование ониевых производных понижает летучесть.

Очевидным продолжением вышеописанной техники является комбинация газо-жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии для того, чтобы разделять и идентифицировать короткие пептиды, получаемые после гидролиза протеиназами. Например, дипептиды, получаемые гидролизом с помощью дипептидиламинопептидазы (см. разд. 23.3.4), можно модифицировать, разделить с помощью ГЖХ и идентифицировать масс-спектрометрически. Аналогично можно обработать альтернативный набор дипептидов, получаемых после предварительной деградации по Эдману (один цикл).

Возможно идентифицировать и смеси коротких пептидов, получаемых после обработки белков ферментами, частичного разделения с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Сопоставление масс-спектров, полученных при различных температурах источника, а также использование полного метилирования и дейтерометилирования, обычно позволяют правильно идентифицировать пики исходных пептидов.

Широкое использование масс-спектрометрии для определения последовательности в протеинах имеет большое будущее. Использование ионизации полем и десорбции полем приводит к чрезвычайно простым спектрам с высокой интенсивностью молекулярного иона. Так как для масс-спектрометрии десорбции полем нет необходимости испарять образец, молекулярную массу пептидов можно определять без предварительного ацилирования и полного метилирования. Много удобств привносит и химическая ионизация. Наряду с ацилиевыми ионами фрагментация образца приводит и к ионам из *C*-концевой области {схема (30)}. Это дает информацию о *C*-концевой области пептида, которая комплиментарна информации, получаемой при использовании методики электронного удара. Наконец, масс-спектрометр можно снабдить счетнорешающим устройством. Существуют программы, с помощью которых можно найти ряд фрагментов, $m/e$ которых точно соответствуют *N*-концевой аминокислоте или ее *N*-ацильному заместителю. Можно и дальше продолжить разработку аналогичных программ для фрагментов с $m/e$, соответствующим сумме двух аминокислотных остатков в виде *N*-ацилированного дипептида и так далее. Большинство снабженных вычислительными машинами масс-спектрометров являются приборами высокого разрешения, и следовательно, такое оборудование чрезвычайно дорого.



(30)

В заключение отметим, что несмотря на чрезвычайную перспективность масс-спектрометрии [30], метод деградации по Эдману применяется гораздо шире, главным образом благодаря большой информации, которую можно получить с его помощью. Однако масс-спектрометрия может создать здесь серьезную конкуренцию, если в будущем будет сведена на нет утомительная процедура выделения чистых пептидов.

### 23.3.8. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Хотя дисульфидные связи частично обусловливают вторичную и третичную структуры белков, определение их локализации является частью изучения первичной структуры.

При определении первичной структуры инсулина Сэнджер с сотр. столкнулись со значительными трудностями из-за склонности дисульфидов претерпевать обменные реакции как в кислой, так и в щелочной среде. В сильнокислой среде, используемой для частичного гидролиза, могут протекать реакции по схемам (31), (32).

$$RSSR + H^+ \rightleftarrows RS^+ + RSH \quad (31)$$

$$R^1S^+ + R^2SSR^2 \rightleftarrows R^1SSR^2 + R^2S^+ \quad (32)$$

$$R^2SSR^2 + R^1S^- \rightleftarrows R^1SSR^2 + R^2S^- \quad (33)$$

$$R^1SSR^2 + R^1S^- \rightleftarrows R^1SSR^1 + R^2S^- \quad (34)$$

В слабощелочных средах, которые используются при гидролизе белка трипсином, следы тиолат-иона катализируют протекание реакций (33) и (34). Такого типа обменные реакции могут протекать, когда гидролизуемый белок содержит одновременно цистеин и цистин. Если протеиназа, катализирующая гидролиз, сама не содержит тиольную группу, то тиольные группы субстрата можно защитить в процессе гидролиза добавлением подходящего реагента, например *N*-этилмалеимида.

Для определения локализации дисульфидных связей белок подвергают частичному гидролизу на относительно малые фрагменты с помощью протеиназы низкой специфичности, такой как пепсин, в условиях, при которых протекает минимум обменных реакций. Пептиды разделяют и определяют их аминокислотный состав для того, чтобы убедиться в том, что они гомогенны и содержат одну дисульфидную связь. Дисульфидная связь в каждом пептиде разрывается (см. разд. 23.3.3) и образуются два фрагмента. Если первичная структура белка известна, то достаточно аминокислотного анализа и частичного определения *N*-концевой последовательности в двух фрагментах для того, чтобы определить ту часть цепи(ей), из которой образовался каждый фрагмент.

Обе стадии разделения и расщепление дисульфидной связи можно изящно провести на бумажной электрофореграмме. Смесь пептидов после частичного гидролиза разделяют, затем вначале бумажную электрофореграмму выдерживают в парах пероксимуравьиной кислоты и далее проводят электрофорез в тех же условиях, но под прямым углом к первоначальному направлению. Пептиды, не содержащие дисульфидные связи, оказываются на диагонали, тогда как пептиды, содержащие дисульфидную связь, превращаются в более кислые пептиды в результате образования в каждом из них сульфогруппы. Следовательно, они должны быть вне диагонали, в идеале в виде двух дискретных зон, представляющих собой фрагменты, образованные в результате окисления пероксимуравьиной кислотой. Их можно элюировать с бумаги и идентифицировать, как описано выше.

### 23.3.9. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКОВ

Информационные рибонуклеиновые кислоты (иРНК) при биосинтезе белков кодируют 20 различных аминокислот. Однако некоторые аминокислоты, такие как Trp, Met и His, встречаются гораздо реже остальных. Это объясняют тем, что в генетическом коде имеется только один кодон для Trp и шесть для Ser. Говорят, что кодирование Ser вырождено. Подобно тому, как языки имеют различное письмо и алфавиты, белки можно рассматривать как биологические послания, записанные с помощью алфавита, состоящего из 20 аминокислот. Эта аналогия может быть продолжена несколько дальше; языки письма, за исключением низкоразвитых языков вычислительных машин, содержат чрезмерное количество слов. Это создает преимущество, так как коммуникационный канал подвержен шумовым воздействиям и присутствующий в сообщении избыточный материал увеличивает шансы того, что наиболее важная часть сообщения сохранится. Если бы каждая аминокислота в белке была бы необходима для проявления биологической активности, то единичная генетическая мутация, которую можно рассматривать как биологический шум, оказалась бы летальной и дальнейшая эволюция была бы невозможна. Сегодня мы знаем, что многие белки содержат избыточные аминокислоты. Например, несмотря на то что в β-кортикотропине 39 аминокислотных остатков, синтетический эйкозапептид, представляющий *N*-концевую область этого гормона, обладает полной биологической активностью. Следует заметить, что изменения в первичной структуре β-кортикотропинов из различных источников наблюдаются в области *C*-конца молекулы. Мы знаем также, что вторичная и третичная структуры белков во многом определяются последовательностью аминокислотных остатков. Например, если восстановить четыре дисульфидные связи панкреатической рибонуклеазы быка, то продукт оказывается неактивным, несмотря на то что конформация его довольно близка к конформации исходного фермента. После окисления воздухом большая часть активности возвращается. Если бы восстановленный фермент имел существенно иную конформацию, то, разумеется, можно было бы говорить о закрепляющей роли дисульфидных связей. Таким образом, некоторые из содержащихся в белках аминокислотных остатков весьма важны для биологической активности, другие же являются избыточными, и, возможно, большинство из них определяет общую конформацию белка и пространственное взаимодействие существенных остатков. Следовательно, при мутациях, которые не приводят к большим изменениям в химической природе и размере, замещение аминокислоты может лишь незначительно повлиять на биологическую активность рассматриваемой молекулы белка. Такой консерватизм замещений обусловлен генетическим кодом. Так, все триплеты UCU, UCC, UCA и UCG кодируют Ser, тогда как ACU, ACC, ACA и ACG кодируют Thr. Таким образом, изменение основания в первом члене триады приводит лишь к замене одной β-гидроксиаминокислоты на другую. Третье основание в этих триадах не влияет на аминокислоту, которая входит в белок. Однако не все мутации консервативны и безвредны. Замена Glu на Val в шестом положении β-цепи гемоглобина вызывает молекулярную болезнь — серповидную анемию. Аномальный гемоглобин в дезоксигенированном состоянии образует нерастворимые полимеры с последующим гемолизом. Мутации белков происходят с определенной скоростью, которая зависит от природы белка. Фибриноген эволюционирует довольно быстро, тогда как цитохром *c* — гораздо медленнее. Несмотря на это, число различных аминокислот в гомологичных протеинах из различных видов лежит в основе метода изучения изменения видов и тем самым построения фило-

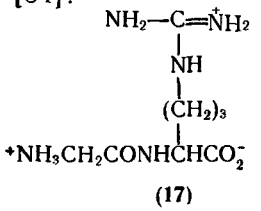
генетического дерева. Цитохромы *c* человека и обезьяны Резус различаются только одним аминокислотным остатком, в то время как белки человека и мотылька (*Samia cynthia*) различаются 31 остатком.

Биологическая эволюция заключается не только в замещении аминокислотных остатков в соответствующих молекулах из различных видов. Очевидно, что дублированный ген существовал в различные периоды, приводя к эволюции гомологичных белков из одного и того же гена наследственности. Так, примерно 40% аминокислотной последовательности трипсина и химотрипсина идентичны и примерно еще 10% представляет собой небольшие замещения. Поэтому неудивительно, что обе молекулы имеют сходные конформации и биологические функции.

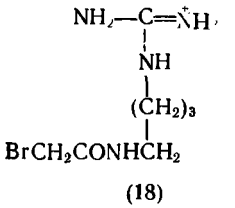
С другой стороны, известны молекулы белков, которые резко отличаются друг от друга первичной, вторичной и третичной структурами, но несмотря на это, обладают сходной биологической активностью. Классическим примером могут служить химотрипсин и бактериальная протеиназа субтилизин. Несмотря на существенные различия в структурах, основные аминокислоты активных центров этих ферментов идентичны и осуществляют свои каталитические функции по сходному механизму. По-видимому, такие белки являются результатом пересечения путей эволюции.

### 23.3.10. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ БЕЛКОВ

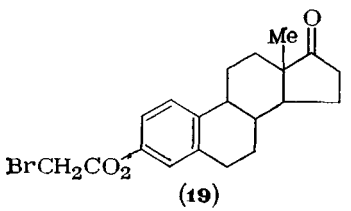
Существует несколько методов, с помощью которых можно обнаружить аминокислотные остатки, ответственные за биологическую активность белков. В первом методе белок необходимо подвергнуть частичной деградации, в особенности вблизи *N*- и *C*-концов соответственно с помощью аминопептидаз и карбоксипептидаз. Например, удаление (с помощью карбоксипептидазы) трех остатков с *C*-конца рибонуклеазы не влияет на ее активность. Более глубокая деградация в этой части молекулы, однако, приводит к инактивации. По второму методу необходимо подвергнуть химической модификации боковые группы аминокислотных остатков белка. Естественно, что результаты такого рода экспериментов проще интерпретировать в том случае, когда эта модификация специфична. Например, легко идентифицировать область связывания кофермента пиридоксальфосфата в аминотрансферазе. Альдимин, образующийся в результате конденсации кофермента с ε-аминогруппой остатка лизина, восстанавливают борогидридом натрия и идентифицируют, так как он не затрагивается при гидролитическом распаде. Аналогично, ферменты, содержащие тиольные группы, такие как алкогольдегидрогеназа, 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназа и папаин, обычно ингибируют реакцией с *n*-хлормеркурибензойной или иодуксусной кислотой. Специфичность модификации белков можно усилить, если структура реагента имитирует структуру молекулы (субстрат, кофермент, аллостерический реагент), которая обычно присоединяется к белку. Эту методику часто называют аффинной меткой [31]. Для ее иллюстрации достаточно двух примеров. Глицил-*L*-аргинин (**17**) является конкурентным ингибитором и плохим субстратом для карбоксипептидазы B и, таким образом, связывается с активным центром этого фермента. α-*N*-(Бромацетил)агматин (**18**) необратимо ингибирует фермент и алкилирует фенольную гидроксильную группу Tyr [32, 248]. Второй пример относится к ферменту эстрадиол-17β-дегидрогеназе. 3-Бромацетоксиэстрон (**19**) реагирует с ферментом из плаценты человека, образуя ковалентную связь. Полученный комплекс можно обратимо восстанавливать и окислять — так называемый «закрепленный субстрат» [33]. С другой стороны, 3-метиловый эфир 16α-бромацетоксиэстрадиола (**20**) необратимо ингибирует этот фермент, алкилируя имидазольное ядро остатка гистидина [34].



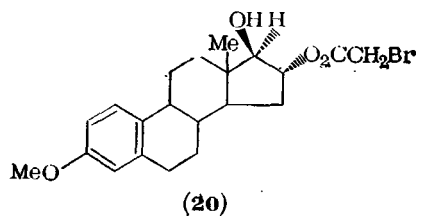
(17)



(18)



(19)



(20)

По третьему способу, состоящему в химическом синтезе (см. гл. 23.6) аналогов, в особенности пептидных гормонов, также можно получить большую информацию относительно связи между структурой и биологической активностью. Гастрин — амид гептадекапептида из слизистой желудка — на *C*-конце имеет последовательность (**21**). После синтеза амида этого пептида было обнаружено, что он обладает полной активностью нативного гормона. Нет необходимости ограничивать синтез, исходя лишь из 20 аминокислот, встречающихся обычно в белках. Синтезирован активный фрагмент β-кортикотропина, у которого вместо $Met^4$ был остаток α-аминомасляной кислоты, однако окисление $Met^4$ до сульфоксида в нативном гормоне приводит к потере активности. Можно предположить, что в данном случае полярность боковой группы играет более важную роль, чем ее химическая структура.

Наконец, много полезного можно извлечь при сравнении последовательностей гомологических белков. Кроме цитированного выше

(см. разд. 23.3.9) β-кортикотропина известно много других случаев. Например, последовательности вблизи весьма важных остатков серина и гистидина в трипсине, химотрипсине, эластине, тромбине и плазмине в высшей степени консервативны. В добавление к сказанному, последовательность (22) (остатки 70—80) присутствует в цитохромах *c* из многочисленных источников. Сохранность такого рода последовательностей является веским доводом в пользу того, что они представляют собой существенные части белковой структуры.

Gly-Trp-Met-Asp-Phe-$NH_2$ **(21)**

Asn-Pro-Lys-Lys-Tyr-Ile-Pro-Gly-Thr-Lys-Met **(22)**

## ЛИТЕРАТУРА


1. *G. K. Ackers*, in «The Proteins», 3rd edn., ed. H. Neurath, R. L. Hill, and C.-L. Boeder, Academic Press, New York, 1975, vol. 1, chapter 1.
2. *K. Weber and M. Osborn*, in «The Proteins», 3rd edn., ed. H. Neurath, R. L. Hill, and C.-L. Boeder, Academic Press, New York, 1975, vol. 1, chapter 3.
3. *K. E. van Holde*, in «The Proteins», 3rd edn., ed. H. Neurath, R. L. Hill, and C.-L., Boeder, Academic Press, New York, 1975, vol. 1, chapter 4.
4. *G. Barth, E. Bunnenberg, and C. Djerassi*, Analyt. Biochem., 1972, **48**, 471.
5. *D. M. Kirschenbaum*, Analyt. Biochem., 1971, **44**, 159.
6. *H. Edelhoch*, Biochemistry, 1967, **6**, 1948.
7. *T. Y. Liu and Y. H. Chang*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 2842.
8. *R. J. Simpson, M. R. Neuberger, and T. Y. Liu*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 1936.
9. *H. P. J. Bennett, D. F. Elliott, B. E. Evans, P. J. Lowry, and C. McMartin*, Biochem. J., 1972, **129**, 695.
10. *F. P. Abramson, M. McCaman, and R. McCaman*, Analyt. Biochem., 1974, **57**, 482.
11. *A. Darbre*, Biochem. Soc. Trans., 1974, **2**, 70.
12. *P. B. Hamilton, D. C. Bogue, and R. A. Anderson*, Analyt. Chem., 1960, **32**, 1782.
13. *J. R. Benson*, in «Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis» ed. R. Perham, Academic Press, New York, 1975, chapter 1.
14. *P. C. Jocelyn*, «Biochemistry of the SH group», Academic Press, New York, 1972, chapter 5.
15. *F. Sanger*, Bull. Soc. Chim. biol., 1955, **37**, 23.
16. *K. R. Woods and K. T. Wang*, Biochim. Biophys. Acta, 1967, **133**, 369.
17. *S. R. Burzynski*, Analyt. Biochem., 1975, **65**, 93.
18. *P. Edman and G. Begg*, European J. Biochem., 1967, **1**, 80.
19. *M. D. Materfield and J. Bridgen*, in «Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis», ed. R. Perham, Academic Press, New York, 1975, chapter 2.
20. *R. A. Laursen*, European J. Biochem., 1971, **20**, 89.
21. *R. A. Laursen, A. G. Bonner, and M. J. Horn*, in «Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis», ed R. Perham, Academic Press, New York, 1975, chapter 3.
22. *E. Atherton, J. Bridgen, and R. C. Sheppard*, FEBS Letters, 1976, **64**, 173.
23. *J. Bridgen, A. P. Graffeo, B. L. Karger, and M. D. Waterfield*, in «Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis», ed. R. Perham. Academic Press, New York, 1975, chapter 4.
24. *R. J. DeLange and E. L. Smith*, in «The Enzymes», 3rd edn., ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, vol. 3, chapter 3.
25. *M. Wingard, G. Matsueda, and R. S. Wolfe*, J. Bacteriol., 1972, **112**, 940.
26. *S. Doonan, H. J. Doonan, R. Hanford, C. A. Vernon, J. M. Walker, F. Bossa, D. Barra, M. Carloni, P. Fasella, F. Riva, and P. L. Walton*, FEBS Letters, 1974, **38**, 229.





27. *J. Houmard and G. R. Drapeau*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1972, **69**, 3506.
28. *S.-I. Hakomori*, J. Biochem. (Japan), 1964, **55**, 205.
29. *E. Vilkas, E. Lederer, and J. C. Massor*, Tetrahedron Letters, 1968, 3089.
30. *H. R. Morris and A. Dell*, in «Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis», ed R. Perham, Academic Press, New York, 1975, chapter 5.
31. *E. Shaw*, Physiol Rev., 1970, **50**, 244.
32. *T. H. Plummer, Jr., and M. T. Kimmel*, J Biol. Chem., 1969, **244**, 5246.
33. *E. V. Groman, R. M. Shultz, and L. L. Engel*, J. Biol. Chem., 1975, **250**, 5450.
34. *J. A. Katzennellenbogen, T. S. Ruh, K. E. Carlson, H. S. Iwamoto, and J. Gorski*, Biochemistry, 1975, **14**, 2310.


## 23.4. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В ПРИРОДЕ

*Б. В Бикрофт (University of Nottingham)*

Встречающиеся в природе низкомолекулярные пептиды целесообразно разделить на две различные группы, беря за основу структурные и биосинтетические факторы. Пептиды, структура которых типична для белка, и пептиды со структурными характеристиками, не типичными для белка.

Разница между пептидами первой группы и белками проблематична и исторически базируется на размере молекул. Способность проходить через природные мембраны при диализе определяет верхний предел молекулярной массы пептидов как $\approx 10\,000$, или примерно 100 аминокислотных остатков. В настоящем обзоре низкомолекулярными мы будем называть пептиды, лежащие в области от дипептида до пептидов, содержащих примерно 50 аминокислотных остатков. Наибольший интерес в этой области за последнюю четверть века представляют в основном пептиды, обладающие гормональной активностью. В этой области достигнут заметный прогресс, что представляется весьма важным для взаимосвязи между биологией и химией.

Вторая группа пептидов гораздо более разнообразна структурно и заключает в себе все соединения, содержащие две или более аминокислот, связанных амидной связью, но которые обладают некоторыми структурными свойствами, не характерными для белков. В нее входят такие необычные аминокислоты, которые не найдены в белках, как аминокислоты с *D*-конфигурацией или в более окисленном состоянии, связанные необычной амидной связью, например γ-глутамилпептиды, связанные сложноэфирной связью (депсипептиды), и различные циклические структуры. Эти пептиды в основном выделены из микроорганизмов, и многие из них обладают значительной биологической активностью. Некоторые из них токсичны для растений и животных, в то время как другие нашли применение в качестве антибактериальных, противоопухолевых и противовирусных агентов. Ионофорные пептиды нашли применение в качестве мощного средства при изучении транспорта ионов через природные и искусственные мембраны. Вероятно, в будущем с помощью более утонченных биологических эксперимен-

тов или детального химического анализа будет обнаружено большее количество структурных типов, чем мы наблюдаем сегодня.

Помимо структурных различий увеличивается количество доводов в пользу того, что эти две группы пептидов существенно различаются и по биосинтезу. Большинство пептидных гормонов образуется путем ферментативной фрагментации более крупных белковых молекул (прогормонов), биосинтез которых происходит на рибосомах при строгом генетическом контроле. Имеются веские доказательства, что биосинтез пептидных антибиотиков осуществляется внерибосомальными ферментативными процессами, которые менее специфичны и часто приводят к продуцированию одним и тем же организмом смеси родственных антибиотиков, отличающихся только одним аминокислотным участком.

В настоящем обзоре не будут рассматриваться конъюгаты представителей каждой из перечисленных групп пептидов с углеводами, липидами и нуклеозидами.

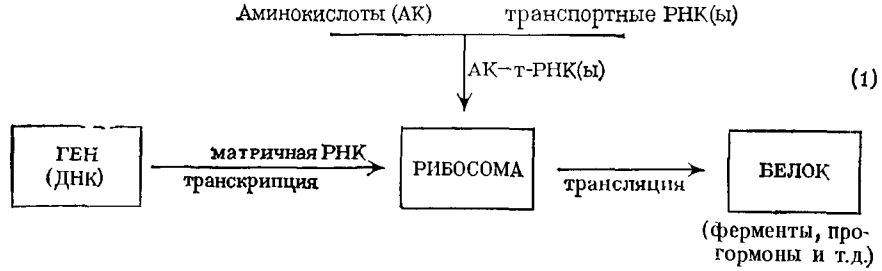
### 23.4.1. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ С ТИПИЧНО БЕЛКОВОЙ СТРУКТУРОЙ

Настоящее сообщение ограничено структурными и биосинтетическими аспектами; принципы химического синтеза, используемые в этой области, рассмотрены в другом месте настоящего издания. Значительное число первичных структур малых пептидов, охарактеризованных к настоящему времени, систематизировано в [1]. Быстрое накопление данных о последовательности дает ключ к разгадке эволюционных и функциональных взаимосвязей между пептидами. Во многих случаях пептиды, которые выполняют одни и те же задачи в сходных организмах, обнаруживают тонкие различия в своей первичной структуре. Видовая специфичность пептидов обеспечивается благодаря строгому генетическому контролю при биосинтезе белков, из которых они образуются.

За последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в понимании биосинтеза белков [2, 3]. В общих чертах эти процессы представлены на схеме (1) (см. также раздел 22.5). Первичная структура протеина, т. е. аминокислотная последовательность, закодирована в виде последовательности оснований в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) гена внутри ядра клетки. Перенос этой генетической информации осуществляется посредством молекул матричной информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), на которую информация, в свою очередь, переносится посредством комплементарного спаривания оснований между мРНК и ДНК. Собственно синтез белка осуществляется на рибосомах, которые представляют собой клеточные структуры, распределенные в цитоплазме клетки. Комплементарное взаимодействие между мРНК и аминоацил-тРНК (существуют транспортные РНК для каждой из 20 аминокислот белка) в процессе синтеза



обеспечивает то, что генетическая информация передается в определенную аминокислотную последовательность. Чрезвычайно высокая точность переноса информации [4] дает уверенность в том, что структура пептидов и белка воспроизводится от синтеза к синтезу.




Вариация первичной структуры пептидов, выполняющих гомологичные функции в различных организмах, представлена (табл. 23.4.1) на примере гормонов гипофиза позвоночных. Окситоцин и вазопрессин занимают особое место в развитии пептидной химии благодаря классическим пионерским исследованиям Дювинье в 1950-е годы [5]. Позднейшие исследования этих гормонов показывают, что общим структурным элементом для них является пептид из девяти аминокислотных остатков с дисульфидным мостиком между первым и шестым остатками, в то время как аминокислоты в положениях 3, 4 и 8 варьируют. Эти различия приписываются генетическим изменениям общего нейрогипофизного гормона в процессе эволюции позвоночных [6].

Интересно отметить, что путем вариации основной структуры химическим синтезом получено около 200 аналогов [7]. Замены в положениях иных, нежели 3, 4 или 8, приводят к неактивным или малоактивным соединениям, и только замещения в положениях 4 и 8 не существенно снижают активность. Действительно, [4-Thr]-окситоцин (1) является высокоактивным синтетическим аналогом, который до сих пор не найден в природе. Значительные усилия, затраченные на изменение биологической активности этих природных гормонов, недавно были вознаграждены введением дезамино-[8-*D*-Arg]-вазопрессина (2) в качестве специфического лекарства при лечении несахарного диабета [8]. Введение остатка *D*-аминокислоты позволило в этом важном случае преодолеть проблему внутренней метаболической нестабильности пептидов.

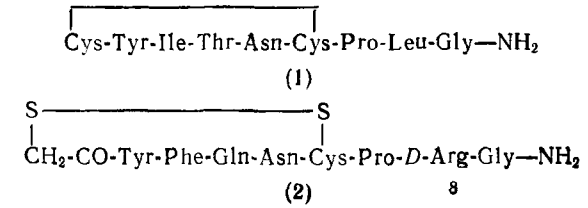


*Таблица 23.4.1. Структура нейрогипофизных гормонов позвоночных **

(а)

Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Gln-Gly—$NH_2$

1 2 3 4 5 6 7 8 9

глумитоцин

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly—$NH_2$

вазотоцин

(б)

Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly—$NH_2$

изотоцин

вазотоцин

(в)

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly—$NH_2$

мезотоцин

вазотоцин

(г)

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly—$NH_2$

окситоцин

Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly—$NH_2$

аргинин-вазопрессин

* (а) Хрящевые рыбы (плавники); (б) костистые рыбы; (в) земноводные; (г) млекопитающие (за исключением гормонов свиньи, которые представляют окситоцин и лизин-вазопрессин)

### 23.4.1.1. Пептидные гормоны

Гормоны, секретируемые эндокринными железами, играют важнейшую роль для стимуляции действия этих желез; кроме того, они стимулируют рост и развитие, а также функциональную активность некоторых тканей. В табл. 23.4.2 представлены некоторые полностью охарактеризованные пептидные гормоны, железы, их продуцирующие, а также кратко указана физиологическая функция. Этот перечень не претендует на полноту, но он дает общее представление и поясняет довольно путанную номенклатуру, возникшую в этой области. Для более детального ознакомления с эндокринологией, вопросами взаимоотношения структура — биологическая активность, а также с биохимией рекомендуем обзоры [9—11].



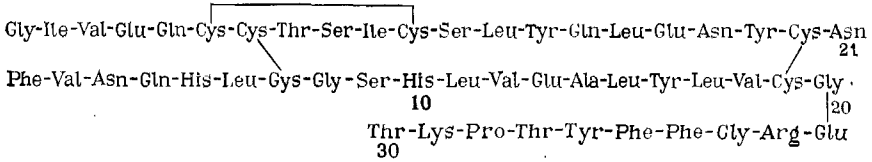
*Таблица 23.4.2. Пептидные гормоны **

| Железа | Гормон | Основная функция |
|---|---|---|
| Поджелудочная | Инсулин (51) | Регулирует метаболизм углеводов, жиров и белков |
| Желудочно-кишечный тракт | Секретин (27) | |
| | Холецистокинин-панкреозимин (CCK) (33) | Влияет на секреторную функцию желудочно-кишечного тракта |
| | Гастрин (17) | |
| | Вазоактивный кишечный пептид (VIP) (28) | |
| Плацента | Плацентарный лактоген (PL) (191) | Пролактин и активность роста |
| Щитовидная и околощитовидная железы | Паратироидный гормон (PH) (84) | Регулирует метаболизм кальция и фосфора |
| | Кальцитонин (32) | |
| Гипофиз: | | |
| передняя доля | Адренокортикотропин (ACTH) (34) | Контролирует активность коры надпочечников |
| | Гормон роста (GH) (191) | Контролирует рост скелета и тканей |
| | Пролактин (198) | Влияет на рост грудных желез и индуцирует секрецию молока |
| средняя доля | Гормон, стимулирующий α- и β-меланофоры (MSH) (13 и 9) | Распределение гранул меланина в коже |
| задняя доля | Вазопрессин (9) | Действует как антидиуретик и сосудосуживающее |
| | Окситоцин (9) | Стимулирует сокращение гладкой мускулатуры |
| Гипоталамус | Тиротропин-релизинг гормон (TRH) (тиролиберин) (3) | Контроль за выделением и синтезом гормонов передней доли гипофиза |
| | Гормон выделения лютеинизирующего гормона (LRH) (гонадолиберин) (10) | |
| | Гормон, ингибирующий выделение гормона роста (GH-RIH) (соматостатин). (14) | Ингибирует выделение гормона роста |

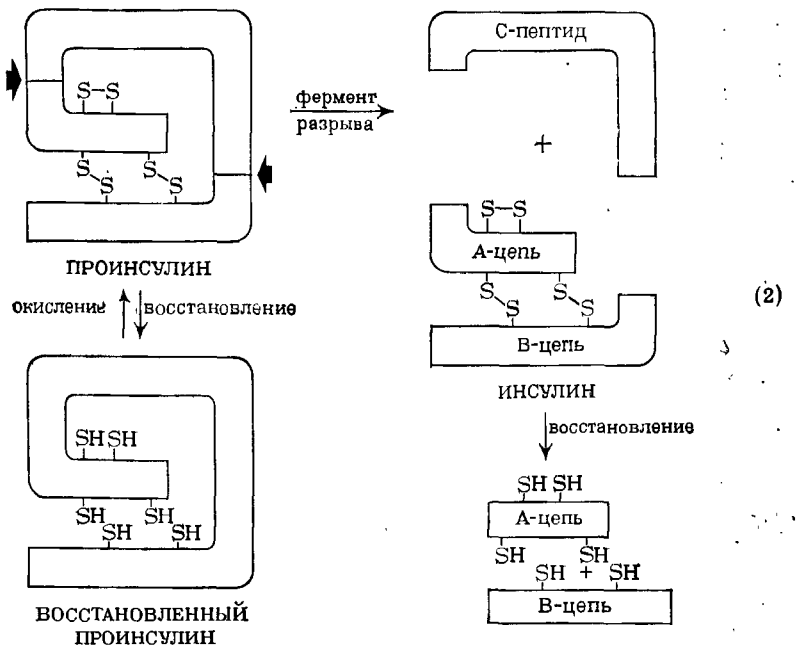
* В скобках даны сокращенные названия и количество аминокислотных остатков.

Поскольку указанные в таблице молекулы сильно различаются по размеру: от трипептида до пептидов с более чем 190 аминокислотными остатками, биологическая активность не может быть четким критерием различия между пептидами и белками. На сегодняшний день имеется достаточное количество доводов в пользу того, что пептидные гормоны произошли от больших прогормонов [10]. Этот процесс доказан для инсулина (3): так, были выделены проинсулины вместе с ферментами, расщепляющими его {схема (2)}.

Инсулины необычны в том смысле, что они состоят из двух пептидных цепей [12], связанных между собой двумя дисульфидными мостиками, и долгое время оставалось загадкой, каким образом живые системы создают такие молекулы. Кроме того, эффективность частичного и полного синтезов ограничивалась потерей специфичности при окислительном соединении двух цепей [13].




(3)

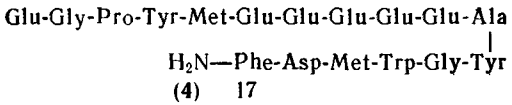



В результате проведенных исследований найдено удовлетворительное объяснение структуры проинсулинов. Молекулы их состоят из одной цепи, а инсулин вместе с неактивным фрагментом (который называют *С*-пептидом) образуются посредством протеолитического действия в двух местах, как показано на схеме (2). Восстановленная форма проинсулина может быть с высоким выходом вновь окислена в прогормон. Геометрия восстановленной молекулы, которая присуща первичной структуре пептидной цепи, контролирует образование дисульфидных мостиков. Аналогичные конформационные взаимодействия между разделенными цепями инсулина А и В отсутствуют, в силу чего наблюдается малый контроль при их рекомбинации.

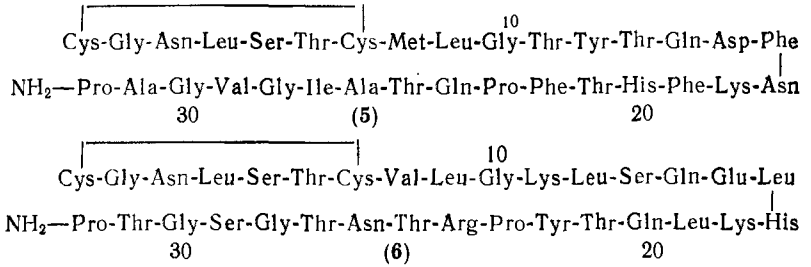


Во многих случаях, как с помощью аналитических и синтетических исследований, так и сравнением действия гормонов из различных видов, было показано, что необходима лишь часть молекулы для того, чтобы вызвать определенный уровень гормональной активности. Вот почему поиски активных участков в молекулах гормонов стали чрезвычайно важной областью исследований [14].

Показано, что все гастрины [в том числе и гастрин человека (4)] из различных видов содержат показанную последовательность остатков 11—17 и лишь незначительно различаются в других местах молекулы [15]. Удаление остатков с *N*-конца вызывает сильную потерю активности. Однако амид тетрапептида, состоящий из последовательности 14—17, еще сохраняет полную физиологическую активность, но примерно в десять раз меньшую, чем у природного гормона [16]. До сих пор не ясно, какую роль играют остатки 1—13 с необычной последовательностью из пяти, связанных друг с другом остатков глутаминовой кислоты.

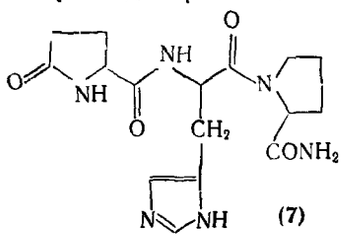



Взаимосвязь структура-активность для кальцитонина — гормона, осуществляющего контроль за транспортом таких ионов, как кальций, калий и фосфат, — менее ясна. Этот гормон выделен из различных позвоночных, богатым источником его является лосось [17]. Сравнение аминокислотной последовательности в кальцитонинах человека (5) и лосося (6) иллюстрирует существенные структурные различия. Как природный лососевый, так и синтетический кальцитонины нашли клиническое применение при лечении болезни Паже — мучительного состояния вследствие нарушения метаболизма составных частей скелета.



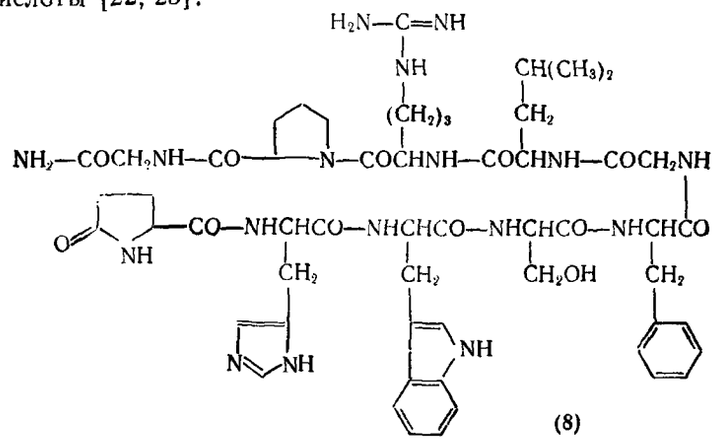

Синтез кальцитонина [17, 18] демонстрирует как возможности полного пептидного синтеза для медицинской химии и изучения взаимосвязи структура-активность [14], так и пути синтеза неприродных аналогов кальцитонина человека. Например [$Ser^{29}$, $Val^{31}$]-кальцитонин человека примерно в пять раз активнее гормона человека, и его время действия дольше.

Выделение и характеристика пептидных гормонов — обычно кропотливая и трудная работа; это относится и к гормонам гипоталамуса [19]. Гипоталамус является той областью ткани мозга, которая осуществляет тонкий контроль за эндокринной системой, влияя на активность продуцирования гормонов внешней долей гипофиза. В ткани одного животного присутствуют лишь нанограммовые количества гормонов. Первые исследования тиротропин-релизинг гормона (TRH) представляли собой огромную работу по экстракции сотен тысяч свиных гипоталамусов и даже в результате ее удалось получить не полностью очищенный препарат. Аминокислоты, найденные в гидролизате, первоначально рассматривали как примеси, и только после того как в достаточно чистом препарате были обнаружены три аминокислоты: гистидин, пролин и глутаминовая кислота в эквимольных количествах, предположили, что гормон имеет пептидную природу. Были синтезированы шесть возможных изомерных трипептида, однако все они оказались неактивными. Дальнейшие исследования привели, наконец, к пептиду (7), содержащему пироглутамииовую кислоту и амидную функцию; этот пептид и оказался идентичным природному TRH [20, 21]. Таким образом, синтез гормона и определение его структуры были достигнуты одновременно.



(7)

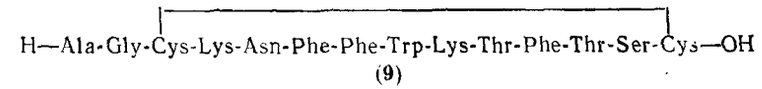
Следующий фактор — гормон выделения лютенизирующего гормона (LRH), как было показано, представляет собой декапептид (8), который также содержит остаток *N*-концевой пироглутаминовой кислоты [22, 23].



(8)



Выделен ряд других факторов активности и ингибирования, различные характеристики которых исследуются. Гормон, ингибирующий выделение гормона роста, (GH-RIH) или соматостатин (9), полностью охарактеризован [24], и описан его синтез [25] наряду с несколькими аналогами. Нет никаких публикаций по видовой специфичности гормонов гипоталамуса.



(9)

Имеются доводы в пользу того, что TRH может быть аномалией по отношению к биосинтезу. Трипептид мог образоваться *in vitro* из исходных аминокислот и экстрактов гипоталамуса. Его синтез не ингибировался белок-блокирующими антибиотиками, но ингибировался добавлением иодацетамида или хлорида ртути, которые инактивируют большинство ферментных систем [26]. Можно предположить, что этот синтез можно провести ферментативно с помощью TRH-синтетазы, весьма сходной с глутатион-синтетазой (см. разд. 23.4.2.1).

### 23.4.1.2. Вазоактивные пептиды

Давно известно, что некоторые вазоактивные пептиды продуцируются путем действия протеолитических ферментов на неактивные белки, присутствующие в плазме крови. К ним относят близкородственные пептиды — ангиотензины I (**10**) и II (**11**), брадикинин (12) и каллидин (13).

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu **(10)**

Asp-Arg-val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe **(11)**

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg **(12)**

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg **(13)**

Интенсивные исследования [27, 28] привели теперь к довольно ясной картине. Эти соединения легко доступны синтетически и, таким образом, являются объектом пристального внимания в изыскании новых антигипертензивных агентов [27].

Кожа земноводных является богатым источником пептидов, которые, кроме того, оказывают сильное действие на гладкую мускулатуру сосудов млекопитающих. Из-за способности вызывать быстрое сократительное действие их назвали тахикининами в отличие от медленно действующих кининов — истинных брадикининов [29].

Присутствие *N*-концевого остатка пироглутаминовой кислоты и карбоксиамида в физалемине [30] (**14**), керулине [31] (**15**) и бомбезине [32] (**16**), которые являются представителями трех основных классов пептидов земноводных, напоминает гормоны гипоталамуса. Это сходство дополнено удивительным наблюдением — оказалось, что TRH (7) является также и компонентом кожи

земноводных. В обзоре [33] описаны структура этих пептидов, их фармакология и сходство с пептидами млекопитающих, а также представлены выводы, следующие из исследования взаимосвязи структура-активность с помощью синтетических аналогов. Пептиды этого класса, выделенные позднее, представлены в [14].

pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Tyr-Phe-Tyr-Glu-Leu-Met—$NH_2$ (14)

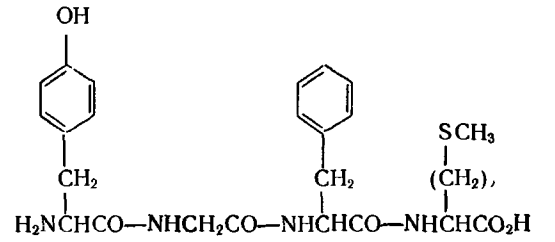
pGlu-Glu-Asp-Tyr(-$SO_3H$)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe—$NH_2$ (15)

pGlu-Glu-Arg-Leu-Gly-Asn-Glu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met—$NH_2$ (16)

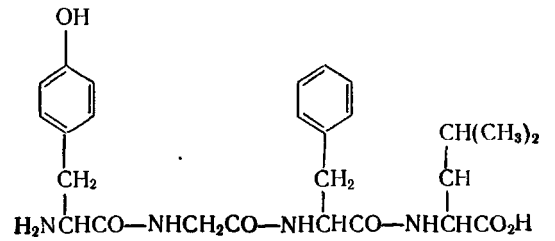
### 23.4.1.3. Пептиды, действующие на нервную систему

Недавние результаты, полученные в различных областях, указывают на широкую распространенность в нервной ткани небольших пептидов и на их влияние на эту ткань. Так, оказалось, что выделенный из мозга свиньи природный материал, обладающий наркотическим действием и долгое время постулировавшийся, представляет собой два тетрапептида [34] (17) и (18). Существование таких молекул, обладающих свойствами физиологических передатчиков, предполагалось и ранее для объяснения функций морфиновых рецепторов, играющих важную роль в передаче болевых ощущений, однако морфин и родственные соединения не являются для этих рецепторов обычными агонистами. Интересно отметить, что в обоих указанных пептидах *N*-концевой аминокислотой является тирозин, что было причиной оживленного обсуждения связи между топологией пептидов и морфина [35].

Показано, что гормоны гипоталамуса действуют на центральную нервную систему. Например, инъекция небольших доз TRH (7) в желудочек мозга кошки вызывает существенное снижение температуры тела [36]. Отсюда возникло предположение, что



(17)



(18)



нейросекреторные процессы доводят химические сигналы до высших мозговых центров, и это открывает новые возможности для медицинской химии. Созданы и испытаны на гормональную активность и на ЦНС-активность аналоги гормонов гипоталамуса.

Возможно, что исследования в этой области, привлекшие большое внимание, касались пептидов, выделенных из мозга животных, которые возникали лишь в связи с определенным стимулом. В некоторых случаях утверждалось, что такие пептиды способны к передаче обусловленного ответа при инъекции подопытным животным [37]. Среди таких веществ наиболее известен скотофобин. Полученные биологические результаты несколько противоречивы, полученные химические данные не помогли разрешить это противоречие. Синтетический пептид, имеющий предложенную ранее последовательность остатков аминокислот, оказался неактивным, однако активность природного пептида была подтверждена [38]. Эта проблема находится, несомненно, на ранней стадии своего разрешения, но она явно представляет значительный интерес для химии и биологии и, возможно, связана с другими, более широкими областями нашего знания.

### 23.4.2. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ С НЕТИПИЧНЫМИ ДЛЯ БЕЛКОВ СТРУКТУРНЫМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

Как указывалось во введении, эти пептиды представляют собой группу различных по структуре соединений, и внутри этой группы имеются четко обособленные классы соединений. Наиболее важный класс — это, несомненно, модифицированные пептиды, а именно пенициллины и цефалоспорины, — здесь опущен, поскольку соответствующий ему материал настолько обширен и значителен, что заслуживает отдельного обсуждения (см. гл. 23.5).

Чтобы повествование строилось на четко разделенных по материалу разделах, данная группа была подразделена на небольшие линейные пептиды, циклические дипептиды (2,5-диоксопиперазины), циклические гомо- и гетеродетные, большие и смешанные пептиды; под этими названиями и сгруппированы различные классы родственных соединений. Поскольку рассматриваемая область характеризуется обширным материалом, интересным не только с точки зрения химии, на эту тему за последние годы появился ряд обзоров общего характера, хотя литература обобщена также и в ежегодных обзорах [39]. Кроме того, имеется множество превосходных обзоров, посвященных отдельным аспектам этой общей темы, и ссылки на эти обзоры будут приведены в соответствующих разделах.

По мере того как растет число новых по свойствам пептидов, выделенных из природных источников, возрастающая сложность их структур отражает совершенство методов установления их строения. За исключением особо интересных случаев установление структуры рассматриваться не будет, и основное внимание в

химическом аспекте проблемы будет уделено биосинтезу и структурным взаимоотношениям.

Отличительной особенностью всех пептидов этой группы является то простое свойство, что все они имеют одну или несколько пептидных связей.

Недавние обширные биосинтетические исследования [40—43] указывают на то, что механизм образования пептидных антибиотиков резко отличается от механизма синтеза белка. Появился новый, нерибосомальный механизм соединения аминокислот, последовательность которых определяется белковым шаблоном, и он был подробно изучен на примере многих пептидных антибиотиков, включая грамицидин, тироцидин и бацитрацин.

Основные достижения этой важной работы [44, 45] следуют из представленных на схеме (3) данных для циклического декапептида грамицидина С (**19**). Фракционированием освобожденного от клеток экстракта *Bacillus brevis* выделена синтетаза грамицидина С, состоящая из легкой и тяжелой фракций ферментной системы. Легкий фермент специфически активирует *L*-фенилаланин, получается соответствующий аденилат с переносом аминокислоты на тиольную группировку молекулы фермента, хиральный α-центр которой имеет *D*-конфигурацию. Хотя этот механизм не выяснен до конца, известна его независимость от коферментов и он, возможно, катализируется основаниями.

Четыре оставшихся аминокислоты включаются сходным путем тяжелым ферментом в виде сложных эфиров тиоловых кислот. Синтез начинается только в присутствии фенилаланина, связанного с легким ферментом, после чего остаток *D*-фенилаланина переносится от легкого к тяжелому ферменту с попутным образованием пептидной связи между фенилаланином и пролином. Дальнейший рост связанной с ферментом пептидной цепи происходит вплоть до пентапептида путем последовательного присоединения соответствующих аминокислот, как показано на схеме (3). После того как присоединяется конечная аминокислота — лейцин, грамицидин высвобождается из комплекса с ферментом. Точный механизм циклизации по типу «голова к хвосту» двух пентапептидов еще не ясен.

Считается, что процесс удлинения цепи включает участие остатка фосфопантетеина, который был обнаружен в системе тяжелого фермента. Полагают, что пантетеин работает как тиольный донор типа размахивающей руки, принимая и подавая растущую пептидную цепь то к участку, где аминокислота присоединяется путем транстиолирования, то от этого участка до тех пор, пока не присоединится остаток концевой аминокислоты. Подмечено сходство этого процесса с синтезом жирных кислот, что обратило на себя внимание, и проведено детальное сопоставление обоих процессов [46].

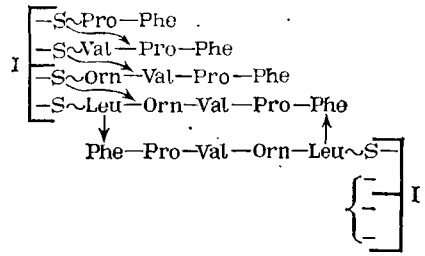
Хотя система требует присутствия и вовлечения в процесс всех пяти аминокислот, ряд из них может быть заменен аналогами.



Так, легкий фермент может связывать тирозин или триптофан, в результате чего получается соответственно замещенный аналог

$$E_{II}\text{—S}\sim\text{PheNH}_2 + E_I\text{—S}\sim\text{Pro=NH} \longrightarrow E_{II}\text{—SH} + E_I\text{—S}\sim\text{Pro—PheNH}_2$$

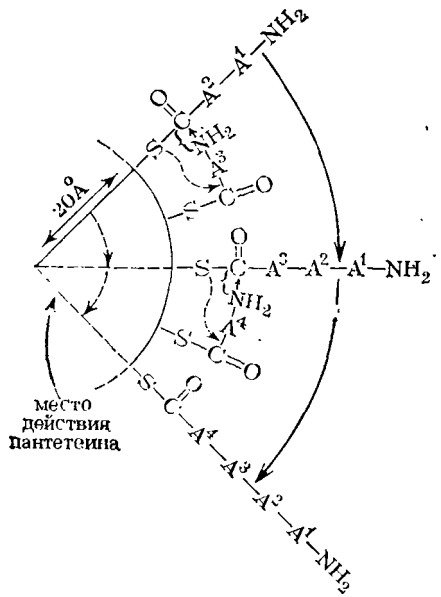
начальная реакция



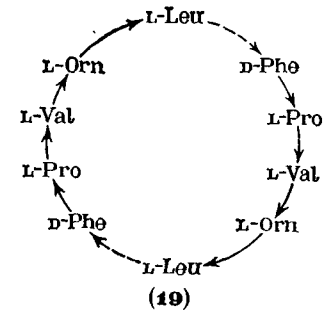

(3)

стадии роста цепи и циклизации

$E_I$ = тяжелый фермент,
$E_{II}$ = легкий фермент




Схематическая картина транспептизации и транстиолирования с участием связанного с ферментом пантетеина
($A^1$, $A^2$, $A^3$, $A^4$ — D-Phe Pro, Val и Orn соответственно)




(**19**)

(прерывистые стрелки показывают точки циклизации)

грамицидина. Из подобных бесклеточных систем могут быть получены приемлемые для работы количества антибиотиков, благодаря чему достигнуты определенные успехи в исследованиях, предпри-

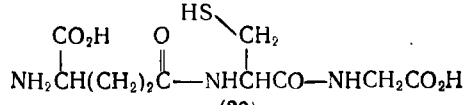
нятых с целью получения грамицидина биокаталитическим, а не ферментативным путем [47].

В группе пептидных антибиотиков наблюдается значительное структурное различие, тем не менее появляется все больше доводов в пользу того, что пептидные связи здесь создаются подобно тому, как это происходит при синтезе грамицидина. Поэтому результаты приведенных выше работ имеют как теоретическое, так и прикладное значение для производства других пептидных антибиотиков.

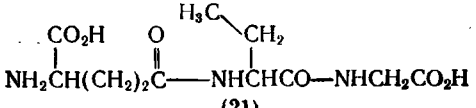
### 23.4.2.1. Небольшие линейные пептиды

Наиболее распространенным пептидом этого типа несомненно является глутатион **(20)**. Он, по-видимому, присутствует во всех живых организмах и найден преимущественно в межклеточном пространстве, обычно в относительно высокой концентрации. Поскольку он выделен и охарактеризован почти 60 лет назад, изучены многие его биологические функции, и они включают сохранение тиольных групп в протеинах и других соединениях, разрушение пероксидов и свободных радикалов, выполнение роли кофермента для некоторых ферментов, а также детоксификация чужеродных соединений по пути образования меркаптуровой кислоты. Многие эти исследования, включая полученные таким путем химические данные, рассмотрены в обзорах [48, 49]. Наиболее крупное достижение, которое привлекло пристальное внимание, касалось роли γ-глутаминового цикла [50] {схема (4)}. Этот важный биохимический процесс, в котором глутатион обеспечивает перенос аминокислот сквозь клеточные мембраны, описан достаточно хорошо. Следует отметить, что этот цикл описывает ферментативный синтез глутатиона с промежуточным образованием ферментно-связанного ацилфосфата.

Соответствующий трипептид — офтальмовая кислота **(21)**, присутствующая в хрусталике млекопитающих, возможно, осуществляет подобную функцию [51]. Большое количество разных γ-глутамильных пептидов найдено в растениях [52, 53], однако значение этих веществ до конца не выяснено. Из *E. coli* [54] выделен глутатионилспермидин **(22)**; предложено, что это соединение может иметь значение для контроля роста и метаболизма нуклеиновых кислот.



**(20)**



**(21)**





**(22)**

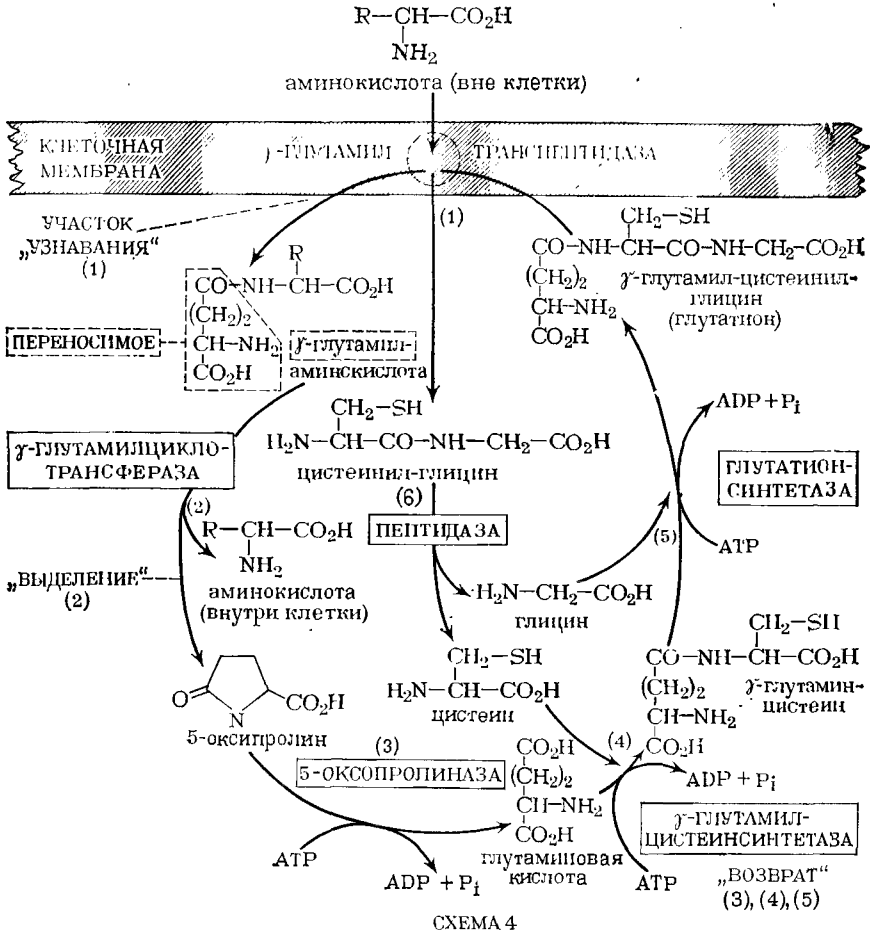
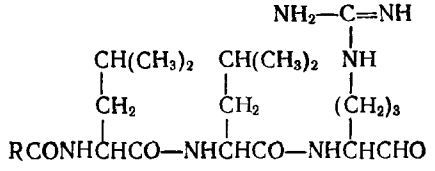


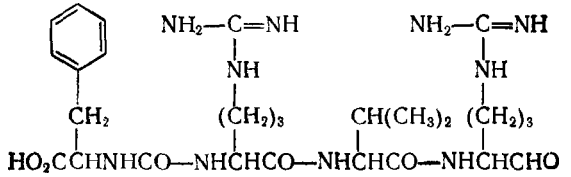

СХЕМА 4

В результате обширного исследования микроорганизмов в поисках соединений с антибактериальной активностью и затем ингибиторов ферментов [55], антиметаболитов [56, 57] появилось много небольших линейных пептидов, значительно отличающихся по структуре [57]. Эти различия могут быть относительно небольшими, как в случае лейпептинов **(23)** [58], антипаина **(24)** [59] и пепстатинов **(25)** [60]; все перечисленные пептиды являются специфическими ингибиторами протеазы. Аминокислоты в этих

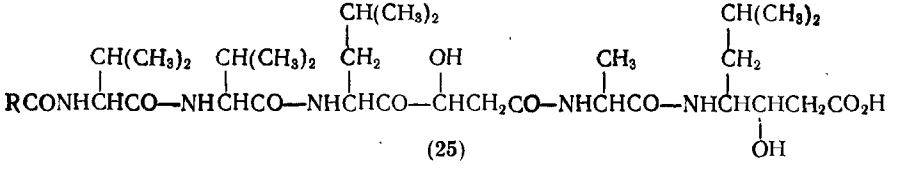
соединениях имеют *L*-конфигурацию *, в соединениях (23) и (24) концевые карбоксильные группы аргининового остатка восстановлены до альдегидной группы, что свойственно лишь данным природным пептидам. Другой атипичной чертой является уреидоподобная связь между остатками фенилаланина и аргинина в соединении (24); (25) содержит необычную γ-аминокислоту. Последний пептид нашел клиническое применение как ингибитор пищеварительной активности желудочного сока при лечении язвы желудка [55]. Эластиналь (26) — выделенный позднее ингибитор эластазы [61] — также содержит концевую альдегидную группу и уреидную связь и, кроме того, необычную гуанидиновую аминокислоту — капреомицидин (см. разд. 23.4.2.3). Его можно формально рассматривать как циклизованный дегидро- или окисленный аргининовый остаток, в связи с тем что структуры такого рода, возникающие в результате окислительного превращения первичных аминокислот, часто встречаются среди микробных пептидов [62].



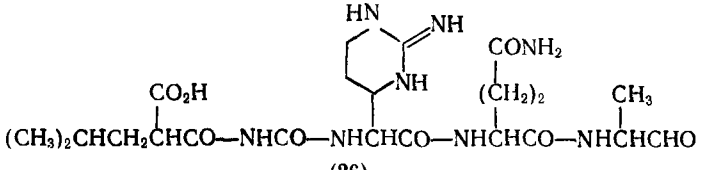
(23)



(24)



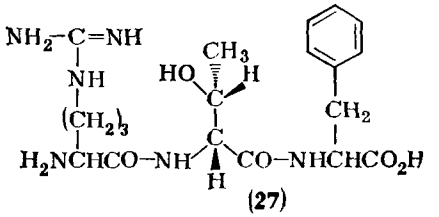
(25)



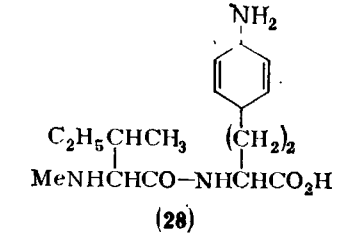
(26)

* В данном разделе, если не оговорено особо, имеется в виду *L*-конфигурация α-центров аминокислот.

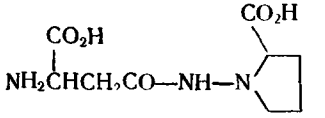




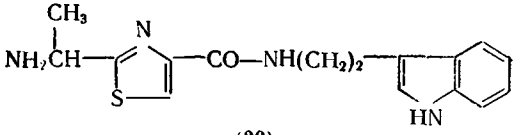
(27)



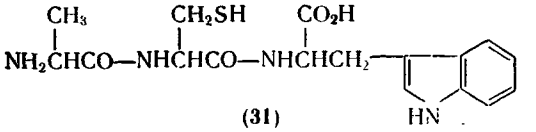
(28)



(29) (*D*-)



(30)



(31)

Выяснено также, что первичные или необычные структурные элементы часто имеют *D*-конфигурацию. Для первичных аминокислот с двумя хиральными центрами обращение конфигурации обычно наблюдается только у α-центра [63], как показано на примере простого трипептида (27), имеющего в составе остаток *ало-D*-треонина [64]. Стравидин (28) обладает двумя необычными особенностями, а именно, довольно часто содержит метилированные аминокислоты, хотя и редко *D*-конфигурации, и небелковые аминокислоты.

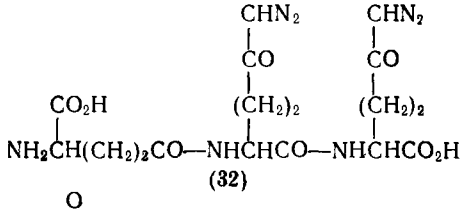
Небелковые или необычные аминокислоты встречаются в микробных пептидах достаточно часто. В некоторых из них явно прослеживается связь с соответствующими первичными аминокислотами, тогда как в других случаях эта связь менее определенна и иногда для своего объяснения нуждается в привлечении независимого пути синтеза. Неясно, на какой стадии происходит такая модификация — или это происходит с аминокислотой до ее включения в пептид, что, по-видимому, характерно для большинства *D*-аминокислот, или это происходит в самом пептиде, однако возможно, что реализуются и оба эти пути.

Так, α-гидразинокислота 1-амино-*D*-пролин, присутствующая в линатине (29), по-видимому, образуется перед образованием связи с глутаминовой кислотой. Исследование действия этого антиметаболита показали, что γ-глутамильный остаток работает как переносчик *D*-аминокислоты, что блокирует ферментативную систему, регулируемую пиридоксалем [66]. Основной пептид (30) [67] формально может считаться производным соответствующего трипептида (31) путем окисления цистеинового остатка, циклизации тиольной группировки с соседней пептидной связью с образованием

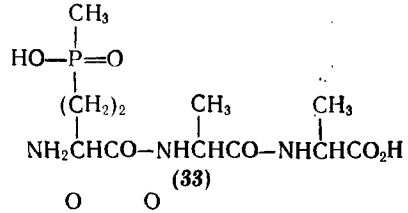
тиазола и последующего декарбоксилирования. Первое из этих превращений, если не все, происходит на стадии пептида.

Первое сообщение о том, что в природных соединениях присутствует диазокетогруппа, было встречено с изрядной долей скептицизма. Тем не менее в структурах ряда аминокислот [68] и в пептидах — диазомицинах A и B (**32**) [69] этот факт четко установлен.

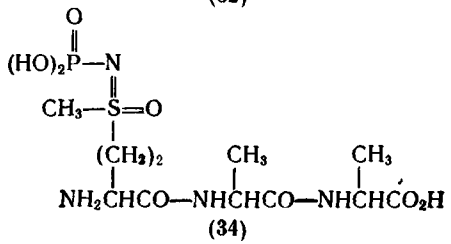
Фосфиновый (**33**) [70] и сульфоксиминовый (**34**) [71] пептиды являются специфическими ингибиторами глутаминсинтетазы; их *N*-концевые аминокислоты, встречающиеся в свободном состоянии, структурно близки глутамину. Особенно примечательно то, что оба трипептида являются более сильными ингибиторами микробного роста, чем входящие в их состав аминокислоты, что показывает важность этих пептидов как переносчиков аналогов аминокислот. Родственное соединение (**35**) предположительно является токсином, вызывающим симптомы болезни венчика бобовых [72].



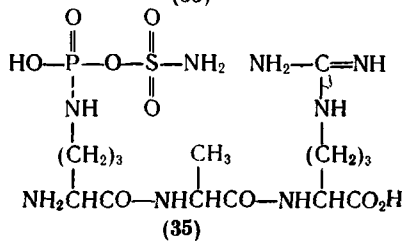
(**32**)



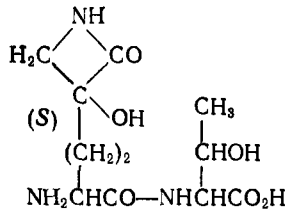
(**33**)



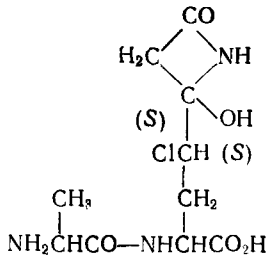
(**34**)



(**35**)



(**36**)

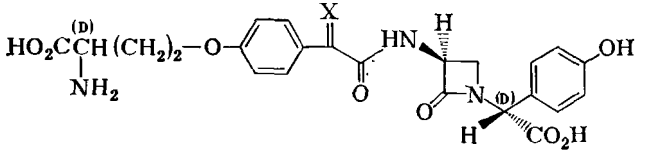


(**37**)

До сравнительно недавнего времени природные пенициллины и цефалоспорины рассматривались как единственные природные пептидные производные с β-лактамным циклом. В связи с их явно выраженной антимикробной активностью, что вызвало к ним повышенный интерес, высказывалось мнение, что по своей структуре они представляют собой некое исключение. Усовершенствование способов выделения, а также биологических испытаний привело к открытию новой серии этих интересных метаболитов. Содержащий β-лактамную группировку дипептид (**36**), выделенный из бактерий *Pseudomonas tobaci*, оказался причастным к возникновению болезни табака, называемой «греческим огнем». Установлено, что объектом действия этого токсина является глутаминсинтетаза, а соответствующий механизм включает необратимое блокирование фермента путем нуклеофильной атаки на азетидиниевое кольцо [73]. Близкое родство соединения (**37**) с токсином «греческого огня» установлено на примере вида *Streptomyces*, где также происходит блокирование глутаминсинтетазы [74].



Одним из наиболее ярких достижений в этой области является работа по нокардицинам, еще одной группе моноциклических антибиотиков с β-лактамной группировкой, выделенных из бактерий *Nocardia uniforms*. Главный компонент — нокардицин A, обладает широким спектром активности против грам-отрицательных бактерий при невысокой токсичности. Структура нокардицина A (**38**), а также минорных компонентов (**39**)—(**44**), выделенных из ферментационной смеси, установлена и подтверждена синтезом. Все аспекты химии этих новых соединений рассмотрены в превосходных работах симпозиума по β-лактамным антибиотикам [75]. Особенно следует отметить присутствие в нокардицинах остатка *D*-*n*-гидроксифенилглицина, так как его редко встречали в микробных пептидах, а также то, что этот остаток представляет собой самую эффективную боковую группу в полусинтетических пенициллинах. Вот пример, как Природа еще раз предвосхитила усилия человека.

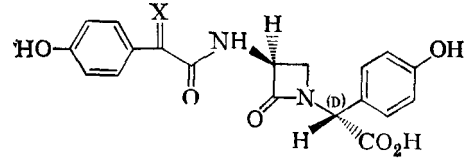


(**38**) X = NOH (*син* - по отношению к ациламиногруппе)

(**39**) X = NOH (*анти* - по отношению к ациламиногруппе)

(**40**) X = 

(**41**) X = O



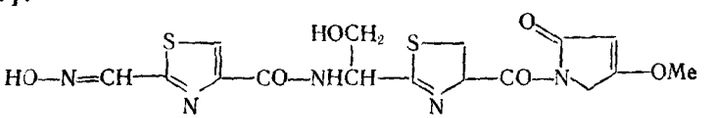
(**42**) X=NOH (*син*)

(**43**) X=NOH (*анти*)

(**44**) X = 

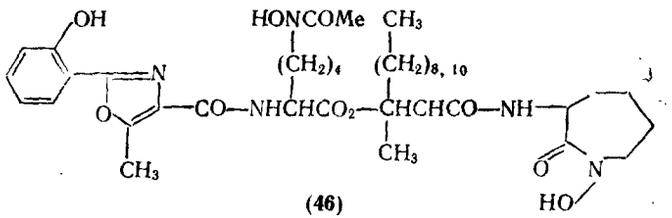
Другой пептидный антибиотик, лежащий в стороне от нокардицинов и имеющий концевую оксимную группу, — альтиомицин (**45**).

Это также существенно модифицированный пептид, в котором пептидная структура только угадывается. Интересно наличие внутри одной молекулы тиазольной системы {ср. (30)}, замаскированных α,β-дегидроцистеина и *D*-цистеина, циклизованного в тиазолин [76, 77].

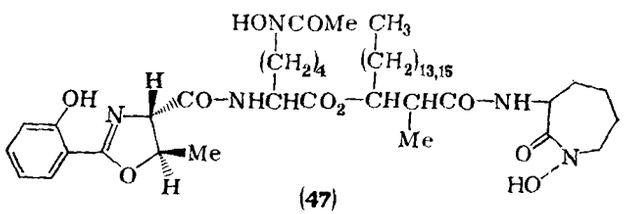


(45) (*D*)

Соответствующие оксазолы и оксазолины, производимые из серина или треонина, встречаются не столь часто, но тем не менее они найдены в семействе микобактина [78]. Они представляют группу бактериальных производных железокомплексующих гидроксамовых кислот, являющихся факторами роста микобактерий. Нокобактин (**46**) [79] напоминает по структуре микобактин М (**47**) [80] с той, однако, разницей, что вместо оксазолинового кольца первый имеет оксазольное. Структуры гидроксамовых кислот, представляющих собой *N*-гидроксилированные производные орнитина, играют важную роль в процессе комплексования железа и присутствуют среди циклических пептидов семейства сидерохромных (см. разд. 23.4.2.3).



(46)



(47)

### 23.4.2.2. 2,5-Диоксопиперазины (циклические дипептиды)

2,5-Диоксопиперазины — одни из самых многочисленных и широко распространенных в природе пептидных производных. В ряде аспектов они отличны по химическим свойствам от других циклических пептидов, и поэтому считается разумным рассматривать их в отдельной группе. Превосходный обзор, который рассматривает все аспекты природных и синтетических 2,5-диоксопиперазинов, и включает литературу до конца 1973 г., представляет собой важный источник информации по этим соединениям [81]. Не было сделано попыток рассмотреть исчерпывающим образом весь до донца литературный материал, однако узловые проблемы, имеющие важное значение для химии природных пептидов, были разработаны.

В процессе выделения этих соединений и их производных следует проявлять значительную осторожность, поскольку они легко образуются из пептидов и белков как при ферментативном или химическом гидролизе, так и при термическом воздействии. Действительно, появление горького вкуса ряда длительно сохранявшихся алкогольных напитков и поджаренных бобов какао, по-видимому, частично связано с образованием циклических дипептидов, так или иначе возникающих при этом. Однако их осторожное выделение, в особенности из культуральных фильтратов или экстрактов микроорганизмов, свидетельствует об их действительно метаболитическом происхождении.

Ряд циклических дипептидов микробного происхождения, полученных из *L*-аминокислот и определенно являющихся природными продуктами, приведен в табл. 23.4.3. Много таких соединений выделено также из разных других микроорганизмов, например *цикло*-Gly-*L*-Pro идентифицирован в экстракте морской звезды *Luidia clatharata*.

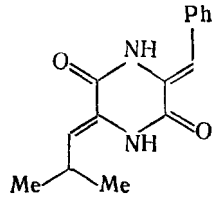
Интересно отметить, что среди этой группы природных соединений имеется значительное количество производных пролина. Это, наверное, не так уж удивительно, принимая во внимание то, что при образовании диоксопиперазинов предшественник дипептида принимает *цис*-расположение относительно пептидной связи, и хорошо известно, что энергия активации *цис/транс*-изомеризации производных *N*-ацилпролина существенно ниже, чем для других пептидных производных. В отличие от большинства других циклических пептидов, две пептидные связи в диоксопиперазинах обладают *цис*-конфигурацией, и это оказывает влияние на топологию и химию этих соединений.

Множество пептидных модификаций, о которых говорилось в предыдущем разделе, представлено и в циклических дипептидах

*Таблица 23.4.3. Некоторые природные 2,5-диоксопиперазины, производные первичных L-аминокислот*

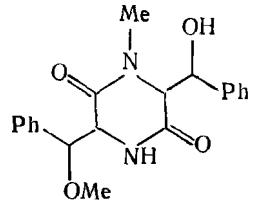
| Пептид | Источник |
|---|---|
| цикло-*L*-Pro-*L*-Leu | *Aspergillus fumigatus* |
| цикло-*L*-Pro-*L*-Val | *Aspergillus ochraceus* |
| цикло-*L*-Pro-*L*-Phe | *Rosellinia necatrix* |
| цикло-*L*-Pro-Gly | Экстракт дрожжей |
| цикло-*L*-Pro-*L*-Tyr | Экстракт дрожжей |
| цикло-*L*-Ala-*L*-Leu | *Aspergillus niger* |
| цикло-*L*-Phe-*L*-Phe | *Streptomyces noursei* |

*Таблица 23.4.4. Некоторые модифицированные 2,5-дикетопиперазины*



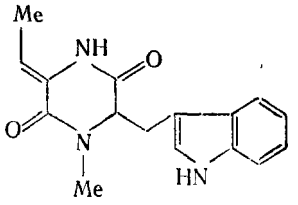
(48) альбоноурсин [82]

*Streptomyces noursei*



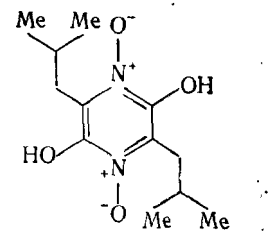
(49) пикроцелин [83]

*Roccella fuciformis*



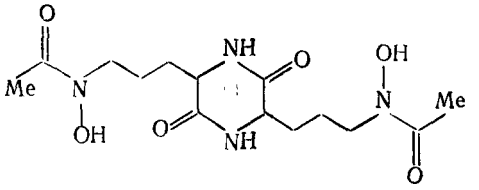
(50) [84]

*Streptomyces spectabilis*



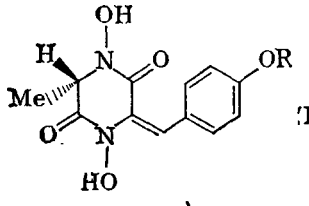
(55) пульхерримовая кислота [89]

*Candida pulcherrima*



(52) родоторуловая кислота [86]

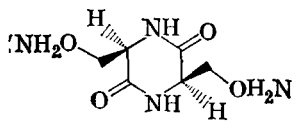
*Rhodotorula pilimarae*



(51)

мицелианамид [85]

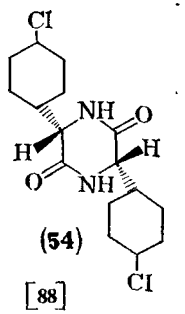
*Penicillium griseofulvum*



(53)

димер циклосерина [87]

*Streptomyces orchidaceus*



(54)

[88]

*Streptomyces griseoluteus*

(табл. 23.4.4). Обычные модификации такого рода представлены остатками α,β-дидегидроаминокислот в (48), (50) и (51), *N*-метильными группами в (49), (50) и *N*-гидроксильными группами в (51) и (52) [82—89]. Механизм окисления (дегидрирования) изучен на многих примерах, включая мицелианамид (51); экспериментами с мечеными аминокислотами показано, что этот механизм включает специфическую потерю *про-S*-метиленового водорода [90].



Детальные биохимические исследования показали, что родоторуловая кислота (52) метаболитически получается из орнитина, который перед ацетилированием и димеризацией подвергается *N*-гидроксилированию [91]. Димер циклосерина интересен тем, что в нем оба остатка аминокислоты имеют *D*-конфигурацию. Установлено, что хлорсодержащий метаболит (54) обладает существенной противоопухолевой активностью, однако о его биосинтезе известно мало.

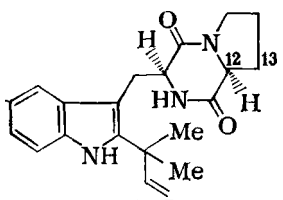
Представителем значительного числа встречающихся в природе производных гидроксипиперазина является пульхерримовая кислота, которую можно рассматривать как высокоокисленную форму соответствующего диоксопиперазина. Эксперименты с мечеными соединениями показали, что *цикло*-*L*-Leu-*L*-Leu превращается в (55) микроорганизмами *C. pulcherrima*, но в общем случае пиперазины не получаются из этих предшественников [92].

За последнее время охарактеризовано большое число диоксопиперазинов, содержащих изопропенилзамещенный триптофановый остаток или новые циклические системы. Сводка различных типов этих метаболитов (56)—(66) дана в табл. 23.4.5 [93—100]. Исторически первым представителем этой группы был эхинулин (64), и с тех пор как показывают структуры соединений (56)—(60) [93—96], идентифицированы и более простые производные. Примечательно присутствие в соединениях систем α,β-дидегидроаминокислот, и имеются доказательства, что процесс дегидрирования происходит на уровне циклодипептидов и включает потерю *про-S*-метиленового водорода.

Изопропенилирование этих соединений также происходит уже после замыкания цикла, и показано, что *цикло*-*L*-Tyr-*L*-Ala превращается в (58) под действием бесклеточного экстракта из *A. amstelodami* в присутствии 3,3-диметилаллилпирофосфата. Соединение (58) образуется быстро и затем включается в эхинулин (64) [94], устанавливая тем самым последовательность введения диметилаллильных групп в индольное ядро. Путь алкилирования бензольного ядра обычен, но миграция остатка у С-5 в положении 2 наблюдается впервые. Можно считать, что механизм этой миграции включает первоначальное алкилирование по индольному азоту с последующей катализируемой кислотой перегруппировкой. Это подтверждается выделением соединения (66) [100]. Миграция остатка у С-5 в положение 3 роквефортина (60) [96] также происходит, вероятно, в результате *N*-алкилирования с последующей перегруппировкой клайзеновского типа.

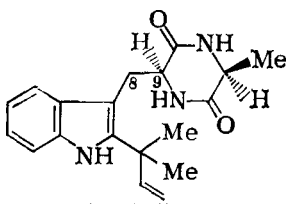
Остальные представленные в табл. 23.4.5 метаболиты получаются в результате последовательных превращений индольного

*Таблица 23.4.5. Некоторые 2,5-диоксопиперазины, содержащие изопренилированные триптофановые звенья*



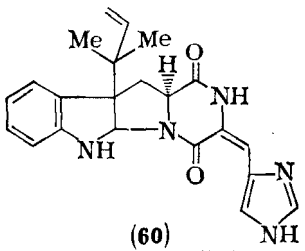
(56) [93]

(57) 12,13-дегидро-
(*Aspergillus ustus*)



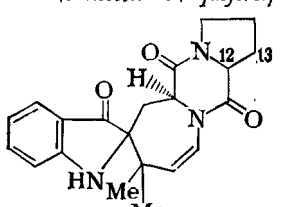
(58) [94]

(59) 8,9-дегидро-[95]
(*Aspergillus amstelodami*)



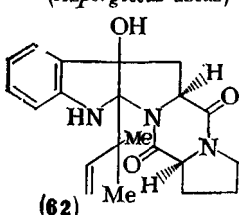
(60)

рокфефортин [96]
(*Penicillium roqueforti*)

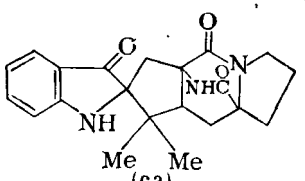


(61)

аустамид [93]
и 12,13-дегидро-
(*Aspergillus ustus*)

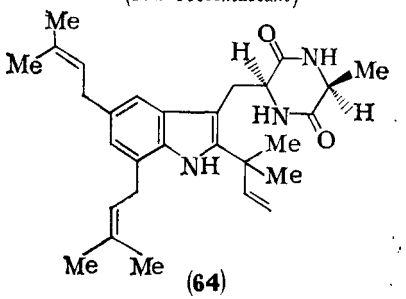


(62)



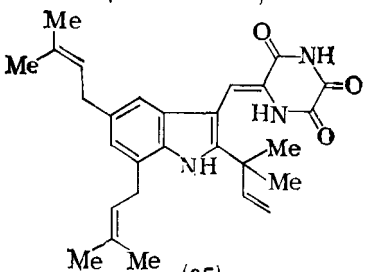
(63)

бревианамид А [97]
(*P. brevicomactum*)



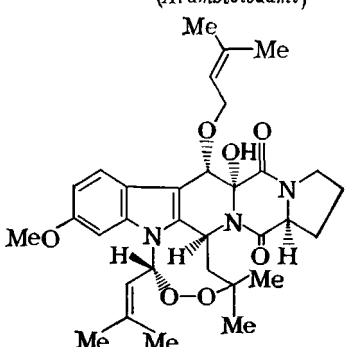
(64)

эхинулин [98]
(*A. echinulatus*)
(*A. amstelodami*)



(65)

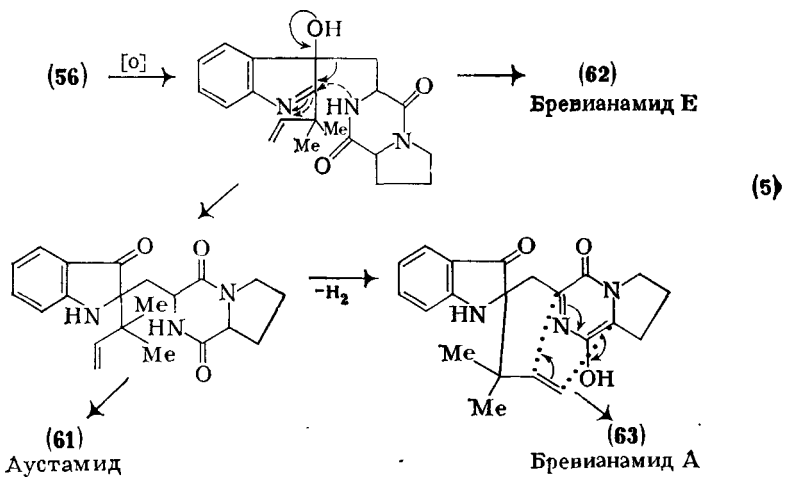
неозхинулин [99]
(*A. amstelodami*)



(66)

фумитреморгин [100]
(*P. verruculosum*)

остатка и взаимодействием диоксопиперазинового кольца либо с остатком у С-5, либо с самим индолом. Эти предположения сведены на схеме (5). Хотя они в какой-то степени и являются спекулятивными, они все же предлагают четкую интерпретацию, вполне согласующуюся с химическими данными. Особенно заслуживает внимания реакция циклоприсоединения, объясняющая образование бревианамида А (**63**). Выявлены химические прецеденты этой реакции [81].

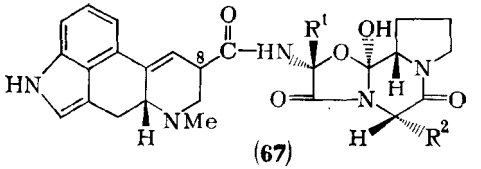


(5)

Другую группу метаболитов структуры диоксопиперазинов представляют пептиды спорыньи, содержащие модифицированный изопропенилированный остаток триптофана, являющийся в этом случае лизергиновой кислотой. Спорынья-склероция гриба *Claviceps purpurea*, найденная в зрелой и незрелой ржи, имеет долгую историю и как причина народных бедствий, и как лекарство. Хлеб, приготовленный из неочищенной ржи, был причиной отравлений, связанных с присутствием спорыньи и называемых ранее Священным огнем, или огнем Св. Антония. Клиническое применение этих пептидов ограничивается лечением мигрени и лечением кровотечения в послеродовой период.

Химия и биосинтез лизергиновой кислоты представляет собой особую тему, выходящую за пределы этой статьи, и по этой теме мы отсылаем читателя к обзорам [101, 102]. Пептиды спорыньи (**67**) представляют собой амиды лизергиновой кислоты, существующие в виде пар эпимеров по С-8. Амины представлены циклическими трипептидами, биосинтез которых остается не вполне ясным. Известно, что они являются производными соответствующих аминокислот, и поскольку из продуцирующего спорынью гриба выделен дипептид (**68**) [103], предложено, что интермедиатом синтеза являются *N*-ацилированные циклические дипептиды. Полагают, что этот продукт получается параллельно путем эпимеризации

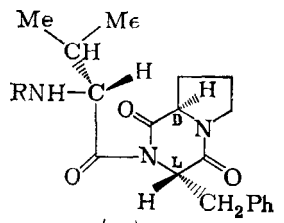
*Таблица 23.4.6. Встречающиеся в природе пептиды спорыньи*



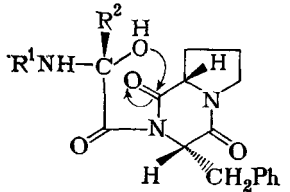
(67)

| Пептидный алкалоид | $R^1$ | $R^2$ | Стереохимия у C-8 |
|---|---|---|---|
| Эрготамин | Me | $CH_2Ph$ | S |
| Эрготаминин | Me | $CH_2Ph$ | R |
| Эргозин | Me | $CH_2CHMe_2$ | S |
| Эргозинин | Me | $CH_2CHMe_2$ | R |
| Эргостин | Et | $CH_2Ph$ | S |
| Эргостинин | Et | $CH_2Ph$ | R |
| Эргокристин | $CHMe_2$ | $CH_2Ph$ | S |
| Эргокристинин | $CHMe_2$ | $CH_2Ph$ | R |
| Эргокриптин | $CHMe_2$ | $CH_2CHMe_2$ | S |
| Эргокриптинин | $CHMe_2$ | $CH_2CHMe_2$ | R |
| Эргокорнин | $CHMe_2$ | $CHMe_2$ | S |
| Эргокорнинин | $CHMe_2$ | $CHMe_2$ | R |

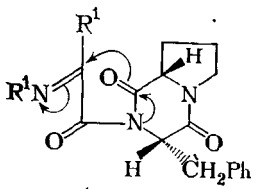
ключевого интермедиата. Последующая циклизация происходит либо путем присоединения α-гидроксильной группы к пептидной связи диоксопиперазинового кольца (**69**), либо присоединением пептидного амида к ацилимину (**70**). Первый из этих процессов и принят в общих чертах для химического синтеза этих соединений [101].



(68)



(69)



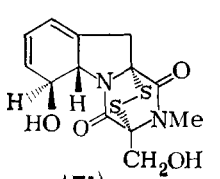
(70)

Последней группой метаболитов, рассматриваемых в этом разделе, являются диоксопиперазины с мостиковой серой (табл. 23.4.7). Эту группу можно подразделить на соединения ряда глиотоксина и споридесмина [104].

Глиотоксин (**71**) — соединение с высокой антигрибковой и антибактериальной активностью — был впервые выделен в 1936 г.; в последующие два десятилетия его химия интенсивно изучалась. Правильная структура была предложена, наконец, в 1958 г. [105] и за-

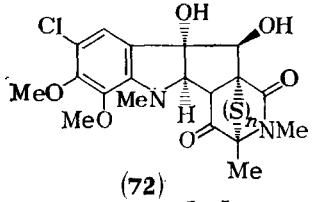


*Таблица 23.4.7. Некоторые природные диоксопиперазины, содержащие серные мостики*



(71)

глиотоксин [105]
(*Trichoderma viride*)

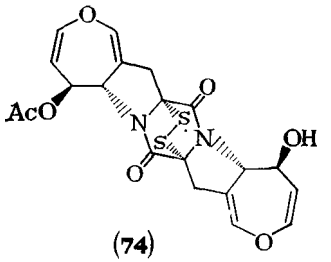


(72)

споридесмин B [106], n=2

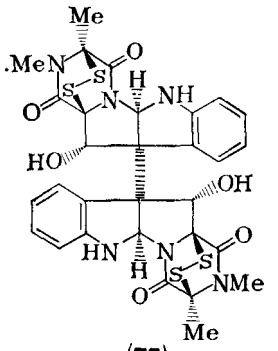
(73)

споридесмин G [107], n=4
(*Pithomyces chartarum*)



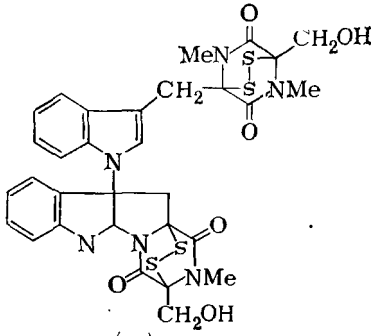
(74)

аранотин [108]
(*Arachniotus aureus*)



(75)

вертициллин [109]
(*Verticillium sp.*)



(76)

хетомин [110]
(*Chaetomin cochliodes*)

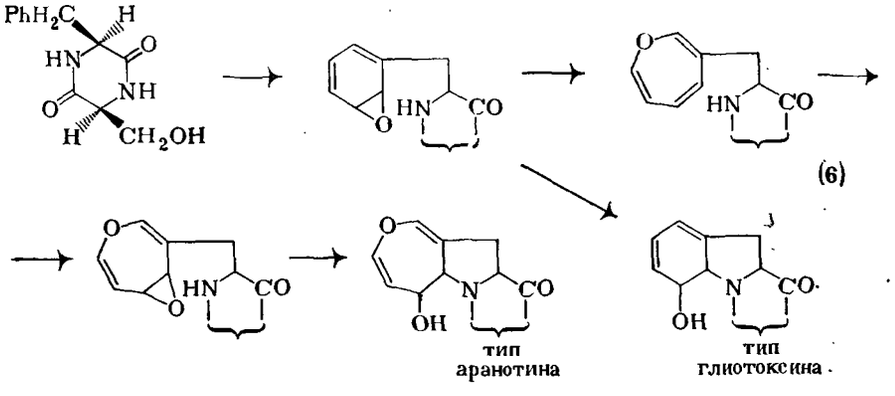
тем подтверждена рентгеновскими данными. Споридесмины были выделены при исследовании экзем лицевой части крупного рогатого скота и овец, подвергавшихся заражению грибковой инфекцией на пастбищах. В результате была предложена структура, основанная на химических и рентгеновских данных [106]. Выделено и охарактеризовано соответствующее соединение, содержащее тетрасульфидный мостик (**73**) [107].

Аранотин (**74**) и родственные соединения, имеющие значительное сходство с глиотоксином, были идентифицированы в процессе изучения их антивирусной активности [108].

Соединения (**75**) и (**76**) — более сложные димерные выделенные метаболиты. Вертициллин А (**75**), кроме того, наряду с антимикроб-

ной активностью имеет ясно выраженные противоопухолевые свойства. Интересно отметить, что (75) по хиральности дитиопиперазиновых колец противоположен споридесмину. Для соответствующего димера — хетомина — после пересмотра принята структура (76), однако конфигурацию еще следует установить [110].

Показано, что *цикло-L*-Phe-*L*-Ser является эффективным предшественником глиотоксина [111]; последующие исследования с помощью меченых соединений подтвердили предложенный ранее механизм образования дигидроароматической системы глиоксинового типа через промежуточный оксид бензольного типа и через равновесие бензольный оксид-оксепин в циклической системе типа аранотина {схема (6)} [112]. Сделанные ранее предположения о промежуточном и попутном образовании при этом детиодегидропиперазинового кольца было исключено, так как фенилаланин включается в метаболиты без потери какого-либо из своих бензильных водородов. Возможно, что в этот процесс вовлечен промежуточный ацилимин, подобно тому как это происходит в биосинтезе бревианамида А и пептидов спорыньи.



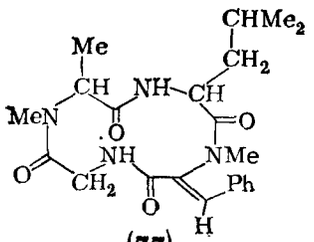

### 23.4.2.3. Циклические гомодетные пептиды

При классифицировании и описании циклических пептидов обычно используются определения гомодетный и гетеродетный пептиды. Представители первой группы содержат циклы, образовавшиеся с помощью амидных связей обычным путем. Гетеродетные пептиды содержат циклы, включающие как амидные, так и иные содержащие гетероатомы связи. Эти пептиды будут рассмотрены в следующем разделе.

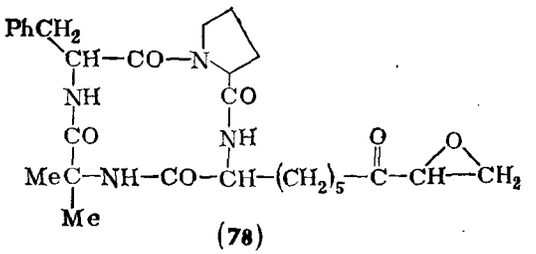
По причинам, уже изложенным, наиболее простые гомодетные пептиды — диоксопиперазины — были рассмотрены в предыдущем разделе. Многие из высших гомодетных пептидов хорошо известны в связи с их биологической значимостью как антибиотиков, токсинов и регуляторов транспорта ионов. Достигнут существенный прогресс в химии циклопептидов, касающийся структуры, синтеза и функции. Наличие тех или иных нетипичных особенностей, связанных с присутствием определенных остатков аминокислот, наблюдающееся как в циклических, так и в линейных дипептидах, выражено четко, и эти данные, так же как и рассмотренные выше вопросы, нашли свое отражение в обзорах [113].

Далее, в силу возрастающего применения физических методов, особенно рентгеноструктурных исследований, ЯМР- и оптической (дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм) спектроскопии, акценты были сдвинуты к проблемам топологии этих важных молекул и ее связи с их биологической функцией [114—116]. Другой, в равной мере важной причиной этого сдвига, была высокая степень жесткости циклопептидов по сравнению с их линейными аналогами, что снижало число связанных взаимопревращениями форм и в определенной мере облегчало анализ. Тем не менее эти пептиды все еще в какой-то мере сохраняют гибкость, и часто конформация в кристаллическом состоянии отличается от конформации в растворе. Подробное обсуждение конформаций выходит за рамки этого обзора, но приводятся узловые моменты, касающиеся химических или биологических свойств молекул.

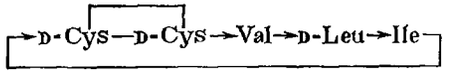
Насколько известно автору, не выделено циклических гомодетных трипептидов и лишь немногие природные тетрапептиды полностью охарактеризованы. Относительно последовательности аминокислот в тентоксине (77) — фитотоксине грибов — имелись противоречивые данные, до тех пор пока не было проведено рентгеноструктурное исследование его дегидропроизводного [117]. Восстановление дидегидрофенилаланинового остатка приводит к стереоспецифичному образованию *D*-изомера *N*-метилфенилаланина, и оба остатка *N*-метиламинокислот принимают в кристаллической решетке дигидротентоксина конформацию, соответствующую *цис*-пептидным связям. Имеются также дополнительные данные как кристаллографические, так и результаты исследования растворов, что пролин и *N*-метиламинокислоты в циклических пептидах часто принимают *цис*-расположение амидных связей, и на этом основании строится взаимосвязь структуры и функции микробных пептидов. Преимущество *цис*-расположения амидных связей, особенно в коротких пептидах, состоит в значительном уменьшении напряжения кольца, достигаемого при этом. В связи с этим удивительно, что дигидропроизводное хламодоцина (78) — циклического тетрапептида с высоким цитостатическим действием — существует по данным рентгеновского анализа в *транс*-конформации по всем пептидным связям [118]. Такая структура — первая среди всех известных природных или синтетических циклотетрапептидов, причем каждая из пептидных единиц существенно отличается от плоскорасположенной. Другой интересной особенностью этой молекулы является наличие в ней остатков ранее не найденных *L*-α-аминодекановой кислоты и α-метилаланина, редко встречающихся в небольших пептидах.



(77)



(78)



(79)

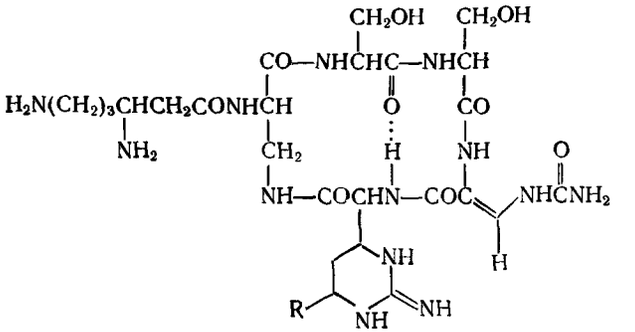
Малоформины, семейство микотоксинов — циклических пентапептидов — получили свое название в связи с их вредным влиянием на прорастание бобовых. Эти токсины были выделены около 20 лет назад и многосторонне изучались. Первоначально предложенная для главного компонента — малоформина А, структура была пересмотрена, в результате чего была предложена альтернативная структура (**79**), которая и была подтверждена синтезом [119]. Этот и подобные ему примеры являются поучительным уроком для всех работающих в области природных соединений химиков, демонстрирующим, что установление структуры небольших пептидов является животрепещущей проблемой, которую не всегда можно разрешить только с помощью спектроскопических методов с минимальным применением химических методов.

Представители семейств виомицина [120], туберактиномицина [121] и капреомицина [122] получили лишь ограниченное клиническое применение для лечения туберкулеза, но они принадлежат к особенно интересной группе в том смысле, что все они — циклические пентапептиды с примечательными структурными, конформационными, а также биосинтетическими особенностями. Они имеют обычный пентапептидный скелет, в который входят модифицированный разным путем остаток аргинина, ранее найденный в эластинале (**26**), единственный в своем роде уреид дидегидросерина, и две молекулы *L*-диаминопропионовой кислоты. Циклическая система гомодетна, но содержит амидную связь, включающую β-аминогруппу одной из диаминопропионовой кислот. Они отличаются по месту присоединения β-лизинового бокового остатка; в случае производных виомицина и туберактиномицина (**80**) это α-аминогруппа одной из диаминопропионовых кислот, а в случае капреомицина (**81**) — β-аминогруппа другой диаминопропионовой кислоты.

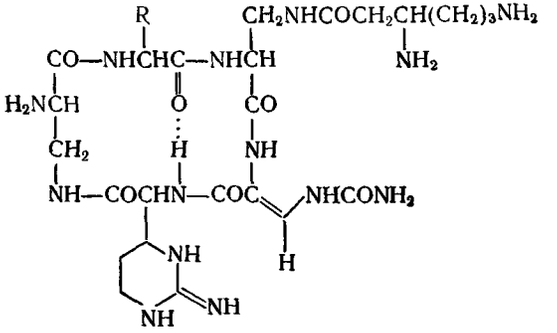
Исследование пищеварения показало, что основные гуанидиновые аминокислоты и β-лизин образуются из аргинина и лизина соответственно [123]. β-Лизин встречается лишь в еще одной группе пептидных антибиотиков, гликопептидах, принадлежащих к



группе стрептотрицина, и считается, что они образуются непосредственно из лизина под действием фермента изомеразы, кофактором которой является 5′-дезоксиаденозилкобаламин (витамин $B_{12}$).



(**80**) туберактиномицин О, R = H; виомицин, R = OH

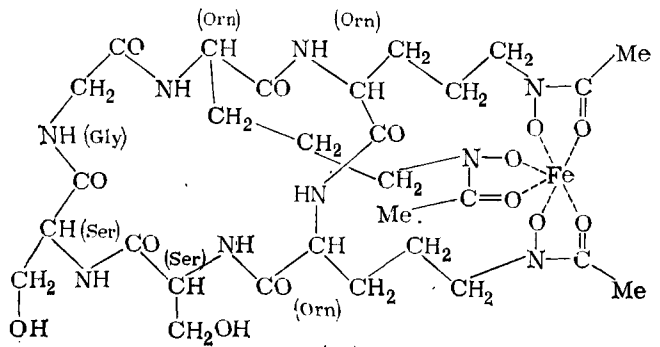


(**81**) капреомицин IA, R = $CH_2OH$; капреомицин IB, R = Me

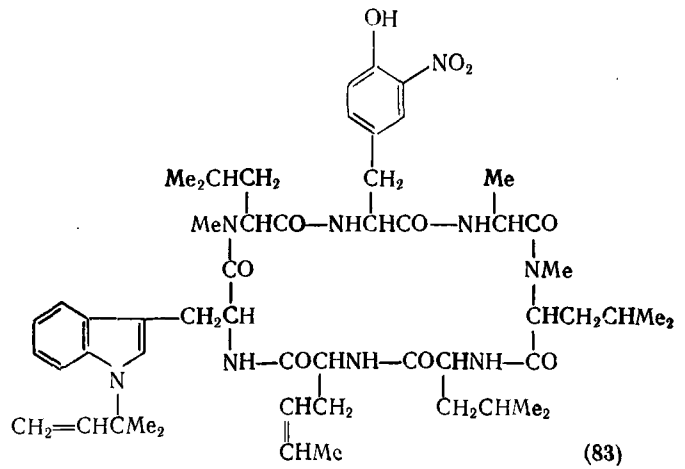
На примере пептидов, состоящих только из *L*-аминокислот, и по данным кристаллографического анализа виомицина и туберактиномицина О видно, что все их амидные группировки имеют *транс*-геометрию. Другой важной особенностью, выявленной рентгеноструктурными исследованиями и затем подтвержденной изучением этих соединений в растворе, является наличие хелатного кольца, стабилизованного водородной связью, конформация которого подобна β-витку, типичному для многих других циклических пептидов (см. ниже). В соединениях семейства виомицина угловое положение в β-витке занято остатками *L*-серина и уреида дидегидросерина.

Наиболее изученный ряд циклических гексапептидов составляют железосодержащие метаболиты класса сидерохромов. Эта тема отражена в обзорах [124, 125], ниже рассмотрены лишь основные данные по структуре и свойствам. Феррихром (**82**) был впервые выделен ≈25 лет назад, и показано, что он является важным фактором микробного роста. Впоследствии были выделены родственные соединения, и найдено, что не содержащие металлов

пептиды продуцировались с высоким выходом в тех случаях, когда организмы выращивались в не содержащей железа среде. На основании этого и других фактов выдвинуто предположение, что эти соединения действуют в аэробных микроорганизмах как агенты клеточного переноса железа. Место, связывающее железо, образовано тремя остатками ацилированного *N*-гидроксиорнитина, включенными в циклический гексапептид. Остающиеся аминокислоты — это глицин или серин, а ацетильная группа может быть заменена на *транс*-5-гидрокси-3-метилпентен-2-оильную группу [126]. Удаление иона металла снимает ограничения, накладываемые на боковую группу остатков орнитина, что основательно увеличивает суммарную гибкость циклического пептида [127]. Свободные от металла пептиды рассматриваются как феррихромы без железа; они способны также к образованию комплексов с другими металлами. Так, взаимодействие с $Al^{3+}$ или $Ga^{3+}$ приводит к алюмихромам и галлихромам соответственно [128].



(82)



(83)

Рентгеноструктурное исследование циклического гексапептида иламицина B (83) согласуется со структурой, предложенной ранее на основании химических исследований. В ранних исследованиях в пептидах с большими кольцами не находили остатков изопренилированного триптофана; остаток 1-(1,1-диметилаллил)триптофана уникален для этого класса пептидных антибиотиков. Конформация в кристаллическом состоянии также указывает на *цис*-расположение амидных связей остатков *N*-метиламинокислот [129]. Другой также интересной структурной особенностью этих веществ является то, что карбонильная группа нитротирозинового остатка одновременно участвует в двух внутримолекулярных водородных связях. Спектральные данные указывают на сохранение этих свойств соединений и в растворе.

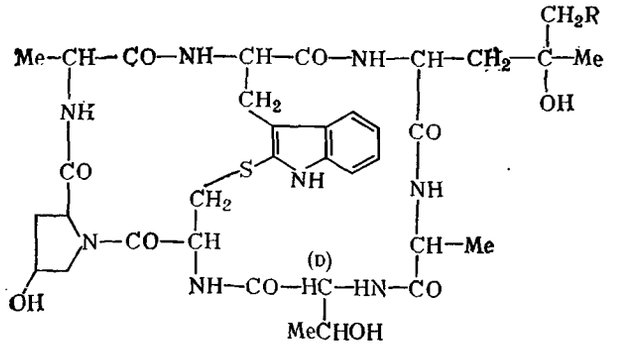
Смертельно ядовитый зеленый гриб *Amanita phalloides* иногда называют «шляпкой смерти»; по внешнему виду и вкусу он похож на съедобный гриб, что и является обычной причиной отравлений. Химические и биологические свойства исследовались почти непрерывно в течение последних 45 лет, и эти усилия увенчались выделением и установлением строения основных компонентов [130, 131]. Эти компоненты подразделяются на две группы, а именно фаллотоксины и аматоксины.

Фаллотоксины — это циклические гептапептиды, соединенные мостиками боковых цепей остатков триптофана и цистеина; общий для этих соединений скелет показан в (**84**). За исключением указанных остатков все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию. Аматоксины (**85**) имеют цикл большего размера (октапептиды) с мостиковым атомом серы, окисленным до сульфоксидной группировки, и гидроксильный заместитель в положении 6 индольного ядра. Все токсины аманита содержат γ-гидроксилированные аминокислоты, что является условием их токсичности.

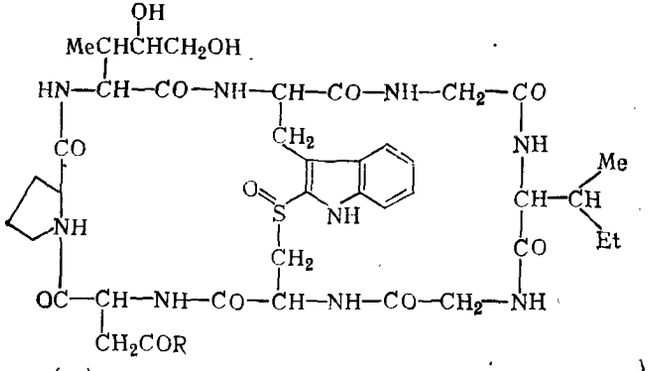
Несмотря на сходство структур, эти две группы токсинов действуют по-разному. Фаллоидин повреждает мембраны клеток печени, выделяя ионы калия и некоторые ферменты. Аманитины действуют более специфично, прочно связывая РНК-полимеразу, и поэтому они широко используются в биохимических исследованиях [132]. Спектроскопические исследования позволили установить, что бициклическая система в этих токсинах жестка [133], однако до сих пор не выявлена корреляция между структурой и токсическим действием.

Значительный интерес привлек циклический декапептид — антаманид (**86**), продуцируемый в небольших количествах *Amanita phalloides* [134] и удивительным образом противодействующий летальному действию токсинов этого гриба. Полагают, что действие антитоксина заключается в предотвращении накопления токсина в клетках печени.

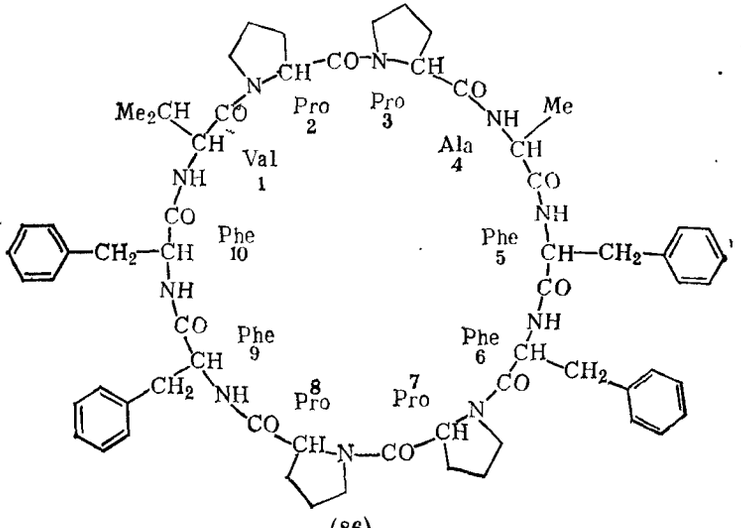
Все аминокислоты соединения обладают *L*-конфигурацией, и имеются серьезные доводы в пользу того, что в растворе существует сложное конформационное равновесие, включающее по меньшей мере четыре различных формы [115, 135, 136]. Антаманид представляет собой ионофор и образует комплексы с ионами ще-



(84) фаллоидин, R= OH; фаллоин, R= H



(85) α-аманитин, R=$NH_2$; β-аманитин, R=OH



(86)



лочных металлов; наиболее устойчивы комплексы с $Na^+$ и $Ca^{2+}$ [137]. Считается, что комплексы принимают обычную седлообразную конформацию с *цис*-конфигурацией амидной связи пролин-пролин. Катион взаимодействует с четырьмя амидными карбонильными кислородами, расположенными приблизительно в вершинах квадрата. Кристаллическая структура комплекса антаманида с $Li^+$ и ацетонитрилом [138] показана на рис. 23.4.1. Сольватирующая молекула ацетонитрила также связана с центральным атомом лития, и топология всей системы контролируется далее

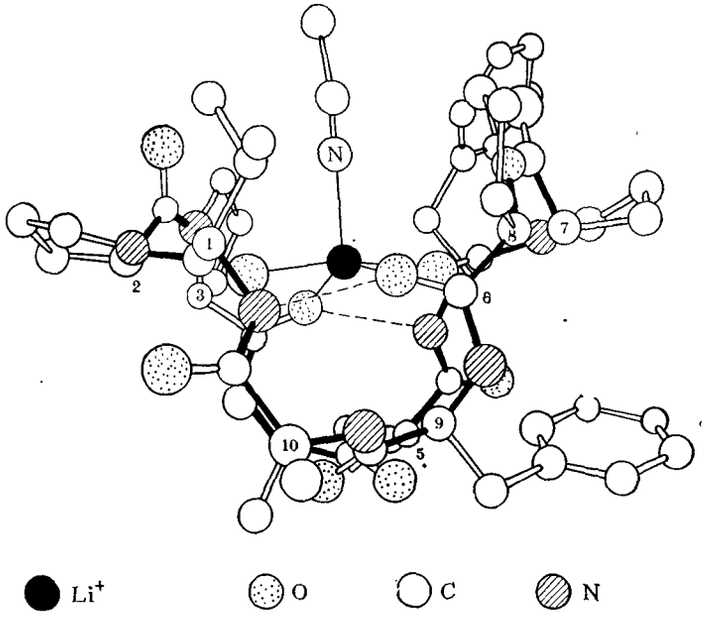


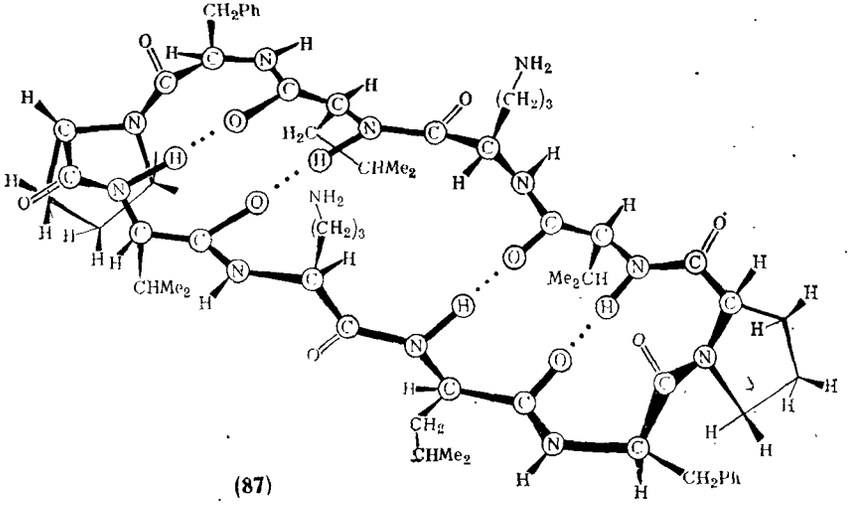

**Рис. 23.4.1. Структура комплекса антаманида с $Li^+$ и ацетонитрила (в кристаллах).**

Номера остатков аминокислот соответствуют указанным в (86).

трансаннулярными водородными связями. Селективность к иону определяется размером углубления и природой амидных лигандов. Все полярные группировки комплекса обращены внутрь, тогда как внешняя поверхность состоит из гидрофобных боковых групп.

Грамицидин С и тироцидиновые антибиотики стали моделями для многих углубленных и новаторских исследований конформации пептидов [115, 139]. Их относительно простые структуры и высокая биологическая активность обеспечивали широкое поле деятельности для изучения связи между структурой и активностью. Хотя грамицидин С существует как в растворе, так и в кристаллическом

состоянии в виде одного преимущественного конформера, предложено несколько структур с различной топологией для этого соединения. В данном случае значимость кристаллографических и спектральных доказательств явно отстает от ранее предложенных моделей, рассматриваемых как «структура сложенного листа» (87) [140]. Другой важной конформационной особенностью рассматриваемого соединения является присутствие двух β-витков или петель, типичных для многих циклических пептидов. Угловые положения в β-витках заняты остатками *D*-феиилаланина и *L*-пролина, и учет энергий соответствующих конформаций согласуется с констатированной устойчивостью таких систем [114—116]. Подобные выводы сделаны и для семейства тироцидина.



(87)

Крайне жесткие конформации этих молекул сохраняются и в растворе, по-видимому, благодаря сильным внутримолекулярным водородным связям. Вполне вероятно, что подобные межмолекулярные водородные связи между двумя одинаковыми пентапептидными цепями могут в определенной степени контролировать процесс циклизации во время биосинтеза этих антибиотиков {см. схему (3)}. Компактное складывание и жесткая природа этих молекул препятствуют образованию каких-либо молекулярных углублений, и поэтому не наблюдается какой-либо склонности к комплексованию с щелочными металлами. Это резко отличает исследуемые соединения от родственного циклического декапептида антаманида и в то же время иллюстрирует, как относительно небольшие изменения структуры вызывают небольшие конформационные изменения, влияющие на ионофорную и антибактериальную активности.



### 23.4.2.4. Циклические гетеродетные пептиды (депсипептиды)

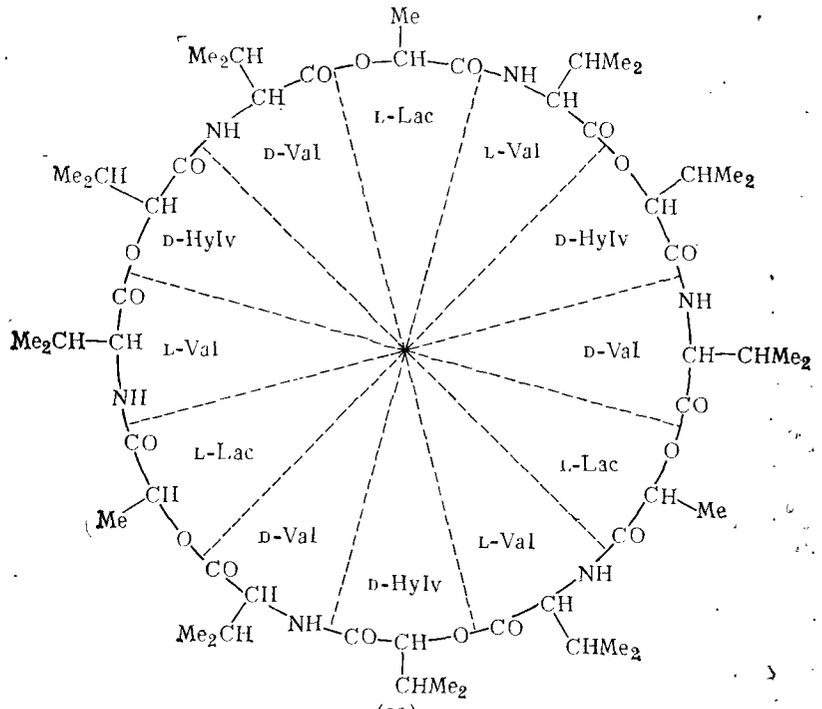
Циклические пептиды, в которых одна или более пептидных связей заменены на эфирные связи, становятся депсипептидами; и они составляют наиболее многочисленное семейство гетеродетных пептидов. Оба эти термина считаются синонимами.

Ранние, вплоть до 1970 г., данные по этим пептидным лактонам рассмотрены в обширном обзоре [141], более поздние достижения прекрасно отражены в авторитетном обзоре, написанном советскими исследователями [142], много сделавшими в этой области.

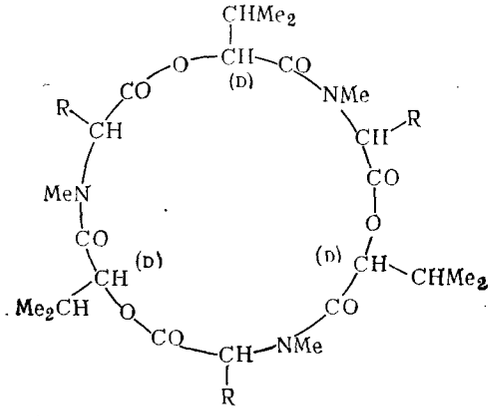
Вообще говоря, циклические депсипептиды можно разделить на две большие группы, а именно группу с регулярно чередующимися пептидными и сложноэфирными связями и группу с нерегулярным внедрением сложноэфирных связей. Валиномицин (88), энниатины (89) и боверицин (90), большинство которых было охарактеризовано еще 25 лет назад, принадлежат к первой группе. Сделанное в середине 60-х годов наблюдение о том, что валиномицин и родственные соединения обладают единственными в своем роде избирательными возможностями транспорта ионов, возобновило интерес к этим соединениям, отнесенным на этом основании к ионофорам. Эти пептиды образуют имеющие важное биологическое значение липидорастворимые комплексы с полярными катионами, такими как $K^+$, $Na^+$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, а также с биогенными аминами. Многообразные физические исследования указывают на то, что кинетика образования и распада комплекса и скорости диффузии ионофоров и их комплексов через липидные барьеры настолько благоприятны, что их транспорт через биологические и искусственные мембраны достигает в некоторых случаях величин, превосходящих соответствующие величины для ферментных систем. Биологические применения ионофоров, среди которых имеются полиэфиры и синтетические соединения, всесторонне рассмотрены в обзорах [142, 143].

Валиномицин со своим 36-членным циклом обладает прекрасными конформационными возможностями. Из спектральных данных следует, что валиномицин существует в виде равновесной смеси трех основных конформеров. Соотношение конформеров в смеси зависит от растворителя и температуры. Кристаллографические данные о двух различных модификациях [144, 145] указывают на небольшие различия в конформации кольца, напоминающие предполагаемый конформер в неполярном растворителе.

Известно, что в неполярных растворителях валиномицин образует более или менее устойчивые комплексы с $K^+$, $Rb^+$ и $Cs^+$. Комплекс с $K^+$ значительно устойчивее, чем комплекс с $Na^+$, и избирательность комплексования калий/натрий выше, чем для какого-либо другого ионофора. Существующая в кристалле конформация валиномицина [145] и его комплекса с ионом калия [146], а также




(88)




(89) R= CHMeEt (A); $CHMe_2$ (B); $CH_2CHMe_2$

(90) R= $CH_2Ph$

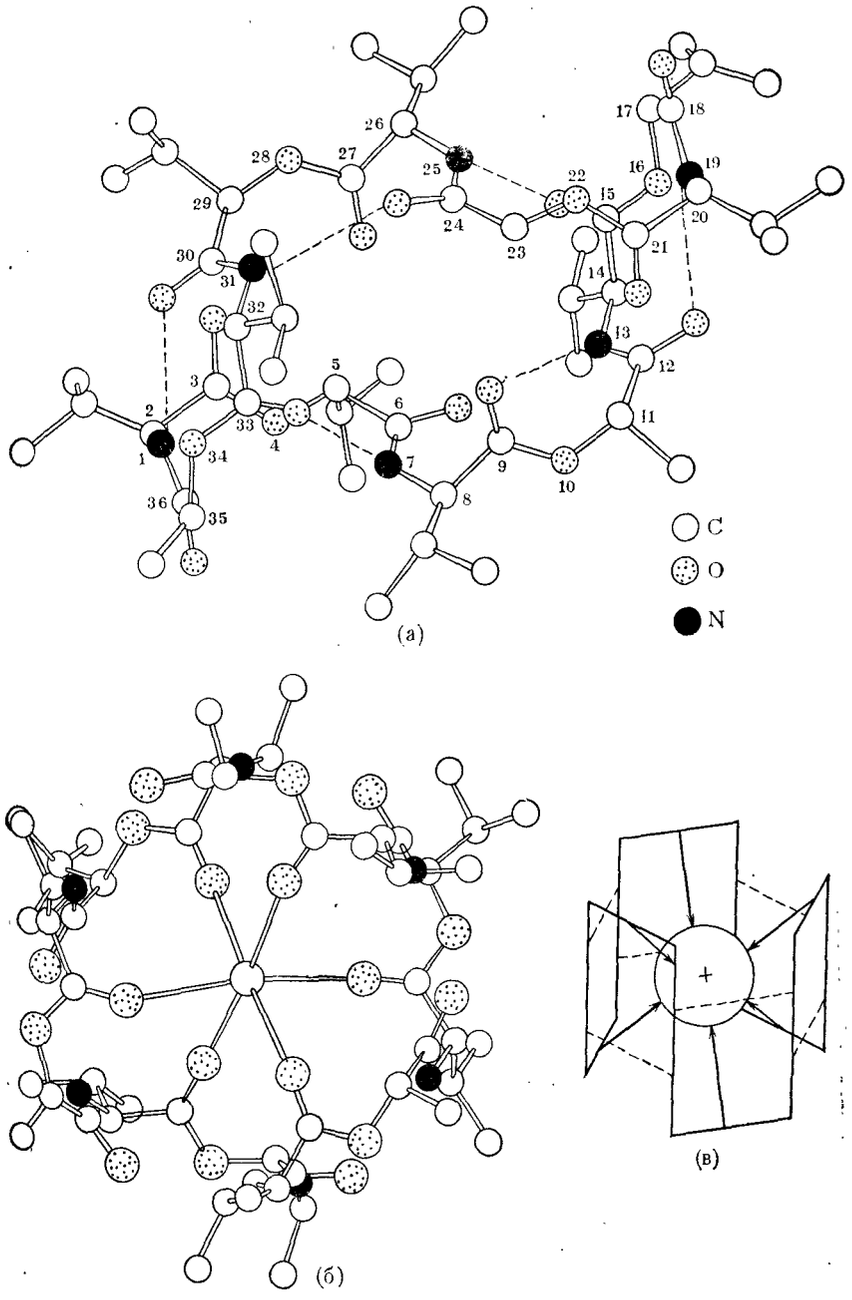
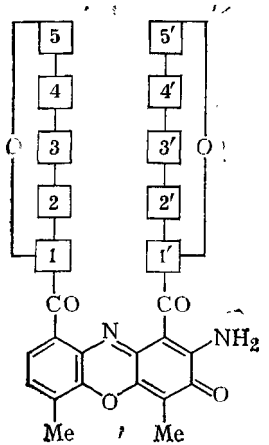



Рис. 23.4.2. Конформации (в кристаллах) некомплексованного валиномицина (а), его комплекса с $K^+$ (б) и общая архитектоника комплекса с $K^+$ (в) [145].

диаграммная интерпретация общего расположения, возникающего при связывании калия, показаны на рис. 23.4.2. Шесть стрелок на рис. 23.4.2 (в) символизируют сложноэфирные карбонилы, ориентированные внутрь к иону калия, а также связывание несольватированного катиона в полости. Пунктиром обозначены водородные связи β-витка (между группами NH и CO), стабилизующие так называемый браслетный скелет молекулы как в комплексном, так и в некомплексном виде. Липофильные группы находятся на внешней поверхности комплекса, что облегчает растворимость системы в неполярных растворителях.

Комплексы валиномицина с $Rb^+$ и $Cs^+$ в основном построены так же, но для того чтобы эти ионы поместились в углублении, происходят небольшие конформационные изменения. С другой стороны, сходные изменения не могут обеспечить создание углубления для ионов меньшего размера, в частности $Na^+$, и этот катион не может в полной мере взаимодействовать с комплексующими его сложноэфирными карбонилами. Подобные обширные исследования, предпринятые в рамках общей программы исследования пептидных ионофоров, проведены с энниатинами, боверицином и их комплексами [115, 142].

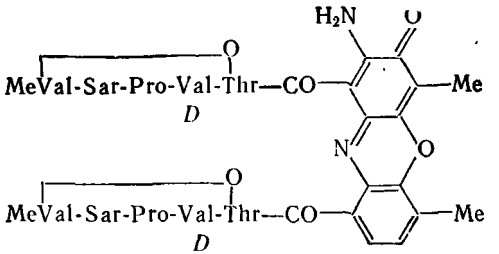
Наиболее исчерпывающее исследование депсипептидов, принадлежащих ко второй категории, — это несомненно изучение актиномицинов. Надежно установлена общая структура соединений этой группы (**91**) и четко охарактеризовано значительное количество ее представителей, в основном продуцируемых видом *Streptomyces* [147, 148]. Чаще всего при этом выделяли актиномицин D (**92**), в котором имеются два одинаковых по структуре пептидных цикла. Метаболиты этого типа относятся к *изо*-ряду, в случае же колец различной пептидной структуры соответствующие пептиды относятся к *анизо*-ряду.




(91)

1,1′=Thr или MeThr
2,2′=D-Val или D-Leu
3,3′=Pro, 5-метил-4-оксопролин, 4-*алло*-гидрокси-5-метилпролин, *цис*-5-метилпролин, пипеколовая кислота, 4-оксопипеколовая кислота или 4-гидроксипипеколовая кислота
4,4′=Sar или Gly
5,5′=MeVal, MeIle, или MeAla






(92)

Широкий набор аминокислот, представленный в пептидных остатках, отражает относительно низкую специфичность биосинтеза. Это обстоятельство может быть использовано для достижения более высоких выходов получаемых при этом специфических антибиотиков путем введения в организм соответствующих аминокислот. Например, соединения, содержащие азетидин-2-карбоновую кислоту вместо пролина или пипеколиновой кислоты, продуцируются, если организму поставлять постороннюю для него азетидин-2-карбоновую кислоту [149].

Диапазон применения этой формы направленного биосинтеза существенно варьирует и зависит как от пептида, так и от организма. Тем не менее этот путь открывает интересный метод получения новых антибиотиков определенной серии; метод можно использовать и в бесклеточной системе {см. схему (3)}. Предполагаемый путь биосинтеза феноксазонового ядра актиномицинов показан на схеме (7) [41—43] (см. также разд. 30.3.5).

Актиномицины являются мощными ингибиторами ДНК-зависимого синтеза РНК, т. е. ступени транскрипции в биосинтезе белка {см. схему (1)} и служат мощным биохимическим средством. Актиномицин D нашел также ограниченное применение в клинике для лечения некоторых видов опухолей. Его действие включает образование высокоустойчивых комплексов с ДНК, что препятствует этой кислоте проявлять свое биологическое действие. В связи с этим были приложены значительные усилия по исследованию конформаций этих молекул как в кристаллическом состоянии, так и в растворе [115, 150]. Общепринятая схема взаимодействия двойной спирали ДНК с актиномицином основана на данных рентгеноструктурного исследования кристаллического комплекса, содержащего актиномицин и дезоксигуанозин (рис. 23.4.3) [151]. По этой схеме феноксазоновый хромофор внедряется между соседними парами оснований G-C ДНК, где остатки гуанина принадлежат различным цепям ДНК, и две аминогруппы остатков гуанина образуют специфические водородные связи с обоими циклическими пептидами, находящимися в узком желобе спирали. Эта модель согласуется с известными данными и представляет собой важное достижение в молекулярной биологии.

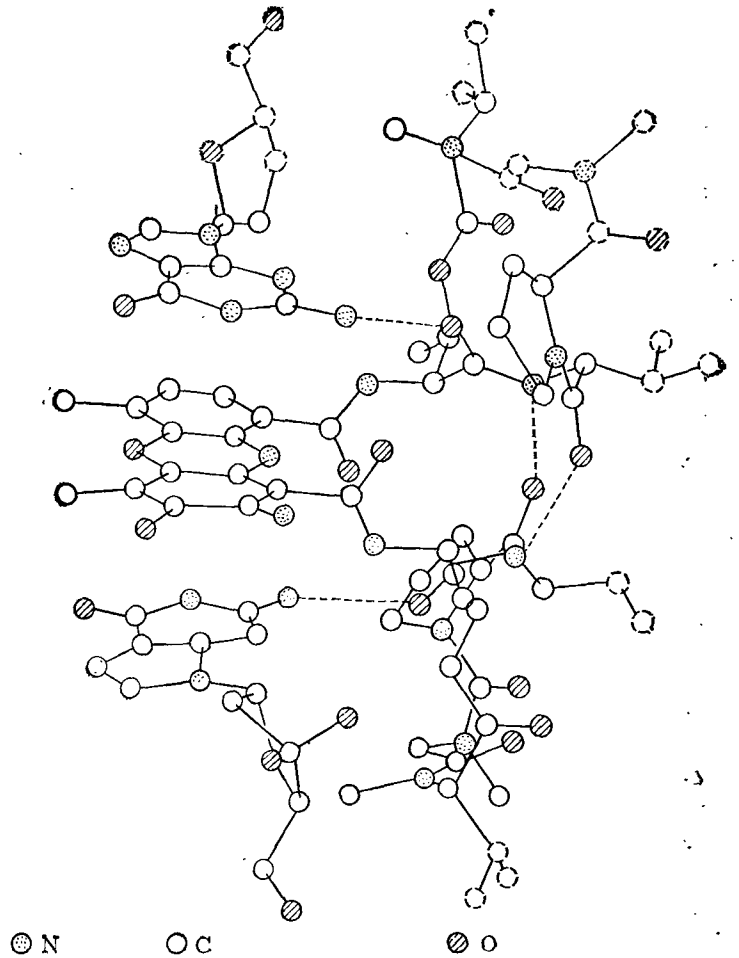
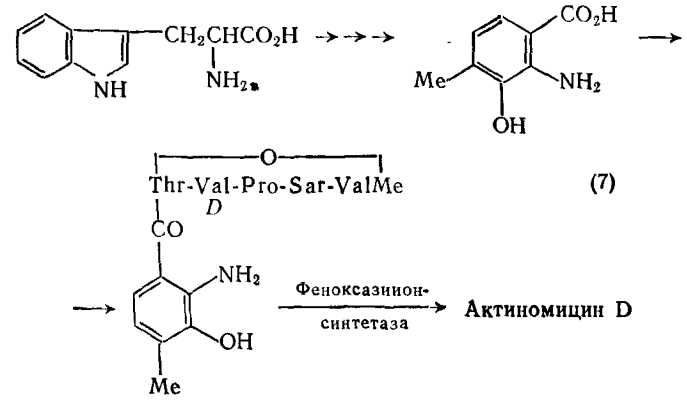


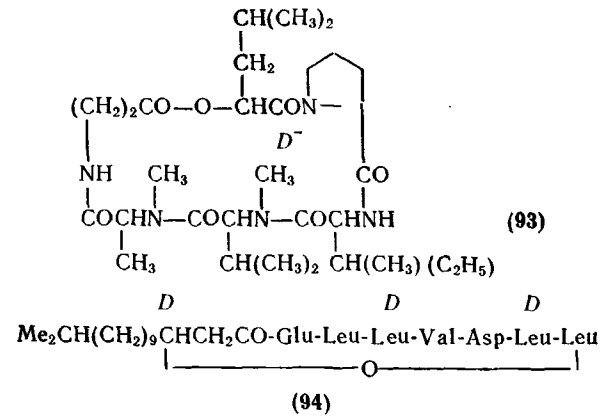

Рис. 23.4.3. Комплекс актиномицина с дезоксигуанозином [151].

Идентифицирован и широкий спектр других циклических депсипептидов с многими нетипичными свойствами, как отмечалось в предыдущих разделах, обладающих широким диапазоном биологической активности. Эти соединения исчерпывающе рассмотрены в обзоре [142], и поэтому мы ограничимся здесь лишь иллюстрацией структурных типов и свойств. Так, деструксин (**93**), выделенный из *Aspergillus ochraceas* [152], является представителем группы пептидов с интересными инсектицидными свойствами. Сурфактин (**94**) представляет собой микробный антикоагулянт, содержащий исключительно *L*-аминокислоты [153], в то время как в антибиотике стендомицине (**95**) имеется значительное число остатков



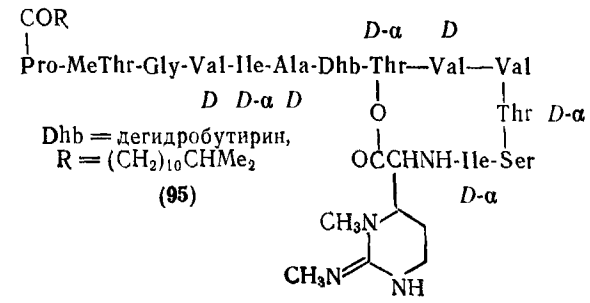
*D*-аминокислот, а также модифицированных гуанидинсодержащих аминокислот [154] {ср. (**26**), (**80**) и (**81**)}.

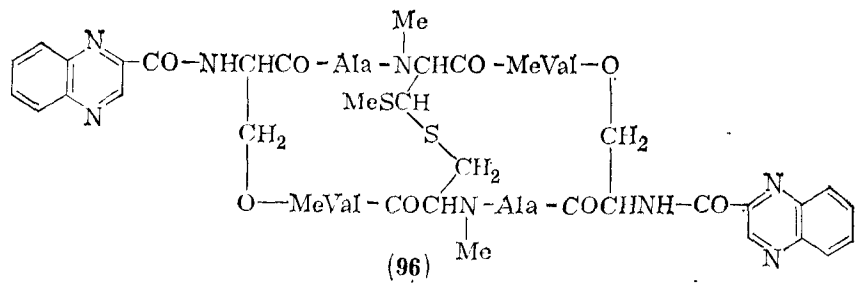



(**94**)

Интересна новая группа антибиотиков, представителем которой является эхиномицин (**96**). Эти соединения взаимодействуют с ДНК аналогично актиномицину, и следует отметить, что они обладают тем же видом псевдосимметрии пептидного кольца [155].



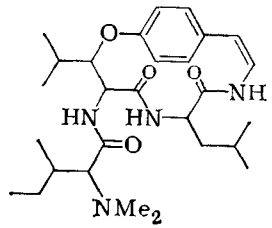


(96)

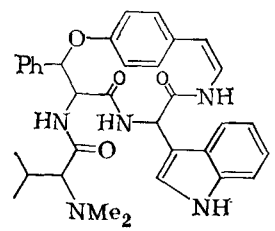
### 23.4.2.5. Циклопептидные алкалоиды

Хотя пептиды этой группы и являются, строго говоря, гетеродетными, но они столь близки между собой, что их удобно рассматривать в отдельном разделе как пептидные алкалоиды. Они были выделены в основном из растений семейства Rhamnaceae, и поскольку число установленных для этих пептидов структур составляет около 60, оказалось возможным приступить к установлению определенных хемотаксономических отношений между ними.

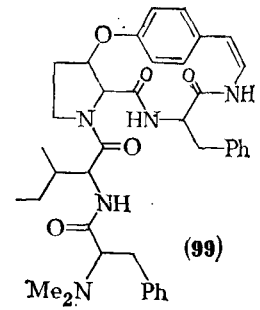
По структуре они могут быть разделены на три определенных класса, основываясь либо на количестве атомов в цикле, соответственно 13, 14 и 15, либо на том, как включается в цикл обычная гидроксистириламиногруппировка. Наиболее многочисленная группа соединений, содержащих 14-членный цикл и *n*-гидроксистириламиногруппу, далее подразделяется на типы франгаланина (**97**), интегеррина (**98**) и амфибина-В (**99**).



(97)



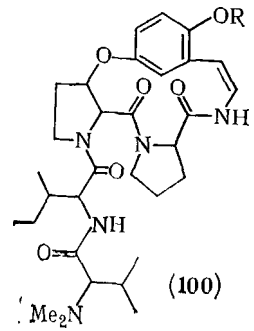
(98)



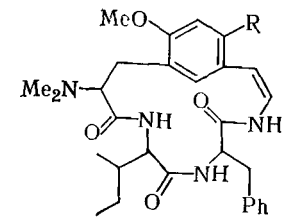
(99)

Менее обширные классы соединений с 13- и 15-членными циклами представлены типами зизифина-А (**100**) и мукронина-А (**101**). Химия, структурные данные и распределение этих растительных продуктов в природе рассмотрены в обзоре [156].

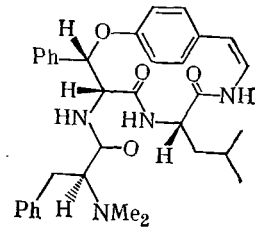
Наряду с уникальной гидроксистириламиногруппой все эти алкалоиды обладают концевым остатком *N*-диметиламинокислоты, которая редко встречается в микробных пептидах. Аминокислоты циклопептидов в основном имеют *L*-конфигурацию, хотя скрутиаиин-Е (**102**), по-видимому, представляет исключение, поскольку содержит остаток новой *D*-аминокислоты, а именно трео-β-фенилсерина. Поскольку о биосинтезе этих пептидов пока ничего не известно, следует с интересом ожидать достижений в этой области, чтобы сравнить продуцирование нетипичных пептидов в растениях и в микроорганизмах. Учитывая значительное структурное многообразие микробных пептидов, становится удивительным наличие лишь одной группы растительных пептидов, а именно циклопептидных алкалоидов. Поскольку эти соединения являются основаниями и первоначально были выделены как алкалоиды, возможно, что такое положение является на самом деле искаженной картиной распределения нетипичных пептидов в растительном мире, и более тщательное исследование растительного материала поможет найти другие типы пептидов.



(100)



(101)

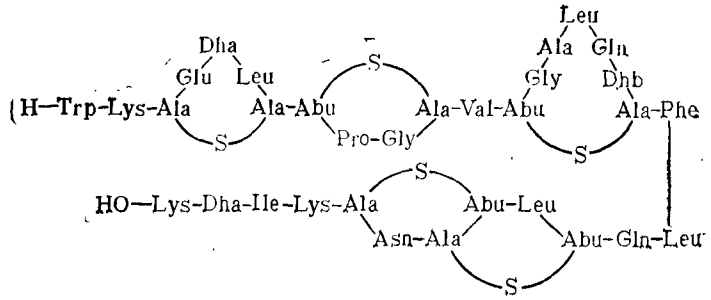


(102)

### 23.4.2.6. Крупные модифицированные пептиды

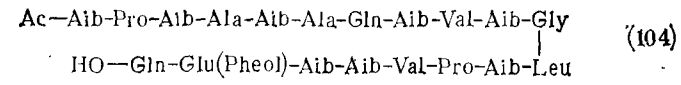
Усовершенствование процессов выделения и методов установления строения позволили охарактеризовать модифицированные микробные пептиды, которые по своему размеру лежат непосредственно между классическими природными продуктами и биомакромолекулами. В общем случае эти метаболиты включают те же типы структурных модификаций, что и пептиды, рассмотренные в предыдущих разделах, но в связи с их сложностью они заслуживают отдельного рассмотрения.

В результате обширных исследований антибиотику субтилину, выделенному из *Bacillus subtilis*, приписана структура (**103**) [157]. Молекула состоит из остатков 32 аминокислот, восемь из которых, а именно четыре остатка 3-метиллантионина, два дегидроаланина, а также остатки дегидро-α-аминомасляной кислоты и лантионина не найдены в природе. Остатки аланина, лантионина, четырех аминомасляных кислот и 3-метиллантионина имеют *D*-конфигурацию. Новый тиоэфирный мостик возникает, вероятно, в результате внутримолекулярного присоединения тиольной группировки цистеина к остатку дегидроаланина или дегидробутирина, получающегося, в свою очередь, в результате дегидратации серина и треонина соответственно.




(103)

Dha– остаток дегидроаланина
Dhb– „ дегидробутирина
Ala—S—Ala-остаток лантионина
Abu—S—Ala- „ метиллантионина




(104)

Aib– остаток α-аминоизомасляной кислоты
Pheol– „ фенилаланинола

Отсюда возникает интересное предположение, что предшественником субтилина может быть линейный пептид, получающийся исключительно из обычных аминокислот и построенный под рибосомальным контролем. Имеются доказательства, что биосинтез близкого пептида низина [158] может протекать по рибосомному плану [159]. Заманчивой представляется возможность выделения и идентификации в будущем низкомолекулярных пептидов с посттрансляционной модификацией.

Линейный осуществляющий транспорт ионов пептид аламетицин (**104**) меньше субтилина, и следует отметить, что это обстоятельство, возможно, связано с присутствием значительного числа остатков α-метилаланина.

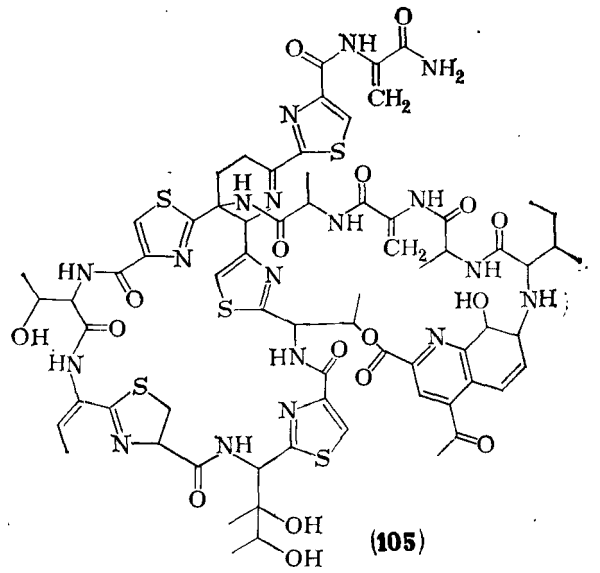
Дополнительным является также остаток β-фенилаланинола, связанный с остатком γ-карбоксиглутаминовой кислоты [160].

В силу сложности структура тиострептона (**105**) смогла быть установленной только с помощью рентгеноструктурного анализа, позволившего выявить ряд модифицированных остатков, найденных ранее в менее сложных метаболитах [161].

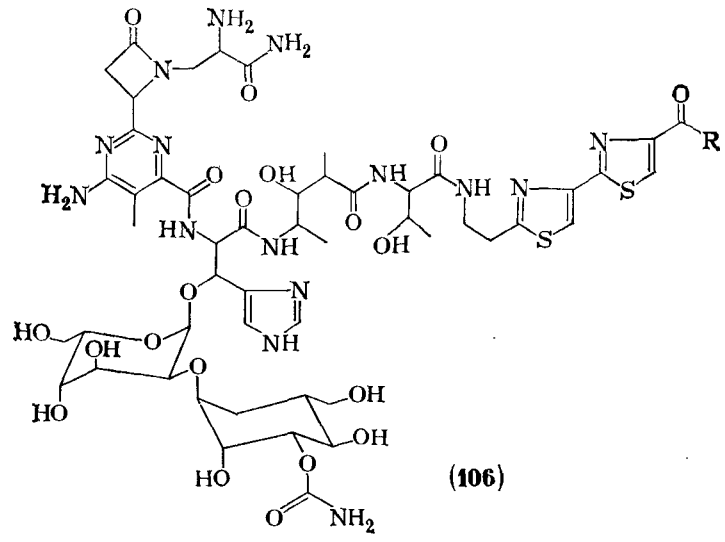
Среди позднее охарактеризованных пептидов, родственных тиострептону, отметим сиомицин [162], носигептид [163] и бернинамицин [164].

Следует в заключение отметить, что целый ряд природных соединений, образуемых за счет взаимодействия пептидов с продук-





(105)



(106)

тами других метаболитических процессов, не включены в настоящий обзор. Они часто имеют совсем иные структуры, неожиданную биологическую активность, обладают многими нетипичными свойствами, которые уже были рассмотрены. Многие из таких наблюдений касаются и противоопухолевых гликопептидов семейства блеомицина (**106**) [165].

## ЛИТЕРАТУРА


1. *M. O. Dayhoff*, «Atlas of Protein Sequence and Structure», Biochemical Research Foundation, Bethesda, 1972, vol. 5 и последующие публикации.
2. *W. Rüger*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1972, **11**, 883.
3. *H. F. Lodish*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 39.
4. *R. B. Loftfield and D. Vanderjagt*, Biochem. J., 1972, **128**, 1353.
5. *V. du Vigneaud, D. T. Gish, and P. Katsoyannis*, J. Amer. Chem. Soc., 1954, **76**, 4751.
6. *R. Acher*, in «Molecular Evolution», ed. E. Schoffeniels, North-Holland, Amsterdam, 1971, vol. II, p. 43.
7. *W. H. Sawyer and M. Manning*, Ann. Rev. Pharmacol., 1973, **13**, 5.
8. *M. Zaoral, J. Kolc, and F. Sorm*, Coll. Czech. Chem. Comm., 1967, **32**, 1250.
9. *S. A. Berson and R. S. Yalow*, «Peptide Hormones», North-Holland, Amsterdam, 1973.
10. *H. S. Tager and D. F. Steiner*, Ann. Rev. Biochem., 1974, **43**, 509.
11. *W. R. Butt*, «Hormone Chemistry», Wiley, New York, 1975.
12. *F. Sanger*, Chem. and Ind. (London), 1959, 104.
13. *H. Zahn*, Naturwiss., 1967, **54**, 396.
14. *D. J. Schafer and M. Szelke*, in «Specialist Periodical Reports, Amino-acids Peptides, and Proteins», The Chemical Society, London, 1976, vol. 8, p. 338.
15. *M. I. Grossman*, Nature, 1970, **228**, 1147.
16. *J. S. Morley*, Fed. Proc., 1968, **27**, 1314.
17. *J. T. Potts Jr., H. T. Keutmann, H. D. Niall, and G. W. Tregear*, Vitamins and Hormones, 1971, **29**, 41.
18. *P. Rivaille and G. Milhaud*, Helv. Chim. Acta, 1972, **55**, 1617.
19. *K. Folkers, N.-G. Johansson, F. Hooper, B. Currie, H. Sievertsson, J.-K. Chang, and C. Y. Bowers*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1973, **12**, 255.
20. *R. Burgus, T. F. Dunn, D. Desiderio, and R. Guillemin*, Compt. rend. (D), 1969, **269**, 1870.
21. *C. Y. Bowers, A. V. Schally, F. Enzmann, J. Boler, and K. Folkers*, Endocrinology, 1970, **86**, 1143.
22. *H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura, and A. V. Schally*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, **43**, 1334.
23. *R. Burgus, M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale, and R. Guillemin*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1972, **69**, 278.
24. *P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, and R. Guillemin*, Science, 1973, **179**, 77.
25. *J. Rivier, P. Brazeau, W. Vale, N. Ling, R. Burgus, C. Gilon, J. Yardley, and R. Guillemin*, Compt. Rend. (D), 1973, **276**, 2737.
26. *M. Mituck and S. Reichlin*, Endocrinology, 1972, **91**, 1145.
27. «Angiotensin», ed. I. H. Page and F. M. Bumpus, Springer-Verlag, Berlin, 1974.
28. *M. Rocha e Silva*, Life Sci., 1974, **15**, 7.
29. *V. Erspamer*, Ann. Rev. Pharmacol., 1971, **11**, 327.
30. *A. Anastasi, V. Erspamer, and J. M. Cei*, Arch. Biochem. Biophys., 1964, **108**, 341.
31. *A. Anastasi, V. Erspamer, and R. Endean*, Arch. Biochem. Biophys., 1968, **125**, 57.
32. *T. Nakajima, T. Tanimura, and J. J. Pisano*, Fed. Proc., 1970, **29**, 284.
33. *V. Erspamer and P. Melchiorri*. Pure Appl. Chem., 1973, **35**, 463.
34. *J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, and H. R. Morris*, Nature, 1975, **258**, 577.
35. *J. L. Marx*, Science, 1976 **193**, 1227.
36. *G. Metcalf*, Nature, 1974, **252**, 310.
37. *G. Ungar*, Life Sci., 1974, **14**, 595.
38. *H. N. Guttman, B. Weinstein, R. M. Bartschot, and P. S. Tam*, Experientia, 1975, **31**, 285.
39. *B. W. Bycroft and C. M. Wels*, in «Specialist Periodical Reports, Amino-acids, Peptides, and Proteins», The Chemical Society, London, 1976, vol. 8, p. 310 и последующие тома.
40. *D. Perlman and M. Bodanszky*, Ann. Rev. Biochem., 1971, **40**, 449.
41. *E. Katz*, Pure Appl. Chem., 1971, **28**, 551.
42. *W. Maier and D. Gröger*, Pharmazie, 1972, **27**, 491.
43. *K. Kurahashi*, Ann. Rev. Biochem., 1974, **43**, 445.
44. *S. G. Laland and T. L. Zimmer*, Essays in Biochemistry, 1973, **9**, 31.
45. *F. Lipmann*, Accounts Chem. Res., 1973, **6**, 361.
46. *F. Lipmann*, Science, 1973, **173**, 875.
47. *C. H. Tzeng, K. D. Thrasher, J. P. Montgomery, B. K. Hamilton, and D. I. C. Wang*, Biotechnol. Bioeng., 1975, **17**, 143.
48. «Glutathione», Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry, ed L. Floné, H. Ch. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, and A. Wendel, Tubingen, 1973.
49. *A. Meister and S. S. Tate*, Ann. Rev. Biochem. 1976, **45**, 559.
50. *A. Meister*, Science, 1973, **180**, 33.
51. *S. G. Waley*, Biochem. J., 1958, **68**, 189.
52. *L. Fowden*, Ann. Rev. Biochem., 1964, **33**, 173.
53. *S. G. Waley*, Adv. Protein Chem., 1966, **21**, 1.
54. *H. Tabor and C. W. Tabor*, J. Biol. Chem., 1975, **250**, 2648.
55. *H. Umezawa*, Pure Appl. Chem., 1973, **33**, 129.
56. *D. L. Pruess and J. P. Scannell*, Adv. Appl. Microbiol., 1974, **17**, 19.
57. *J. P. Scannell and D. L. Pruess*, in «Chemistry and Biochemistry of Amino-acids, Peptides, and Proteins», ed. B. Weinstein, Marcel Dekker, New York, 1974, vol. 3, p. 189.
58. *K. Kawamura, S.-I. Kondo, K. Maeda, and H. Umezawa*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1969, **17**, 1902.
59. *S. Umezawa, K. Tatsuta, K. Fujimoto, T. Tsuchiya, H. Umezawa, and H. Naganawa*, J. Antibiotics, 1972, **25**, 267.
60. *T. Aoyagi, S. Kunimoto, H. Morishima, T. Takeuchi, and H. Umezawa*, J. Antibiotics, 1971, **24**, 687.
61. *A. Okura, H. Morishima, T. Takita, T. Aoyagi, T. Takeuchi, and H. Umezawa*. J. Antibiotics, 1975, **28**, 337.
62. *B. W. Bycroft*, Nature, 1969, **224**, 595.
63. *M. Bodanszky and D. Perlman*, Nature, 1968, **218**, 291.
64. *W. A. König, W. Loeffler, W. H. Meyer, and R. Uhmann*, Chem. Ber., 1973, **106**, 816.
65. *K. H. Baggaley, B. Blessington, C. P. Falshaw, W. D. Ollis, L. Chaiet, and F. L. Wolf*, Chem. Comm., 1969, 101.
66. *H. J. Klosterman, G. L. Lamoureux, and J. L. Parsons*, Biochemistry, 1967, **6**, 170.
67. *Y. Konda, Y. Suzuki, S. Omura, and M. Onda*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1976, **24**, 92.
68. *R. F. Pittillo and D. E. Hunt*, in «Antibiotics», ed. D. Gottlieb and P. D. Shaw, Springer-Verlag, Berlin, 1966, vol. 1, p. 481.
69. *K. V. Rao, S. C. Brooks, M. Kugelman, and A. A. Romano*, Antibiot. Ann., 1960, 943.
70. *E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. König, and H. Zahner*, Helv. Chim. Acta, 1972, **55**, 224.
71. *D. L. Pruess, J. P. Scannell, H. A. Ax, M. Kellett, F. Weiss, T. C. Demny, and A. Stempel*, J. Antibiotics, 1973, **26**, 261.
72. *R. E. Mitchell*, Nature, 1976, **260**, 75.
73. *W. W. Stewart*, Nature, 1971, **229**, 174.
74. *J. P. Scannell, D. L. Pruess, J. F. Blount, H. A. Ax, M. Kellett, F. Weiss, T. C. Demny, T. H. Williams, and A. Stempel*, J. Antibiotics, 1975, **28**, 1.
75. *T. Kamiya*, in «Recent Advances in the Chemistry of β-Lactam Antibiotics», ed. J. Elks, The Chemical Society, London, 1977, p. 281.
76. *B. W. Bycroft and R. Rinchin*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 121.

77. *H. Sakakibara, H. Naganawa, M. Ohno, K. Maeda, and H. Umezawa*, J. Antibiotics, 1974, **27**, 897.
78. *H. Maehr*, Pure Appl. Chem., 1971, **28**, 603; *G. A. Show*, Bacteriol. Rev., 1970, **34**, 99.
79. *C. Ratledge and G. A. Show*, Biochem. J., 1974, **139**, 407.
80. *E. Hough and Rogers*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1974, **57**, 73.
81. *P. G. Sammes*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1975, **32**, 51.
82. *A. S. Kokhlov and G. B. Lokshin*, Tetrahedron Letters, 1963, 1881.
83. *M. O. Forster and W. B. Saville*, J. Chem. Soc., 1922, 816.
84. *K. Kakinuma and K. L. Rinehart Jr.*, J. Antibiotics, 1974, **27**, 733.
85. *A. J. Birch, R. A. Massey-Westropp, and R. W. Rickards*, J. Chem. Soc., 1956, 3717.
86. *C. L. Atkin and J. B. Neilands*, Biochemistry, 1968, **7**, 3734.
87. *M. Ya. Karpeiskii, Yu. N. Breusov, R. M. Khomutov, E. S. Severin, and O. L. Polyanovskii*, Biokhimiya, 1963, **28**, 342.
88. *B. H. Arison and J. L. Beck*, Tetrahedron, 1973, **29**, 2743.
89. *J. C. MacDonald*, Canad. J. Chem., 1963, **41**, 165.
90. *G. W. Kirby and S. Narayanaswami*, J. C. S. Perkin I, 1976, 1564.
91. *H. A. Akers, M Llinas, and J. B. Neilands*, Biochemistry, 1972, **11**, 2283.
92. *J. C. MacDonald*, Biochem. J., 1965, **96**, 533.
93. *P. S. Steyn*, Tetrahedron, 1973, **29**, 107.
94. *C. M. Allen*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 2386.
95. *A. Dossena, R. Marchelli, and A. Pochini*, J. C. S. Chem. Comm., 1974, 771.
96. *P. M. Scott, M. A. Merrien, and J. Polonsky*, Experentia, 1976, **32**, 140.
97. *A. J. Birch and J. J. Wright*, Tetrahedron, 1970, **26**, 2329.
98. *A. J. Birch, G. E. Blance, S. David, and H. Smith*, J. Chem. Soc., 1961, 3128.
99. *G. Casnati, A. Pochini, and R. Ungaro*, Gazzetta, 1973, **103**, 141.
100. *N. Eickman, J. Clardy, R. J. Cole, and J. W. Kirksey*, Tetrahedron Letters, 1975, 1051.
101. *P. A. Stadler and P. Stütz*, in «The Alkaloids», ed. R. H. F. Manske, Academic. Press, New York, 1975, vol. 15, p. 1.
102. *H. G. Floss*, Tetrahedron, 1976, **32**, 873.
103. *P. Stütz, R. Brunner, and P. A. Stadler*, Experientia, 1973, **29**, 936.
104. *A. Taylor*, in «Microbial Toxins», ed. A. Ceigler, S. J. Ajl, and S. K. Adis, Academic Press, New York, vol. VII, chapter 10.
105. *M. R. Bell, J. R. Johnson, B. S. Wildi, and R. B. Woodward*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 1001.
106. *J. Fridrichsons and A. McL. Mathieson*, Acta Cryst., 1965, **18**, 1043.
107. *E. Francis, R. Rahman, S. Safe, and A. Taylor*, J. C. S. Perkin I, 1972, 470.
108. *R. Nagarajan, L. L. Huckstep, D. H. Lively, D. C. DeLong, M. M. Marsh, and N. Neuss*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 2980.
109. *H. Minato, M. Matsumoto, and T. Katayama*, J. C. S. Perkin I, 1973, 1819.
110. *A. G. McInnes, A. Taylor, and J. A. Walter*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 6741.
111. *J. D. Bu'lock and C. Leigh*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 628.
112. *N. Neuss, R. Nagarajan, B. B. Molloy, and L. L. Huckstep*, Tetrahedron Letters, 1968, 4467
113. *T. Wieland and C. Birr, in* «International Review of Science, Organic Chemistry Series Two», ed. D. H. Hey, Butterworths, London, 1976. vol. 6, p. 183.
114. *F. A. Bovey, A. I. Brewster, D. J. Patel, A. E. Tonelli, and D. A. Torchia*, Accounts Chem. Res., 1972, **5**, 193.
115. *Yu. A. Ovchinnikov and V. T. Ivanov*, Tetrahedron, 1974, **30**, 1871, and 1975, **31**, 2177.
116. *C. M. Deber, V. Madison, and E. R. Blout*, Accounts Chem. Res., 1976, **9**, 106.
117. *W. L. Meyer, G. E. Templeton, C. J. Grable, R. Jones, L. F. Kuyper, R. B. Lewis, C. W. Sigel, and S. H. Woodhead*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3802.
118. *J. L. Flippen and J. L. Karle*, Biopolymers, 1976, **15**, 1081.
119. *M. Bodanszky and G. L. Stahl*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1974, **71**, 2791.



120. *B. W. Bycroft*, J. C. S. Chem. Comm, 1972, 660; and in «The Chemistry and Biology of Peptides", ed. J. Meyenhofer, Ann Arbor Science, Ann Arbor, 1972, p. 665.
121. *H. Yoshioka, T. Aoki, H. Goko, K. Nakatsu, T. Noda, H. Sakakibara, T. Take, A. Nagata, J. Abe, T. Wakamiya, T. Shiba, and T. Kaneko*, Tetrahedron Letters, 1971, 2043.
122. *T. Shiba, S. Nomoto, T. Teshima, and T. Wakamiya*, Tetrahedron Letters, 1976, 3907.
123. *J. H. Carter, R. H. Du Bus, J. R. Dyer, J. C. Floyd, K. C. Rice, and P. D. Shaw*, Biochemistry, 1974, **13**, 1221 and 1227.
124. *W. Keller-Schierlein, V. Prelog, and H. Zahner*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1964, **22**, 279.
125. *J. B. Neilands*, in «Inorganic Biochemistry», ed. G. L. Eichhorn, Elsevier, New York, vol. I, 1973, p. 167.
126. *R. Norrestam, B. Stensland, and C. I. Branden*, J. Mol. Biol., 1975, **99**, 501.
127. *M. Llinas, D. M. Wilson, M. P. Klein, and J. B. Neilands*, J. Mol. Biol., 1976, **104**, 853.
128. *M. Llinas, W. J. Horsley, and M. P. Klein*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 7554.
129. *Y. Litaka, H. Nakamura, K. Takada, and T. Takita*, Acta Cryst., 1974, **B30**, 2817.
130. *Th. Wieland*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1967, **25**, 214.
131. *Th. Wieland and O. P. Wieland*, in «Microbiol Toxins», ed. A. Ciegler, S. J. Ajl, and S. K. Adis, Academic Press, New York, 1972, vol. VIII, p. 248.
132. *G. C. Strain, K. P. Mullinix, and L. Bogorad*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, **68**, 2467; *P. D. Thut, and T. J. Lindell*. Mol. Pharmacol., 1974, **10**, 146; *L. Fiume and G. Barbanti*, Experentia, 1974, **30**, 76.
133. *D. J. Patel, A. E. Tonelli, P. Pfaender, H. Faulstich, and Th. Wieland*, J. Mol. Biol., 1973, **79**, 185.
134. *Th. Wieland, J. Faesel, and W. Konz*, Annalen, 1969, **722**, 197.
135. *Yu. A Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. F. Bystrov, and A. I. Miroshnikov*, in «The Chemistry and Biology of Peptides», ed. J. Meienhofer, Ann Arbor Science, Ann Arbor, 1972, p. 111.
136. *H. Faulstich and Th. Wieland*, in «The Peptides», ed. H. Hanson and H. D. Jakubke, North/Holland/ Elsevier, Amsterdam. 1973, p. 312.
137. *Th. Wieland, H. Faulstich, and W. Burgermeister*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, **47**, 984.
138. *I. L. Karle*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 4000.
139. *L. K. Ramachandran*, Biochem. Rev., 1975, **46**, 1.
140. *D. C. Hodgkin and B. M. Oughton*, Biochem. J., 1957, **65**, 752.
141. *A. Taylor*, Adv. Appl. Microbiol., 1970, **12**, 189.
142. *Yu. A. Ovchinnikov and V. T. Ivanov*, in «International Review of Science, Organic Chemistry Series Two», ed. D. H. Hey, Butterworths, London, 1976, vol. 6, p. 219.
143. *B. C. Pressman*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 501.
144. *I. L. Karle*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 4379.
145. *G. D. Smith, W. L. Duax, D. A. Langs, G. T. DeTitta, J. W. Edmonds, D. C. Rohrer, and C. M. Weeks*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 7242.
146. *K. Neupert-Laves and M. Dobler*, Helv. Chim. Acra, 1975, **58**, 432.
147. *H. Brockmann*, Forschr. Chem. org. Naturstoffe, 1960, **18**, 1.
148. *U. Hollstein*, Chem. Rev., 1974, **74**, 625.
149. *J. V. Formica and M. A. Apple*, Antimicrob. Agents Chemother., 1976, **9**, 214.
150. *H. Lackner*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1975, **14**, 375.
151. *H. M. Sobell, S. C. Jain, T. D. Sakore, and C. E. Nordman*, Nature New Biol., 1971, **231**, 200; J. Mol. Biol., 1972, **68**, 1.
152. *S. Tamura, S. Kuyama, Y. Kodiara, and S. Higashikawa*, Agric. Biol. Chem. (Japan), 1964, **28**, 137.
153. *A. Kakinuma, M. Hori, H. Sugino, I. Yoshida, M. Isono, G. Tamura, and K. Arima*, Agric. Biol. Chem. (Japan), 1969, **33**, 1523.

154. *M. Bodanszky, I. Izdebski, and I. Muramatsu*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 2351.
155. *A. Dell, D. H. Williams, H. R. Morris, G. A. Smith, J. Feeney, and G. C. K. Roberts*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 2497.
156. *R. Tschesche and E. U. Kaussmann*, in «The Alkaloids», ed. R. H. F. Manske, Academic Press, New York, 1975, vol. 15, p. 165.
157. *E. Gross, H. H. Kiltz, and E. Nebelin*, Z. physiol. Chem., 1973, **354**, 810.
158. *E. Gross and J. L. Morell*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 4634.
159. *L. Ingram*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **224**, 263.
160. *D. R. Martin and R. J. P. Williams*, Biochem. J., 1976, **153**, 181.
161. *B. Anderson, D. C. Hodgkin, and M. A. Wismavitra*, Nature, 1970, **225**, 233.
162. *K. Tori, K. Tokura, K. Okabe, M. Ebata, and H Otsuka*, Tetrahedron Letters, 1976, 185.
163. *P. Depaire, J.-P. Thomas, A. Brun, A. Olesker, and G. Lukacs*, Tetrahedron Letters, 1977, 1403.
164. *J. M. Liesch and K. L. Rinehart, Jr.*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 1645.
165. *H. Umezawa*, Pure Appl. Chem., 1971, **28**, 665.

## 23.5. АНТИБИОТИКИ С β-ЛАКТАМНОЙ ГРУППИРОВКОЙ

*Г. Лоу (University of Oxford)*

### 23.5.1. ВВЕДЕНИЕ

Открытие и исследование антибиотиков с β-лактамной группировкой — это один из самых пленительных эпизодов современной науки. Первоначальное наблюдение Александра Флеминга, заметившего, что загрязняющая плесень из семейства *Penicillium* продуцирует вещество, ингибирующее рост микроорганизмов семейства *Staphylococci* [1], было, быть может, единственным в своем роде важнейшим наблюдением в химиотерапии, которое привело нас к успешным поискам антибактериальных веществ, получаемых из микроорганизмов и во многих случаях широко используемых в медицине. Пенициллин — ингибитор роста, продуцируемый *Penicillium notatum* и некоторыми другими видами *Penicillium*, оказалось трудно выделить, и лишь Флори удалось получить активный материал из культуры плесени во время его работы в Оксфорде. Первоначальное наблюдение Флеминга было подтверждено терапевтической эффективностью пенициллина против бактериальной инфекции на человеке [2].

Признание кроющихся в пенициллине возможностей для медицины привело к началу обширных англо-американских исследований, проводившихся во время Второй мировой войны и направленных на получение антибиотика в количествах, достаточных для широкого использования [3]. Быстрое развитие технологии ферментации, в особенности развитие техники погружаемой культуры и выведение мутантов *Penicillium chrysogenum*, обеспечивающих высокий выход продукта, привели к огромным успехам в продуктивности. Затем было установлено, что добавление жидкости, в которой замачивали кукурузу, в культуральную среду позволяет обойти этап, ограничивающий скорость процесса ферментации, и

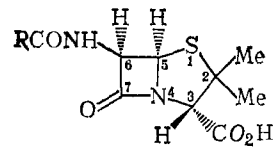


это, в свою очередь, позволило установить, что предшественники образования боковой цепи, такие как фенилуксусная кислота, ускоряют образование пенициллина.

Сегодня почти весь пенициллин производится в виде пенициллина G (**1а**) с выходом, приближающимся к 20 г на 1 л культуральной жидкости, и по цене лишь несколько пенсов за грамм.

После того как химиотерапевтические свойства пенициллина были продемонстрированы, во всем мире начались поиски антибактериальных средств на основе микроорганизмов. Работавший на острове Сардиния Броцу предположил, что самоочистка воды может быть связана частично с антагонизмом бактерий, и исследовал микробную флору морской воды вблизи от водосброса г. Кальяри. Из этих вод он выделил гриб, подобный *Cephalosporum acremonium*, который при выращивании на агаре выделял вещество, ингибирующее рост ряда грам-положительных и грам-отрицательных бактерий [4].

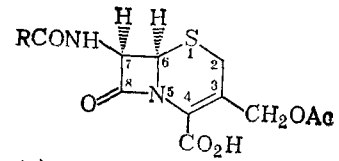
Культура этого организма была послана в Оксфорд к Флори. Абрахам и Ньютон выделили из этого организма несколько антибактериальных веществ, из которых главное, ответственное за наблюденный Броцу эффект, оказалось пенициллином N (**1б**). Авторы отметили, однако, наличие другого вещества с умеренной антибактериальной активностью против грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, которое было устойчиво к действию пенициллиназ. Это вещество, названное цефалоспорином C (**2а**), стало предшественником другого важного семейства антибиотиков с β-лактамной группировкой — цефалоспоринов (**2**) [5].



(**1**) а, R = $CH_2Ph$

б, R = D-$(CH_2)_3CH(NH_3^+)CO_2^-$

в, R = L-$(CH_2)_3CH(NH_3^+)CO_2^-$



(**2**) а, R = D-$(CH_2)_3CH(NH_3^+)CO_2^-$

### 23.5.2. БИОСИНТЕЗ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНА C

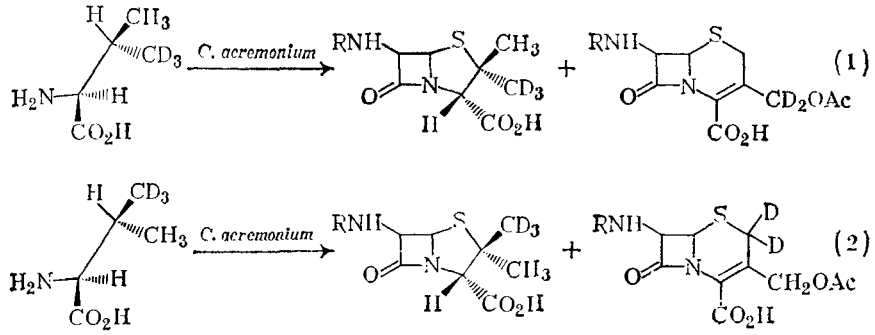
В отсутствие специфических предшественников боковой цепи *Penicillium chrysogenum* продуцирует большое число пенициллинов с боковой цепью типа природных карбоновых кислот. В одном из таких пенициллинов боковая цепь представлена остатком *L*-α-аминоадипиновой кислоты — это изопенициллин N (**1в**). В этих условиях продуцируется также пенициллиновое ядро, лишенное боковой цепи — 6-аминопенициллановая кислота [6].

Одним из первых интересных соображений, возникших при работе Броцу с культурой вида *Cephalosporium*, было то, что основной антибиотик — пенициллин N (**1в**) проявил против грамотрицательных бактерий более высокую активность, чем пенициллин G (**1а**). Открытый первоначально как примесь к пенициллину N в культуре *Cephalosporium acremonium* цефалоспорин C [7] также имеет в боковой цепи остаток *D*-α-аминоадипиновой кислоты, но содержит β-лактамное дигидротиазиновое ядро цефалоспоринов [8, 9].

С другой стороны, в смеси, получающейся в результате ферментации, не были обнаружены ни 7-аминоцефалоспорановая кислота, т. е. цефалоспорин C с удаленной боковой *D*-α-аминоадипиновой группой, ни какие-либо другие цефалоспорины с иной боковой цепью, чем цепь *D*-α-аминоадипиновой кислоты.

Структуры пенициллина N и цефалоспорина C формально могут быть произведены из α-аминоадипиновой кислоты, цистеина и валина. Выделение трипептида δ-(α-аминоадипил)цистеинилвалина из *Penicillium chrysogenum* [10] и сходного трипептида из *Cephalosporium acreminium*, имеющего строение δ-(*L*-α-аминоадипил)-*L*-цистеинил-*D*-валина [11], указывает на то, что такие трипептиды могут быть биосинтетическими предшественниками β-лактамных антибиотиков. Эту гипотезу трудно доказать, так как микроорганизмы не усваивают трипептидов. Тем не менее показано, что бесклеточный экстракт из протопластов *Cephalosporium* усваивает и включает в конечный продукт (пенициллин *N*) трипептид δ-(*L*-α-аминоадипил)-*L*-цистеинил-*D*-валин. Однако этого не наблюдается с δ-(*L*-α-аминоадипил)-*L*-валином и с δ-(*D*-α-аминоадипил)-*L*-цистеинил-*D*-валином [12, 13].

Существует много предположений о том, каким путем трипептид может превращаться в пенициллин N или в цефалоспорин C, однако промежуточные продукты последовательности превращений, приводящей к образованию тиазолидинового β-лактамного или дигидротиазолидинового β-лактамного циклов, получены не были, возможно из-за их связывания с ферментами [6]. Показано, что [α-$^3$H]-*L*-цистеин включается со своей $^3$H-меткой в пенициллин G, как и следовало ожидать, по C-6. Это означает, что ни на одной стадии биосинтеза не образуется α,β-дегидроцистеин [14]. Более того, с использованием *L*-цистеина хирально меченного $^3$H по C-3, удалось показать, что этот атом становится в пенициллине C-5 с полным сохранением конфигурации [15]. Как *D*-, так и *L*-валин включаются в пенициллины, и опыты с меченным $^3$H-*L*-валином показали, что в процессе включения метки в трипептид δ-(*L*-α-аминоадипил)-*L*-цистеинил-*D*-валин α,β-дегидровалин не образуется, поскольку теряется только α-протон [16]. Показано также, что включение δ-(*L*-α-аминоадипил)-*L*-цистеинил-*D*-валина в пенициллин N под действием бесклеточного экстракта из протопластов *Cephalosporium acremonium* происходит без потери α-протона валина [13]. Отсюда следует, что образование тиазолидинового цикла не включает промежуточного возникновения α,β-дегидровалина. При включении в пенициллин N (2*S*, 3*R*)-[4,4,4-$^2$H$_3$]-валина и (2*S*, 3*S*)-[4,4,4-$^2$H$_3$]валина атомы дейтерия появляются соответственно в β-метильной и α-метильной группах. Таким образом, возникновение тиазолидинового кольца происходит с сохранением конфигурации C-3 валина, возможно через радикальный или карбонийионный интермедиат. Цефалоспорин C, включающий дейтериевую метку валинов, метится соответственно по C-2 и по экзоциклической метиленовой группе C-3 {схемы (1), (2)} [17]. Показано также, что пенициллин N под действием протопластов из *Cephalosporium acremonium* превращается в цефалоспорин C. Поскольку это превращение ингибируется цианид-ионами, в этом превращении, вероятно, принимает участие оксигеназа [18].




(1)

(2)

### 23.5.3. ХАРАКТЕР ДЕЙСТВИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

Антибактериальные свойства пенициллинов и цефалоспоринов вытекают из их способности ингибировать ферменты, ответственные за конечную стадию биосинтеза бактериальной клеточной стенки. Бактериальная клеточная стенка представляет собой макромолекулярную сетку, полностью окружающую клетку и обеспечивающую ее структурную целостность. В присутствии пенициллинов и цефалоспоринов нарушается тонкий контроль деятельности расщепляющих и синтезирующих ферментов, необходимый для правильного роста клеточной стенки растущих бактерий. Возникающая в таких условиях клеточная стенка становится дефектной и не может обеспечить защиту хрупкой мембраны цитоплазмы от внешнего осмотического давления. При этом внутриклеточная жидкость прорывается сквозь мембрану цитоплазмы и организм погибает [19, 20].

Строение клеточной стенки *Staphylococcus aureus* схематически изображено на рис. 23.5.1. Здесь X и Y представляют остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты соответственно. Пустыми кружками обозначены аминокислоты, которых в возникающих пептидогликанах содержится пять. Однако когда

они образуют сетчатую систему с пентаглициновыми цепями (представлены черными кружочками), остаток терминальной аминокислоты теряется (ТА — остаток техойевой кислоты, Р-фосфат). Процесс образования сетчатой системы более подробно показан на схеме (3).

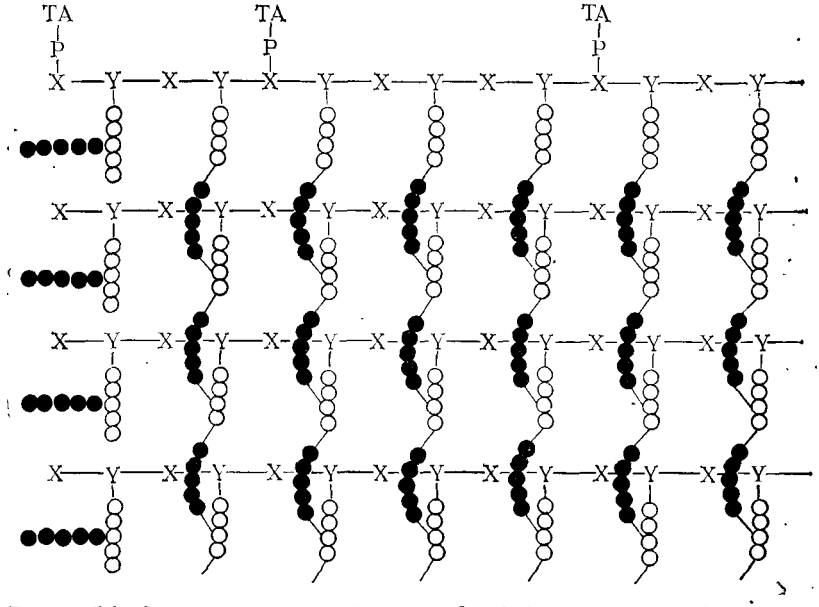



Рис. 23.5.1. Структура клеточной стенки *Staphylococcus aureus* (см. текст).

Образование сетчатой системы пептидогликановых цепей сопровождается потерей терминального остатка *D*-аланина. Ответственный за катализ этой стадии фермент транспептидаза ингибируется пенициллином. Терминальные участки пентапептидной цепи содержат, по всей видимости, два остатка *D*-аланина. Предложено, что конформация этих остатков, когда они связаны с ферментом, вероятно, подобна жесткой конформации ацилдипептидного фрагмента пенициллинов, как указано на рис. 23.5.2 [21]. Если это так, то β-лактамный цикл должен помещаться с той стороны, с которой происходит расщепление пептидной связи природного субстрата, и, следовательно, пенициллин должен необратимо ингибировать фермент путем ацилирования важной для работы функциональной группы. Данные о том, что пенициллины прочно связаны с транспептидазой, но могут высвобождаться гидроксиламином или меркаптоэтанолом, поддерживают представление об образовании пенициллоил-транспептидазы. Позднее из *Streptomyces* и *Bacillus stearothermophilius* были выделены аланилкарбоксипептидазы, являющиеся, возможно, солюбилизованными формами их транспептидаз, и показано, что они быстро ингибируются пенициллинами,



образуя пенициллоил-фермент. Этот фрагмент, однако, очень медленно восстанавливает свою активность с высвобождением произ-

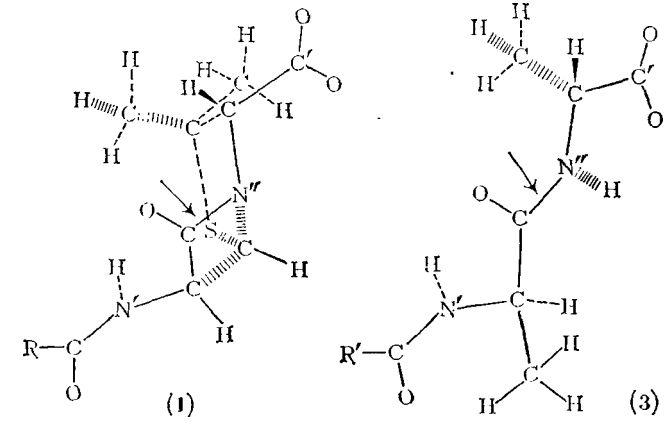
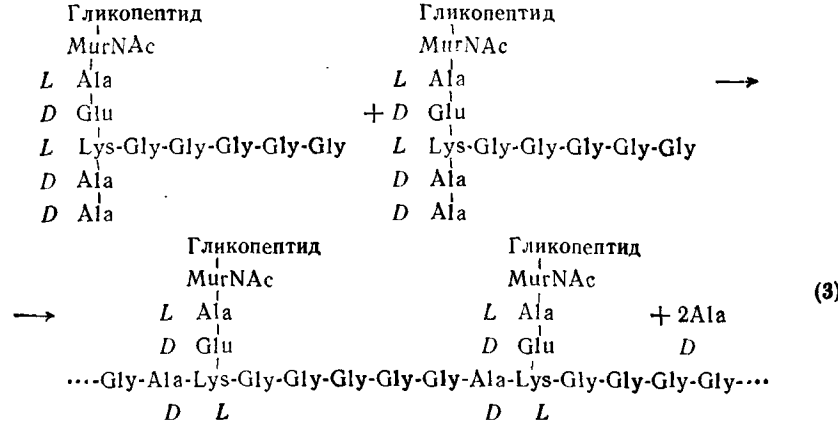



Рис. 23.5.2. Стереопроекции пенициллина (1) и остатка *D*-аланил-*D*-аланина (3) пептидогликановых цепей.

Стрелки указывают на пептидные связи, расщепляемые транспептидазой. Кратность связи и заряды не показаны.

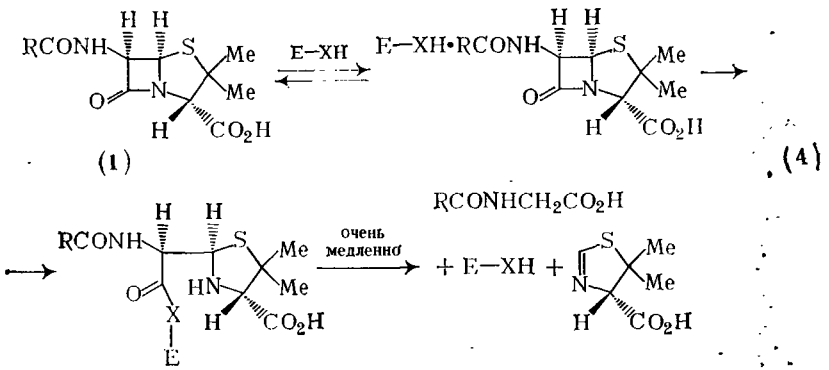
водного глицина [в случае (1а), R = $CH_2Ph$] и *D*-5,5-диметил-$\Delta^2$-тиазолидинкарбоновой-4 кислоты {схема (4)} [21а].




(3)

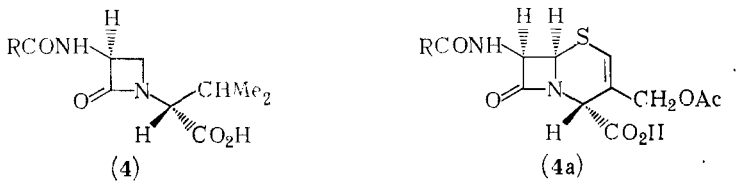
Пенициллины и цефалоспорины помимо ацилдипептидной группировки имеют реакционноспособное β-лактамное кольцо. Как отщепление от пенициллина серы, приводящее к детиопенициллину

(4), так и сдвиг двойной связи в цефалоспоринах в $\Delta^2$-положение (4а) приводят к потере антибактериальных свойств и (в обоих случаях) к значительной стабилизации β-лактамного кольца. Отсюда можно предположить, что β-лактамное кольцо активировано в пенициллинах за счет напряжения, из-за чего снижается пере-



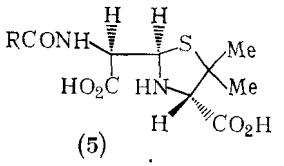

крывание орбиталей карбонильной и аминной функций β-лактама. В цефалоспоринах β-лактамная группировка активирована за счет электронного эффекта аллильной ацетоксигруппы.

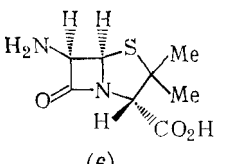
Рентгеновский анализ выявил пирамидальный характер общего для двух колец атома азота как в пенициллинах, так и в цефалоспоринах, что, по-видимому, достаточно важно [22]. В результате основательной проверки этой гипотезы стало ясно, что среди гетероциклических систем, содержащих β-лактамное кольцо, могут быть вещества с антибактериальной активностью. Однако постепенно появились данные, что в случае некоторых бактерий ингибирование транспептидазы, ответственной за завершающую стадию биосинтеза клеточной стенки, не является единственным направлением действия антибиотика [20].

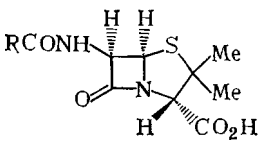



### 23.5.4. ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕНИЦИЛЛИНЫ

В конце 50-х годов, когда пенициллины уже нашли широкую клиническую практику, возникла большая проблема. Бактерии *Staphylococcus aureus* оказались устойчивыми к пенициллинам, в особенности в больничных условиях. Выжившие штаммы *Staphylococci* продуцировали фермент пенициллазу, расщепляющую пенициллины до пенициллановых кислот (5). И поэтому было несомненной удачей именно в тот момент, когда проблема стала критической, нахождение 6-аминопенициллановой кислоты (6) в тех культурах *Penicillium chrysogenum*, которые выращивали на не содержащих предшественников боковых групп питательных средах.




(1) а, R = $CH_2Ph$
б, R = D-$(CH_2)_3CH(^+NH_3)CO_2^-$
в, R = L-$(CH_2)_3CH(^+NH_3)CO_2^-$
г, R = $C_6H_3(OMe)_2$-2,6
д, R = D-$CH(Ph)NH_2$
е, R = D-$CHC_6H_4OH$-4 ($NH_2$)
ж, R = D-$CH(Ph)CO_2H$

Выделение из среды ферментации 6-аминопенициллановой кислоты и возможное значение этой кислоты как промежуточного продукта для синтеза новых пенициллинов заставило провести поиск ферментов, которые могли бы избирательно удалить боковую цепь пенициллина G. Установлено, что такие ферменты достаточно широко распространены, причем наиболее избирательные из них, удаляющие таким путем фенилацетильную боковую группу пенициллина G, находятся в бактериях *Escherichia* и *Alcaligenes* [23]. 6-Аминопенициллановая кислота теперь производится в промышленности прокачиванием раствора пенициллина G через слой сефарозы, к которой ковалентно присоединена амидаза из *Escherichia coli*, до полного гидролиза при контролируемой величине pH.

Ацилированием 6-аминопенициллановой кислоты получено несколько тысяч новых пенициллинов. Одним из первых нашедших клиническое применение полусинтетических пенициллинов, полученных таким путем, был метициллин (1г), достоинством которого была его негидролизуемость пенициллазой и вытекавшая отсюда эффективность против устойчивых к пенициллину стафилококков. Содержащиеся в нем две метоксигруппы ответственны в первом приближении за устойчивость этого пенициллина к гидролизу пенициллазой.

Главная антибактериальная активность полученных путем ферментации пенициллинов направлена против грам-положительных бактерий, за исключением пенициллина N (1б), который проявил обнадеживающую активность против грам-отрицательных бактерий. Этот неожиданный для пенициллинов антибактериальный спектр связан, по-видимому, с присутствием в боковой группе свободной аминной функции, поскольку после ацилирования активность против грам-отрицательных бактерий существенно снижается,

тогда как активность против грам-положительных бактерий возрастает. Некоторые аминозамещенные пенициллины были синтезированы из 6-аминопеницилановой кислоты, и они оказались наиболее ценными из всех доступных пенициллинов. Ампициллин (**1д**) имеет широкий антибактериальный спектр и может использоваться орально [24]. Сложные эфиры ампициллина имеют еще и то преимущество, что они легче усваиваются кишечными стенками и, попадая в кровоток, гидролизуются. Амоксициллин (**1е**) — более новое производное пенициллина, также активное против грам-отрицательных бактерий, можно использовать орально.

Карбенициллин (**1ж**) имеющий карбоксильную группу, также эффективен против грам-отрицательных бактерий, но имеет иной антибактериальный спектр; он особенно эффективен также против видов *Proteus* и *Pseudomonas*. Эффективность ампициллина и карбенициллина против грам-отрицательных бактерий связана, вероятно, с наличием более полярной боковой группировки, что облегчает проникновение в клетку [25].

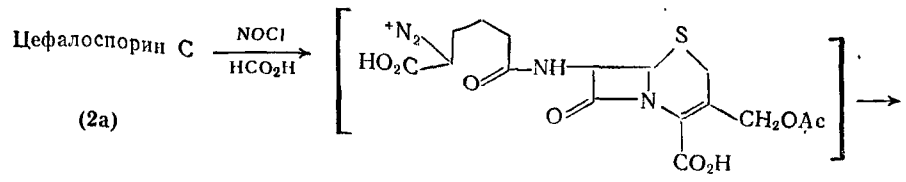
### 23.5.5. ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

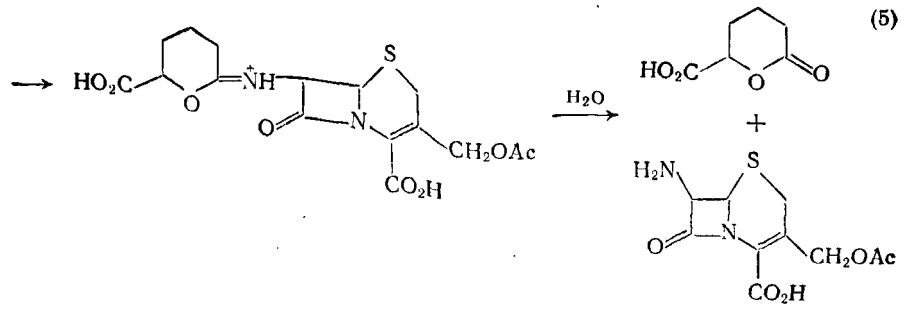
#### 23.5.5.1. Модификации цефалоспоринов по С-7

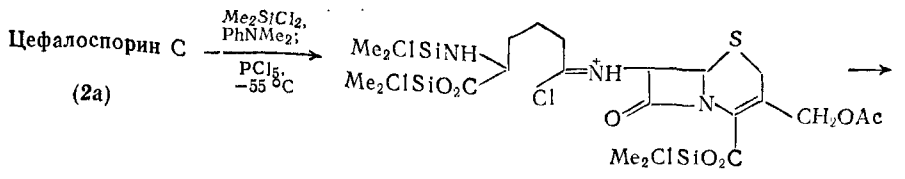
Поскольку пенициллин G (**1а**) обладает большей антибактериальной активностью, чем пенициллин N (**1б**), были сделаны попытки превратить цефалоспорин С в 7-фенилацетамидоцефалоспорановую кислоту (**2б**) ($R = PhCH_2$). Вначале это осуществляли мягким кислотным гидролизом с образованием 7-аминоцефалоспорановой кислоты (хотя и с очень малым выходом) с последующим фенилацетилированием [26].

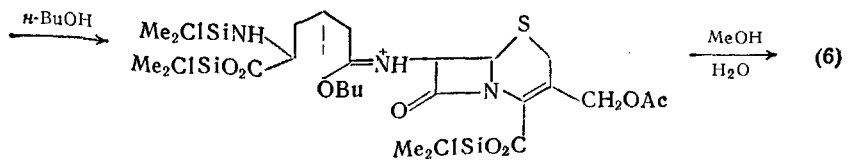
Поиски фермента, который отщеплял бы боковой остаток *D*-2-аминоадипиновой кислоты в цефалоспорине С, были обширными, однако такой ацилазы найти не удалось. Однако боковая группировка может быть с высоким выходом удалена химическими методами [27]. Первый удавшийся метод представлен на схеме (5). Обработка цефалоспорина С нитрозилхлоридом в муравьиной кислоте привела к диазониевой соли, которая самопроизвольно циклизовалась в иминоэфир. После удаления растворителя и избытка летучего реагента боковую группировку отщепляли гидролизом и получали 7-аминоцефалоспорановую кислоту. После небольших усовершенствований методики выход удалось увеличить до 50 %.

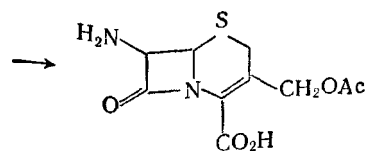
Превращение 7-амидогрупп цефалоспорина С (с предварительной защитой амино- и карбоксильной групп) в иминохлорид действием пентахлорида фосфора с последующей обработкой спиртом с образованием иминоэфира и гидролитическим расщеплением явилось наиболее простым и эффективным методом. При использовании диметилдихлорсилана для защиты амино- и карбоксильной групп {схема (6)} удалось получить 7-аминоцефалоспорановую кислоту с выходом 92,5 %. Преимущество использования силиль-

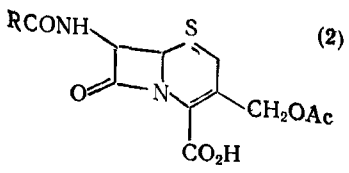



(**2**) **а**, $R = D\text{-}(CH_2)_3CH(NH_3^+)CO_2^-$ **в**, $R = CH_2$-(2-тиенил)

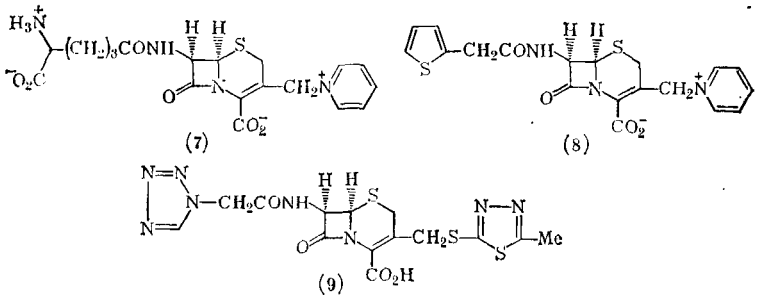
**б**, $R = CH_2Ph$ **г**, $R = D\text{-}CH(Ph)NH_2$

ной защиты состоит в ее одновременном удалении при обработке иминоэфира водным метанолом.

Доступность 7-аминоцефалоспорановой кислоты привела к получению множества полусинтетических цефалоспоринов, при этом были успешно использованы данные о связи структуры и активности, полученные на полусинтетических пенициллинах. Среди наиболее важных по использованию в клиниках цефалоспоринов следует отметить цефалотин (**2в**) и цефалоглицин (**2г**). Цефалотин проявил бактерицидную активность против как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий; он эффективен также против *Staphylococcus aureus*, вырабатывающих пенициллиназу. Цефалоглицин может использоваться орально и особенно эффективен против инфекций мочевого тракта. Подобно ампициллину (**1д**) он проявил высокую активность против грам-отрицательных бактерий, но в отличие от ампициллина он устойчив к пенициллиназе.

### 23.5.5.2. Модификации цефалоспоринов по С-3

В процессе очистки цефалоспорина С электрофорезом в пиридин-ацетатном буфере было получено новое антибактериальное вещество, не имевшее определенного заряда при pH 7 и оказавшееся пиридиниевым бетаином (**7**). Примечательная легкость происходящего при этом нуклеофильного замещения связана с устойчивостью карбениевого иона, генерируемого при сольволизе ацетоксигруппы. Благодаря нуклеофильному замещению при этом центре были получены сотни модифицированных цефалоспоринов. Два модифицированных по С-3 и по С-7 цефалоспорина обладают ценными свойствами; это были цефалоридин (**8**) и цефазолин (**9**) [28].



(7)

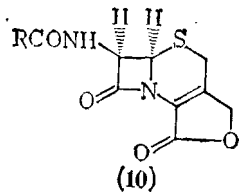


(8)

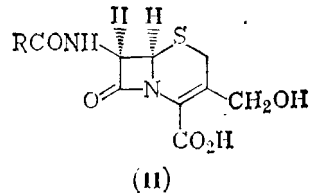


(9)

Отщепление ацетоксигруппы может происходить также путем внутримолекулярной реакции с участием карбоксигруппы с образованием лактона (**10**), а также путем гидролиза в присутствии ацетилэстеразы с образованием производных дезацетилцефалоспорановой кислоты (**11**). Эти продукты, однако, не обладали заметной антибактериальной активностью.

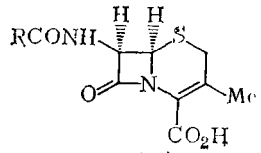


(10)

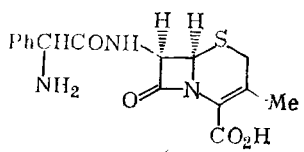


(11)

Дезацетоксицефалоспорановые кислоты (**12**) особенно хорошо проникают через стенки кишечника и могут использоваться орально. Хотя они менее активны *in vitro*, чем сами цефалоспорины, возможность достижения высокого уровня содержания в крови делает их орально используемыми антибиотиками.

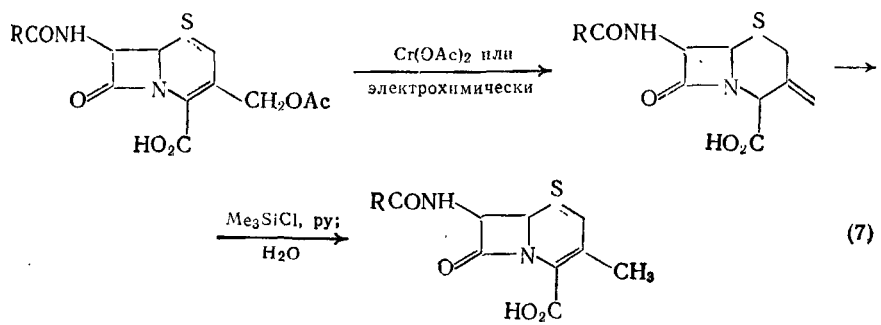


(12)



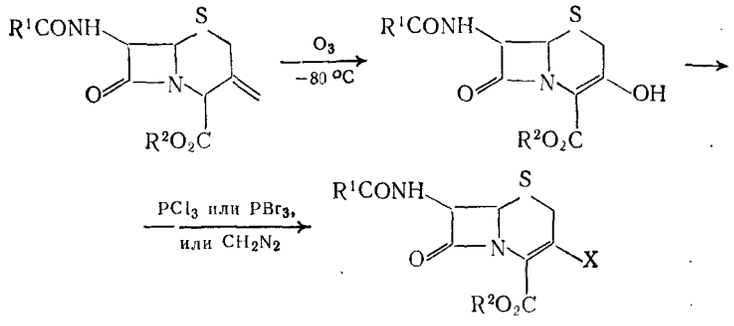
(13)

Дезацетоксицефалоспорановые кислоты были впервые получены с довольно низким выходом каталитическим гидрогенолизом цефалоспорановых кислот с использованием значительных количеств палладиевого катализатора. Более эффективно превращение при использовании солей хрома(II) [29] или электрохимическим путем [30] с образованием 3-метиленцефамов, количественно изомеризуемых в дезацетоксицефалоспорановые кислоты {в виде их силиловых эфиров, схема (**7**)}. Цефалексин (**13**) — один из наиболее ценных и обладающих широким спектром действия антибиотиков, годных для приема орально, может быть получен таким путем.



(7)

Установлено также, что 3-метиленцефемы являются полезными интермедиатами для синтеза 3-оксоцефамовых кислот, из которых могут быть получены многие ценные лекарства {схема (**8**)} [31].

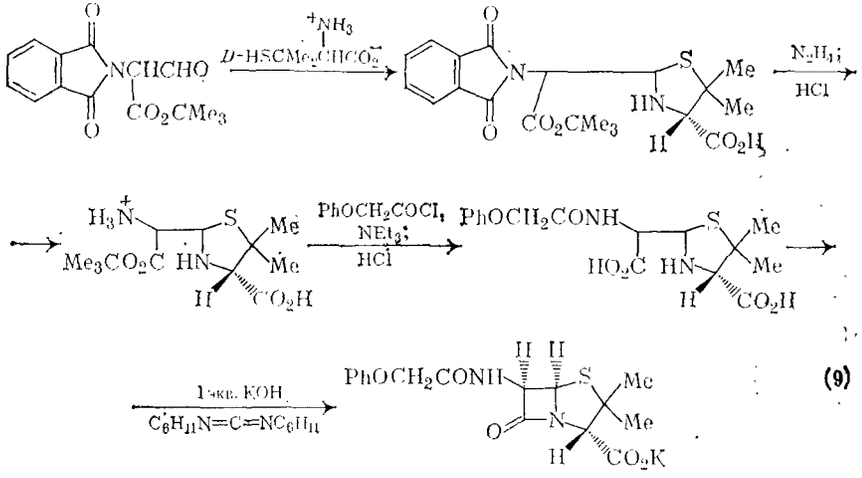


(8)

X = Cl, Br или OMe

### 23.5.6. СИНТЕЗ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

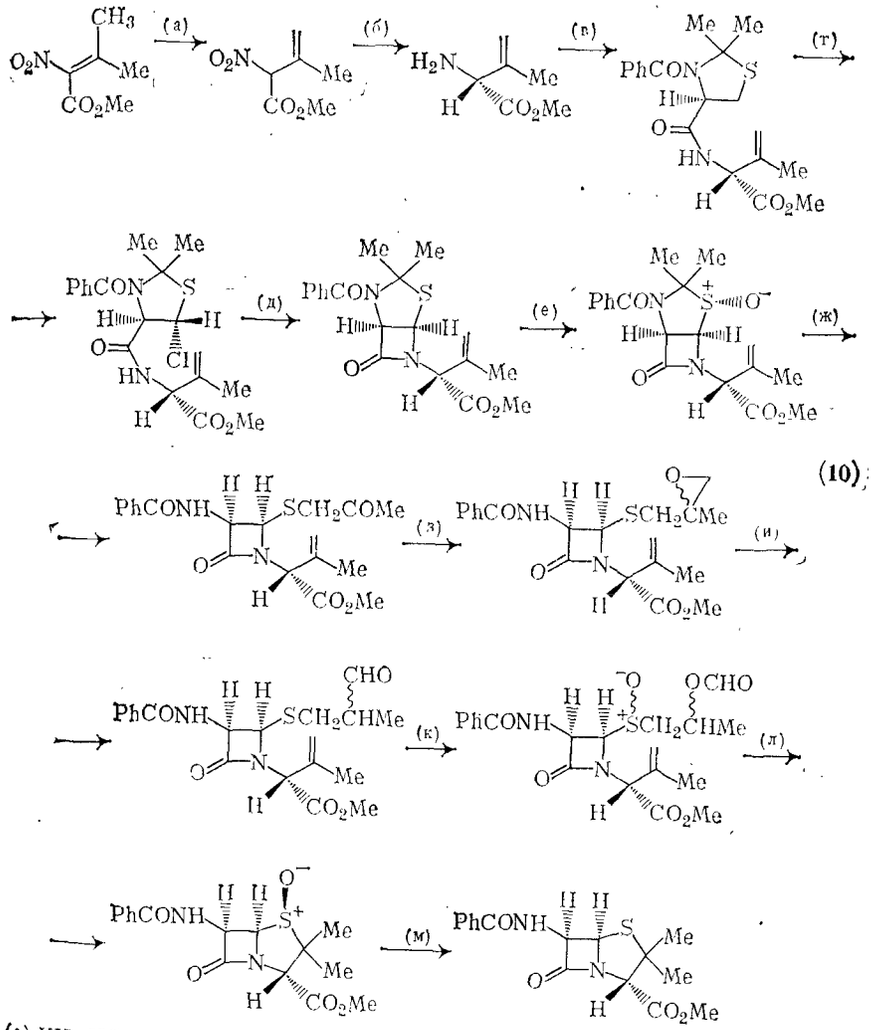
После того как была выяснена структура пенициллина, были предприняты многочисленные попытки осуществить его синтез. Однако лишь в конце 50-х годов был впервые выполнен синтез пенициллина с приемлемым выходом Шиханом и Хенери-Логаном [32]. Путь синтеза показан на схеме (9).



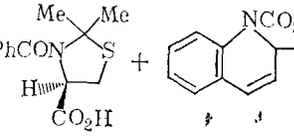
(9)

Конденсацией альдегидов с 1,2-аминотиолами получены с хорошим выходом тиазолидины. С использованием соответствующим образом защищенного производного формилглицина и *D*-пеницилламина была получена пенициллоиновая кислота, содержащая защитную группу. Хотя в этой реакции и получалась смесь диастереомеров, нужный изомер был все же выделен. Фталимидную группу удаляли действием гидразина, образовавшийся амин ацилировали феноксиацетилхлоридом, после чего защитную *трет*-бутильную сложноэфирную функцию удаляли обработкой безводным





(10)

(а) KH; HCl; (б) SnHCl; разделение в виде хлорацетилпроизводных с ацилазой I свиньи; (в)  ; (г) $(PhCOO)_2$; HCl; (д) NaH; (е) *м*-$ClC_6H_4CO_3H$; (ж) Δ, $H_2SO_4$; (з) $CH_2N_2$; (и) $BF_3 \cdot Et_2O$; (к) *м*-$ClC_6H_4CO_3H$; (л) Δ; (м) $PBr_3$

хлоридом водорода. Получающуюся дикарбоновую кислоту обрабатывали 1 экв КОН, получая калиевую соль по более сильной карбоксигруппе. Такая соль и служила удобной защитной группой при реакции, в которой происходило образование β-лактамного цикла при действии дициклогексилкарбодиимида, реагента, уже известного по его использованию в пептидном синтезе.

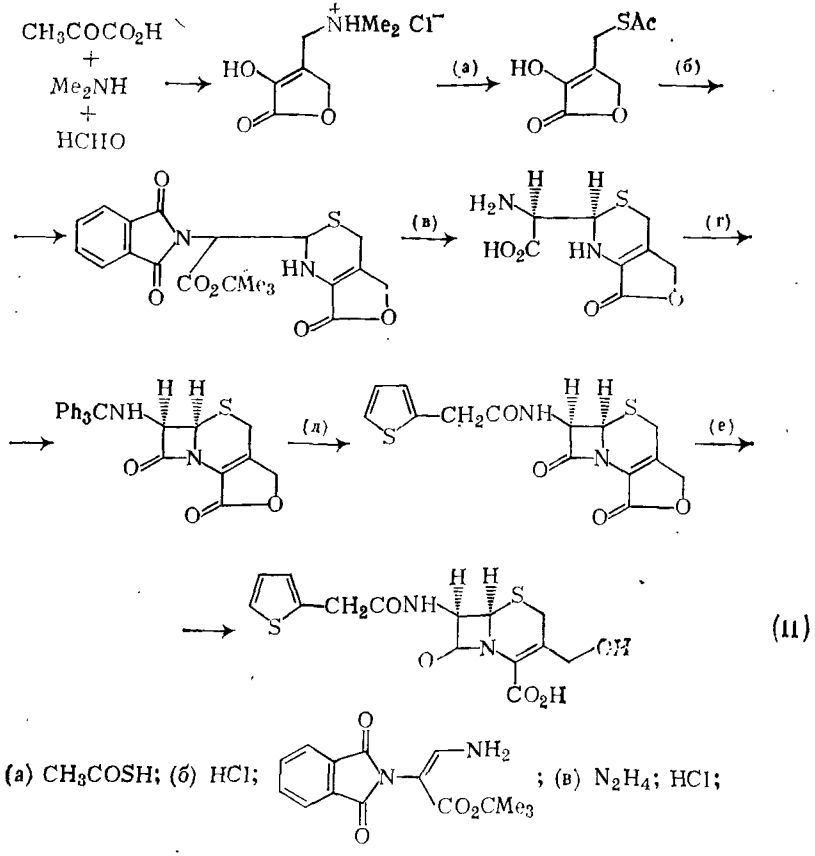
Полный синтез пенициллина был большим достижением, прекрасно иллюстрировавшим умелое применение в синтезе защитных групп. Однако развитие технологии ферментации сделали нерентабельным полный синтез пенициллина. Сегодня это еще более справедливо, однако научный интерес к разработке проблем синтеза пенициллина продолжает стимулировать химические изыскания. Первый полный стереоспецифичный синтез производного пенициллина приведен на схеме (10) [35].

### 23.5.7. СИНТЕЗ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

Общий подход к синтезу пенициллинов, разработанный Шиханом и Хенери-Логаном, успешно использован и для синтеза цефалоспорина; этот синтез приведен на схеме (11). Основание Манниха, полученное из пировиноградной кислоты, формальдегида и диметиламина, превращали по реакции диметиламиногруппы с тиоуксусной кислотой в соответствующий тиолацетат. Защиту с тиольной группой затем удаляли в присутствии кислоты, после чего проводили конденсацию с производным аминометиленглицина и получали *эритро-* и *трео*-изомеры продукта конденсации. Хотя эти изомеры и возможно разделить, однако после обработки гидразином (удаление фталоильной группы) и кислотой (удаление *трет*-бутильной сложноэфирной группы) оба изомера превращались в нужную *трео*-аминокислоту. Тритилирование аминогруппы значительно облегчает образование β-лактама, проводимое с помощью дициклогексилкарбодиимида. После удаления в присутствии кислоты тритильной группы продукт разделили на диастереомеры, используя (+)-винную кислоту, и затем ацилировали тиенилацетилхлоридом. Полученное вещество оказалось идентичным с образцом, полученным из цефалотина. Превращение лактона в гидроксикислоту уже осуществляли с продуктом, полученным из природного цефалотинлактона [34—36].

Совсем иной подход к синтезу цефалоспорина был разработан Вудвардом и сотр., о чем впервые было сообщено в Нобелевской лекции 1965 г. {схема (12)} [37—38].

В исходном *L*-цистеине три функциональные группы сначала защищали тиазолидиновый сложноэфирной группировкой, что позволяло ввести новую функциональную группу рядом с атомом серы, соблюдая полный стереохимический контроль. При действии на продукт диметилового эфира азодикарбоновой кислоты происходит присоединение тиазолидинового цикла по связи N=N, вначале через атом серы с последующим 1,2-сдвигом. Окисление гидразо-



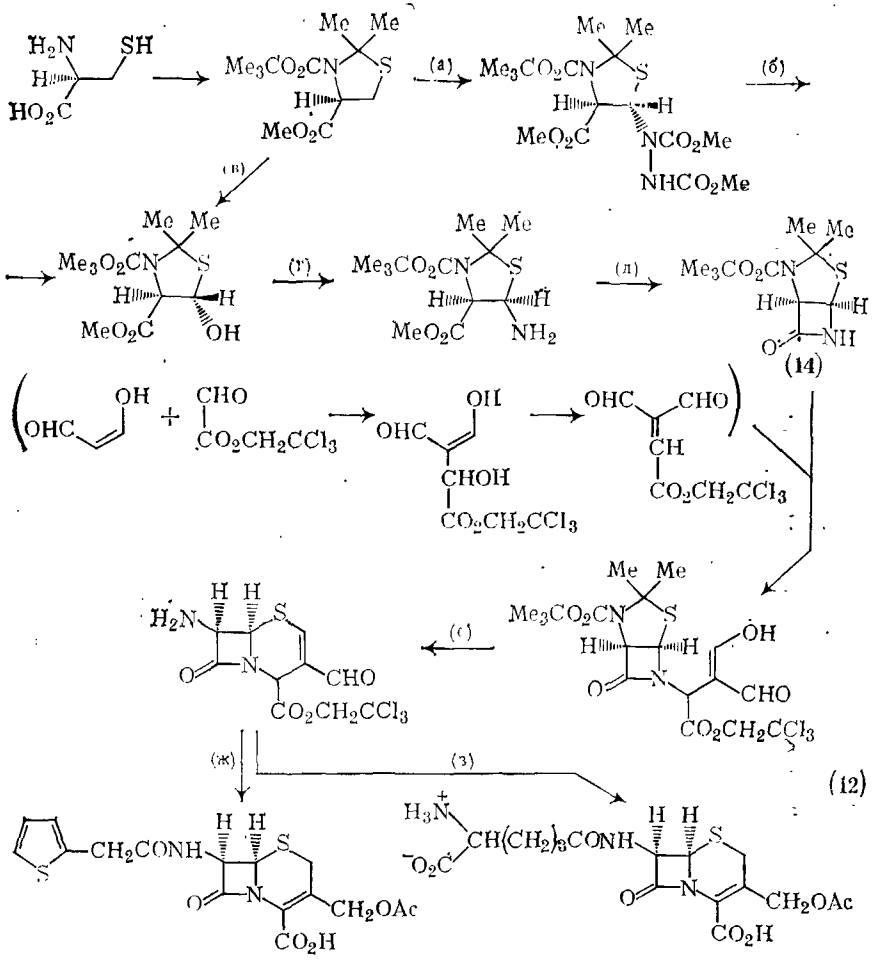

(11)

(а) $CH_3COSH$; (б) HCl; ; (в) $N_2H_4$; HCl;

(г) $Ph_3CCl$; $C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$; (д) HCl; $C_4H_3SCH_2COCl$; (е) КОН

группировки тетраацетатом свинца приводит к ацетоксиэфиру. Впоследствии было установлено, что ацетат (и его эпимер) могут быть получены из тиазолидинового производного путем облучения ультрафиолетовым светом в присутствии тетраацетата свинца. Превращение гидроксиэфира в аминоэфир с обращением конфигурации было достигнуто путем мезилирования, реакции с азидом и восстановлением амальгамой алюминия. Замыкание β-лактамного цикла осуществлено реакцией *цис*-иминоэфира с триалкилалюминием. Образующийся β-лактам **(14)** — важный интермедиат, используемый не только для получения цефалоспоринов, но и для синтеза многочисленных структур, родственных пенициллинам **(1)** и цефалоспоринам **(2)**.

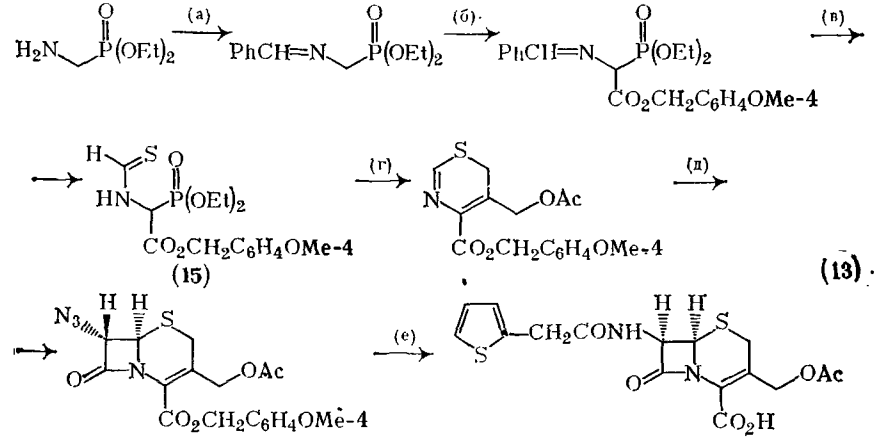
В силу подавления резонанса амидной группы в четырехчленном кольце β-лактамы сохраняют в определенной степени характер аминов и поэтому легко присоединяются к ненасыщенным диальдегидам, образующимся из малонового диальдегида и трихлорэтил-



(а) $MeO_2CN{=}NCO_2Me$; (б) $Pb(OAc)_4$; NaOAc, MeOH; (в) $Pb(OAc)_4$, $Me_3COH$, $h\nu$; NaOAc, MeOH; (г) $MeSO_2Cl$, $(Me_2CH)_2NH$; $NaN_3$; Al/Hg, MeOH; (д) Al(Bu-изо)$_3$; (е) $CF_3CO_2H$; (ж) $C_4H_3SCH_2COCl$, $C_5H_5N$; $B_2H_6$; $Ac_2O$, $C_5H_5N$; Zn, водн. AcOH; (з) $Cl_3CCH_2O_2CNHCH(CO_2H)(CH_2)_3CO_2H + C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$; $Cl_3CCH_2OH$, $C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$, $C_5H_5N$; $B_2H_6$; $Ac_2O$, $C_5H_5N$; Zn, водн. AcOH

глиоксилата. При удалении защитных групп обработкой трифторуксусной кислотой попутно происходит замыкание дигидротиазинового кольца. Свободную аминогруппу ацилируют тиенилацетилхлоридом или соответствующим образом защищенной *D*-α-аминоадипиновой кислотой. После восстановления дибораном альдегидной группы и ацилирования полученного при этом спирта с последующим действием каталитических количеств пиридина для перемещения двойной связи в нужное положение были получены защищенные цефалотин и цефалоспорин С соответственно. На последней стадии трихлорэтильную группу удаляли восстановительным отщеплением цинком в водной уксусной кислоте.

Другой подход, доказавший свою эффективность и широкий диапазон применения, был использован группой фирмы Мерк. На схеме (13) показан синтез цефалотина. Ключевым интермедиатом здесь является тиоамид **(15)**, из которого получают *6H*-1,3-тиазин. Реакция циклоприсоединения между *6H*-1,3-тиазином и кетеном, образующимся непосредственно в реакционной смеси из азидоацетилхлорида и триэтиламина, приводит к смеси диастереомерных азидов, которые при гидрировании превращали в соответствующие амины. Поскольку эфир 7α-аминоцефалоспорановой кислоты можно через соответствующее Шиффово основание изомеризовать в эфир 7β-аминоцефалоспорановой кислоты, нужный диастереомер может быть получен с хорошим выходом. Ацилированием этого соединения тиенилацетилхлоридом с последующим удалением защитной эфирной группы получен рацемический цефалотин [39].



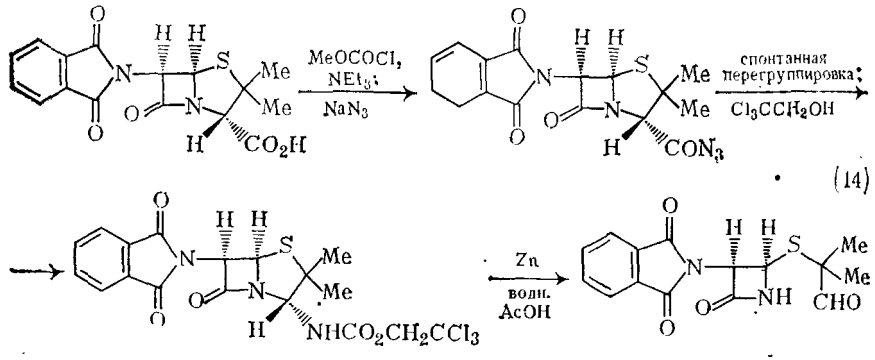
(а) PhCHO; (б) PhLi; $ClCO_2CH_2C_6H_4OMe$-4; (в) 4-$MeC_6H_4SO_3H.H_2O$; HCSOEt; (г) $ClCH_2COCH_2OAc$, $K_2CO_3$; (д) $N_3CH_2COCl$, $NEt_3$; (е) $H_2$, Pt; 4-$O_2NC_6H_4CHO$, PhLi, −78 °C, водн. AcOH; TsOH; $C_4H_3SCH_2COCl$, $C_5H_5N$; $CF_3CO_2H$

### 23.5.8. ПРЕВРАЩЕНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

Ключевым промежуточным продуктом в полном синтезе цефалоспоринов, осуществленном Вудвардом и сотр., был β-лактам **(14)** [37, 38]. Этот продукт был получен из пенициллина, чем было достигнуто превращение пенициллина в цефалоспорины [40].

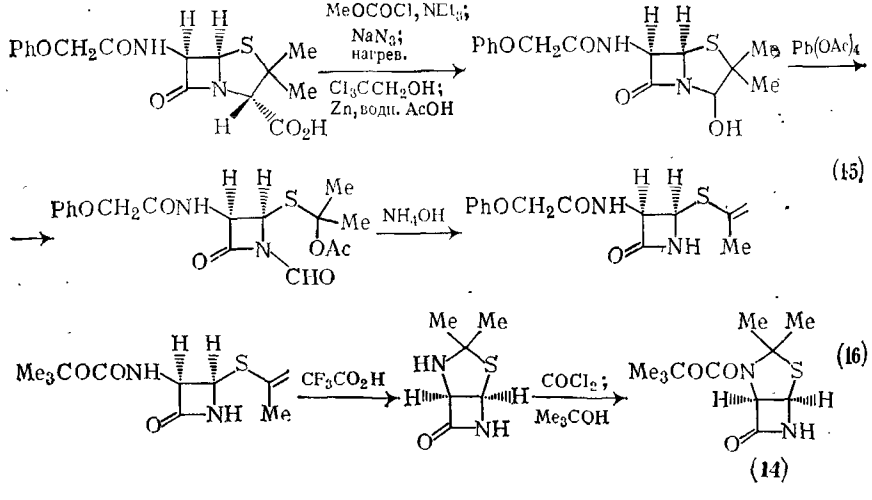
Раскрытие тиазолидинового кольца пенициллина без одновременного расщепления β-лактамного цикла может быть достигнуто многими путями {см. схему (14)}. После превращения кислотной

функции пенициллина в соответствующий азид возможно осуществить перегруппировку Курциуса [41]. Если получающийся при этом изоцианат превратить действием трихлорэтанола в трихлорэтилуретан, то после удаления трихлорэтильной группы обработкой цинком и водной уксусной кислотой можно получить с хорошим выходом продукт раскрытия цикла — альдегид [40].




(14)

Полученный, исходя из пенициллина {схема (15)}, соответствующий альдегид (находящийся в равновесии с циклическим карбиноламином) при действии тетраацетата свинца превращали в соответствующий третичный ацетат, который, легко отщепляя уксусную кислоту, с высоким выходом дал винилсульфид.




(15)

(16)

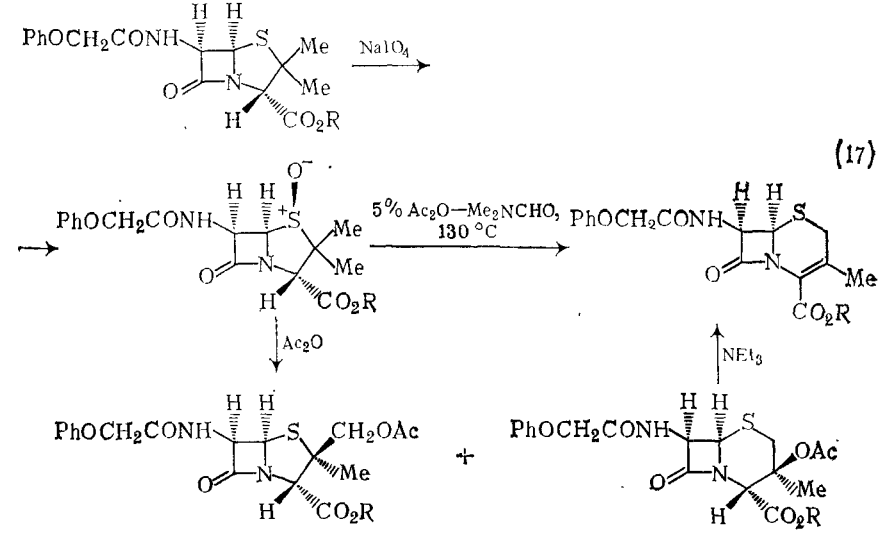
(14)

Если боковая цепь представлена *трет*-бутоксикарбонильной группой {схема (16)}, то при обработке соответствующего винилсульфида трифторуксусной кислотой происходит отщепление *трет*-бутоксикарбонильной группы и получающийся амин замыкается в тиазолидиновое кольцо. Повторное введение *трет*-бутоксикарбонильной группы приводило к промежуточному продукту Вудварда (14).



Более непосредственным и эффективным способом превращения пенициллинов в цефалоспорины стали реакции сульфоксидов пенициллина. Поскольку производство пенициллинов путем ферментации обходится значительно дешевле, чем производство цефалоспорина С, этому способу было уделено большое внимание [42, 43]. Кажется вполне вероятным, что в будущем цефалоспорины будут получать путем химических превращений пенициллинов.

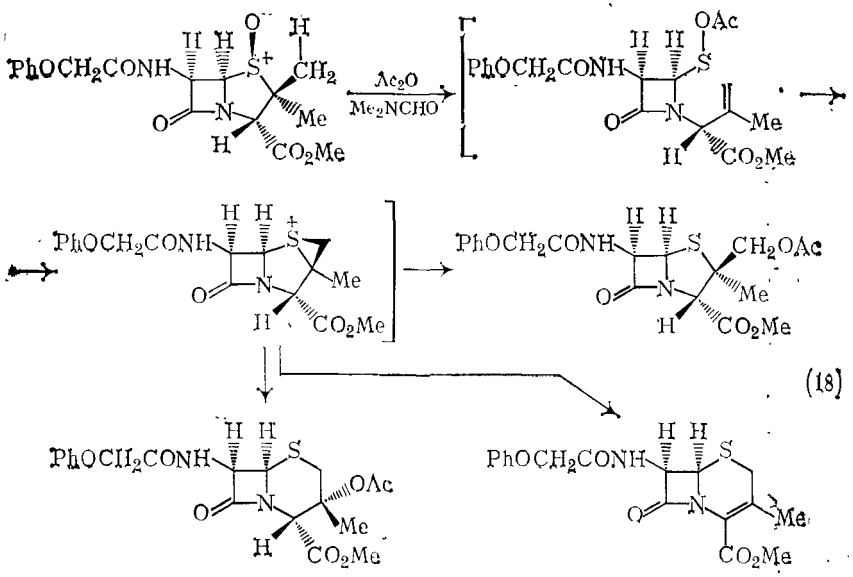
Морин и сотр. полагали, что превращение тиазолидинового кольца в дигидротиазиновое должно включать окисление [44]. Они избрали путь окисления атома серы в пенициллиновом эфире в соответствующий сульфоксид. Это превращение стереоспецифично и с высоким выходом проводят окислением периодатом натрия. Сульфоксид метилового эфира пенициллина при кипячении с уксусным ангидридом превратился с выходом 60 % в смесь двух изомеров (соотношение 2 : 1) — производных пенициллина и цефалоспорина. Производное цефалоспорина при действии триэтиламина отщепляло уксусную кислоту и превращалось в дезацетоксицефалоспорин. Этот дезацетоксицефалоспорин был получен, однако, непосредственно из сульфоксида пенициллина с выходом 10—20 % при перегруппировке в ксилоле при 130 °С в присутствии следовых количеств 4-толуолсульфокислоты. Выход в этой реакции можно существенно увеличить (до 60 %), если ее проводить в 5 %-ном растворе уксусного ангидрида в диметилформамиде {схема (17)} [45]




(17)

Высокая стереоспецифичность окисления пенициллинов в соответствующие сульфоксиды обусловлена, вероятно, водородной

связью, возникающей между периодат-ионом и группой NH боковой цепи, что благоприятствует атаке реагента именно с этой стороны молекулы. В результате исследования механизма сульфоксидной перегруппировки установлено, что интермедиатами этого превращения являются сульфеновая кислота и сульфониевый ион {схема (18)}. Сульфеновая кислота может быть идентифицирована многими способами, а получающийся из нее сульфониевый ион — интермедиат, обычный для подобных превращений промежуточный продукт.

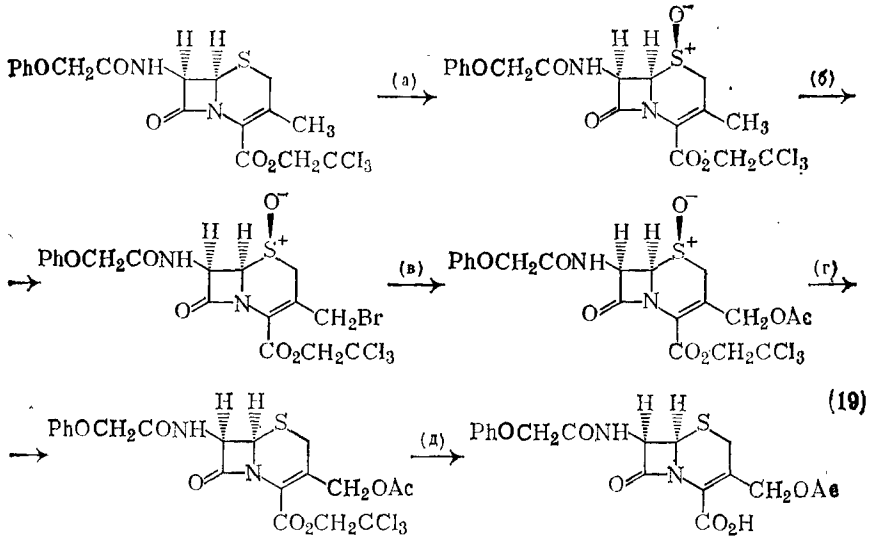



(18)

Наиболее эффективный способ превращения пенициллина в дезацетоксицефалоспорановую кислоту — это одностадийное превращение сульфоксида пенициллина G в соответствующую дезацетоксицефалоспорановую кислоту с выходом свыше 80 % и с промежуточной защитой карбоксильной функции в виде триметилсилильного эфира с использованием для этой цели *N*,*O*-бис(триметилсилил)ацетамида [45а].

Дезацетоксицефалоспорины, которые сейчас лучше всего получать из пенициллинов, обладают сами по себе ценными антибактериальными свойствами, но могут также превращаться в цефалоспорины. Один из лучших способов такого превращения показан на схеме (19) [43]. При этом сначала атом серы превращают в сульфоксидную группировку, что защищает серу от реакции с *N*-бромсукцинимидом и направляет бромирование на метильную группу. Замена аллильного бромида на ацетат с последующим восстановлением сульфоксидной группировки приводит к цефалоспорановому эфиру, легко превращаемому после снятия защиты в соответствующую кислоту.

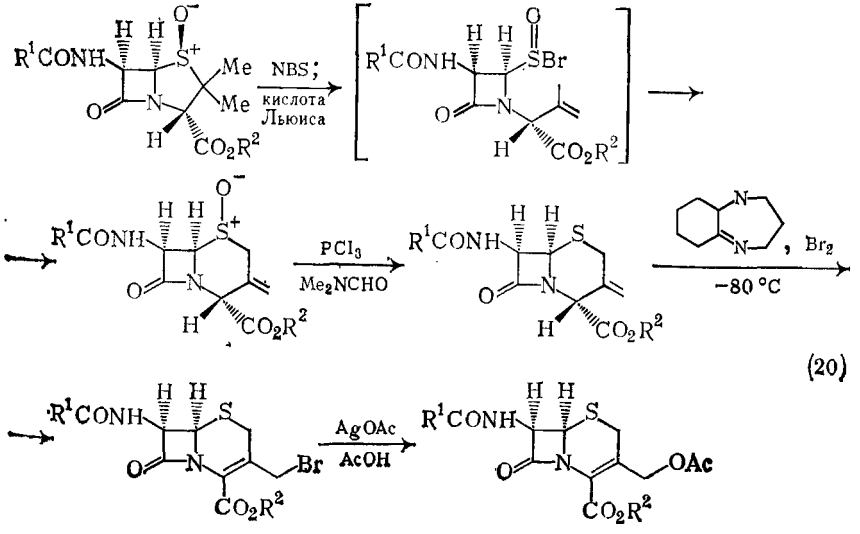





(19)

(а) *м*-$ClC_6H_4CO_3H$; (б) NBS, *hν*; (в) KOAc, $Me_2NCHO$; (г) $PCl_3$, $Me_2NCHO$; (д) Zn, водн. AcOH

С тех пор как 3-метиленцефамы стали ценными промежуточными продуктами для синтеза 3-галоген- и 3-метоксицефемов {см. схему (8)}, а также цефалоспорановых кислот, проводились поиски путей соответствующих синтезов, исходя из пенициллинов {схема (20)}. Превращение сульфоксидного производного эфира пенициллина в сульфинилгалогенид действием *N*-галогензамещенного соединения (например, *N*-бромсукцинимида) с последующим

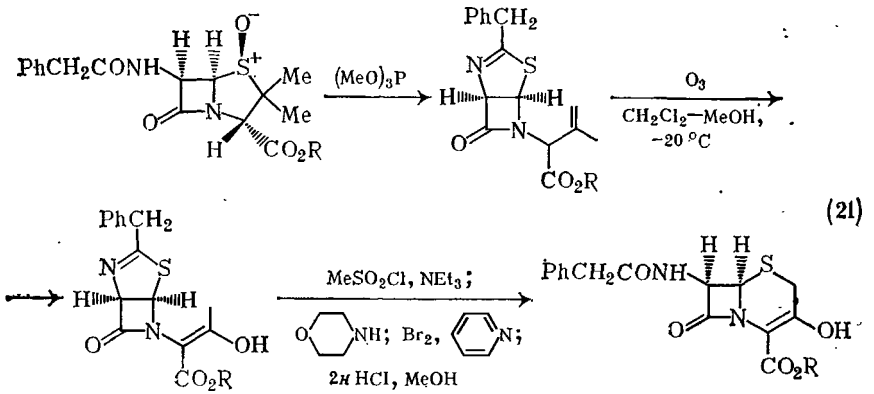



(20)

действием кислоты Льюиса (например, $TiCl_4$, $AlCl_3$, $ZnCl_2$) приводит к сульфоксиду 3-метиленцефама [45б]. При восстановлении сульфоксида трихлоридом фосфора с последующим бромированием в присутствии сильного органического основания получают 3-бромметилцефем, превращаемый далее действием ацетата серебра в уксусной кислоте в цефалоспорановую кислоту [45в].

Превращение сульфоксида 3-метиленцефама в сульфоксиды 3-метокси- и 3-галогенцефема достигается с помощью реакций, приведенных на схеме (8). Заключительное восстановление сульфоксидной группы проводили в присутствии трихлорида фосфора.

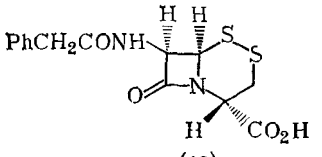
Тем не менее вряд ли можно сомневаться, что наиболее эффективный из всех известных методов превращения пенициллинов в 3-гетерозамещенные цефемы — это разработанный лабораторией Шиноги метод, показанный на схеме (21) [45г]. Исходный пенициллин, например пенициллин G, вначале превращают в *п*-нитробензиловый эфир его сульфоксида и далее при действии триметилфосфита по описанной ранее методике [45д] получают конденсированный тиазолин-β-лактам. После озонолиза олефина все последующие реакции проводят без выделения в одном реакционном сосуде. Вначале мезилируют енол, который далее действием морфолина превращают в енамин. Затем проводят бромирование в аллильное положение с последующим гидролизом енамина хлороводородной кислотой. Получающийся при этом бромкетон самопроизвольно циклизуется и путем таутомеризации превращается в 3-гидроксицефем. Выход кристаллизующегося из реакционной смеси продукта составляет 70 %, что, несомненно, делает этот процесс привлекательным для промышленности [45д].



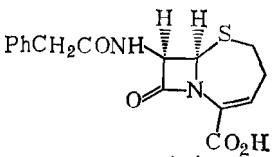

(21)

### 23.5.9. АНАЛОГИ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ ПО СТРУКТУРЕ ЦИКЛОВ

Из общих соображений о характере действия пенициллинов и цефалоспоринов можно представить, что ацилдипептидная группировка и реакционноспособное β-лактамное кольцо играют важную роль для проявления антибактериальной активности. Но отсюда, однако, вовсе не обязательно следует, что β-лактамный цикл должен быть сконденсирован с тиазолидиновым или дигидротиазиновым циклами, и теперь существует новая группа β-лактамных антибиотиков, содержащих различные гетероциклы.

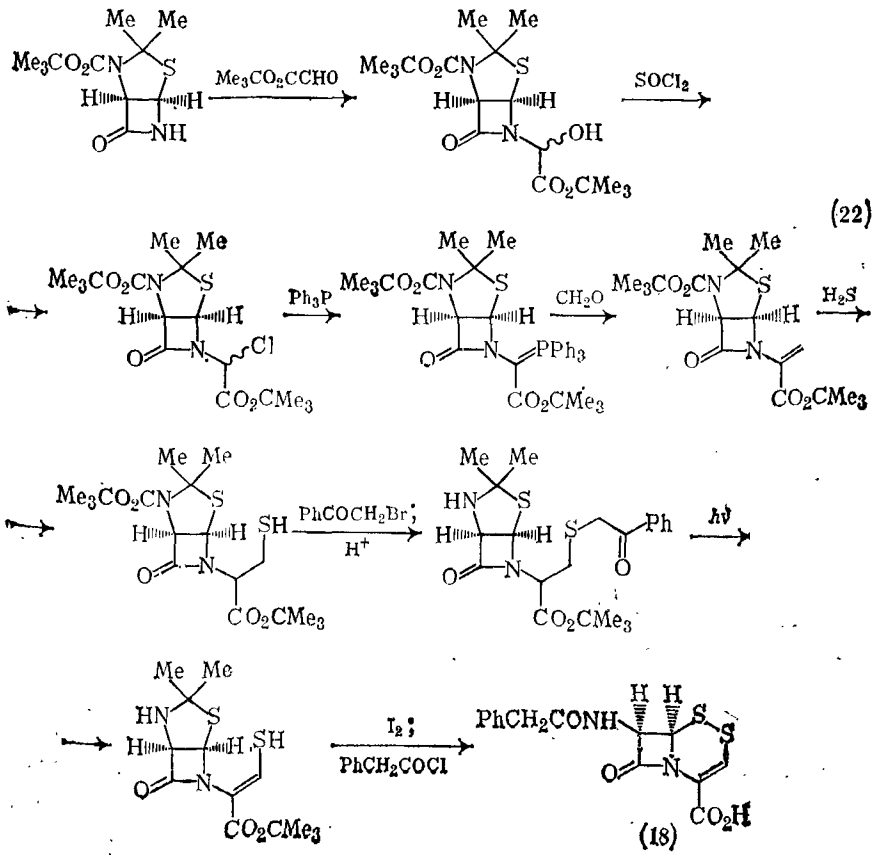



(16)




(17)

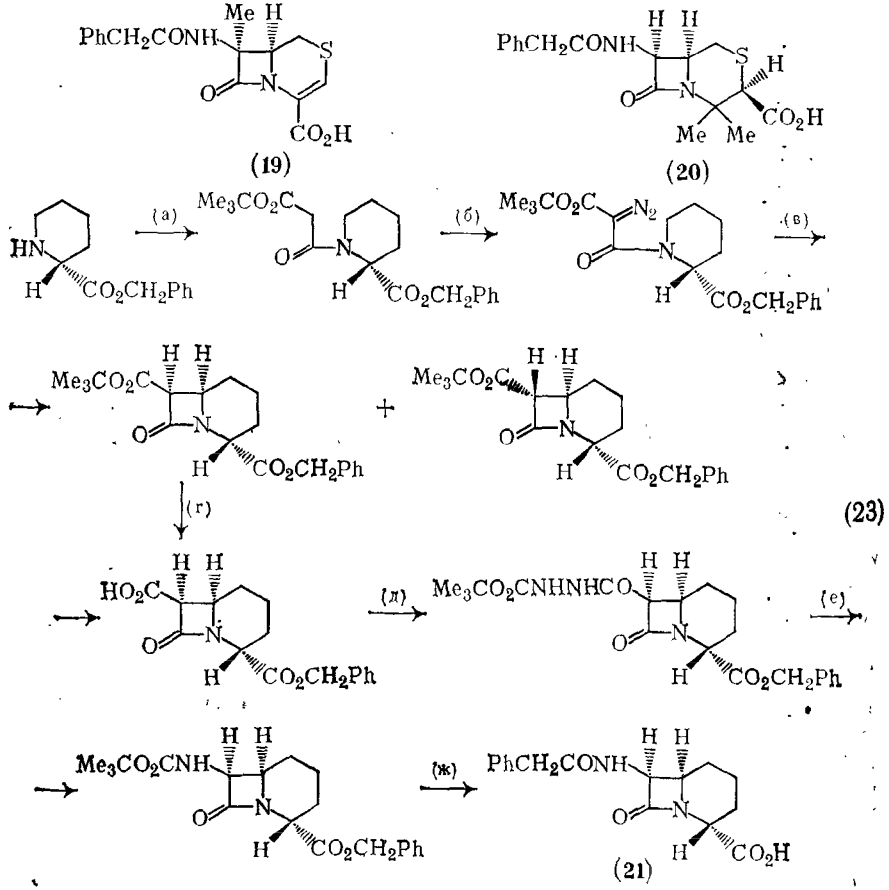
Применяемый в синтезе Вудварда цефалоспорина С промежуточный продукт {**14**, см. схему (12)}, который может быть также получен из пенициллина, является потенциальным предшественником производных пенициллинов и цефалоспоринов, отличающихся гетероядрами. Этот промежуточный продукт (и его ближайшие структурные аналоги) были использованы для получения некото-




(22)

(18)

рых гетероядерных аналогов цефалоспорина — соединений (16) и (17). Синтез их ближайшего аналога (18) показан на схеме (22) [46]. β-Лактам проявляет в определенной мере свойства амина и легко присоединяется к эфирам глиоксиловой кислоты. Получающуюся при этом смесь изомерных карбинолов превращают действием тионилхлорида в соответствующие хлориды, которые при действии трифенилфосфина и основания образуют устойчивый индивидуальный фосфоран. При реакции фосфорана с формальдегидом образуется эфир α,β-ненасыщенной кислоты, присоединяющей сульфид водорода по реакции Михаэля. Полученный тиол алкилируют фенацилбромидом с последующим избирательным отщеплением *N-трет*-бутоксикарбонильной группы в присутствии кислоты. Дальнейший фотолиз, промотируемый расщеплением кетона по

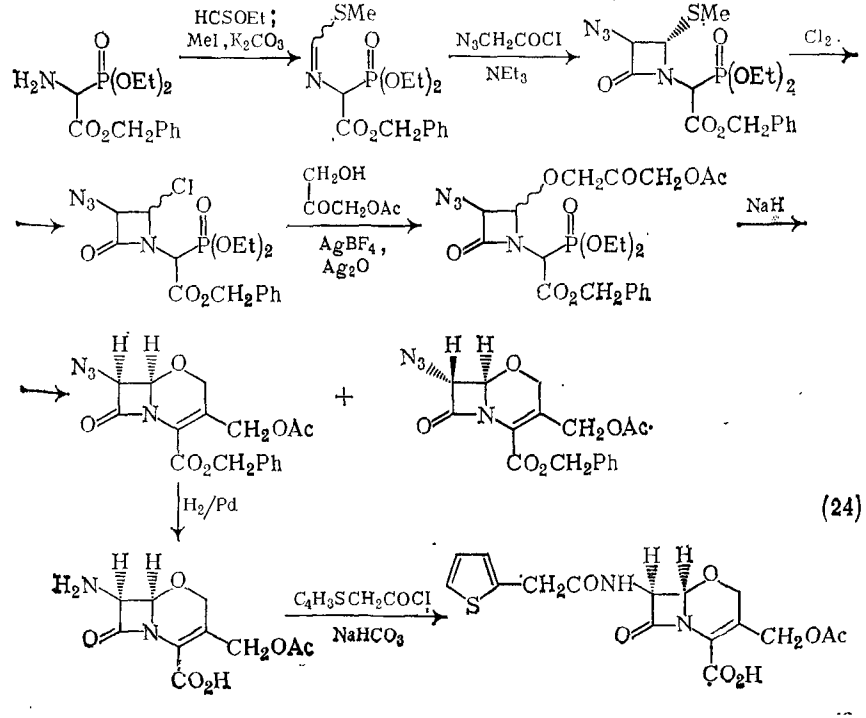


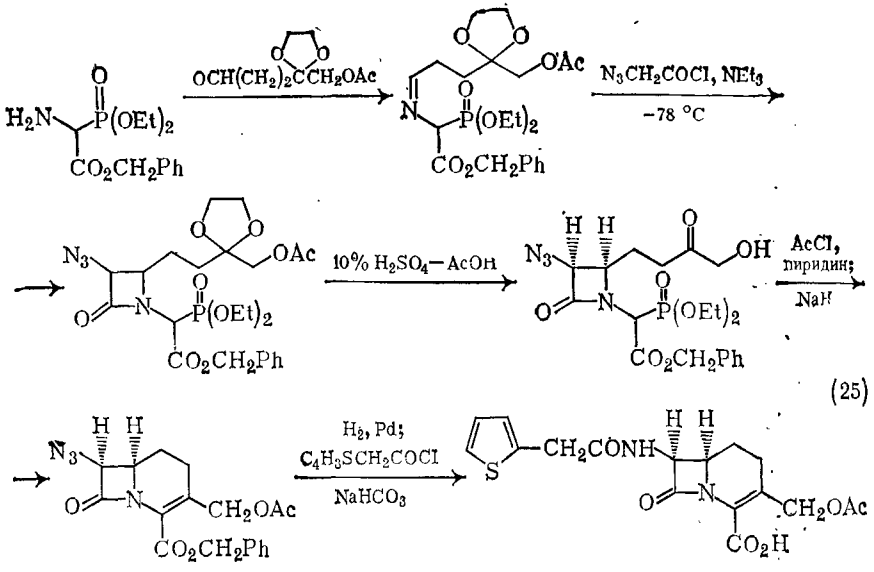

(а) $Me_3CO_2CH_2CO_2H$, $C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$; (б) 4-$MeC_6H_4SO_2N_3$, $NEt_3$; (в) $h\nu$; (г) $CF_3CO_2H$; (д) $Me_3CO_2CNHNH_2$, $C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$; (е) $CF_3CO_2H$; $NaNO_2$, HCl; нагрев.; $Me_3COH$; (ж) $CF_3CO_2H$; $PhCH_2COCl$, $NEt_3$; $H_2$, Pd

типу Норриша II, приводит к быстро енолизующемуся тиолальдегиду. Последующая обработка иодом приводит к дисульфидной связи и удалению защитных групп. Синтез завершается фенилацетилированием аминогруппы.

Важный вопрос, касающийся связи между строением и активностью пенициллинов и цефалоспоринов, состоят в том, можно ли заменить атом серы. Разработан общий метод синтеза отличающихся структурой ядер пенициллинов и цефалоспоринов, например (19) и (20). Синтез аналога (21) представлен на схеме (23) [47]. Ключевая стадия этого синтеза — фотолиз диазоамида обеспечивает регио- и стереоспецифичное внедрение карбена в гетероядро. При этом образуются лишь два стереоизомерных лактама. Превращение карбоксильной группы боковой цепи в аминную функцию достигалось путем перегруппировки Курциуса азида кислоты; завершающая стадия включает фенилацетилирование и удаление защитных групп.

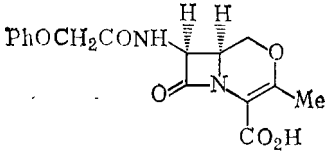
Первоначально избранный для цефалотина {см. схему (13)} путь синтеза был изменен с тем, чтобы получить отличающиеся структурой ядер аналоги 1-оксацефалотина {схема (24)} и 1-карбацефалотина {схема (25)}, в которых сера заменена соответственно на кислород и метиленовую группу [48]. Оба этих отличающихся строением ядра аналога показали сравнимую с самим цефалотином антибактериальную активность.



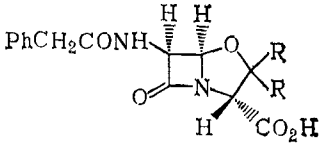


(25)

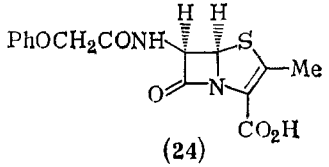
Группа Бристоля-Мейера описала синтез аналога цефалоспорина (**22**), который обладает сравнимой с цефалексином (**13**) [49] активностью. Группой Мерка получен ряд 1-оксадетиапенициллинов {например, (**23**) R = Me или H}, которые оказались активными *in vitro*, но слишком неустойчивыми для изучения *in vivo* [50]. Надежды соединить в одной молекуле наиболее ценные осо-



(**22**)



(**23**)



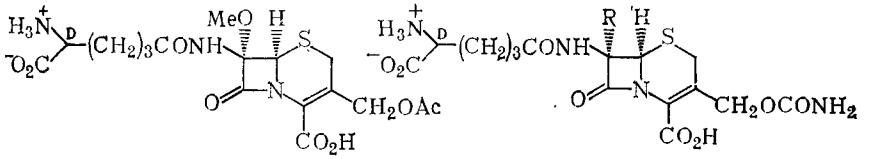
(**24**)

бенности как пенициллинов, так и цефалоспоринов, привели группу Вудвардовского института, работающую в Базеле, к разработке синтеза пенемового (β-лактамтиазолинового) ядра, и описан синтез некоторых производных, например (**24**) [51].

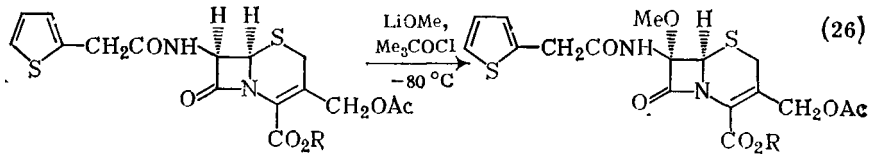


## 23.5.10. НОВЫЕ АНТИБИОТИКИ С β-ЛАКТАМНОЙ ГРУППИРОВКОЙ

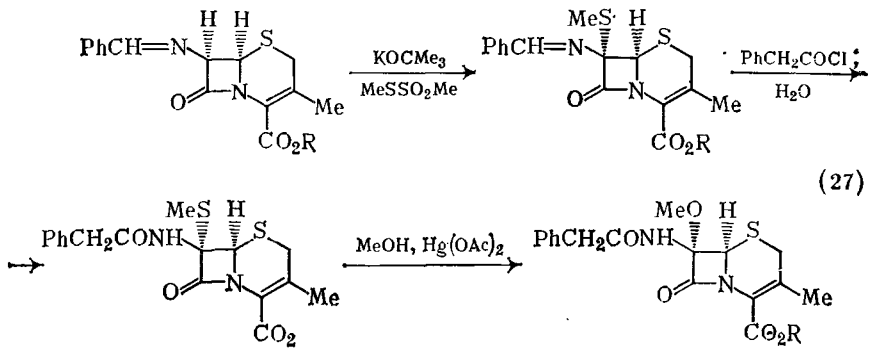
В результате неустанно продолжавшихся поисков новых антибиотиков из микроорганизмов двух видов *Streptomyces* были выделены три новых антибиотика с β-лактамной группировкой, родственные цефалоспорину С. 7α-Метоксицефалоспорин С (**25**) продуцируется штаммом *Streptomyces lipmanii NRRL* 3584, два родственных антибиотика (**26**; R = H или OMe) — *Streptomyces clavuligerus NRRL* 3585 [52]. Цефалоспорин С был превращен в карбамат (**26**; R = H) для превращения цефалоспоринов в их 7α-метоксипроизводные разработано множество методов. Два несколько различных друг от друга подхода показаны на схемах (26) [53] и (27) [54].



(**25**) (**26**)



(26)



(27)

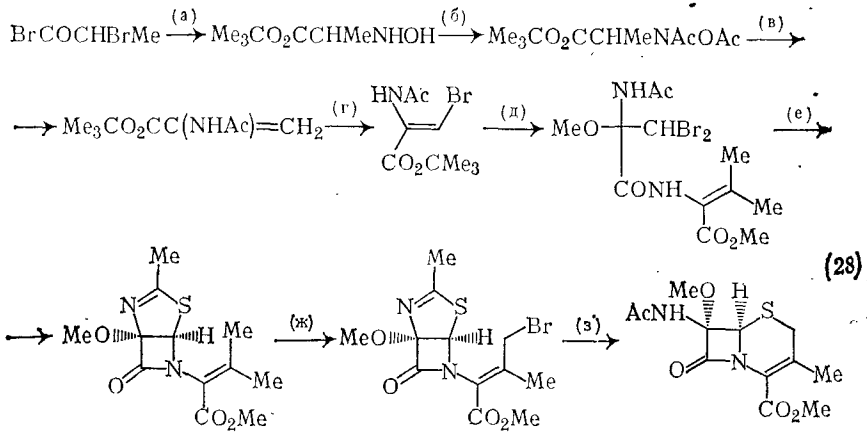
Опубликован полный синтез производных 7α-метоксидезацетоксицефалоспорановой кислоты. Он явно соответствует биосинтетической схеме и изображен на схеме (28) [55].

Многочисленные достоинства пенициллинов, благодаря чему пенициллины занимали передовые позиции в антибактериальной химиотерапии в течение более 30 лет, привели недавно к развитию чувствительных к β-лактамам штаммам *E. coli* и других организ-

мов, используемых для обнаружения микробных продуктов, содержащих β-лактамную группировку. С помощью такого метода были обнаружены два новых источника антибиотиков с β-лактамной группировкой. Нокардицин А (**27**) выделен из бактерий вида *Nocardia*; он оказался активным против ряда грам-отрицательных бактерий, показав особо высокую активность против *Pseudomonas*, *Proteus*, *E. coli*. Показано, что это вещество ингибирует биосинтез бактериальной клеточной стенки, но удивительной особенностью нокардицина А является его значительно бóльшая активность *in vivo*, чем *in vitro* [56]. Шесть родственных ему метаболитов, нокардицины B—G выделены из ферментационной жидкости, и установлены структуры (**28**)—(**33**). Однако их антибактериальная активность ниже, чем у нокардицина А. Некоторые из них, включая нокардицин А, были синтезированы [56а].

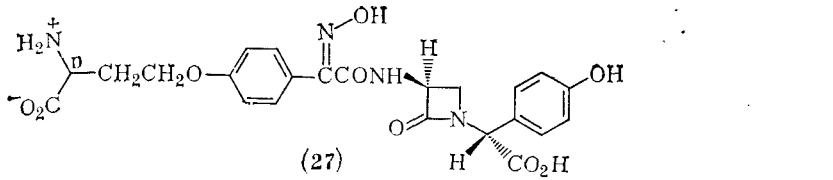
Тиенамицин (**34**) выделен из *Streptomyces cattleya*; и он оказался активным как против грам-положительных, так и против грам-отрицательных бактерий [57]. Его неустойчивость в водном растворе может, однако, помешать использованию в клинике.

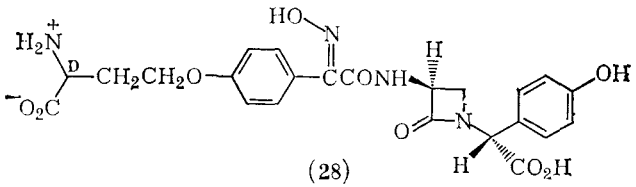
Клавулановая кислота (**35**), выделенная из *Streptomyces clavuligerus* оказалась ингибитором β-лактамазы и может использоваться совместно с пенициллинами [58]. Она проявляет антибактериальную активность, хотя ее молекула и не содержит боковой цепи [59]. Эти новые антибиотики с β-лактамной группировкой указывают на неполноту наших знаний о связи структуры с активностью в этом ряду, а также на то, что среди этих антибиотиков возможны бóльшие структурные вариации, чем мы это до сих пор представляли.

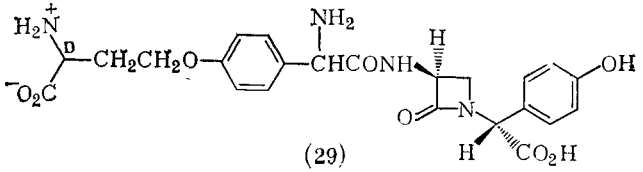


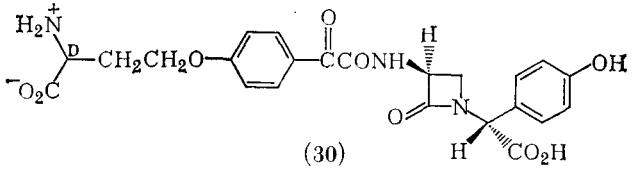

(а) $Me_3COH$, $C_5H_5N$; $NH_2OH$; (б) $Ac_2O$, 100 °C; (в) $NEt_3$; (г) $Br_2$; $NEt_3$; (д) $Br_2$, MeOH; $C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$, $MeO_2CCH(NH_2)C(SH)Me_2$; *n*-$MeC_6H_4SO_2Cl$, $C_5H_5N$; $Et_3N$; (е) $P_2S_5$; NaH; (ж) NBS; (з) комнатная темп., 3 дня

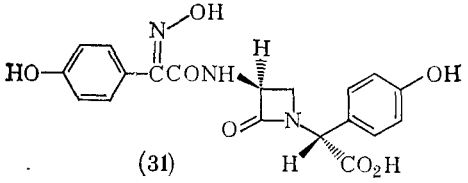


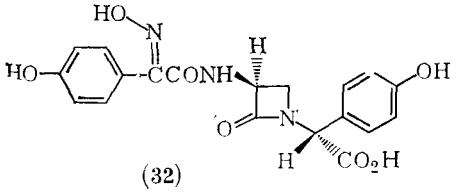

(27)

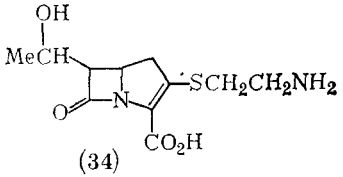

(28)

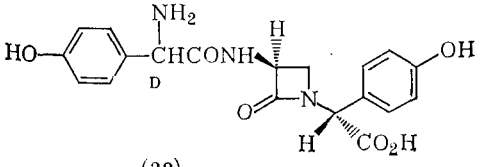

(29)

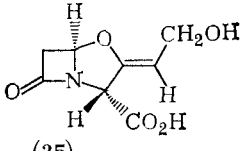

(30)


(31)


(32)


(34)


(33)


(35)

Известно, что β-лактамная группировка присутствует в некоторых других природных продуктах, включая антибиотики блеомицин и флеомицин. Однако наличие β-лактамного цикла является их единственным сходством с пенициллином и цефалоспорином, и направление их действия почти наверняка различно [60]. По этой причине они здесь не рассматриваются.

Вряд ли можно сомневаться, что содержащие β-лактамную группировку антибиотики останутся активной для исследований областью. Определенно то, что наше лучшее понимание связи между структурой и антибактериальной активностью значительно повышает вероятность синтеза новых мощных антибиотиков. И хотя арсенал антибактериальных агентов в настоящее время достаточно велик, бактерии обладают приспособляемостью, и их способность становиться резистентными к существующим антибиотикам не должна упускаться из виду.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *A. Fleming*, Brit. J. Exp. Pathol.. 1929, **10**, 226.
2. *H. W. Florey, E. Chain, N. G. Heatley, M. A. Jennings, A. G. Sanders, E. P. Abraham, and M. E. Florey*, «Antibiotics», Oxford Medical Publications, 1959, vol. I and II.
3. «The Chemistry of Penicillin», ed. H. T. Clarke, J. R. Johnson, and R. Robinson, Princeton University Press, 1949.
4. *G. Brotzu*, Lavori dell'instituto D'Igiene di Cagliari, 1948.
5. *E. P. Abraham and P. B. Loder*, «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 1.
6. *P. A. Lemke and D. R. Brannon*, «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 370.
7. *G. G. F. Newton and E. P. Abraham*, Biochem. J., 1954, **58**, 103; Nature, 1955, **175**, 548.
8. *E. P. Abraham and G. G. F. Newton*, Biochem. J., 1961, **79**, 377.
9. *D. C. Hodgkin and E. N. Maslen*, Biochem. J., 1961, **79**, 393.
10. *H. R. V. Arnestein and D. Morris*, Biochem. J., 1960, **76**, 357.
11. *P. B. Loder and E. P. Abraham*, Biochem. J., 1971, **123**, 481.
12. *P. A. Fawcett, J. J. Usher, and E. P. Abraham*, «Proc. 2nd Internat. Symp. Genetics Industrial Microorganisms», ed. K. D. MacDonald, Academic Press, New York, 1976, 129.
13. *P. A. Fawsett, J. J. Usher, J. A. Huddleston, R. C. Bleaney, J. J. Nisbet, and E. P. Abraham*, Biochem. J., 1976, **157**, 651.
14. *B. W. Bycroft, C. M. Wels, K. Corbett, and D. A. Lowe*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 123.
15. *D. J. Morecombe and D. W. Young*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 198.
16. *F.-C. Huang, J. A. Chan, C. J. Sih, P. Fawcett, and E. P. Abraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3858.
17. *H. Kluender, F.-C. Huang, A. Fitzberg, H. Schnoes, C. J. Sih, P. Fawsett, and E. P. Abraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 4054.
18. *M. Kohsaka and A. L. Demain*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, **70**, 465.
19. *J. L. Strominger*, The Harvey Lectures, 1970, **64**, 179.
20. *J. L. Strominger, P. M. Blumberg, H. Suginaka, J. Umbreit, and G. G. Wickus*, Proc. Roy. Soc., 1971, **B179**, 369.
21. *D. J. Tipper, and J. L. Strominger*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1965, **54**, 1133.
21a. *J.-M. Frere, J.-M. Ghuysen, J. Degelaen, A. Loffet, and H. R. Perkins*, Nature, 1975, **258**, 168; *S. Hammarstrom and J. L. Strominger*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, **72**, 3463; J. Biol. Chem., 1976, **251**, 7947.
22. *R. M. Sweet*, in «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 280.
23. *E. P. Doyle and J. H. C. Nayler*, «Advances in Drug Research», ed. N. J. Harper and A. B. Simmonds, Academic Press, New York, 1964, vol. 1, p. 1.
24. *G. T. Stewart*, «The Penicillin Group of Drugs», Elsevier, Amsterdam, 1965.
25. *M. Gorman and C. W. Ryan*, in «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 532.
26. *B. Loder, G. G. F. Newton, and E. P. Abraham*, Biochem, J., 1961, **79**, 408.
27. *F. M. Huber, R. R. Chauvette, and B. G. Jackson*, in «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 27.
28. *W. E. Wick*, in «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 496.
29. *M. Ochiai, O. Aki, A. Morimoto, T. Okada, and H. Shimadzu*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 800.
30. *M. Ochiai, O. Aki, A. Morimoto, T. Okada, K. Shinozaki, and Y. Asahi*, Tetrahedron Letters, 1972, 2341.
31. *R. R. Chauvette and P. A. Pennington*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 4986; J. Medicin, Chem., 1975, **18**, 496.
32. *J. C. Sheehan and K. R. Henery-Logan*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 1262; 1959, **81**, 3089.
33. *J. E. Baldwin, M. A. Christie, S. B. Haber, and L. I. Kruse*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3045.
34. *R. Heymes, G. Amiard, and G. Nomine*, Compt. rend. (C), 1966, **263**, 170.
35. *G. Nomine*, Chim. Therapeut, 1971, **6**, 53.
36. *S. L. Neidleman, S. C. Pan, J. A. Last, and J. E. Dolfini*, J. Medicin. Chem., 1970, **13**, 386
37. *R. B. Woodward*, Science, 1966, **153**, 487.
38. *R. B. Woodward, K. Heusler, H. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, and H. Vorbruggen*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 852.
39. *R. W. Ratcliffe and B. G. Christehsen*, Tetrahedron Letters, 1973, 4645, 4649; *R. A. Firestone, N. S. Maciejewicz, R. W. Ratcliffe, and B. G. Christensen*, J. Org. Chem., 1974, **39**, 437.
40. *K. Heusler and R. B. Woodward*, Заявка ФРГ 1935607/1970.
41. *J. C. Sheehan and K. G. Brandt*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 5468.
42. *R. D. G. Cooper, L. D. Hatfield, and D. O. Spry*, Accounts Chem. Res., 1973, **6**, 32.
43. *R. D. G. Cooper and D. O. Spry*, in «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology», ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, 183; R. D. G. Cooper, частное сообщение.
44. *R. B. Morin, B. G. Jackson, R. A. Mueller, E R. Lavagnino, W. B. Scanlon, and S. L. Andrews*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 1896.
45. *R. R. Chauvette, P. A. Pennington, C. W. Ryan, R. D. G. Cooper, F. L. Losé, I. G. Wright, E. M. van Heyningen, and G. W. Huffman*, J. Org. Chem., 1971, **36**, 1259.
45а. *J. J. de Koning, H. J. Kooreman, H. S. Tan, and J. Werveij*, J. Org. Chem., 1975, **40**, 1346.
45б. *S. Kukolja*, in «Recent Advances in the Chemistry of β-Lactam Antibiotics», ed. J. Elks, Special Publication No. 28, The Chemical Society, London, 1977, p. 181.
45в. *G. A. Koppel, M. D. Kinnick, and L. J. Nummy*, см. сс. 45b, p. 101.
45г. *Y. Hamashima, K. Ishikura, H. Ishitobi, H. Itani, T. Kubota, K. Minami, M. Murakami, W. Nagata, M. Narisada, Y. Nishitani, T. Okada, H. Onoue, H. Satoh, Y. Sendo, T. Tsuji, and M. Yoshioka*, см. сс. 45б, p. 243.
45д. *R. D. G. Cooper and F. L. José*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 2575.
46. *K. Heusler*, «Cephalosporins and Penicillins — Chemistry and Biology» ed. E. H. Flynn, Academic Press, New York, 1972, p. 255.

47. *G. Lowe*, Chem. and Ind. (London), 1975, 459.
48. *L. D. Cama and B. G. Christensen*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 7582, 7584.
49. *B. R. Belleau, T. W. Doyle, B. Y. Luh, and T. T. Conway*, Ger. Offen. 2 600 039 (Chem. Abs., 1977, **86**, 140 060).
50. *B. G. Christensen and R. W. Ratcliffe*, Ger. Offen., 2 411 856/1974 (Chem. Abs., 1975, **82**, 31 314); Ann. Reports Medicin. Chem., 1976, **11**, 271.
51. *R. B. Woodward*, in «Recent Advances in the Chemistry of β-Lactam Antibiotics», ed. J. Elks, Special Publication No. **28**, The Chemical Society, London, 1977, p. 167.
52. *R. Nagarajan, L. D. Boeck, M. Gorman, R. L. Hamill, C. E. Higgens, M. M. Hoehn, W. M. Stark, and J. G. Whitney*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 2308.
53. *G. A. Koppel and R. E. Koehler*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 2403.
54. *W. A. Slusarchyk, H. E. Applegate, P. Funke, W. Koster, M. S. Puer, M. Young, and J. E. Dolfini*, J. Org. Chem., 1973, **38**, 943.
55. *S.-I. Nakatsuka, H. Tanino, and Y. Kishi*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 5008.
56. *H. Aoki, H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konomi, J. Hosoda, T. Kubochi, E. Iguchi, and H. Imanaka*, J. Antibiotics, 1976, **29**, 492; *M. Hashimoto, T.-A. Komori, and T. Kamiya*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3208.
56a. *T. Kamiya*, in «Recent Advances in the Chemistry of β-Lactam Antibiotics», ed. J. Elks, Special Publication No. 28, The Chemical Society, London, 1977, p. 281.
57. *J. S. Kahan, F. M. Kahan, E. O. Stapley, R. T. Georgeiman, and S. Hernandez*, U. S. Pat. 3 950 357/1976.
58. *T. T. Howarth, A. G. Brown, and T. J. King*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 266; *A. G. Brown, J. Goodacre, J. B. Harbridge, T. T. Howarth, R. J. Ponsford, I. Stirling, and T. J. King*, in Ref. 56a, p. 295.
59. *I. D. Fleming, D. Noble, H. M. Noble, and W. F. Wall*, Ger. Offen., 2 604 697/1976.
60. *H. Umezawa*, «Antibiotics», ed. J. W. Corcoran and F. E. Hahn, Springer-Verlag, Berlin, 1975, vol. III, p. 21.

## 23.6. ПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ

*P. C. Шепард (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge)*

### 23.6.1. ВВЕДЕНИЕ [1, 2]

Формально говоря, пептидный синтез сводится попросту к отщеплению воды от двух молекул аминокислот или пептидов {схема (1)}. Однако на самом деле из-за диполярной природы аминокислот эта реакция термодинамически невыгодна и требует для своего осуществления неприемлемо высоких температур. В любом случае это привело бы к полной неупорядоченности последовательности аминокислот в продукте реакции, а также к продуктам циклизации и поликонденсации.

$$^{+}NH_3CHR^1CO_2^- + {}^{+}NH_3CHR^2CO_2^- \longrightarrow {}^{+}NH_3CHR^1CO{-}NHCHR^2CO_2^- + H_2O \quad (1)$$

Разумно осуществляемый пептидный синтез требует: (а) преодоления диполярного характера реагирующих аминокислот; (б) создания различия между аминокомпонентой (аминокислота, участвующая своим атомом азота во вновь образующейся пептидной связи) и карбоксикомпонентой, участвующей своей карбонильной группой; и (в) дальнейшей активации последней так, чтобы образование связи между аминокислотами протекало эффективно и в очень мягких условиях.

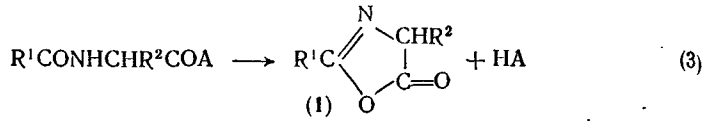
Требования (а) и (б) обычно выполняются применением удаляемых впоследствии защитных групп. Пептидный синтез в присутствии оснований {схема (2)} сопровождается удалением X (защитная группа по N- или по аминогруппе, см. раздел 23.6.2.1) и Y

$$\left.\begin{array}{l} {}^{+}NH_3CHR^1CO_2^- \longrightarrow XNHCHR^1CO_2H \\ \qquad\qquad\qquad\qquad \text{карбоксикомпонента} \\ {}^{+}NH_3CHR^2CO_2^- \longrightarrow NH_2CHR^2CO_2Y \\ \qquad\qquad\qquad\qquad \text{аминокомпонента} \end{array}\right\} \longrightarrow XNHCHCO{-}NHCHCO_2Y \quad (2)$$

(защита по С- или карбоксигруппы). Защиты амино- и карбоксигрупп должны также быть способны отщепляться независимо одна от другой, а также независимо от какой-либо иной защитной группы в полифункциональной боковой аминокислотной цепи, что позволило бы наращивать пептид с любого конца. Защита аминогруппы приводит к подавлению основности и нуклеофильности атома азота, что предотвращает протонирование и ацилирование и высвобождает α-карбоксигруппу из ее внутренней соли для последующей ее активации. Строго говоря, ковалентно связанная карбоксильная защита Y не обязательна, и металлические или другие соли аминокислот (например, $NH_2CHRCO_2^-Na^+$) иногда могут использоваться в качестве аминокомпоненты. Однако для разрешения проблем растворимости, выделения и для повышения эффективности образования пептидной связи в качестве аминокомпоненты используют эфиры аминокислот или другие мало реакционноспособные производные карбоновых кислот. Это обстоятельство позволяет также более гибко выбирать условия образования пептидной связи.

В принципе, активация карбоксильной группы может достигаться с помощью широко применяемых реакций ацилирования, известных из общей органической химии (образование хлорангидридов, ангидридов и т. д.). Однако аминокислоты и пептиды являются полифункциональными соединениями, и нежелательная реакционная способность в той или иной мере всегда присутствует даже в полностью защищенных производных. Эта реакционная способность часто возрастает вследствие определенных пространственных соотношений между боковыми группами или концевыми функциональными группами и находящимися внутри молекулы пептидными связями. Например, неожиданно легко могут происходить β-элиминирование и замыкание пятичленного цикла. Главным образом по этой причине пептидный синтез представляет собой отдельную техническую операцию; необходимо точное следование оптимальным условиям реакции, чтобы свести к минимуму указанные побочные реакции. Важным примером этих последних является образование оксазолонов (1) путем взаимодействия акти-

вированной концевой карбоксильной группы и соседней пептидной связью {схема (3)}.



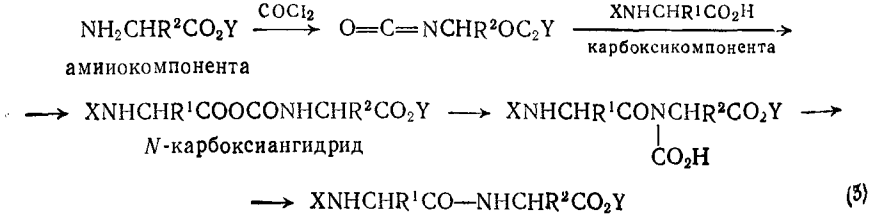
(3)

Это особенно неприятная побочная реакция, поскольку она обычно приводит к рацемизации хирального α-центра. Рацемизация остатков индивидуальных аминокислот в полипептидах часто приводит к образованию практически неразделимых смесей диастереомеров. Кроме того, биологические свойства пептидов, создание которых чаще всего является целью пептидного синтеза, обычно критическим образом зависят от правильности стереохимии. Хотя и имеется много возможных механизмов рацемизации производных α-аминокислот, возможно, что в отсутствие особых эффектов боковой группы или заместителя при азоте, наиболее существенный процесс — это образование оксазолона [3]. Исчезновение оптической активности оксазолонов (1) обычно приписывается возникновению резонансно стабилизованного аниона {схема (4)} и, следовательно, способ активации должен быть избран с большой осторожностью, и притом так, чтобы свести к минимуму образование оксазолона. На образование оксазолона оказывает сильное влияние природа *N*-ацильного заместителя, а также растворитель и сила основания. При планировании пептидного синтеза все эти факторы должны быть приняты во внимание.

В принципе, для создания пептидной связи возможна также активизация аминокомпоненты, но, по-видимому, в превращениях такого рода активация вначале передается на карбоксильную функцию. Непосредственным примером этого [4] является реакция между карбоновой кислотой и аминокомпонентой, активированной путем превращения в соответствующий изоцианат {схема (5)}. Образование пептидной связи в действительности происходит путем внутримолекулярной перегруппировки промежуточного



(4)



(5)



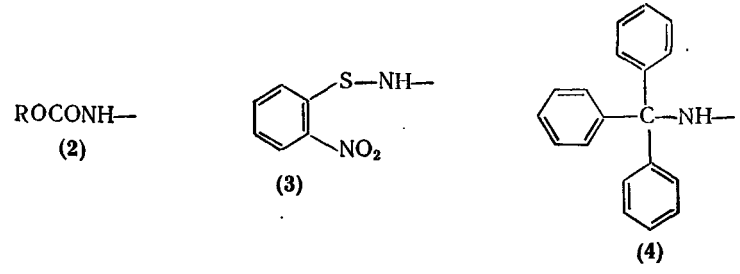
*N*-карбоксиангидрида [5]. Аналогичные механизмы можно представить для других превращений, в которых аминокомпонента вначале реагирует с активирующим агентом, например, при реакции с трихлоридом фосфора [6].

## 23.6.2. ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ

### 23.6.2.1. Защита аминогруппы

При выборе или планировании защиты аминогрупп существенны многие факторы. Надо учитывать, с какой легкостью вводится данная защита в случае определенной аминокислоты, насколько хорошо она выполняет свою защитную функцию, насколько группа устойчива в условиях пептидного синтеза, насколько хорошо защищен соседний хиральный центр (для всех остатков α-аминокислот, кроме глицина) от рацемизации, насколько легко защитная группа может быть удалена в процессе синтеза или по его окончании. Ввиду того что аминогруппы могут присутствовать также и в боковой группировке некоторых аминокислот (например, в лизине, орнитине) и в связи с необходимостью иметь для синтеза защищенные производные как пептидов, так и аминокислот, возникает потребность использования ряда защитных групп, которые можно было бы удалять избирательно. Чаще всего это достигается применением защитных групп, лабильность которых ступенчато изменяется в зависимости от кислотности среды, или же сочетанием разных групп, удаляемых соответственно кислым и иным (например, щелочным) агентом.

Находящиеся на аминогруппе защиты снижают нуклеофильность атома азота. Это снижение достигается путем оттягивания электронов за счет сопряжения, как в случае ацильных производных, особенно в случае уретанов (2), за счет также индуктивного эффекта, как в случае *о*-нитрофенилсульфенилпроизводных (3) или за счет создания пространственных препятствий, как в случае трифенилметильных (тритильных) производных (4). Обычно имеется комбинация всех этих факторов.



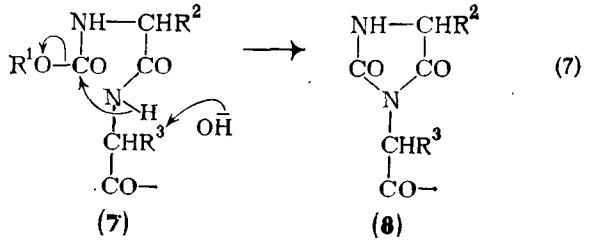
(2) (3) (4)

### (1) *Уретановые защитные группы*

Уретановая группа — наиболее важная защитная группировка аминогруппы: отдельные примеры приведены в табл. 23.6.1. Уретановая структура (**5**) обеспечивает удобный и гибкий способ защиты аминофункции в виде сложноэфирного производного, поскольку соответствующие карбаминовые кислоты (**6**) самопроизвольно декарбоксилируются в нейтральных и в кислых средах

$$\underset{(5)}{R^1OCONHCHR^2CO-} \longrightarrow \underset{(6)}{HOCONHCHR^2CO-} \longrightarrow CO_2 + NH_2CHR^2CO- \quad (6)$$

{схема (6)}. Спирт $R^1OH$, из которого возникает уретан, подбирают с точки зрения структуры таким образом, чтобы в уретановом сложном эфире эфирная связь была бы способна к расщеплению и образованию свободной кислоты в настолько мягких условиях, что при этом оставались бы незатронутыми как пептидная связь, так и различные другие защитные группы, присутствующие в боковой группе полифункциональной аминокислоты. Щелочной гидролиз не удобен для расщепления этих сложноэфирных связей, поскольку уретаны довольно устойчивы к действию гидроксид-иона, а также потому, что при этом может происходить внутримолекулярная циклизация в производные гидантоина (**8**) {схема (7)}.




(7)

Эта побочная реакция протекает особенно легко, если предпоследний аминокислотный остаток в цепи — глицин [$R^3 = H$ в (**7**)]; другие уретановые защитные группы, где R = Alk или Ar, обычно устойчивы к мягким основным реагентам. *C*-концевой пептидный эфир, например, часто можно омылить или превратить в гидразид в присутствии простой уретановой защиты аминогруппы.

Важнейшей среди уретановых защитных групп являются производные, содержащие карбобензоксигруппу (**9**), введенные в практику Бергманом и Зервасом в 1932 г. Это и послужило началом современной эры пептидного синтеза [7]. Эти производные легко образуются через промежуточный хлормуравьиный эфир {схема (8)} и для большинства аминокислот являются устойчивыми кристаллическими соединениями. Значительное число вариаций этой защитной группы, которые могут быть использованы в

$$PhCH_2OH \xrightarrow{COCl_2} \underset{(9)}{PhCH_2OCOCl} \xrightarrow[\text{контролируемое щелочное pH}]{NH_2CHRCO_2^-Na^+} \underset{(8)}{PhCH_2OCONHCHRCO_2H}$$

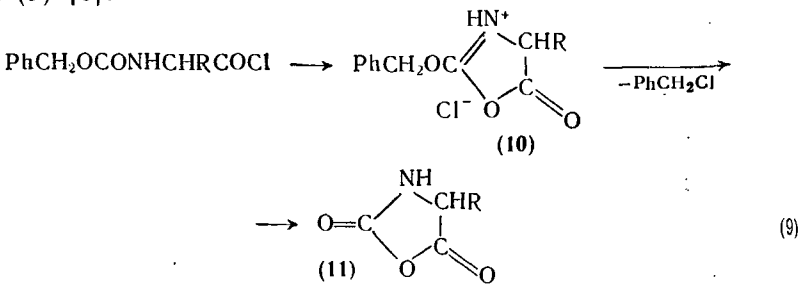
трудных случаях для получения более легко кристаллизующихся производных, включены в табл. 23.6.1.

Одним из наиболее важных свойств карбобензоксигруппы является придание ею устойчивости защищенным аминокислотам к рацемизации. Отсюда следует, что содержащая карбобензоксизащиту аминокислота может быть активирована для проведения пептидного синтеза любым из широкого набора методов (см. раздел 23.6.3) с очень малым риском рацемизации соседних хиральных центров. Этим свойством обладают по всей видимости все аминокислоты (но не пептиды), имеющие уретановую защиту, и это свойство связано с понижением склонности к образованию оксазолонов или оксазолиниевых солей типа (**10**) {схема (9)}. Хотя алкоксиоксазолоны этого типа известны, для их образования требуются жесткие условия и эти соединения далее разлагаются,

*Таблица 23.6.1. Защитные группы уретанового типа*

| Название | Сокращенное обозначение | Типичные расщепляющие реагенты | Литература |
|---|---|---|---|
| Бензилоксикарбонил | Z | $H_2$, Pd; HBr, AcOH; HF | [6а] |
| *n*-Хлорбензилоксикарбонил | Z(Cl) | $H_2$, Pd; HBr, AcOH; HF | [6б] |
| *n*-Нитробензилоксикарбонил | Z($NO_2$) | $H_2$, Pd; HBr, AcOH; HF | [6в] |
| *n*-Фенилазобензилоксикарбонил | Pz | $H_2$, Pd; HBr, AcOH; HF | [6г] |
| *n*-Метоксибензилоксикарбонил | Z(OMe) | $H_2$, Pd; $CF_3CO_2H$; HCl, AcOH | [6д] |
| 3,5-Диметоксибензилоксикарбонил | Z($OMe)_2$ | $H_2$, Pd; фотолиз; $CF_3CO_2H$ | [6е] |
| *трет*-Бутоксикарбонил | Boc | $CF_3CO_2H$; HCl, AcOH | [6ж] |
| *трет*-Амилоксикарбонил | Aoc | $CF_3CO_2H$; HCl, AcOH | [6з] |
| Адамантилоксикарбонил | Adoc | $CF_3CO_2H$ | [6и] |
| Изоборнилоксикарбонил | Bornoc | $CF_3CO_2H$ | [6к] |
| Бифенилизопропоксикарбонил | Broc | AcOH | [6л] |
| 3,5-Диметокси-α,α-диметилбензилоксикарбонил | Ddz | AcOH; фотолиз | [6м] |
| Изоникотинилоксикарбонил | Noc | Zn, AcOH; $H_2$, Pd | [6н] |
| *n*-Дигидроксиборилбензилоксикарбонил | Dobz | $H_2O_2$, pH 9,5 | [6о] |
| 5-Бензизоксазолилметоксикарбонил | Bic | $NEt_3$ | [6п] |
| β-Метилсульфонилэтоксикарбонил | Nsc | NaOH | [6р] |
| 9-Флуоренилметоксикарбонил | Fmoc | *Морфолин*; жидк. $NH_3$ | [6с] |
| β,β,β-Трихлорэтоксикарбонил | — | Zn, AcOH | [6т] |

образуя *N*-карбоксиангидриды. Типичный пример — термическое разложение хлорангидридов *N*-карбобензоксиаминокислот с образованием циклических *N*-карбоксиангидридов (**11**), представлен на схеме (9) [8].

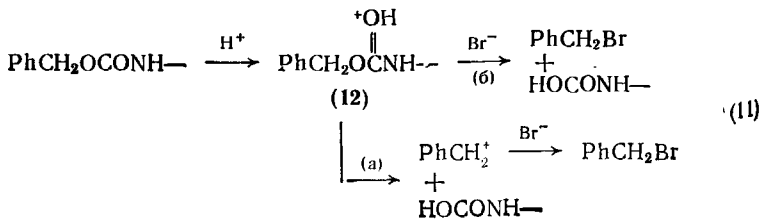


(9)

Бергман и Зервас первоначально использовали каталитический гидрогенолиз связи в бензиловом эфире для удаления карбобензоксигруппы, и до настоящего времени это один из самых мягких и наиболее эффективный способ снятия защиты в химии пептидов {схема (10)}.

$$PhCH_2OCONHCHRCONH— \xrightarrow{H_2,\ Pd} PhCH_3 + CO_2 + NH_2CHRCONH— \quad (10)$$

В среде жидкого аммиака гидрогенолиз может успешно идти даже в присутствии двухвалентной серы (в производных метионина и цистеина), которая обычно отравляет платиновые и палладиевые катализаторы [9]. Восстановление натрием в жидком аммиаке также эффективно для расщепления карбобензоксипроизводных [10], но в случае третичной амидной связи, как, например, в пептидах пролина и *N*-метиламинокислот, оно протекает только частично. Из-за чувствительности бензиловых эфиров как к $S_N1$-, так и к $S_N2$-расщеплению связи *O*-алкил, карбобензоксигруппа может быть также удалена путем расщепления сильной безводной кислотой. Для этой цели обычно используют раствор бромоводорода в уксусной кислоте [11] и жидкий фтороводород [12]. Исследования кинетики реакции расщепления HBr показывают, что при распаде *O*-протонированного интермедиата (**12**) важны и мономолекулярный (а), и бимолекулярный (б) пути {схема (11)}. Для более кислотолабильного *n*-метоксибензоилоксикарбонилпроизводного характерен ожидаемый сдвиг механизма в сторону $S_N1$-, а для более устойчивых *n*-нитро- и хлорпроизводных



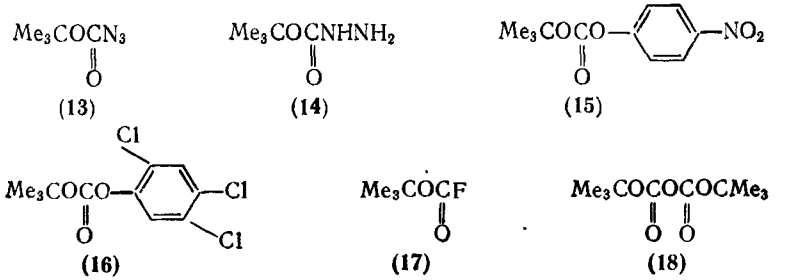
(11)



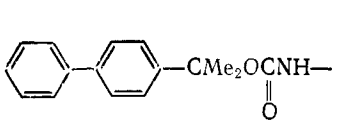
характерен сдвиг в сторону $S_N2$-процесса. Константы скорости реакции псевдопервого порядка для расщепления незамещенного, *n*-метокси- и *n*-нитробензилоксикарбонилглицинов под действием 0,85 *M* бромида водорода в уксусной кислоте при 25 °C составляют $1{,}8\cdot10^{-4}$; $1{,}3\cdot10^{-2}$ и $2{,}6\cdot10^{-5}$ $с^{-1}$ соответственно.

*n*-Метоксибензилоксикарбонильные производные достаточно лабильны, чтобы расщепляться в присутствии более слабых кислот, например трифторуксусной кислоты. Когда приводящие к образованию карбениевых ионов реакции расщепления проводят с теми кислотами, анионы которых являются слабыми нуклеофилами, нуклеофильные боковые группы аминокислот (например, в тирозине, триптофане, метионине) могут конкурировать в реакции со свободным катионом. Для того чтобы избежать этого осложнения, в реакционную смесь добавляют большой избыток «акцептирующего» реагента (например, анизола, индола или метилэтилсульфида).

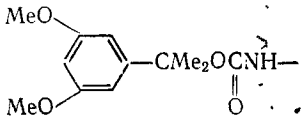
Помимо бензилоксикарбонильной группы, для защиты аминогрупп часто используют *трет*-бутоксикарбонильную группу [13]. Она расщепляется трифторуксусной кислотой и другими кислыми реагентами, в присутствии которых бензилоксикарбонильная группа устойчива, (*n*-метоксибензилоксикарбонильная группа сравнима по кислотолабильности); *трет*-бутоксикарбонильная группа устойчива к каталитическому гидрированию. Это делает бензильные производные удобными для защиты боковых групп аминокислот, а *трет*-бутильные производные для защиты α-положения, и наоборот. Такой подход стал особенно популярен в связи с его почти повсеместным использованием в твердофазном пептидном синтезе (см. разд. 23.6.4). *трет*-Бутилхлорформиат довольно неустойчив и может использоваться для получения *трет*-бутоксикарбониламинокислот только при низких температурах. Соответствующий азид (**13**), получаемый действием нитритов на карбазат (**14**), употребляется наиболее широко для получения бутоксикарбонильных соединений [14], однако из недавних данных следует, что этот азид взрывоопасен [15]. Многие другие реагенты, например *трет*-бутил-*n*-нитрофенил- (**15**) [16] и *трет*-бутил-2,4,5-трихлорфенил- (**16**) [17] -карбонаты, а также *трет*-бутилфторформиат (**17**) [18] и пирокарбонат (**18**) [19], также могут быть использованы. Последний из перечисленных назван «идеальным реагентом».



В поисках все более мягких условий реакции для удаления защитных групп, а также для обеспечения избирательности удаления бензилоксикарбонильной и *трет*-бутилоксикарбонильной защит предложена еще более кислотолабильная уретановая защитная группа [см. также тритильную **(32)** и *о*-нитрофенилсульфенильные защиты **(33)**]. Поскольку *трет*-бутоксикарбонильная и, частично, бензилоксикарбонильные защиты обязаны своей кислотолабильностью стабилизации *трет*-бутильного и бензильного катионов, образующихся в результате гетеролиза по механизму $S_N1$, то еще большей кислотолабильности можно достичь, если объединить структурные элементы обеих этих групп. В связи с этим был предложен ряд защитных групп уретанового типа общей формулы $ArCMe_2OCO-$ [20]. Эти группы в высшей степени кислотолабильны, поскольку образующийся при их расщеплении катион является одновременно бензильным и третичным. *п*-Фенилзамещенные производные, например **(19)**, расщепляются водной уксусной кислотой со скоростью примерно в $10^4$ раза большей, чем аналогичные *трет*-бутоксикарбонильные производные. Они могут быть избирательно введены и удалены в присутствии и *трет*-бутильных и бензилсодержащих защитных групп. 3,5-Диметоксипроизводные **(20)** по своей лабильности занимают промежуточное место между **(19)** и *трет*-бутоксикарбонильной группой, однако дополнительным удобством этой группы явилась возможность ее удаления путем ультрафиолетового облучения [21].

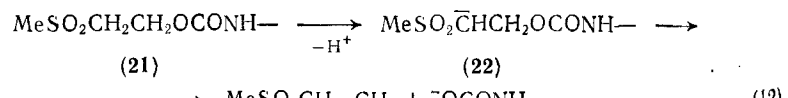


**(19)**



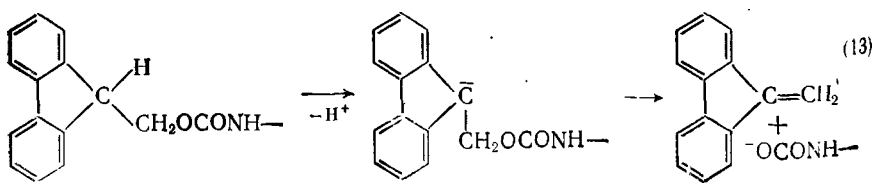
**(20)**

Значительной изобретательности потребовала разработка такой уретановой защитной группы, которая могла быть удалена в специальных некислотных условиях. Многие из них снимаются с помощью катализируемых основаниями реакций отщепления. Простыми примерами служат метилсульфонилэтоксикарбонильные **(21)** [22] и флуоренилметоксикарбонильные производные **(23)**



**(21)** **(22)**

(12)



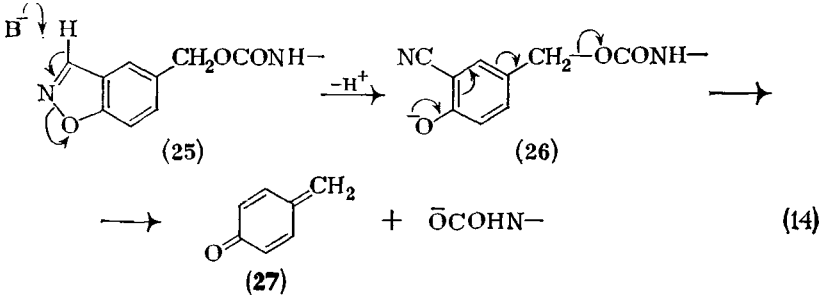
(13)

**(23)** **(24)**



[23]. Производные обоих этих типов распадаются по схеме β-элиминации {схемы (12) и (13)}, образование промежуточного карбаниона облегчается мезомерным и индуктивным факторами в **(22)** и за счет делокализации отрицательного заряда по всей ароматической дибензоциклопентадиенильной системе в **(24)**. Более сложно протекает отщепление модифицированных бензилоксикарбонильных производных **(25)** [24] и **(28)** [25].

β-Протон в бензизоксазоле особенно лабилен и легко отщепляется под действием третичных оснований. Разложение **(25)** происходит далее через цианофенолят-анион **(26)** и хинонметид **(27)** {схема (14)} [24].

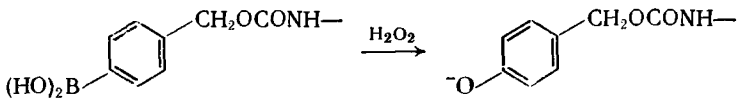


**(25)** **(26)**

**(27)**

(14)

*п*-Дигидроксиборилбензилоксикарбонильные производные **(28)** подвергаются в мягких условиях окислительному расщеплению с образованием фенолят-аниона **(29)**. Предполагается, что процесс разложения протекает по схеме (15) [25].

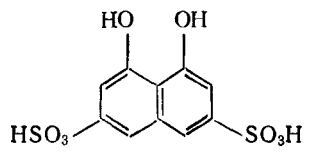


**(28)** **(29)**

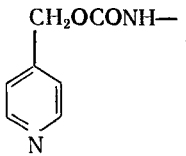
(15)

Интересной особенностью этой защитной группы, значимость которой в пептидном синтезе все возрастает, является наличие остатка борной кислоты, что используется для проведения обработки и очистки. Так, пептидные производные типа **(28)** способны к обратимому комплексообразованию с диолами, что, например, делает возможным экстракцию вещества в водный раствор с помощью хромотроповой кислоты **(30)** или в неполярную органическую среду действием липофильных диолов, например *N*-октадецилдиэтаноламина. Эта система является также потенциальным лигандом для аффинной хроматографии на содержащем диолы твердом носителе. Пиридиновые аналоги **(31)** бензилоксикарбонильных производных [26] и других созданных на основе бензильных соединений защитных групп [27] также обладают выгодными свойствами, используемыми при очистке продуктов реакции, что связано с их слабо основным характером. Следует отметить, что предпочтительное протонирование азота кольца эффективно инги-

бирует катализируемое кислотами отщепление этой защитной группы. Чувствительность всех производных бензилоксикарбонильного типа к восстановительному расщеплению, например каталитическому гидрогенолизу при этом, однако, сохраняется.



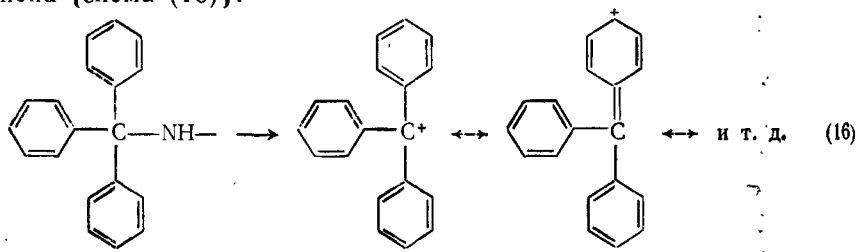

(30)




(31)

### *(2) Другие защитные группировки для аминогруппы*

Разработан целый ряд защитных групп, не содержащих уретановых связей, некоторые примеры приведены в табл. 23.6.2. Кислотолабильные тритильные (трифенилметильные) производные (**32**) [28] получены с помощью тритилхлорида. Их лабильность обусловлена резонансной стабилизацией, трифенилметильного катиона {схема (16)}.




(32) (16)

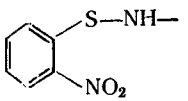
Тритиламинокислоты сохраняют в определенной мере свои основные свойства, и их атом азота, вероятно, недостаточно реакционноспособен по отношению к ацилирующим агентам из-за значительных пространственных препятствий, вносимых объемистой тритильной группой. Эти пространственные препятствия проявляются и в реакциях по карбоксильной группе *N*-тритиламинокислот, и в случае производных аминокислот, за исключением глицина, реакции конденсации могут быть затруднены. *о*-Нитрофенилсульфенилпроизводные (**33**) [29] легко получают реакцией *о*-нитрофенилсульфенилхлорида и свободной аминокислоты в щелочной среде. Эта реакция легко обратима в безводных органических растворителях в присутствии хлорида водорода и протекает с отщеплением защитной группы.

*Таблица 23.6.2. Неуретановые защиты для аминогрупп*

| Название | Сокращенное обозначение | Типичные расщепляющие реагенты | Литература |
|---|---|---|---|
| Тритил (трифенилметил) | Trt | $H_2$, Pd; AcOH; $CF_3CO_2H$ | [28а] |
| *о*-Нитрофенилсульфенил | Nps | HCl, EtOAc; HCl, MeOH; RSH | [28б] |
| Формил | HCO— | HCl, EtOH; $H_2O_2$ | [28в] |
| Хлорацетил | $ClCH_2CO$— | Тиомочевина; (пиперидил-1)-тиомочевина) | [28г] |
| Трифторацетил | TFA | NaOH; $NH_4OH$; водн. пиперидин | [28д] |
| Фталоил | Phth | $NH_2NH_2$; $PhNHNH_2$ | [28е] |
| Ацетоацетил | Acac | $PhNHNH_2$; $NH_2OH$ | [28ж] |

Сульфенамидная группировка (—S—NH—) в нитрофенилсульфенилпроизводных в некоторой мере аналогична дисульфидной (—S—S—) связи. Поэтому нитрофенилсульфенильные производные аминокислот и пептидов могут расщепляться при действии ряда нуклеофильных агентов, которые реагируют также с дисульфидами, а именно с тиолат-, тиосульфат- и тиоцианат-анионами.

В определенных случаях для защиты аминогруппы могут использоваться простые ацильные производные, например формильная [30], трифторацетильная [31] и фталильная [32, 33] группы. Формильные производные аминокислот и пептидов (**34**) легко получают действием муравьиной кислоты в присутствии уксусного ангидрида и расщепляются спиртовым раствором хлорида водорода. Интересно, что формильная группа легко удаляется также окислением до соответствующей карбоновой кислоты (**35**) с последующим самопроизвольным декарбоксилированием.



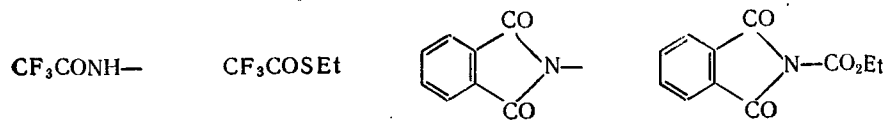

(33)




(34) (35)

Трифторацетильная защита (**36**), обычно вводимая в аминокислоты действием тиольного эфира (**37**), лабильна в силу мощного электроотрицательного эффекта трех атомов фтора. Пептиды, содержащие трифторацетильную защиту аминогруппы аминокислотных остатков, легко расщепляются под действием гидроксид-иона и медленно — действием этанольного раствора хлорида водорода. Эти производные, однако, устойчивы в безводных кислотных средах, обычно используемых для удаления *трет*-бутоксикарбонильной группы, а поэтому могут использоваться в сочетании с этой защитой. Важно использование этих защитных групп для защиты аминогруппы в боковом радикале, например в остатке лизина. Фталильная защитная группа (**38**) находила применение на ранних этапах развития химии пептидов. Она легко вводится с помощью *N*-карбэтоксифталимида (**39**) [33] и чаще всего снимается при действии гидразина или его производных. Сильное электроноотгягивающее действие фталимидной группы благоприятствует непосред-

ственной ионизации хирального α-водорода. Поэтому фталиламинокислоты склонны к рацемизации.

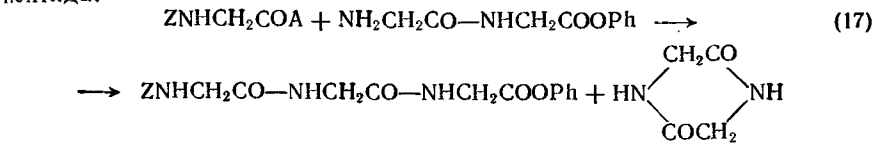


(36) (37) (38) (39)

### 23.6.2.2. Защита карбоксильной группы

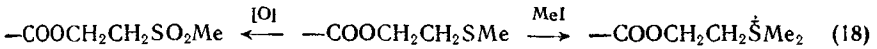
Аналогично использованию многих уретановых производных для защиты аминогрупп существует целый набор простых эфиров, которые можно использовать для защиты карбоксильной группы. Так, бензиловые эфиры (расщепляемые гидрогенолизом или сильными кислотами) и *трет*-бутиловые эфиры (расщепляемые кислотной обработкой, но в более мягких условиях) нашли широкое применение для защиты *C*-терминальных и боковых карбоксильных групп в производных аминокислот и пептидов. Подобным образом могут быть использованы некоторые содержащие заместители в кольце бензиловые и другие сложные эфиры, аналогичные уретанам, приведенным в табл. 23.6.1. Эфиры с простыми алкилами (метил или этил), расщепляемые омылением, находят лишь ограниченное применение для защиты карбоксильной функции. Хотя производные пептидов со сложноэфирной группой на *C*-конце существенно более электрофильны, чем обычные алифатические сложные эфиры (благодаря электронооттягивающим свойствам α-карбоксамидного заместителя), условия для их расщепления в щелочной среде слишком жестки для пептидов, за исключением самых простых. В общем случае они также непригодны для защиты карбоксильной функции в боковой группе (см. разд. 23.6.2.3); соответствующие уретаны в этих условиях продвергаются внутримолекулярной циклизации в производные гидантоина (см. разд. 23.6.2.1) вместо обычного гидролиза. Тем не менее метиловый и этиловый эфиры являются важными промежуточными продуктами для получения *C*-терминальных гидразидных производных для продолжения пептидного синтеза азидным методом (см. разд. 23.6.3.4).

Хотя фениловые эфиры и омыляются в более мягких щелочных условиях, все же существует опасность рацемизации оптически активного *C*-терминального остатка, что, по-видимому, связано с катализируемым основаниями образованием оксазолона. Степень такого риска существенно возрастает с учетом чрезвычайно сильного ускорения расщепления в присутствии гидропероксид-аниона, который явно действует как высокоизбирательный нуклеофил α-эффекта [34]. Фениловые сложные эфиры ввиду присущей им реакционной способности по отношению к аминонуклеофилам склонны к образованию дикетопиперазинов (**40**), что является серьезной побочной реакцией при превращении сложных эфиров дипептидов в производные трипептидов, например по схеме (17). Поэтому во всех синтезах с использованием фениловых сложных эфиров, следует избегать стадии образования сложного эфира свободного дипептида.



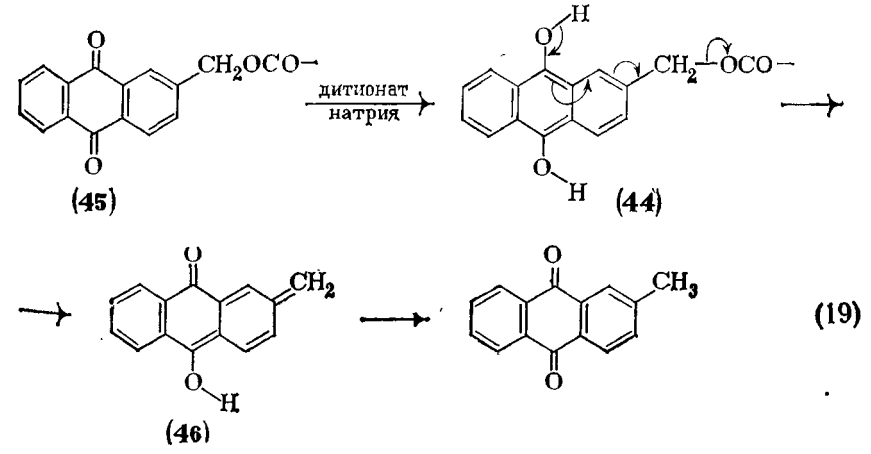
(40) (17)

Для защиты карбоксильной группы используются сложные эфиры, расщепляемые катализируемыми основаниями реакциями отщепления. Простыми примерами здесь служат производные сульфонов (**41**) и сульфониевых солей (**42**); оба этих производных расщепляются в мягких щелочных условиях по схеме β-элиминации [ср. (**21**)] [35]. Интересные возможности связаны с образованием этих сложных эфиров на более поздних стадиях синтеза путем окисления или реакцией с метилиодидом более устойчивого метилтиоэтилового эфира (**43**) {схема (18)}. Таким путем в процессе создания пептидной связи в щелочных условиях уменьшается риск преждевременного открытия концевой карбоксильной группы.



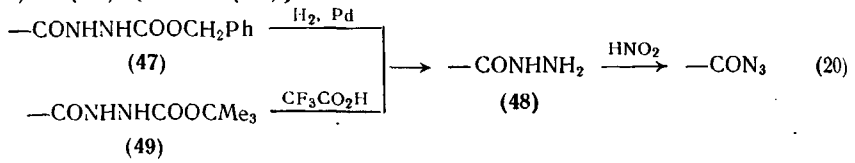
(41) (43) (42) (18)

Сложные эфиры 2-гидроксиметилантрахинола (**44**) претерпевают более сложное расщепление с освобождением свободной карбоксильной компоненты {схема (19)} [36]. Расщепление начинается восстановлением устойчивого антрахинонового сложного эфира (**45**) с образованием антрахинола (**44**), который затем претерпевает расщепление и таутомеризацию первоначально образующегося хинон-метида (**46**) в более устойчивый 2-метилантрахинон.



(45) (44) (46) (19)

Диацилгидразиды, например (47) и (49), могут применяться для защиты карбоксильной группы в тех случаях, когда для дальнейшего пептидного синтеза необходимо превращение в ацилазиды (см. разд. 23.6.3.4). Моноацилгидразид (пептида) (48) высвобождается в обычных условиях отщепления бензилоксикарбонильной [37] или *трет*-бутоксикарбонильной [38] групп соответственно из (47) и (49) {схема (20)}.



(20)

### 23.6.2.3. Защитные группы для боковых радикалов

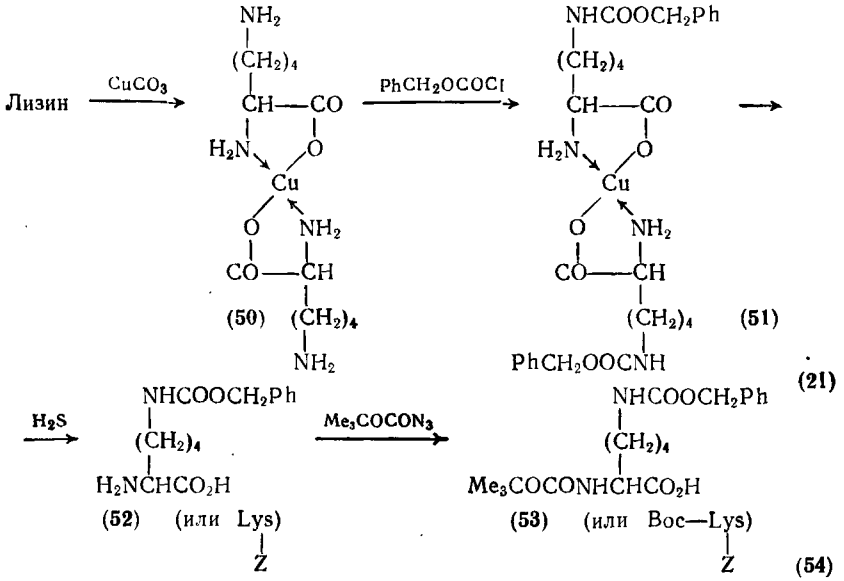
Обычные или «белковые» аминокислоты можно классифицировать по их боковым радикалам. Аминокислоты, содержащие функциональные группы в боковом радикале, например кислые аминокислоты — аспарагиновая и глутаминовая кислота (карбоксильная группа), основные аминокислоты — лизин (аминогруппа), аргинин (гуанидиногруппа) и гистидин (имидазол), а также цистеин (тиольная группа) и серин, треонин и тирозин (гидроксильная группа), могут требовать определенной защиты в зависимости от условий создания пептидной связи (см. разд. 23.6.3) и общей стратегии синтеза (см. разд. 23.6.5). Кроме того, в случае аминокислот, содержащих в боковом радикале аминогруппу или карбоксильную группу, сама намечаемая схема синтеза требует четкого разграничения условий синтеза, идущего по этим боковым группам и α-амино- и карбоксигруппам с тем, чтобы исключить неоднозначность в создаваемой последовательности остатков в конечном продукте.

#### *(1) Лизин*

ε-Аминогруппа лизина (α,ε-диаминогексановой кислоты) может быть легко вовлечена в селективную реакцию с медной солью {схема (21)}. В комплексе (50) основность α-аминогруппы значительно понижена за счет координации с центральным атомом меди. Это благоприятствует избирательному ацилированию по свободным аминогруппам бокового радикала и дает, например, ε-бензилоксикарбонилпроизводное (51). После разложения медного комплекса (51) сульфидом водорода или более сильным комплексующим агентом (этилендиаминтетрауксусной кислотой, 8-гидроксихинолином) полученный свободный ε-бензилоксикарбониллизин (52) можно ввести в реакцию, например, с *трет*-бутоксикарбонилазидом с образованием удобного для синтеза промежуточного соединения (53). Подобным путем может быть получен его изомер (54) с противоположным (ε,α-) расположением защитных группировок.



Бензилоксикарбонильная группа становится заметно более кислотолабильной, если она присоединена к сильно основной аминофункции в боковом радикале по сравнению с тем, когда она присоединена к α-аминогруппе. Защитная группа, таким образом, может и не обеспечить нужные защитные свойства для бокового радикала, если, например, α-*трет*-бутоксикарбонильную группу нужно будет последовательно удалять на нескольких стадиях пептидного синтеза. Для увеличения устойчивости защитной группы в боковом радикале можно использовать замещенные в кольце бензилоксикарбонильные группы, например *п*-нитро- или галогензамещенные.



(21)

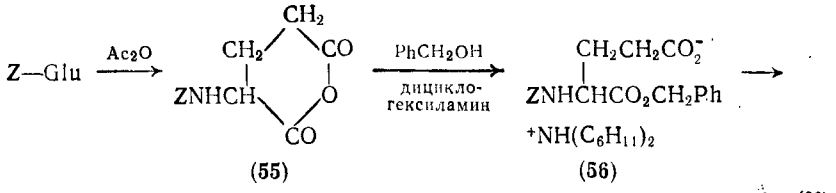
Кроме того, для защиты боковых радикалов можно применять более кислотоустойчивые трифторацетильную и фталоильную группы.

#### *(2) Аспарагиновая и глутаминовая кислоты*

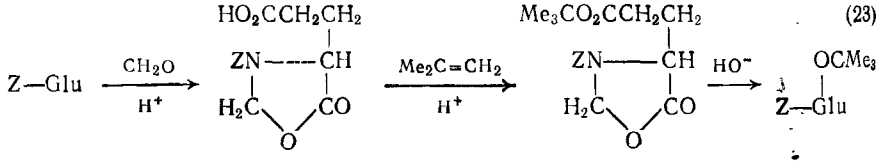
Однозначный синтез аспарагил- и глутамилпептидов, связанных исключительно по α-карбоксильной группе, требует защиты карбоксильных групп, находящихся в боковой цепи в β- и γ-положении. Обычно это достигается получением бензилового и *трет*-бутилового эфиров по боковым карбоксилам. Эти моноэфиры могут быть легко получены, например катализируемой кислотой частичной этерификацией или переэтерификацией, или же частичным щелочным гидролизом диэфиров. Избирательность атаки по более электрофильной α-карбонильной группе обеспечивается в последнем случае присутствием иона меди. Остальные способы основаны на предпочтительном раскрытии цикла ангидридов дикарбоновых

кислот, например ангидрида бензилоксикарбонилглутаминовой кислоты (**55**), который при действии бензилового спирта в присутствии дициклогексиламина дает преимущественно α-бензиловый эфир (**56**) {схема (22)} [39].

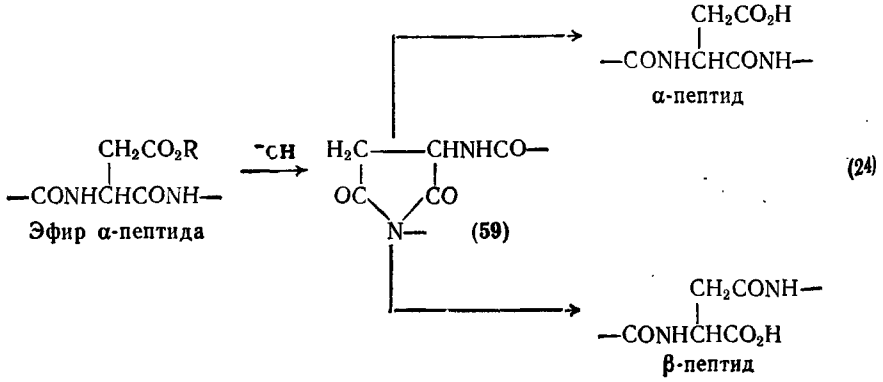
Таким путем могут быть получены смешанные диэфиры, например α-бензил-γ-*трет*-бутиловый эфир (**57**) и далее γ-*трет*-бутиловый эфир глутаминовой кислоты (**58**).




Другой возможный путь к бензилоксикарбонилпроизводному (**58**) включает промежуточное образование оксазолидинонов {схема (23)} [40]. Этим путем можно получить также производные аспарагиновой кислоты.




Эфиры глутаминовой и аспарагиновой кислот с низшими спиртами в пептидном синтезе обычно не применяют, поскольку происходящее на последней стадии омыление алкилового сложного эфира может в существенной мере вызвать α → γ- или α → β-транспептидирование. Эта последовательность реакций (схема (24) требует

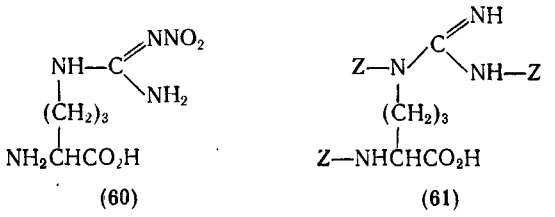



особого внимания в случае аспарагиновых пептидов, поскольку происходящая промежуточная циклизация с образованием пятичленного циклического имида (**59**) может происходить достаточно легко. Гидролиз этого соединения приводит к смеси α- и β-пептидов. Образование (**59**) зависит от последовательности аминокислот и ему особенно благоприятствуют последовательности -Asp-Gly- и -Asp-Ser-. Первый из них может претерпевать циклизацию в процессе отщепления β-бензилового эфира в присутствии кислоты, и это обстоятельство делает синтез пептида с такой последовательностью особенно трудным.

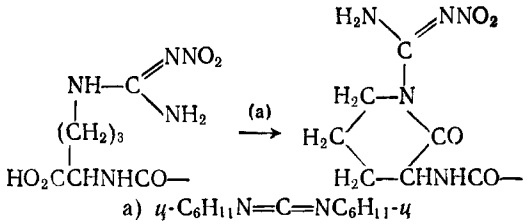
### *(3) Аргинин*

Гуанидиногруппа, имеющаяся в боковом радикале аргинина, является сильно основной и остается протонированной на всех стадиях обычного пептидного синтеза. При этом, строго говоря, не требуется добавочная защита, и имеется немало синтезов с производными аргинина, в которых гуанидиногруппа аргинина оставалась незащищенной. Это обстоятельство особенно полезно на завершающих стадиях синтеза, когда протонирование гуанидиногруппировки обеспечивает нужную растворимость вещества в полярной среде. Однако в общем случае считается полезным использовать в синтезе защищенную по гуанидиновой группировке форму аргинина.

$N_G$-Нитроаргинин (**60**)* легко получить из свободной аминокислоты действием смеси серной и азотной кислот, причем нитрогруппа приводит к понижению основности гуанидиновой функции [41]. Она может быть удалена в конце синтеза вместе с другими бензильными защитами с помощью каталитического гидрирования. Нуклеофильность гуанидиногруппы в соединении (**60**) подавлена не в полной мере, и образование лактама может стать важной побочной реакцией в том случае, если карбоксильная группа концевого нитроаргининового остатка в должной мере активирована {схема (25)}.




* Положение двойной связи в замещенных по гуанидиновой группировке производных аргинина или же относительное расположение ацильных групп в этой же системе нельзя считать однозначно установленным.

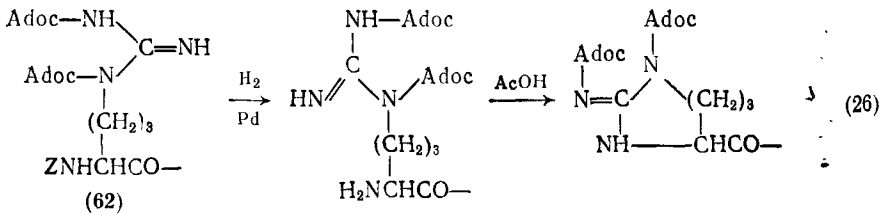



(25)

а) $u$-$C_6H_{11}N{=}C{=}NC_6H_{11}$-$u$

В синтезах используются различные моно-, ди- и триацильные производные аргинина, хотя некоторые из них не устойчивы и распадаются с образованием производных орнитина. $N_\alpha$, $N_\omega$, $N_\omega$-Трибензилоксикарбониларгинин **(61)** [42] можно получить реакцией аргинина в сильно щелочном растворе с бензилхлорформиатом. Показано, что (61) является полезным промежуточным продуктом.

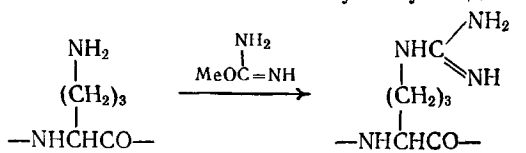
Как и в случае производных нитроаргинина, защиту можно удалить каталитическим гидрогенолизом. Использованный позднее $N_\alpha$-бензилоксикарбонил-$N_\omega$, $N_\omega$-бис (адамантилоксикарбонил)аргинин **(62)** [43] сохраняет при гидрогенолизе защитную группу в боковом радикале; адамантилоксикарбонильные группы удаляются в кислых условиях. Побочной реакцией, наблюдаемой в этой серии превращений, является атака свободной α-аминогруппы на диацилированную гуанидиновую функцию {схема (26)} [43]. Этот процесс, вероятно, катализируется слабыми кислотами.




(26)

Очень устойчивые $N_a$-толуол-*n*-сульфонилпроизводные аргинина находят все возрастающее применение особенно в твердофазном синтезе [44, 45]. Толуол-*n*-сульфонильная группа может быть удалена только при действии очень сильной кислоты (жидкого фторида водорода) [46] или путем восстановления натрием в жидком аммиаке.

Другой подход к получению пептидов аргинина состоит в использовании производных орнитина, содержащих в боковом радикале защитные группы, с последующим превращением на конечных стадиях синтеза орнитиновой боковой группировки в аргининовую {схема (27)}. Таким путем можно избежать осложнений при синтезе, связанных с наличием в молекуле гуанидиновой функции.

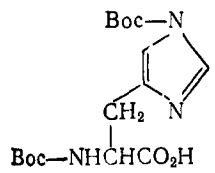



(27)

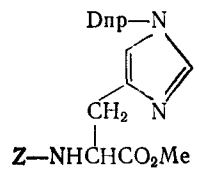


## (4) *Гистидин*

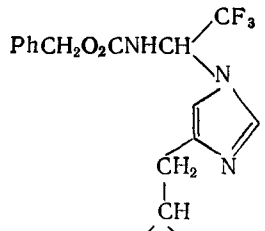
Успешное введение аминокислотного остатка гистидина в синтетические пептиды по-прежнему представляет собой чрезвычайно сложную проблему. И это связано с крайне неудобными для синтеза химическими свойствами имидазольного цикла. Свободный имидазол — это эффективный катализатор гидролиза сложных эфиров и амидов, а также рацемизации. Сами же гистидиновые производные особенно склонны к рацемизации в процессе пептидного синтеза. Если имидазольный цикл оставить незащищенным, то он может подвергаться ацилированию активированными карбоксильными компонентами, причем получающиеся ацильные производные сами по себе достаточно реакционноспособны и могут затем вызывать перенос ацильной группировки в разных участках молекулы. По этой причине $N_{im}$-ацильные производные гистидина часто неудобны в качестве синтетических интермедиатов, если на ряде стадий нужно сохранить находящуюся в боковом радикале защитную группу. Для ступенчатого синтеза можно использовать защищенные уретановые производные, например $N_\alpha$, $N_{im}$ бис-*трет*-бутоксикарбонилпроизводное **(63)***, причем обе защитные группы удаляют непосредственно после введения аминокислотного остатка в пептидную цепь. Так, интермедиат **(63)** успешно используется в твердофазном синтезе [47].




(63)




(64)




(65)

Несмотря на то, что основные свойства имидазольного кольца в его im-бензильных производных не подавлены, эти производные устойчивы к ацилированию. Их применение в пептидном синтезе имеет длинную историю [49]. Удаление защитных групп требует продолжительного гидрогенолиза или восстановления натрием в жидком аммиаке. Другие простые производные, применяемые в этих реакциях — это $N_{im}$-динитрофенилгистидин **(64)** [50] (удаление при действии сильного нуклеофила, например тиола) и $N_{im}$-тозильное производное [51]. Последняя защитная группа имеет,

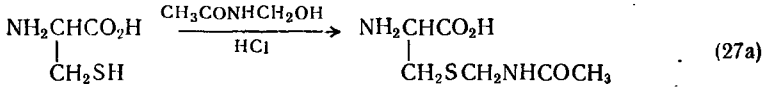
* В общем случае положение заместителя при $N_{im}$ при определенном из двух атомов азота кольца точно не установлено. Единственный случай, когда это положение определено точно — это, по-видимому, $N_{im}$ — динитрофенильное производное **(64)**, где заместитель Dnp находится при τ-атоме азота, как указано [48].

по-видимому, ограниченную устойчивость. Она удаляется в присутствии широко применяемого в пептидном синтезе гидроксибензотриазола (**79**) (см. разд. 23.6.3.1) и других нуклеофилов. Таким образом, появляется серьезный риск сдвига к α-аминогруппе в процессе дальнейшего удлинения пептидной цепи.

Группировка Ztf, как в (**65**), была введена Вейгандом с сотр. специально для гистидина [52]. Избирательность ее отщепления связана с бензилоксикарбонильной группировкой (известно также применение для этой цели *трет*-бутоксикарбонильного производного), в которой в отличие от реакционноспособного ацилимидазола основность фактически подавлена за счет электроноакцепторной трифторметильной группы. Тем не менее, и в этом случае возникают проблемы. Так, сообщалось о сдвиге группы Ztf в $N_\alpha$-положение в процессе синтеза.

### *(5) Цистеин*

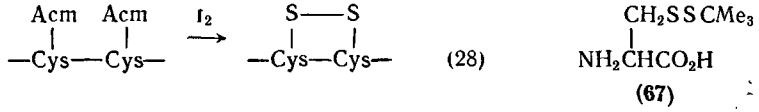
Для блокирования реакционноспособной тиольной группы цистеина используют большой набор аралкильных групп. Для этой цели используют бензильную [53] и более кислотолабильные *п*-метокси- [54] и *п*-метилзамещенные [55] бензильные, а также дифенилметильную [56] и трифенилметильную (тритильную) группы [56, 57]. С первой из этих групп образуется очень устойчивое защищенное производное, удаление из которого блокирующей группы требует либо восстановления натрием в жидком аммиаке, либо обработки жидким фторидом водорода. С другой стороны, *S*-тритильные производные расщепляются в сравнительно мягких условиях ($HCl/CHCl_3$), что связано с высокой устойчивостью трифенилметил-катиона.




(27a)

(**66**)

Позднее в качестве ценного интермедиата в пептидном синтезе предложен *S*-ацетамидометилцистеин (**66**) [58]. Его легко получить из ацетамидометанола {схема (27а)} и он устойчив в широком диапазоне кислых и щелочных условий. Ацетамидометильная (Acm) группа гладко удаляется при pH 4 в присутствии иона $Hg^{2+}$. Особого внимания заслуживает окислительное отщепление действием иода с непосредственным образованием содержащих дисульфидную группировку пептидов цистеина [59]. Этот процесс может идти как внутри-, так и межмолекулярно {схема (28)}.




(28)

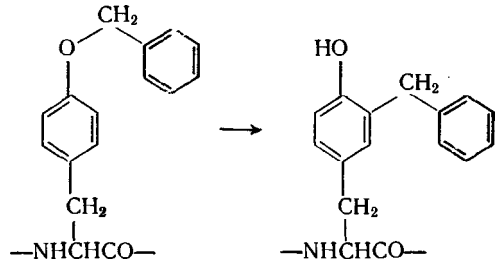
(**67**)



Сами цистиновые пептиды также могут применяться в синтезе, причем в некоторых случаях для этого не требуется защиты тиольной группировки [60]. Успешно используют с этой целью также смешанные дисульфиды, например (**67**).

### *(6) Серин, треонин, тирозин*

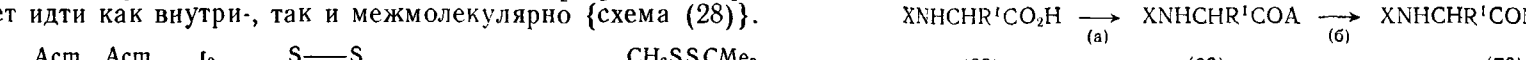
В зависимости от выбранного метода создания пептидной связи, гидроксильные группы этих аминокислот требуют определенной защиты. Широко используются их *О*-бензиловые и *трет*-бутиловые простые эфиры; первые расщепляются гидрогенолизом, вторые — мягкой кислотной обработкой. Удаление *О*-бензиловой группы из производных тирозина обработкой сильными кислотами (например, жидкой HF) менее желательно, поскольку в этих условиях иногда происходят перегруппировки в ароматическом кольце [61] {схема (29)}. Эта, по-видимому, внутримолекулярная побочная реакция может быть сведена к минимуму, если работать с соответствующим 2,6-дихлорбензиловым эфирным производным.




(29)

## 23.6.3. ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

Обычно используемые способы создания пептидных связей представлены на схеме (30). На первой стадии синтеза (а) *N*-защищенная аминокислота или ее соль по карбоксильной группе вступает в реакцию с активирующим реагентом, образуя активированный карбоксикомпонент (**69**). Активирующая или уходящая группа [A в (**69**)] по своему строению может быть очень разнообразной. Она может быть анионом обычной неорганической кислоты [например, (**69**) A = Cl, $N_3$ и т. д.]; этот анион получается при нуклеофильном замещении аминами. Она может быть также производным карбоновой кислоты в виде смешанного или симметричного ангидрида [например, (**69**) $A = OCOR_3$] или фенола в виде активированного арилового эфира [например, (69) $A = OC_6H_4NO_2$].




(30)

(**68**) (**69**) (**70**)

Спиртовым компонентом других активированных сложных эфиров могут быть различные азотсодержащие производные,

например *N*-ацилгидроксиламин или енольные формы карбонильных соединений. Особенно важными примерами второго типа являются сложные эфиры изомочевин, промежуточно образующихся при карбодиимидном активировании.

Для использования в пептидном синтезе исследовано большое число активирующих соединений, однако многие из них оказались слишком активными (например, галогенангидриды) или непригодными из-за нежелательных побочных реакций. На практике в подавляющем большинстве сложных пептидных синтезов используется сочетание лишь небольшого числа методов. Наиболее важные из них будут описаны ниже.

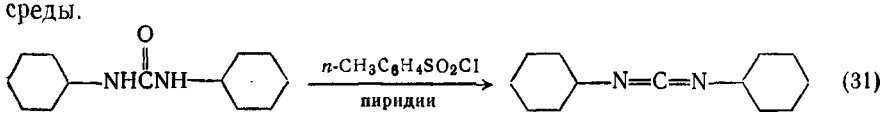
Выбор метода создания пептидной связи в каждом случае определяется общей стратегией синтеза (см. разд. 23.6.5), скоростью и эффективностью протекания реакции и факторами повседневной практики. Не последнюю роль играет при этом легкость отделения конечного пептида от неизбежно получающегося побочного продукта, образующегося при превращении активирующей группы. Так, активация дициклогексилкарбодиимидом (см. разд. 23.6.3.1) приводит к практически нерастворимой дициклогексилмочевине, тогда как при использовании сложных эфиров *N*-гидроксисукцинимида (см. разд. 23.6.3.2) образуется водорастворимый *N*-гидроксисукцинимид. Таким образом, обоснованный подбор конденсирующих реагентов обеспечивает значительную гибкость выбора методики обработки реакционной смеси. Выбор метода активации зависит также от природы карбоксильной компоненты, в особенности от группы X, защищающей аминогруппу {схема (30)}. Уретаноподобные защиты обеспечивают существенную устойчивость к рацемизации в простых производных аминокислот, и поэтому здесь не столь важно, насколько выбранный метод создания пептидной связи способствует рацемизации. Если защитная группа представляет собой простое ацильное производное или замещена дополнительным остатком аминокислоты, как в карбоксикомпоненте пептидов, то тогда предотвращение рацемизации полностью зависит от избранной методики активации и условий реакции.

В качестве активированных производных по карбоксильной группе могут применяться производные сложных эфиров фенолов. Обычно это устойчивые кристаллические соединения, которые можно приготовить в больших количествах и хранить. И, напротив, активированные производные можно получать *in situ* и вводить в реакции в том же растворе после добавления аминокомпоненты. Таким способом проводят реакцию с довольно неустойчивыми активированными соединениями, например со смешанными ангидридами, которые в процессе выделения могут диспропорционировать или распадаться. Активацию карбоксикомпоненты можно проводить даже в присутствии амина. Эту простую и удобную методику часто используют при карбодиимидной активации. И, наконец, активированные соединения могут получаться не из свободной карбоксикомпоненты или ее соли, но как, например, в азидном методе (см. разд. 23.6.3.4), из эфиров карбоновых кислот действием гидразина и затем азотистой кислоты или из защищенных гидразидных производных.



### 23.6.3.1. Использование карбодиимидов

Применение [62] в 1955 г. карбодиимида для пептидного синтеза оказалось одним из наиболее значительных достижений в пептидной химии. С тех пор и до настоящего времени *N,N'*-дициклогексильное производное (71) наиболее широко используется для создания пептидной связи. Популярность объясняется доступностью этого реагента, простотой применения и при использовании подходящего растворителя, эффективностью и быстротой реакций конденсации. При получении коротких растворимых пептидов крайне малая растворимость второго продукта — *N,N'*-дициклогексилмочевины в большинстве растворителей, кроме низших спиртов, облегчает процесс очистки. Недостатками дициклогексилкарбодиимида являются его токсичность, склонность к рацемизации не имеющих уретановых защит аминокислот (и пептидов), а также возможное образование побочного продукта, получающегося в результате перегруппировки активированных интермедиатов. Эти два последние недостатка могут быть сведены к минимуму путем тщательного подбора условий реакции, в частности добавлением к реакционной смеси некоторых производных гидроксиламина (см. ниже). Карбодиимиды реагируют с аминами относительно медленно, так что активация карбоксикомпоненты может достигаться в присутствии аминокомпоненты. На практике реагент обычно просто добавляют к смеси карбокси- и аминопроизводных, растворенных в подходящем растворителе. Более подходящим для этой цели растворителем является относительно неполярный растворитель, такой как дихлорметан, однако если позволяет растворимость веществ, можно использовать диметилформамид и другие полярные среды.

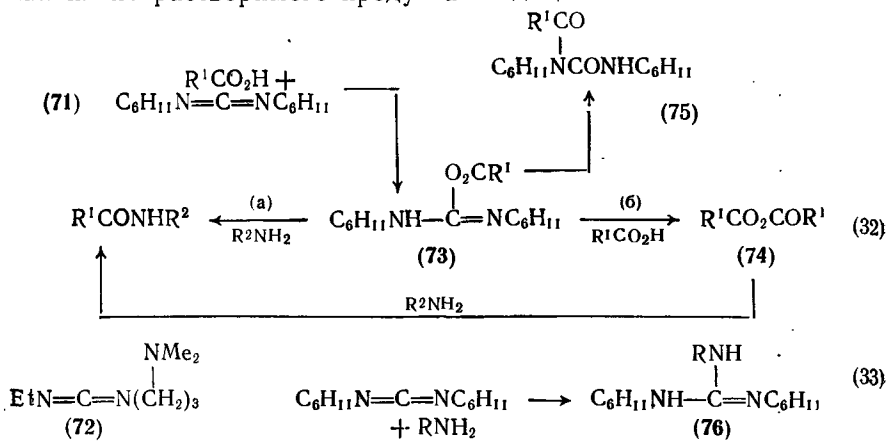



(31)

(71)

Обычно используемый для этой цели дициклогексилкарбодиимид (ДЦК) чаще всего получают дегидратацией соответствующей мочевины {схема (31)}. Интермедиатом в этой реакции является, по-видимому, *O*-сульфонилизомочевина. Другой, более ранний метод получения включает отщепление элементов сульфида водорода от дициклогексилтиомочевины в присутствии солей тяжелых металлов. Другие карбодиимиды могут быть приготовлены аналогично, однако практическое значение имеют лишь вещества, содержащие основную функцию, например (72), которые приводят к водо- или кислоторастворимым мочевинам. Это обстоятельство имеет

важное значение в тех случаях, когда возникает проблема отделения плохо растворимого продукта от дициклогексилмочевины.



(32)

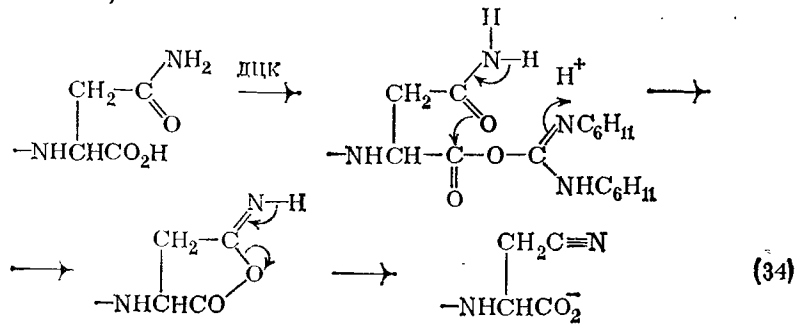


(33)

Механизм реакций ацилирования в присутствии карбодиимида достаточно сложен; его различные пути приведены на схеме (32) [63]. Кроме того, существует возможность непосредственной реакции между пептидным амином и карбодиимидом, приводящая к производным гуанидина (**76**) {схема (33)}, однако при нормальных условиях реакции это направление, по-видимому, несущественно. На первой, катализируемой кислотой стадии реакции карбоновые кислоты образуют с карбодиимидом *O*-ацилизомочевину (**73**). Этот аддукт является первоначальной активированной формой карбоксильной компоненты и может реагировать непосредственно с пептидным амином по направлению (а) на схеме (32). Изучение механизма [63] показало, что это и есть основная стадия образования пептидной связи при проведении синтеза в растворе.

Если первоначально возникающая карбоксильная компонента находится в избытке, *O*-ацилизомочевина (**73**) может предпочтительно реагировать с карбоновой кислотой или ее производным, что приводит к симметричному ангидриду (**74**) {путь (б) на схеме (32)}. Это вторичное активированное соединение способно в свою очередь реагировать с аминокомпонентой с образованием пептида и с регенерацией части карбоксильной компоненты, которая, таким образом, включается в цикл. Вполне вероятно, что образование пептидной связи в процессе твердофазного синтеза (см. разд. 23.6.4), при котором карбоксильная компонента обычно находится в большом избытке, в значительной мере протекает через промежуточный симметричный ангидрид. В отсутствие аминов карбодиимиды можно очень успешно применять для получения симметричных ангидридов. И, наконец, в отсутствии аминокомпоненты или когда реакции соединений (**73**) или (**74**) с амином протекают особенно вяло, может образоваться устойчивая *N*-ацилмочевина (**75**). Это может произойти либо путем внутримолекулярной перегруппировки *O*-ацильного производного (**73**), либо путем межмолекулярного ацилирования дициклогексилмочевины действием (**74**) или (**73**). *N*-Ацилмочевины — обычные побочные продукты в карбодиимидных конденсациях. Их количество зависит также от структуры карбоксильной компоненты и от среды, в которой проводится реакция. В случае *o*-нитрофенилсульфенил- и фталоилзамещенных аминокислот их образование мало. В таких растворителях как дихлорметан и ацетонитрил [64] образование *N*-ацилмочевины минимально.

Характерной побочной реакцией аминокислот в этом синтезе является дегидратация находящейся в боковом радикале амидной группы. Это направление становится значительным в случае активации карбодиимидом производных аспарагина и глутамина {схема (34)}. Этого не происходит, когда эти остатки аминокислот уже включены в пептидную цепь, поскольку для этого необходимо наличие свободной α-карбоксильной функции. Предполагаемый механизм реакции приведен на схеме (34). Добавление к реакционной смеси производных гидроксиламина заметно подавляет реакцию (см. ниже).



(34)

При реакции в присутствии карбодиимида с карбоксикомпонентой, способной к образованию оксазолона, т. е. для простых (не уретановых) ациламинокислот и пептидов [65] возможна заметная рацемизация. Согласно тесту Янга на рацемизацию [реакция бензоиллейцина с гидрохлоридом этилового эфира глицина и триэтиламином {схема (35)}, дициклогексилкарбодиимид в растворе дихлорметана дает примерно 50 % рацемического дипептидного производного [66]. В присутствии избытка триэтиламина получается более 80 % рацемата.

$$\text{PhCO-Leu-OH} + \overline{\text{Cl}}\ \text{H}_2\overset{+}{\text{G}}\text{lyOEt} + \text{NEt}_3 \xrightarrow{\text{ДЦК}}$$

$$\longrightarrow \text{PhCO-Leu-Gly-OEt} + \text{Et}_3\overset{+}{\text{N}}\text{H}\ \overline{\text{Cl}} \qquad (35)$$

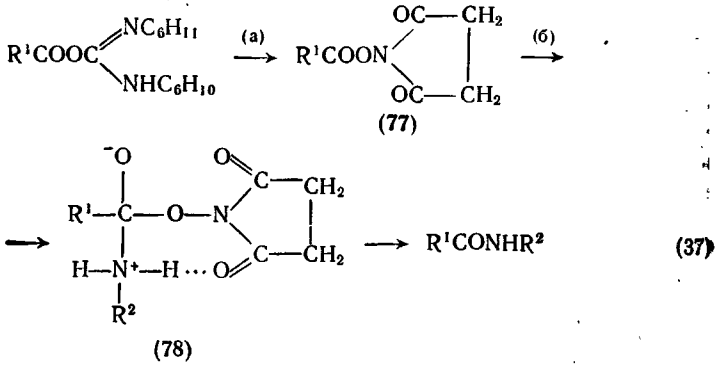
Это очень точная проба на рацемизацию, поскольку бензоиламинокислоты крайне легко образуют 2-фенилоксазолоны, однако и в других более типичных случаях наблюдается значительная рацемизация. Так, конденсация *трет*-бутоксикарбонил-*L*-лейцил-*L*-

фенилаланина с гидрохлоридом *трет*-бутилового эфира *L*-валина {схема (36)}, проводимая в различных растворителях и с применением более слабого основания — *N*-метилморфолина для того, чтобы высвободить индивидуальный аминоэфир, привела с 20 %-ным выходом к *L*-*D*-*L*-диастереомеру, что соответствует 40 % рацемизации, согласно пробе Янга [67]. Это серьезное ограничение использования карбодиимида в пептидных конденсациях (в противоположность аминокислотам с уретановой защитой) было в зна-

$$\text{Boc-}L\text{-Leu-}L\text{-Phe-OH} + \bar{\text{C}}\text{l}\ \text{H}_2\text{-}L\text{-Val-OMe}_3 \xrightarrow[N\text{-метилморфолин}]{\text{ДЦК}} \longrightarrow \text{Boc-}L\text{-Leu-}(L+D)\text{-Phe-}L\text{-Val-OMe}_3 \quad (36)$$

чительной степени преодолено благодаря важному наблюдению Вейганда и Вюнша, что добавление *N*-гидроксисукцинимида к реакционной смеси при синтезе пептидов существенно снижает рацемизацию и другие побочные реакции. Так, в синтезе трипептида по схеме (36) добавление *N*-гидроксисукцинимида к смеси реагентов в диметилформамиде снизило количество *L*-*D*-*L*-трипептида с 14 % до 1 %.

Ранее [69] (см. разд. 23.6.3.2) было предложено использовать преформированные сложные эфиры *N*-гидроксисукцинимида в пептидном синтезе (77); проба на рацемизацию дала хорошие результаты [70]. Благоприятное действие добавки *N*-гидроксисукцинимида в конденсациях с карбодиимидом почти наверняка связано с промежуточным образованием этих эфиров. *N*-Гидроксисукцинимид является нуклеофилом с «α-эффектом» и очень быстро реагирует с *O*-ацилизомочевиной {схема (37)}. Последующая реакция возникающего эфира (77) с аминокомпонентой также быстра, что, возможно, связано с возникновением стабилизованного водородной связью интермедиата (78).



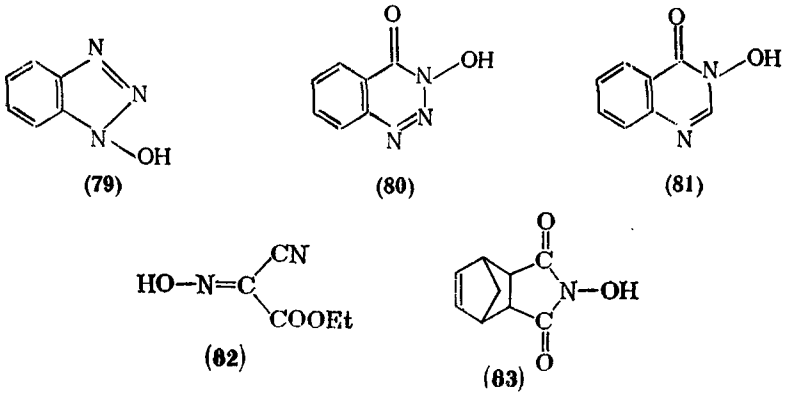

(37)

(а) *N*-гидроксисукцинимид; (б) аминокомпонента $R^2NH_2$

Представление о сходных интермедиатах привлекалось для объяснения чрезвычайной реакционной способности с аминными нуклеофилами других активированных сложноэфирных производных



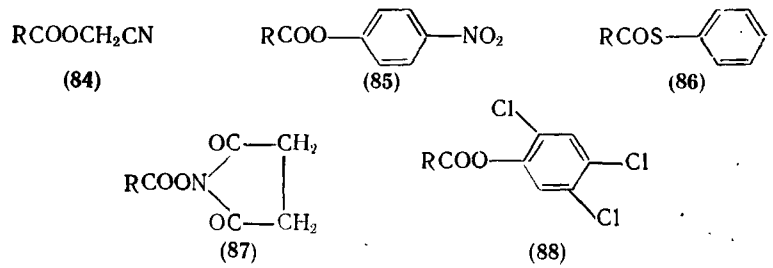
(см. разд. 23.6.3.2). Не показано, что столь повышенная реакционная способность проявляется в образовании оксазолона путем реакции с соседней карбонильной группой. Полагают, что быстрое образование и аминолиз (77) эффективно препятствует рацемизации через промежуточный оксазолон. Дегидратация бокового радикала производных аспарагина и глутамина {см. схему (34)}, включающая также атаку активированного интермедиата карбонильным кислородом, сводится аналогичным образом к минимуму добавлением к реакционной смеси *N*-гидроксисукцинимида. Показано, что некоторые другие производные гидроксиламина (79)—(83) действуют сходным образом; среди них предпочтительным оказался 1-гидроксибензотриазол (79) [67].




### 23.6.3.2. Использование активированных сложных эфиров

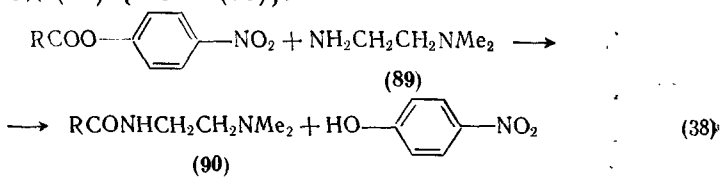
Поскольку аминолиз низших алкиловых и ациловых эфиров протекает слишком медленно, подобная активация карбоксильной компоненты в пептидном синтезе не достаточна. Исключением является легкое образование дикетопиперазинов при циклизации дипептидных эфиров (см. с. 380), ускоренное крайне благоприятным пространственным фактором. Для осуществления быстрой бимолекулярной реакции необходимо увеличение электрофильного характера сложноэфирной карбонильной группы. Обычно это достигается введением электроотрицательного заместителя в алкильную или арильную сложноэфирную функцию. Типичным примером такого рода являются цианометиловый (84) [71] и *n*-нитрофениловый эфиры (85) [72, 73]. Большей реакционноспособностью обладают сложные эфиры тиолов, например (86) [73, 74], и многие особые структуры, прежде всего производные *O*-ацилгидроксиламина, например (87) [69].

В современном пептидном синтезе очень широко используется метод активированных сложных эфиров. Его преимущества — простота, мягкость условий реакции и в связи с невысокой степенью активации карбоксикомпоненты в общем случае отсутствие побочных реакций. Однако, с другой стороны, выделение продукта пеп-



(84) (85) (86) (87) (88)

тидного синтеза из смеси, содержащей образующиеся в результате аминолиза спирты или фенолы, может представлять трудности. Эти трудности можно свести к минимуму тщательным подбором конкретного активированного сложноэфирного производного. Удобным способом удаления любого избытка активированного эфира ациламинокислоты, остающегося после завершения конденсации, является добавление высокоактивного диамина, например диметиламиноэтиламина (**89**). Он очень быстро реагирует с избытком ацилирующего агента, образуя основный кислоторастворимый диметиламиноэтиламид (**90**) {схема (38)}.

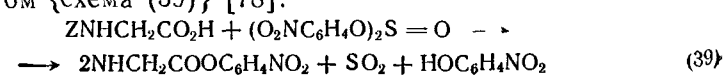


(89)

(90) (38)

Получение самих активированных сложноэфирных производных связано с лишней стадией синтеза, однако есть возможность получать эти производные в больших количествах и сохранять их до момента использования. Тем не менее следует заметить, что стадии образования сложного эфира и аминолиза подвержены рацемизации в связи с образованием оксазолона, и поэтому метод активированных сложных эфиров наиболее часто используется в ступенчатом наращивании оптически устойчивых производных аминокислот, содержащих устойчивые уретановые (например, бензилоксикарбонильную и *трет*-бутоксикарбонильную) защитные группы.

Для использования в пептидном синтезе [75] изучено большое число активированных эфиров, но лишь немногие из них получили применение на практике. Среди них наиболее важными являются, по-видимому, применяемые с 1957 г. упомянутые выше *п*-нитрофениловые эфиры. Обычно их легко получают из уретановых производных аминокислот и *п*-нитрофенола с использованием в качестве конденсирующего компонента дициклогексилкарбодиимида [76]. Другой метод получения включает реакцию карбоновой кислоты с бис(*п*-нитрофенил)сульфитом [77] или с трис(*п*-нитрофенил)фосфитом {схема (39)} [78].

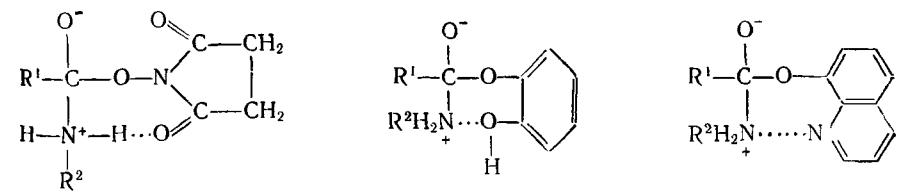


(39)



Среди многих других изученных сложных эфиров, имеющих в своем составе низшие ацильные группы, нашли широкое применение только эфиры 2,4,5-трихлорфенола (**88**) [75]. Этот фенол имеет $pK_a$ 9,45, почти как *п*-нитрофенол ($pK_a$ 9,27), и его сложные эфиры примерно в той же степени способны к аминолизу. Более реакционноспособные пентахлорфениловый [79] и пентафторфениловый [80] эфиры также нашли значительное применение. Предпочтительное использование галогензамещенных ациловых эфиров в отличие от нитропроизводных отмечено в синтезе, включающем гидрогенолиз бензилоксикарбонильных групп, поскольку в противном случае из остаточных количеств *п*-нитрофенола получается высокореакционноспособный *п*-аминофенол.

Сложные эфиры *N*-гидроксисукцинимида (**87**) более реакционноспособны, чем эфиры *п*-нитро- и 2,4,5-трихлорфенола, и, кроме того, имеют ту важную особенность, что они растворимы в родоначальном спирте [69]. Это существенно упрощает методику выделения в пептидном синтезе. Как говорилось выше, крайне высокая реакционная способность и малая склонность к рацемизации сложных эфиров такого типа связана, вероятно, с образованием стабилизованного водородной связью промежуточного комплекса типа (**91**) с аминокомпонентом. Подобное анхимерное ускорение наблюдалось для сложных эфиров пирокатехина [81] и 8-гидроксихинолина [82], способных к образованию интермедиатов (**92**) и (**93**). Как можно ожидать, реакции конденсации с участием сложных эфиров *п*-нитро- и 2,4,5-трихлорфенола ускоряются добавками соединений типа гидроксисукцинимида и гидроксибензотриазола, что, возможно, связано с возникновением сложных эфиров гидроксисукцинимида и гидроксибензотриазола.



(91) (92) (93)

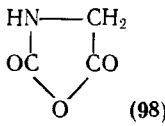
### 23.6.3.3. Использование смешанных и симметричных ангидридов

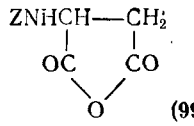
В качестве реакционноспособной карбоксикомпоненты в пептидном синтезе исследовано большое количество соединений ангидридоподобной структуры. Среди них симметричные ангидриды бензоилоксикарбонил- и *трет*-бутоксикарбониламинокислот, например (**94**) [83], несимметричные ангидриды с другими карбоновыми кислотами, например (**95**) [84], или с кислыми эфирами карбоновых кислот, например (**96**) [85], ангидриды с различными неорганическими кислотами, например (**97**) [86], и циклические *N*-карбоксиангидриды, например (**98**) [87]. Внутренние ангидриды, в

которых вторая карбоксильная группа находится в боковой цепи аспарагиновой или глутаминовой кислот (например, **99**), также находили ранее применение в пептидном синтезе.

$(Boc\text{-}NHCH_2CO)_2O$ **(94)** $Boc\text{-}NHCH_2COOCOCMe_3$ **(95)** $Boc\text{-}NHCH_2COOCOOEt$ **(96)**

$ZNHCH_2COOSO_3^-Li^+$ **(97)**


**(98)**


**(99)**

### *(1) Симметричные ангидриды* [83]

Простейшие ангидридные производные ациламинокислот легко получают в мягких условиях с использованием, например, в качестве дегидратирующего агента дициклогексилкарбодиимида [88]. Тем не менее их применение в пептидном синтезе не получило широкого распространения. В определенной мере это связано с неэкономичностью использования часто дорогих ациламинокислот, поскольку при этом только половина реагента включается в пептид {схема (40)}.

$$(Boc\text{-}NHCHR^1CO)_2O + NH_2R^2 \longrightarrow$$
$$\longrightarrow Boc\text{-}NHCHR^1CONHR^2 + Boc\text{-}NHCHR^1CO_2H \qquad (40)$$

Применение симметричных ангидридов в качестве карбоксильной компоненты оказалось наиболее эффективным в твердофазном синтезе (см. ниже), где особенно важно освободиться от любой побочной реакции, включающей активированные реагенты [88]. Рассматриваемый метод синтеза в основном ограничивается применением производных аминокислот, имеющих уретановую или другую обеспечивающую сохранение хиральности защиту, так как при несоблюдении этого условия может произойти частичная или полная рацемизация.

### *(2) Несимметричные ангидриды угольной и карбоновых кислот*

Значительно большее распространение получили несимметричные ангидриды, получаемые, как правило, из солей ациламинокислот и хлорангидрида другой карбоновой, например по схеме (41) [84], или хлорангидрида угольной кислоты, например по схеме (42) [85]. Образование ангидрида при 0 °C или ниже обычно завершается за несколько минут. Соблюдение столь низкой температуры реакции и необходимость немедленного использования ангидрида в качестве ацилирующего агента без его выделения важны для предотвращения диспропорционирования с образованием смеси двух симметричных ангидридов.



$$ZNHCHRCO_2^- {}^+NHEt_3 + CMe_3COCl \longrightarrow ZNHCHRCOOCOCMe_3 + {}^+NHEt_3\ Cl^- \qquad (41)$$

$$ZNHCHRCO_2^- {}^+NHEt_3 + EtOCOCl \longrightarrow ZNHCHRCOOCOOEt + {}^+NHEt_3\ Cl^- \qquad (42)$$

Поскольку смешанные ангидриды содержат две по разному замещенные карбонильные группы, нуклеофильная атака аминокомпонента может привести к двум продуктам {схема (43)}. Второй заместитель в ангидридной группировке должен быть выбран так, чтобы уменьшить нежелательную атаку на его карбонильную группу {путь (б) на схеме (43)}.

$$ZNHCHR^1COOCOR^2 \xrightarrow{R^3NH_2} \begin{cases} \xrightarrow{(а)} ZNHCHR^1CONHR^3 + R^2CO_2H \\ \xrightarrow{(б)} ZNHCHR^1CO_2H + R^2CONHR^3 \end{cases} \qquad (43)$$

**(100)**

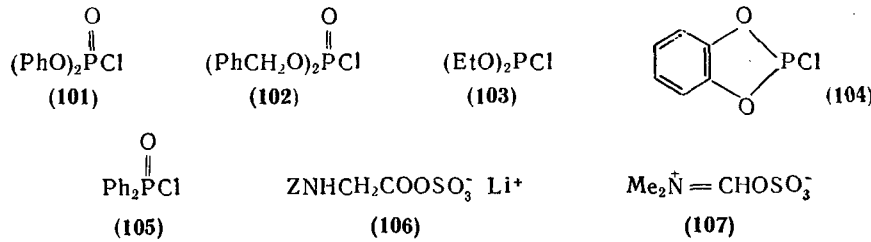
На реакцию несимметричных ангидридов карбоновых кислот с аминными нуклеофилами влияют пространственный и электронный факторы, а также характер растворителя и природа аминокомпоненты. Пространственный эффект используют путем применения в качестве второй компоненты карбоновых кислот с объемистыми заместителями. Атака аминной компоненты в сравнительно неполярной среде на ангидриды, содержащие группировки пивалиновой {триметилуксусной (**100**) $R^2 = CMe_3$} [84] и изовалериановой (**100**) $R = CHMeEt$ кислот, направлена почти исключительно на пространственно менее затрудненный карбонил остатка ациламинокислоты {путь (а) на схеме (43)}. Электронный эффект, т. е. относительная электрофильность двух карбонильных групп ангидрида, может быть приблизительно оценен по соотношению констант диссоциации соответствующих кислот. Это соотношение отражает электроноакцепторный или электронодонорный характер их α-заместителей. Нуклеофильной атаке благоприятствует та карбонильная группа, которая соответствует более сильной кислоте. Ввиду особенной слабости угольной кислоты, получаемые из нее смешанные ангидриды с относительно сильными ациламинокислотами являются идеальными реагентами [85]. Эти ангидриды, например (**100**) $R^2 = COOEt$, реагируют в обычных условиях с аминокомпонентой почти исключительно по карбонилу ациламинокислоты, образуя соответствующие пептидные производные {путь (а) на схеме (43)}.

Дополнительное преимущество использования смешанных ангидридов карбоновых и угольной кислоты заложено в летучести обоих побочных продуктов реакции — диоксида углерода и низшего спирта. Однако с другой стороны, эти ангидриды получаются из соответствующих хлорформиатов в строго безводных условиях.

при их аминолизе возможна рацемизация. Этот метод обычно применяется для соединения пептидных фрагментов, заканчивающихся либо оптически неактивным остатком (глицином), либо устойчивым к рацемизации пролином или же остатками аминокислот с уретановой защитой. Особое распространение получил метод, включающий повторное использование избытка смешанного ангидрида, когда производные одной определенной аминокислоты последовательно добавляют к аминокомпоненте без выделения промежуточно получающегося защищенного пептида [90]. При этом, чтобы обеспечить быстрое и почти количественное протекание реакции, используют более одного эквивалента смешанного ангидрида; после завершения ацилирования аминокомпоненты избыток реагента разлагают водной щелочью. По своему замыслу этот ускоренный метод синтеза сходен с твердофазной методикой Меррифилда (см. ниже).

### *(3) Ангидриды с неорганическими кислотами*

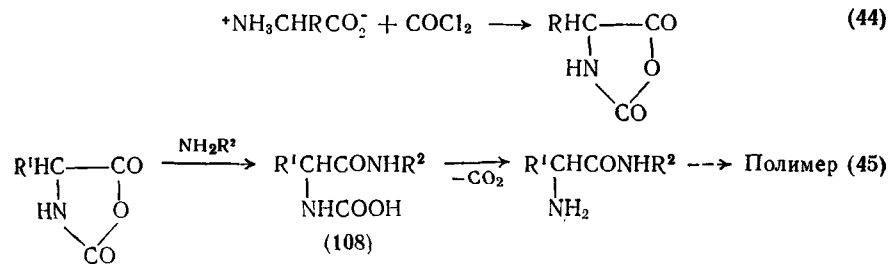
Для получения используемых для пептидного синтеза соответствующих смешанных ангидридов могут применяться различные неорганические кислоты, обычно — это производные фосфорной кислоты. Примеры этого класса включают производные, получаемые из ациламинокислот и дифенилфосфорилхлорида (**101**) [91], дибензилфосфорилхлорида (**102**) [92], диэтилхлорфосфита (**103**) и о-фениленхлорфосфита (**104**) [93]. Позднее этот перечень был пополнен дифенилфосфинилхлоридом (**105**) [94]. Все они дают с солями соответствующих карбоновых кислот смешанные ангидриды, которые реагируют с аминокомпонентами, по-видимому, исключительно по карбонильной группе. Особую группу составляют ангидриды с серной кислотой, например (**106**), поскольку присутствие солевой группировки в ангидриде двухосновной кислоты придает соединению водорастворимость, и такие активированные производные считаются особенно подходящими для ацилирования свободных аминокислот и пептидов в слабощелочном водном растворе. Эти ангидриды получены [86] реакцией между ациламинокислотой или солью пептида по его карбоксильной группе и комплексом (**107**) триоксида серы и диметилформамида. При проведении пептидной конденсации в безводной среде рацемизации не обнаружено; в случае водной среды она невелика.






### *(4) Карбоксиангидриды*

Ангидриды этого типа могут быть получены путем термического отщепления бензилхлорида от хлорангидридов бензилоксикарбониламинокислот [95] (см. раздел 23.6.2.1) или непосредственной реакцией между аминокислотой и фосгеном {схема (44)} [96]. Они реагируют {схема (45)} с аминными нуклеофилами преимущественно по карбонильной группе аминокислоты, поскольку вторая карбонильная группа ангидрида дезактивирована для нуклеофильной атаки ввиду наличия стабилизованной за счет резонанса амидной системы. Однако получающиеся карбаминовые кислоты (**108**) неустойчивы и обычно разлагаются в процессе реакции с высвобождением второй аминокомпоненты. В результате последующей реакции с *N*-карбоксиангидридом образуется полимер. Эта полимеризация *N*-карбоксиангидридов составляет важный метод получения высокомолекулярных поли(аминокислот) [97]. Если первоначальную реакцию проводят с избытком карбоксиангидрида при щелочном pH и при такой температуре, когда не происходит декарбоксилирования (**108**), метод может применяться для контролируемого пептидного синтеза [87].




### 23.6.3.4. Использование азидов кислот

В течение многих лет предпочтительным методом получения пептидных фрагментов с целью их последующего превращения в более крупные пептиды была реакция с азидными производными [98]. Прежде всего это было связано с существовавшим долгое время мнением об этом методе как о единственном, не связанном с риском рацемизации. Как известно теперь, такое определение данного метода не всегда справедливо, и в присутствии третичных оснований азидные производные карбоксикомпонент претерпевают рацемизацию. Среди более новых методик (например, использование дициклогексилкарбодиимида в присутствии гидроксибензотриазола) есть такие, которые, насколько сегодня известно, свободны от рацемизации. Тем не менее азидный метод сохраняет видное место среди известных в настоящее время способов.

В первоначальном варианте эфиры ациламинокислот или пептидов превращали по Курциусу действием гидразина в соответ-

ствующие гидразиды, которые затем выделяли и реакцией с азотистой кислотой превращали в азиды кислот {схема (46)}.

$$\text{—CONHCHRCO}_2\text{Me} \xrightarrow{N_2H_4} \text{—CONHCHRCONHNH}_2 \xrightarrow[HCl]{NaNO_2} \longrightarrow \text{—CONHCHRCON}_3 \qquad (46)$$

До настоящего времени этот метод остается наиболее распространенным для синтеза гидразидов аминокислот и пептидов, в методику внесено много усовершенствований. Побочные реакции, в частности образование амида, сведены к минимуму за счет применения низкой температуры (ниже —25 °С) и использования органического нитрита вместо азотистой кислоты [99]. При низкой температуре снижается также риск перегруппировки азида по Курциусу. Это потенциальное серьезное осложнение, поскольку получающийся при этом изоцианат может взаимодействовать с аминокомпонентой, давая производные мочевины {схема (47)}, очень по-

$$\text{—CONHCHR}^1\text{CON}_3 \longrightarrow \text{—CONHCHR}^1\text{N=C=O} \longrightarrow \xrightarrow[\text{аминокомпонента}]{R^2NH_2} \text{—CONHCHR}^1\text{NHCONHR}^2 \qquad (47)$$

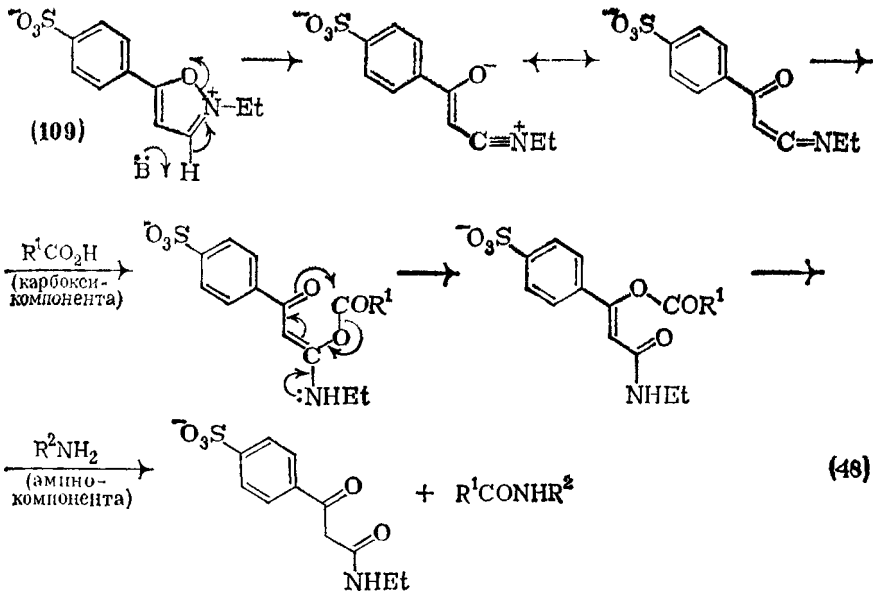
хожие на нужные пептиды. Другой путь [100] к исходным гидразидам, через производные диацилгидразина, обсуждался ранее [например, (47), (49)].

Азидный метод особенно ценен тем, что в общем случае он свободен от рацемизации при проведении реакции только в мягких щелочных условиях, а также поскольку количество защитных групп в полифункциональных боковых радикалах сведено к минимуму. Гидроксигруппы (серина, треонина и тирозина) и боковые цепи (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), а также концевые карбоксигруппы аминокомпоненты в процессе пептидного синтеза, проводимого в частично водной среде, могут оставаться незащищенными.

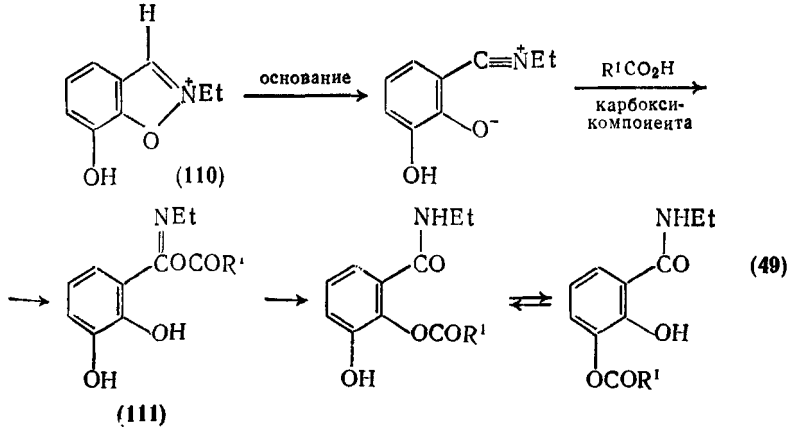
### 23.6.3.5. Другие методы получения пептидной связи

Изобретательность химиков-органиков нашла свое выражение в открытии новых реакций и реагентов, ведущих к образованию пептидной связи. 5-Фенил-*N*-этилизоксазолиевые соли, например производное сульфоновой кислоты (**109**), реагируют с солями пептидов или ацилиминокислот, образуя сложные эфиры енола. Они достаточно реакционноспособны для обеспечения быстрого взаимодействия с аминокомпонентами, приводящего к пептидам [101]. Этот метод сразу завоевал популярность благодаря лежащей в его основе выдумке: легкости выделения продукта реакции из смеси с водорастворимыми побочными продуктами — производными сульфоновых кислот, а также в силу положительного теста на отсутствие рацемизации. Тем не менее последующие данные показали, что рацемизация может быть значительной. Предлагаемый механизм активации изображен на схеме (48).

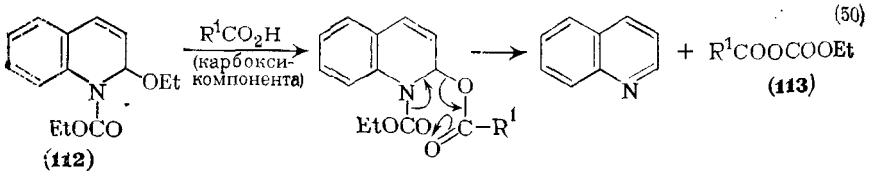





В качестве исходных предложен широкий набор изоксазолиевых солей. Интересный пример [102] — производное 7-гидроксибензоизоксазолия (**110**). Реакция с карбоксикомпонентой приводит аналогичным путем к промежуточному сложному эфиру енола (**111**) {схема (49)}, однако в данном случае оказалось возможным перемещение ацильной группы с одного фенольного гидроксила на другой. Конечным активированным реагентом стал сложный эфир пирокатехина, аммонолиз которого протекает с анхимерным участием свободной соседней фенольной или фенолатной группировки (см. выше) и с ясно выраженным противодействием рацемизации.

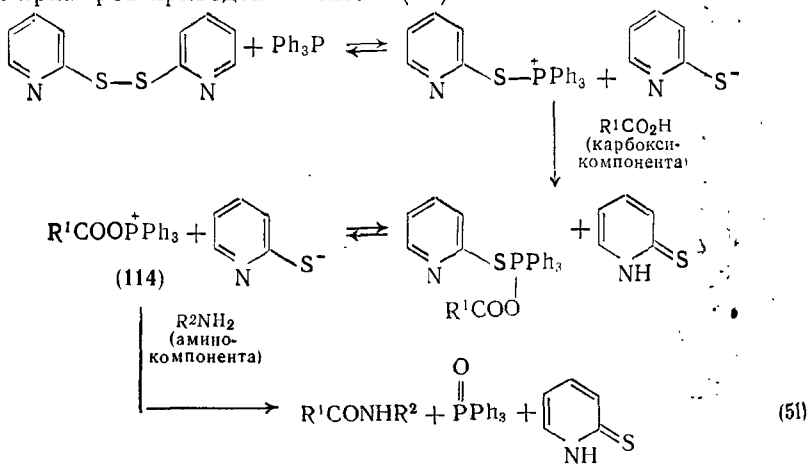


Другой реагент, который в результате многоступенчатой реакции с карбоксильной компонентой дает активированное производное, — 1,2-дигидро-2-этокси-1-этоксикарбонилхинолин (**112**) {схема 50} [103]. В этом случае активированной частицей является, вероятно, смешанный ангидрид угольной и карбоновой кислот (**113**), идентичный ангидриду, возникающему из этилхлорформиата {см. схему (42)}



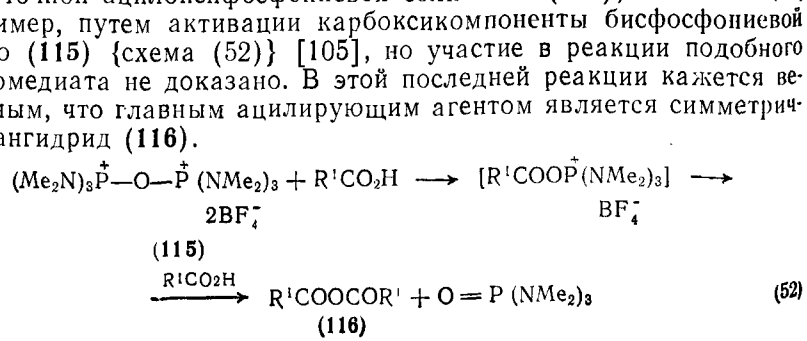

(50)

Хотя процесс образования пептидной связи формально представляют как дегидратацию, он может быть реализован также как комбинация действия окислителя и восстановителя [104]. Один из таких примеров приведен на схеме (51).




(51)

В других пептидных синтезах постулируется образование промежуточной ацилоксифосфониевой соли типа (**114**), возникающей, например, путем активации карбоксикомпоненты бисфосфониевой солью (**115**) {схема (52)} [105], но участие в реакции подобного интермедиата не доказано. В этой последней реакции кажется вероятным, что главным ацилирующим агентом является симметричный ангидрид (**116**).



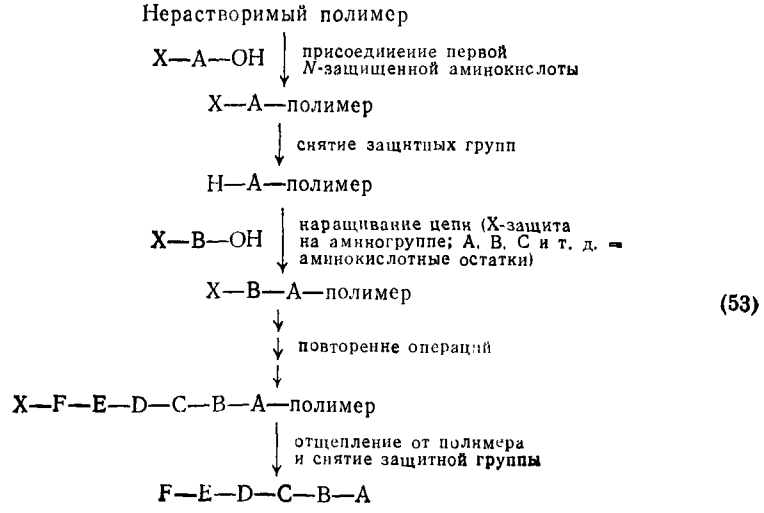

(52)



### 23.6.4. ТВЕРДОФАЗНЫЙ ПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ

Пептидный синтез становится трудоемкой и длительной операцией в том случае, когда целевой пептид велик. Образование каждой пептидной связи требует должным образом защищенной аминокислоты, проведения конденсации и снятия защитных групп. Несмотря на то, что большое число последовательных стадий может быть модифицировано путем изменения общего плана синтеза (см. разд. 23.6.5), общее число дискретных химических операций в синтезе больших пептидных гормонов и небольших белков остается весьма значительным. Пептидный синтез предъявляет также значительные технические требования. Условия реакции требуют тщательного исследования и строгой оптимизации для того, чтобы обеспечить приемлемый выход и избежать побочных реакций. Выделение лабильных и труднодоступных продуктов реакции требует опыта и искусства экспериментатора. По этой причине в целом ряде схем предлагаются ускоренные синтетические методики, которые упрощают также многие обычные операции. Среди этих схем широкое распространение нашла методика твердофазного синтеза, разработанная Меррифилдом [106, 107].

Общая схема синтеза на твердом носителе представлена на схеме (53). Нужная последовательность аминокислот достигается введением соответствующего остатка на каждой ступени, причем пептидная цепь присоединена к твердому носителю. Каждый цикл наращивания аминокислотной цепи включает стадии конденсации и снятия защитных групп. Синтез завершается отщеплением цепи от полимерного носителя, обычно с одновременным удалением защитных групп с боковых радикалов и *N*-конца. В процессе синтеза пептид все время остается присоединенным к нерастворимому носителю и физические операции сводятся лишь к фильтрованию и промывке.




(53)

Наиболее обычная последовательность химических операций для проведения синтеза на твердом носителе указана на схеме (53). При этом почти исключительно используются *трет*-бутоксикарбониламинокислоты и полистирольные носители. Остаток первой аминокислоты присоединяется к смоле в виде замещенного бензильного сложноэфирного производного путем реакции с частично хлорметилированным полимером. Катализируемое кислотой удаление бутоксикарбонильной группы с последующей нейтрализацией освобождает концевую аминогруппу для последующей конденсации с остатком второй аминокислоты, что выполняется обычно с помощью дициклогексилкарбодиимида. Избыток растворимых реагентов удаляют тщательной промывкой на каждой стадии, и далее следует удаление защитных групп, нейтрализация и повторное построение пептидной связи до тех пор, пока не образуется весь продукт. Отщепление материала от смолы включает разрыв бензильной сложноэфирной связи действием очень сильной кислоты, обычно безводного фтороводорода. Основные ступени синтеза на твердом носителе представлены на схеме (54).

$$Me_3COCONHCHR^1COO^- + ClCH_2—C_6H_4—\text{смола}$$

Boc-аминокислота — хлорметилполистирол

↓ EtOH, 80 °C

$$Me_3COCONHCHR^1COOCH_2—C_6H_4—\text{смола}$$

Boc-аминоацилсмола

↓ HCl, AcOH или $CF_3CO_2H$

$$^-Cl\ H_3\overset{+}{N}CHR^1COOCH_2—C_6H_4—\text{смола} \qquad (54)$$

↓ $Et_3N$, $CHCl_3$

$$H_2NCHR^1COOCH_2—C_6H_4—\text{смола}$$

↓ Boc-аминокислота, ДЦК, $CH_2Cl_2$

$$Me_3COCONHCHR^2CONHCHR^1COOCH_2—C_6H_4—\text{смола}$$

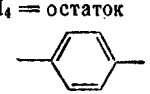
Boc-дипептид-смола

↓ HBr, $CF_3CO_2H$ или жидк. HF

$$NH_2CHR^2CONHCHR^1CO_2H$$

Дипептид

$C_6H_4$ = остаток



1. Синтез проводится в полу-гетерогенной системе с применением нерастворимого полимерного носителя. Оригинальный метод Меррифилда и подавляющее большинство известных синтезов [106] используют стирол-дивинилбензольный полимер; позднее предложен и более полярный материал [108]. Синтетический сополимер сшит очень слабо (обычно 1—2 % в случае полистирола), и поэтому в него легко проникают используемые реагенты и растворители. Таким образом, полимерная фаза представляет собой гель с довольно подвижной решеткой полимера и присоединенными к нему наращиваемыми пептидами. Пространственные препятствия, столь значительные в случае жесткой сетки полимера, в данном случае сведены к минимуму, и реакции протекают со скоростями, не очень сильно отличающимися от таковых в растворе.

2. Нерастворимость полимерных частиц сильно упрощает методику, что позволяет прибегнуть к машинной помощи. Полимер держат обычно в одном реакционном сосуде на всем протяжении синтеза, что сводит к минимуму механические потери. Все физические операции состоят из перемешивания, промывки и фильтрации.

3. Возможность применения больших избытков химических реагентов ускоряет и повышает эффективность образования пептидной связи. Избыток растворимых реагентов легко удаляют фильтрованием и тщательной промывкой смолы.

4. Промежуточный связанный с полимером пептид после удаления растворимых реагентов и побочных продуктов не нуждается в очистке, что позволяет избежать традиционных процедур очистки (перекристаллизация, хроматографирование) и связанных с ними потерь. В принципе такой подход приемлем только в том случае, если все последовательные синтетические реакции идут количественно. Поскольку этого вряд ли можно достичь, метод синтеза на твердом носителе неизбежно приводит к окончательному продукту, загрязненному более короткими пептидами, в которых нехватает одной или более аминокислот (дефект последовательности). Подобным же образом побочные реакции могут привести к загрязнению пептидами с искаженной и частично выполненной последовательностью. Поэтому успех синтеза на твердом носителе полностью зависит от того, возможно ли очистить конечный продукт от близких побочных продуктов. Для достижения даже умеренной чистоты продукта, получаемого на смоле, необходима очень высокая эффективность реакций образования пептидной связи. Так, для получения декапептида с правильной цепью с выходом 80 % необходимо, чтобы выход на каждой стадии образования пептидной связи был около 98 %. В случае пептида с 20 остатками аминокислот средний выход увеличивается до 99 %. В обоих случаях остающиеся 20 % связанного со смолой пептида имеют более короткие пептидные цепи, в основном на одну или две аминокислоты меньше. Поэтому проблема очистки становится очень трудной.

5. Из-за нерастворимости продукта реакции на всех промежуточных стадиях количественный аналитический контроль затруднителен и обычно его не проводят. По этой причине требуется строгое доказательство строения очищенного конечного продукта.

Метод использован со значительным успехом для получения очень многих коротких (8—12 остатков аминокислот) биологически активных пептидов. В этих случаях пептиды с дефектами последо-

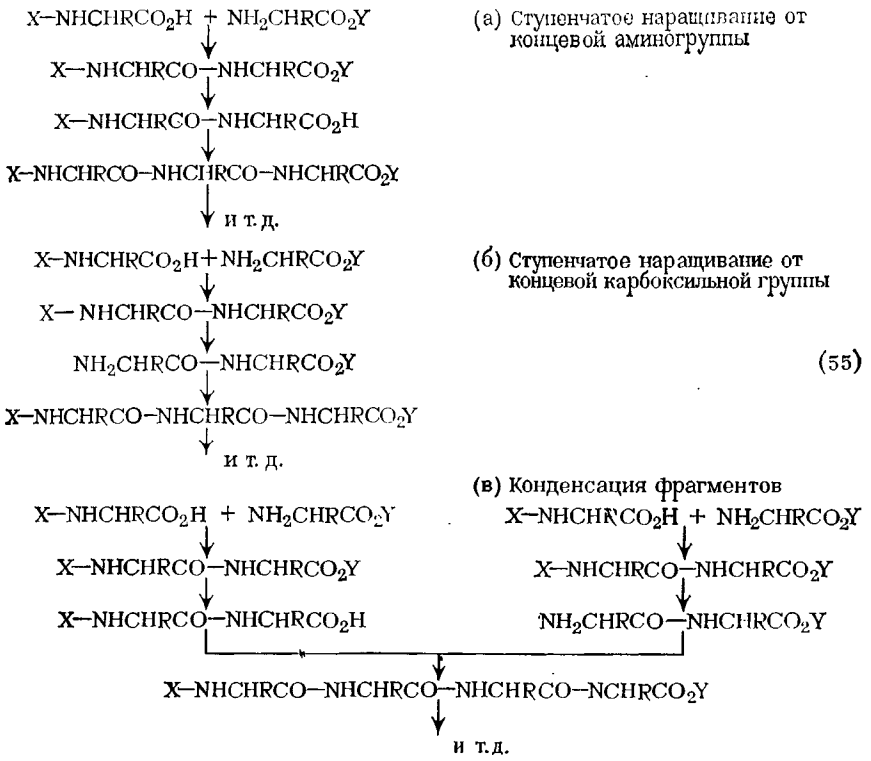
вательности, в которых недостает одной или более аминокислоты, часто могут быть отделены. Осуществлен также твердофазный синтез большого числа более крупных пептидов, которые обладали высокой биологической активностью. Установление полной однородности продукта таких синтезов — задача очень трудная. Выдающимся достижением в этой области был синтез рибонуклеазы А [109], содержащей 124 аминокислотных остатка и обладавшей ферментативной активностью.

### 23.6.5. СТРАТЕГИЯ И ТАКТИКА ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА

При планировании синтеза пептидов значительного размера нужно уделить особое внимание как разработке общего или стратегического плана, так и тактике, с помощью которой этот план может быть эффективно выполнен [110]. Основной стратегический замысел состоит в способе, которым может быть достигнуто построение определенной последовательности остатков аминокислот, т. е. либо ступенчатым способом по одному остатку за одну ступень, начиная с концевой амино- или карбоксигруппы, либо путем объединения нескольких частей с определенной последовательностью (конденсация фрагментов), проводя синтез либо в растворе, либо твердофазным способом и т. д. Тактические соображения включают выбор подходящего сочетания защитных групп для концевых амино- и карбоксильных групп для различных боковых радикалов аминокислот. Некоторые из этих защитных групп «постоянны», т. е. сохраняются до конца синтеза, другие — «временны», т. е. подлежат отщеплению на промежуточных стадиях синтеза, что дает возможность создания определенного типа пептидной связи или это производится для того, чтобы нужным образом изменить растворимость и т. д. Условия для снятия защитных групп должны быть выбраны с учетом аминокислотного состава пептида. Другую часть тактики составляет выбор методики создания пептидной связи, выбор растворителя, особенно в связи с опасностью рацемизации.

#### 23.6.5.1. Последовательное наращивание и конденсация фрагментов

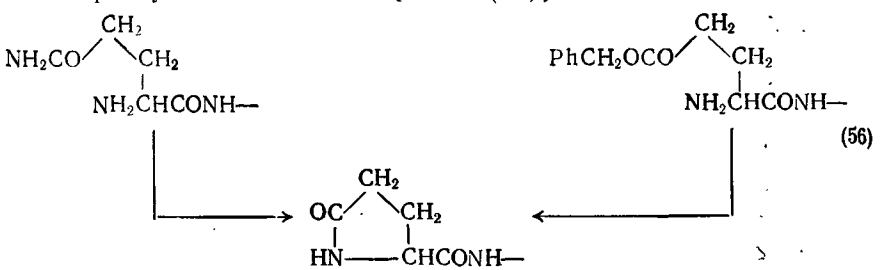
Три основные подхода к созданию полипептидной цепи показаны на схеме (55), части (а)—(в). Первый подход, состоящий в постепенном наращивании со стороны концевой аминогруппы {участок (а) на схеме}, применяется редко, хотя он и имеет прямую аналогию с биосинтезом белка. Он включает удаление защиты карбоксигруппы и активирование концевой карбоксигруппы пептида. Этот подход, следовательно, делает максимальной возможность рацемизации и других возможных побочных реакций, затрагивающих активированный пептид. Противоположный процесс, т. е. ступенчатое наращивание со стороны концевой карбоксильной группы {участок (б) на схеме (55)}, значительно более привлекателен. Активированными реагентами этого синтеза являются простые производные аминокислот, которые можно предохранить от рацемизации с помощью уретановых или других тщательно подбираемых




защит для аминогруппы. Кроме того, на практике найдено, что выходы в реакции конденсации значительно выше в случае активированных ациламинокислот, чем в случае активированных пептидов. Первые несомненно значительно доступнее, чем большие пептиды, и выходы в пептидном синтезе можно значительно улучшить, если ацилирующий агент брать в умеренном избытке. Это особенно справедливо для твердофазного синтеза, где избыток растворимого реагента легко удаляется от нерастворимого полимера. Несмотря на то, что подход, состоящий в ступенчатом наращивании, делает максимальным число последовательно проводимых конденсаций, его относительная эффективность часто делает этот метод оптимальным для синтеза пептидов средней величины. Он был успешно использован для синтеза в растворе полной последовательности цепи гормона секретина [111], содержащего 27 остатков аминокислот. Этот же подход с использованием твердофазного носителя использован для получения биологически активных препаратов пептидов большей длины и даже небольших белков, включая

фермент рибонуклеазу, содержащую 124 аминокислотных остатка [109].

Метод конденсации фрагментов {участок (в) на схеме (55)} имеет преимущество в меньшем количестве конденсаций, что в принципе может обеспечить более высокую суммарную эффективность. Успех такого подхода может критическим образом зависеть от выбора мест сшивки в системе целевого полипептида. Предпочтительными остатками такого рода будут остатки глицина, поскольку конденсация фрагментов с *C*-концевым глицином исключает возможность рацемизации. Подобным же образом часто используют пептидный фрагмент с *C*-концевым пролином, поскольку образование оксазолона с вторичными аминокислотами не может протекать. И, наоборот, остатки глутамина или γ-бензилглутамата не должны располагаться на концевой аминогруппе пептидного фрагмента, поскольку при этом существует риск протекающей параллельно циклизации в производные пирролидонкарбонильного или пироглутамильного типа {схема (56)}.



(56)

Этим реакциям явно благоприятствует невысокая скорость образования нужной пептидной связи, что происходит из-за пространственных препятствий, и по этой причине объемистые аминокислотные остатки, например валин и изолейцин, не следует располагать в местах сшивки. Во всех случаях, когда пептидные фрагменты содержат *C*-концевые остатки, не являющиеся глицином или пролином, должна использоваться также методика, делающая риск рацемизации минимальным.

### 23.6.5.2. Выбор защитных групп и способов активации

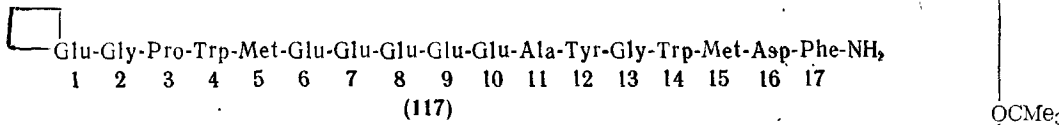
Как отмечалось выше, используемые в пептидном синтезе защитные группы подразделяются в первом приближении на два типа: постоянные и временные. При последовательном наращивании цепи {участок (б) на схеме (55)}, например, различные защиты в боковых радикалах, а также закрывающие терминальную *C*-группировку, сохраняются до конца синтеза. С другой стороны, защита аминогрупп индивидуальных ациламинокислот существует сравнительно недолго и должна избирательно удаляться в присутствии постоянных защит. Обычно для достижения этой цели применяют подходящее сочетание бензильных и *трет*-бутильных производных. Возможно, что наиболее мягкий и чистый способ удаления защитной группы в пептидной химии — это каталитический гидрогенолиз. Так, часто применяемый метод состоит в последовательном наращивании *N*-бензилоксикарбониламинокислот, имеющих в боковых радикалах кислотолабильную группу — *трет*-бутилоксикарбонил (в случае лизина), *трет*-бутильную сложноэфирную группу (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота) или *трет*-бутильную группировку простого эфира (серин, треонин, тирозин). В таком ступенчатом синтезе используют активированные эфиры, поскольку проблема рацемизации не возникает. В присутствии группировок, содержащих двухвалентную серу, гидрогенолиз чаще всего неприменим, поэтому для синтеза пептидов с цистеином или метионином необходим иной подход. Часто оказывается достаточным поменять ролями бензильную и *трет*-бутильную группы и проводить ступенчатый синтез с *N*-*трет*-бутоксикарбониламинокислотами, содержащими в боковых радикалах бензилоксикарбонильную, бензильную сложноэфирную и бензильную группу простого эфира. Повторное удаление защит аминогруппы достигается кислотной обработкой в мягких условиях, тогда как постоянная защита на основе бензила удаляется на завершающей стадии синтеза действием сильной кислоты.

Часто вначале используют метод ступенчатого наращивания для получения пептидов с определенной последовательностью с последующим применением метода конденсации фрагментов. В этих случаях требуется избирательное отщепление защитной группы с *C*-концевой группировки. В отсутствие чувствительной к основаниям последовательности (ср., например, разд. 23.6.2.3) можно использовать метиловый эфир в сочетании с *N*-бензилоксикарбонильной и *трет*-бутильной защитами в боковых радикалах; расщепление метилового эфира проводится мягкой щелочной обработкой или действием гидразина. Вначале при отщеплении защитных групп высвобождается кислота (пептид), которая далее может быть активирована для последующей конденсации, например, с дициклогексилкарбодиимидом в присутствии гидроксибензотриазола, когда риск рацемизации минимален. В тех случаях, когда С-концевой группой является остаток глицина или пролина, можно прибегнуть к другим методам активации, например часто используют метод смешанных ангидридов — достаточно эффективный и упрощающий задачу выделения. Отщепление сложноэфирной метильной группы действием гидразина способствует проведению дальнейших конденсаций через азиды кислот.

Более лабильные фенильные сложноэфирные группы [112] применяют для защиты концевой карбоксильной группы в присутствии чувствительных к щелочи структур. С другой стороны, С-концевая защита может быть снята, и ступенчатый синтез начинается со свободной аминокислотой в качестве аминокомпоненты. Подобным же образом можно иногда избежать защиты карбоксильной группы и в боковых радикалах; в этом случае общий замысел син-

теза предусматривает использование минимального, а не полного набора защитных групп. В случае больших молекул минимальная защищенность боковых радикалов может создать растворимость более благоприятную для процедуры очистки, однако в этом случае реакции образования пептидной связи следует проводить в мягких условиях и обеспечивать их высокую избирательность. В синтезах, включающих сшивку минимально защищенных фрагментов, часто используется азидный метод. При применении других методов конденсации часто наблюдаются побочные реакции, что связано с переносом активации на незащищенные карбоксильные группы [113].

Изложенные соображения и некоторые встречающиеся в практике проблемы нашли четкое отражение в оригинальном синтезе гормона гастрина [114—117]. Этот природный пептид **(117)**, содержащий 17 остатков аминокислот, принимает участие в регуляции выделения кислоты желудочного сока.




**(117)**

Его аминокислотный состав включает два остатка метионина (что ограничивает использование гидрогенолиза в процессе синтеза), два остатка чувствительного к кислотной обработке триптофана и шесть остатков кислых аминокислот. Карбоксильная концевая группа закрыта остатком первичного амида, а концевая аминогруппа — пироглутамильным остатком (циклической глутаминовой кислотой). Первоначальный план синтеза включал как ступенчатое наращивание, так и конденсацию фрагментов, и вся цепь была разделена по пептидным связям 5,6 и 13,14. Глициновый остаток в положении 13 служил обычной точкой сшивки, поскольку он представляет собой нерацемизующийся остаток на *C*-конце одного пептидного фрагмента. Сшивка в точке 5 была выбрана потому, что наличие в этом месте остатка метионина не дает возможности проводить гидрогенолиз в процессе построения нужной последовательности остатков в центре молекулы.

Центральная часть пептида, включающая остатки 6—13, была синтезирована обычным путем последовательного наращивания {схема (57)} [115]. Исходной аминокомпонентой служил метиловый эфир аланина. В процессе синтеза для защиты аминогруппы использовались бензилоксикарбонильные производные; защита снималась гидрогенолизом. Карбоксильные группы боковых радикалов защищались *трет*-бутильной эфирной группировкой.

Тирозин вводился в синтез в виде его *N,O*-дибензилоксикарбонильного производного, причем при первом же гидрогенолизе обе защитные группы удалялись и далее фенольный гидроксил оставался незащищенным. Более надежным защищенным производным был бы *трет*-бутиловый эфир тирозина, однако его труднее приготовить. Все пять остатков γ-*трет*-бутилглутамата вводили конденсацией с активированным трихлорфениловым эфиром. Конденсации с дициклогексилкарбодиимидом проходили удовлетворительно как

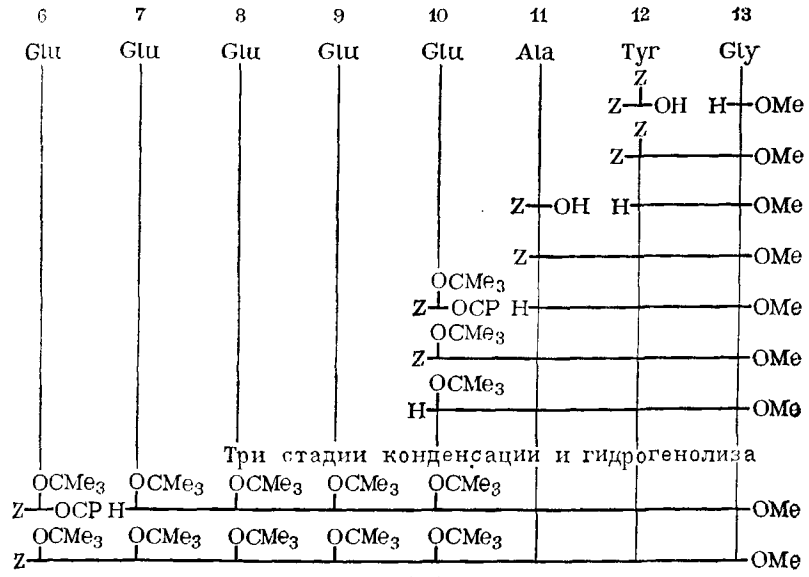
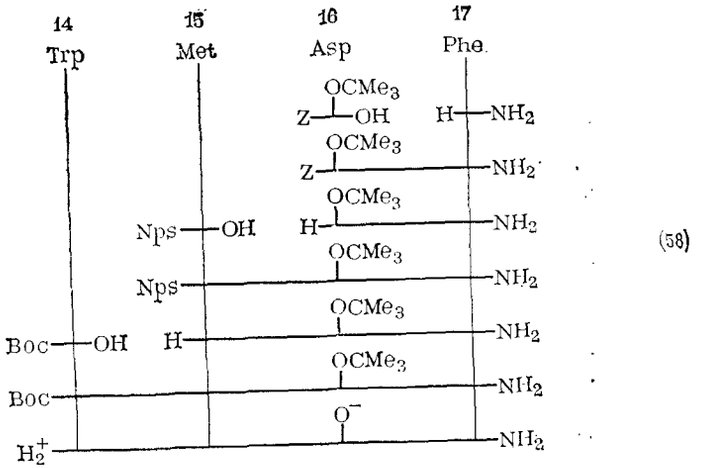



Схема (57)

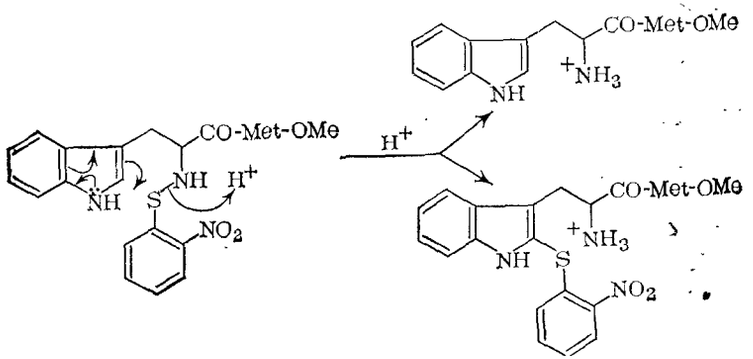
с аланиновыми, так и с тирозиновыми производными, однако на последующих стадиях синтеза также применялись активные сложные эфиры.

Тетрапептидный фрагмент 14—17 содержит неудобное для синтеза сочетание аминокислот, что потребовало использования целого ряда защитных групп при синтезе {схема (58)} [114, 117]. *C*-Концевой дипептидный амид удобно получать конденсацией двух производных аминокислот в присутствии дициклогексилкарбодиимида с отщеплением бензилоксикарбонильных групп путем гидрогенолиза. Поскольку следующим остатком является метионин, далее нельзя использовать гидрогенолиз, и для данной аминокислоты была выбрана чрезвычайно кислотолабильная *o*-нитрофенилсульфенильная защитная группа. Эта группа легко отщеплялась при обработке кислотой; β-*трет*-бутильная сложноэфирная группировка аспарагина оставалась при этом нетронутой. Однако попытки ввести таким же путем следующую аминокислоту (триптофан) оказались безуспешными из-за неожиданно происходившей при снятии защитных групп перегруппировки {схема (59)}.

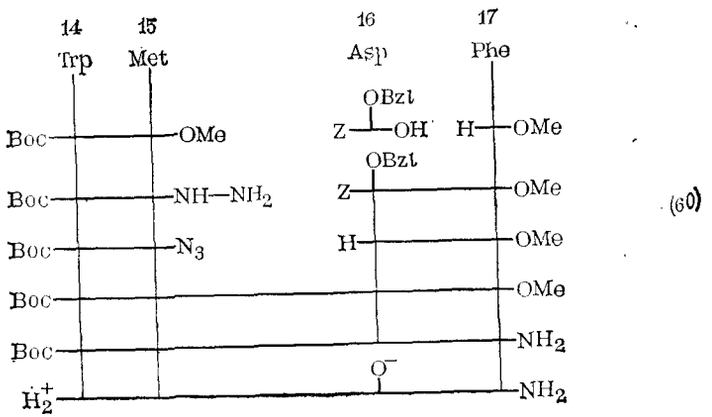
Поскольку в то время не были известны другие пригодные в подобном случае высоко кислотнолабильные *N*-защиты, пришлось для триптофана прибегнуть к *трет*-бутоксикарбонильной защите. Удаление этой защитной группы из полученного тетрапептида




(58)




(59)



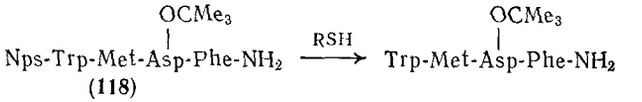

(60)



приводило к одновременному отщеплению *трет*-бутильной эфирной группировки в боковом радикале аспарагиновой кислоты.

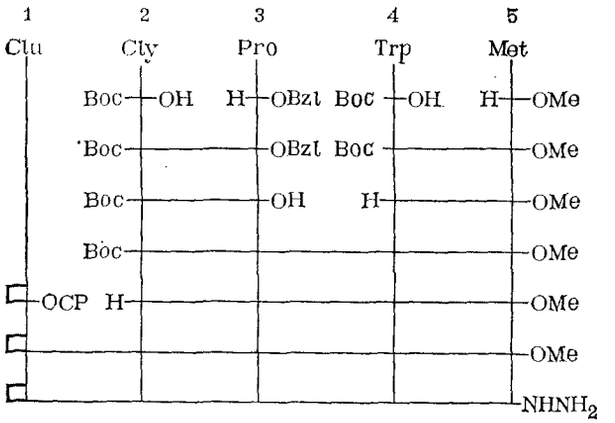
Позднее был предложен другой синтез [116, 117] {схема (60)}, включавший конденсацию фрагментов 2 + 2, что также приводит к амиду цвиттерионного тетрапептида. Последующее открытие отщепления о-нитрофенилсульфенильной группы в некислой среде простым образом разрешило эту проблему, и тиолиз тетрапептидного производного (**118**) проложил путь к синтезу амида тетрапептида с защищенным боковым радикалом [117] {схема (61)}:

Несмотря на наличие трудносинтезируемой последовательности Trp-Met, присутствие в *N*-терминальном фрагменте остатков глицина и пролина обеспечивает значительную гибкость в синтетическом подходе. Первый синтез [116] включал непосредственную




(**118**) (61)

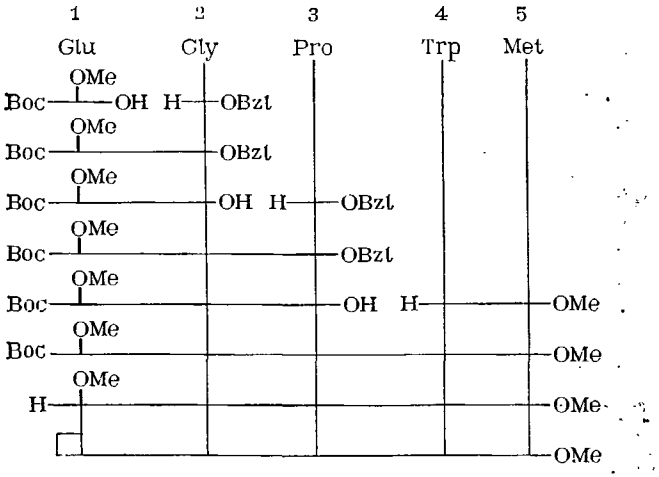
конденсацию фрагментов 2 + 2 с последующим добавлением *N*-концевого пироглутамильного остатка {схема (62)}. Поскольку аминогруппа этого остатка внутримолекулярно ацилирована, защитные группы не нужны. В другом синтезе {схема (63)} [117] этот остаток получали на последней стадии путем циклизации *N*-концевого γ-метилглутамата.



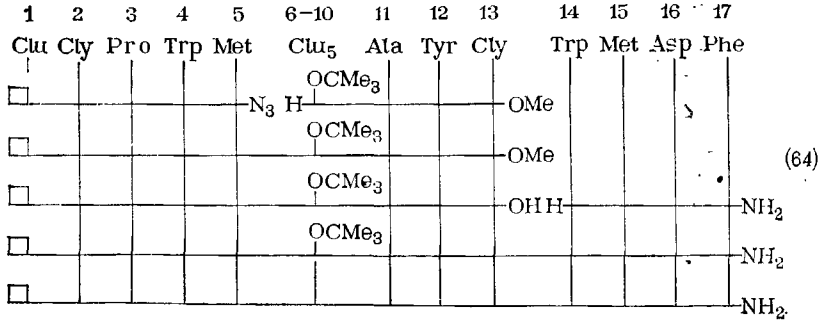

(62)

Для завершающего соединения *N*-концевого, центрального и С-концевого фрагментов было исследовано несколько возможностей [114, 115]. По первому пути {схема (64)} метиловый эфир *N*-концевого пентапептида превращали в соответствующий гидразид, затем в азид и конденсировали с центральным октапептидом. Реакция шла медленно из-за возрастающих пространственных затруднений, создаваемых *N*-концевой *трет*-бутильной сложноэфирной группировкой центрального пептида по мере его превращения,

и значительная часть азидной компоненты претерпевала конкурентную мономолекулярную перегруппировку Курциуса (см. разд. 23.6.3.4).

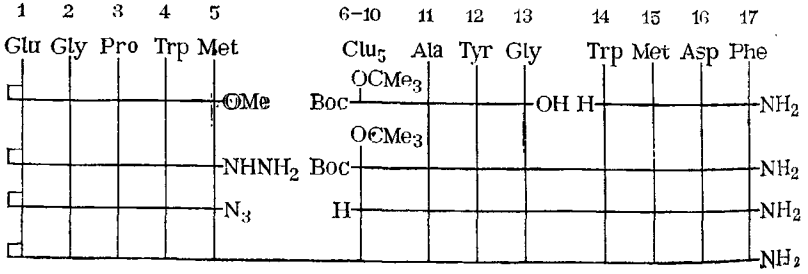



(63)




(64)

Поэтому был предложен другой путь {нижняя схема}, по которому *N-трет*-бутоксикарбонилоктапептид вначале омыляли и с использованием метода смешанных ангидридов вводили в реакцию с *C*-концевым фрагментом. Затем с полученного додекапептида были




сняты все защитные группы, и последующая конденсация азида *N*-концевого пентапептида протекала в этом случае быстрее и более гладко, не приводя к продуктам перегруппировки Курциуса.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Сокращения и номенклатура следуют рекомендациям I. U. P. A. C.-I. U. B. Commission on Biochemical Nomenclature, in «Amino-Acids, Peptides, and Proteins», Specialist Periodical Reports of the Chemical Society, London, vols. 2, 4, 5, 8 и другие публикации.

2а. *M. Bodanszky, Y. S. Klausner, and M. A. Ondetti*, «Peptide Synthesis», Wiley, New York, 2nd Edn., 1976.

2б. *F. M. Finn and K. Hofmann*, in «The Proteins», ed. H. Neurath, R. L. Hill, and C.-L. Boeder, Academic Press, New York, 3rd edn., 1976, p. 106.

2в. «Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)», Vol. XXV/1, 2, «Synthese von Peptiden», ed E. Wunsch, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.

2г. «Amino-Acids, Peptides, and Proteins», Specialist Periodical Reports of the Chemical Society, London.

3. *G. T. Young*, in «Peptides», Proceedings of the 8th European Peptide Symposium, Noordwijk, Holland, 1966, North Holland, Amsterdam, 1967, p. 55.

4. *S. Goldschmidt*, Angew. Chem., 1950, **62**, 538; *S. Goldschmidt and M. Wick*, Z. Naturforsch., 1950, **5b**, 170; Ann. Chem., 1952, **575**, 217.

5. *W. Dieckmann and F. Breest*, Ber., 1906, **39**, 3052; *H. Staudinger*, Helv. Chim. Acta, 1922, **5**, 87; *C. Naegeli and A. Tyabji*, ibid., 1934, **17**, 931; ibid., 1935, **18**, 142.

6. *S. Goldschmidt and H. Lautenschlager*, Ann Chem., 1953, **580**, 68.

6а. *M. Bergmann and L. Zervas*, Ber., 1932, **65**, 1192.

6б. *R. A. Boissonnas and G. Preitner*, Helv. Chim. Acta, 1953, **36**, 875; *L. Kisfaludy and S. Bualszky*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 1960, **24**, 301.

6в. *F. H. Carpenter and D. T. Gish*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 3818; *D. T. Gish and F. H. Carpenter*, ibid., 1953, **75**, 950.

6г. *R. Schwyzer, P. Sieber, and K. Zatsko*, Helv. Chim. Acta, 1958, **41**, 491.

6д. *F. C. McKay and N. F. Albertson*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 4686; *F. Weygand and K. Hunger*, Chem. Ber., 1962, **95**, 1.

6е. *J. W. Chamberlin*, J. Org. Chem., 1966, **31**, 1658.

6ж. *L. A. Carpino*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 98; *F. C. McKay and N. F. Albertson*, ibid., 1957, **79**, 4686; *G. W. Anderson and A. C. McGregor*, ibid., 1957, **79**, 6180.

6з. *S. Sakakibara, M. Shin, M. Fujino, Y. Shimonishi, S. Inouye, and N. Inukai*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1965, **38**, 1522; *S. Sakakibara and M. Fujino*, ibid., 1966, **39**, 947; *S. Sakakibara and M. Itoh*, ibid., 1967, **40**, 646; *I. Honda, Y. Shimonishi, and S. Sakakibara*, ibid., 1967, **40**, 2415; *S. Sakakibara, J. Honda, and K. Takada*, ibid., 1969, **42**, 809

6и. *W. L. Haas, E. V. Krumkalns, and K. Gerzon*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 1988.

6к. *G. Jäger and R. Geiger*, in «Peptides» Proceedings of the Eleventh European Peptide Symposium, Vienna, 1971, ed. H. Nesvadba, North-Holland, Amsterdam, 1973, p. 78; *G. Jäger and R. Geiger*, Annalen, 1973, 1535; *M. Fujino, S. Shinagawa, O. Nishimura, and T. Fukuda*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1972, **20**, 1017.

6л. *P. Sieber and B. Iselin*, Helv. Chim. Acta, 1968, **51**, 614, 622; *S. S. Wang and R. B. Merrifield*, Internat. J. Protein Res., 1969, **1**, 235; *R. S. Feinberg and R. B. Merrifield*, Tetrahedron, 1972, **28**, 5865; *E. Schnabel, G. Schmidt, and E. Klauke*, Annalen, 1971, **743**, 69.

6м. *C. Birr, F. Flor, P. Fleckenstein, and Th. Wieland*, in «Peptides», Proceedings of Eleventh European Peptide Symposium, Vienna, 1971, ed. H. Nesvadba, North-Holland, Amsterdam, 1973, p. 175; *C. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke, and P. Lang*, Annalen, 1972, **763**, 162; *C. Birr*, Ibid., 1973, **1652**.

6н. *D. F. Veber, S. F. Brady, and R. Hirschmann*, in «Chemistry and Biology of Peptides», Proceedings of the Third American Peptide Symposium, Boston, 1972, Ann Arbor Science Publishing, Ann Arbor, Mich., 1972, p. 315; *R. Hirschmann and D. F. Veber*, in «The Chemistry of Polypeptides», ed. P. G. Katsoyannis, Plenum Press, New York, 1973, p. 125.
6о. *D. S. Kemp and D. C. Roberts*, Tetrahedron Letters, 1975, 4629.
6п. *D. S. Kemp and C. F. Hoyng*, Tetrahedron Letters, 1975, 4625.
6р. *G. I. Tesser*, in «Peptides», Proceedings of the Thirteenth European Peptide Symposium, Kiryat Anavim, Israel, 1974, ed. Y. Wolman, Wiley, New York — Israel University Press, Jerusalem, 1975, p. 53; *G. I. Tesser and I. C. Balvert-Geers, Internat.* J. Peptide Protein Res., 1975, **7**, 295.
6с. *L. A. Carpino and G. Y. Han*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 5748; J. Org. Chem., 1972, **37**, 3404.
6т. *R. B. Woodward, K. Heusler, H. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, and H. Vorbruggen*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 852; *T. B. Windholz and D. B. R. Johnston*, Tetrahedron Letters, 1967, 2555; *H. Yajima, H. Watanabe, and M. Okamoto*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1971, **19**, 2185.
7. *M. Bergmann and L. Zervas*, Ber., 1932, **65**, 1192.
8. *M. Bergmann, L. Zervas, and W. F. Ross*, J. Biol. Chem., 1935, **111**, 245; см. также *H. Leuchs*, Ber., 1906, **39**, 857; *H. Leuchs, and W. Manasse*, ibid., 1907, **40**, 3225; *H. Leuchs and W. Geiger*, ibid., 1908, **41**, 1721.
9. *J. Meienhofer and K. Kuromizu*, Tetrahedron Letters, 1974, 3259; *K. Kuromizu, and J. Meienhofer*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 4978.
10. *R. H. Sifferd and V. du Vigneaud*, J. Biol. Chem., 1935, **108**, 753; *H. S. Loring and V. du Vigneaud*, ibid., 1935, **111**, 385.
11. *D. Ben-Ishai and A. Berger*, J. Org. Chem., 1952, **17**, 1564; D. Ben-Ishai, ibid., 1954, **19**, 62; *G. W. Anderson, J. Blodinger, and A. D. Welcher*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 5309; *R. A. Boissonnas and I. Shumann*, Helv. Chim. Acta, 1952, 35, 2229.
12. *S. Sakakibara and Y. Shimonishi*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1965, **38**, 1412; *S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara*, ibid., 1967, **40**, 2164.
13. *L. A. Carpino*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 98; *F. C. McKay and N. F. Albertson*, ibid., 1957, **79**, 4686; *G. W. Anderson and A. C. McGregor*, ibid. 1957, **79**, 6180.
14. *R. Schnabel, P. Sieber, and H. Kappeler*, Helv. Chim. Acta, 1959, **42**, 2622.
15. Chem. Eng. News, 1976, **54**, 3.
16. *G. W. Anderson and A. C. McGregor*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 6180.
17. *W. Broadbent, J. S. Morley, and B. E. Stone*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 2632.
18. *E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, E. Klauke, and I. Ugi*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1968, **7**, 380; Annalen, 1968, **716**, 175; *E. Schnabel, J. Stoltefuss, H. A. Offe, and E. Klauke*, ibid., 1971, 743, 57.
19. *L. Moroder, A. Hallett, E. Wunsch, O. Keller, and G. Wersin*, Z. Physiol. Chem., 1976, **357**, 1651.
20. *P. Sieber and B. Iselin*, Helv. Chim. Acta, 1968, **51**, 614, 622.
21. *C. Birr, F. Flor, P. Eleckenstein, and Th. Wieland*, in «Peptides 1971», Proceedings of the 11th European Peptide Symposium, Vienna, 1971, ed. H. Nesvadba, North-Holland, Amsterdam, 1973, p. 175; *C. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke, and P. Lang*, Annalen, 1972, **763**, 162; *C. Birr*, ibid., 1973, 1652.
22. *G. I. Tesser*, in «Peptides». Proceedings of the 13th European Peptide Symposium, Kiryat Anavim, Israel, 1974, ed. Y. Wolman, Wiley, New York, — Israel University Press, Jerusalem, 1975, p. 53; *G. I. Tesser and I. C. Balvert-Geers*, Internat. J. Peptide Protein Res., 1975, **7**, 295.
23. *L. A. Carpino and G. Y. Han*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 5748; J. Org. Chem., 1972. 37, 3404.
24. *D. S. Kemp and D. C. Roberts*, Tetrahedron Letters, 1975, 4629.
25. *D. S. Kemp and C. F. Hoyng*, Tetrahedron Letters, 1975, 4625.
26. *D. F. Veber, S. F. Brady and R. Hirschmann*, in «Chemistry and Biology of Peptides», Proceedings of the Third American Peptide Symposium, Boston 1972, Ann Arbor Science Publishing, Ann Arbor, Michigan, 1972, p. 315; *R. Hirschmann and D. F. Veber*, in «The Chemistry of Polypeptides», ed. P. G. Katsoyannis, Plenum. New York, 1973, p. 125.
27. *S. Coyle, O. Keller, and G. T. Young*. J. C. S. Chem. Comm., 1975, 939, *R. Camble, R. Garner, and G. T. Young*, Nature, 1967, **217**, 247; *R. Camble, R. Garner, and G. T. Young*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 1911.
28. *A. Hillmann-Elies, G. Hillmann, and H. Jatzkiewitz*, Z. Naturforsch., 1953, **8b**, 445; *G. Amiard, R. Heymes, and L. Velluz*, Bull. Soc. chim. France, 1955, 191, 201, 1464, ibid., 1956, 97, 698; *L. Zervas and D. M. Theodoropoulos*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, 87, 1359.
28а. *A. Hillmann-Elies, G. Hillmann, and H. Jatzkewitz*, Z. Naturforsch., 1953, **8b**, 445; *G. Amiard, R. Heymes, and L Velluz*, Bull. Soc. chim. France, 1955, 191, 201, 1464; ibid., 1956, **97**, 698; *L. Zervas and D. M. Theodoropoulos*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 1359.
28б. *L. Zervas, D. Borovas, and E. Cazis*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 3660; см. также *L. Zervas and C. Hamalidis*, ibid., 1965, **78**, 99; *J. Goerdeler and A. Holst*, Angew. Chem., 1959, **71**, 775.
28в. *V. du Vigneaud, R. Dorfmann, and H. S. Loring*, J. Biol. Chem., 1932, **98**, 577; *J. S. Fruton and H. T. Clarke*, ibid., 1934, **106**, 667; *A. Stoll and Th. Petrzilka*, Helv. Chim Acta, 1952, **35**, 589; см. также: *J. C. Sheehan, D. W. Chapman, and R. W. Roth*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 3822.
28г. *A. Fontana and E. Scoffone*, Gazzetta, 1968, **98**, 1261; *C. Toniolo and A. Fontana*, ibid., 1969, **99**, 1017; *M. Masaki, T. Kitahara, H. Kurita, and M. Ohta*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 4508.
28д. *F. Weygand and E. Csendes*, Angew. Chem. 1952, **64**, 136; *F. Weygand*, Chem.-Ztg., 1954, **78**, 480.
28е. *D. A. A. Kidd and F. E. King*, Nature, 1948, **162**, 776; J. Chem. Soc., 1949, 3315, *J. C. Sheehan and V. S. Frank*, J. Amer. Chem. Soc. 1949, **71**, 1856; *W. Grassmann and E. Schulte-Uebbing*, Chem. Ber., 1950, **83**, 244; *G. H. L. Nefkens*, Nature, 1960, **185**, 309; *G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser, and R. J. F. Nivard*, Rec. Trav. chim, 1960, **79**, 688.
28ж. *F. D'Angeli, F. Filira, and E. Scoffone*, Tetrahedron Letters, 1965, 605; *C. Di Bello, F. Filira, V. Giormani, and F. D'Angeli*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 350; *C. Di Bello, F. Filira, and F. D'Angeli*, J. Org. Chem., 1971, **36**, 1818.
29 *L. Zervas, D. Borovas, and E. Gazis*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 3660; *L. Zervas and C. Hamalidis*, ibid., 1965, **87**, 99; *J. Goerdeler and A. Holst*, Angew. Chem., 1959, **71**, 775.
30. *V. du Vigneaud, R. Dorfmann, and H. S. Loring*, J. Biol. Chem., 1932, **98**, 577; *J. S. Fruton and H. T. Clarke*, ibid., 1934, **106**, 667; *A. Stoll and Th. Petrzilka*, Helv. Chim. Acta, 1952, **35**, 589; *J. C. Sheehan, D. W. Chapman, and R. W. Roth*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 3822.
31. *F. Weygand and E. Csendes*, Angew. Chem., 1952, **64**, 136; *F. Weygand*, Chem.-Ztg., 1954, **78**, 480.
32. *D. A. A. Kidd and F. E. King*, Nature, 1948, **162**, 776; J. Chem. Soc., 1949, 3315; *J. C. Sheehan and V. S. Frank*, J. Amer. Chem. Soc., 1949, **71**, 1856; *W. Grassmann and E. Schulte-Uebbing*, Chem. Ber., 1950, **83**, 244.
33. *G. H. L. Nefkens, Nature*, 1960, **185**, 309; *G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser, and R. J. F. Nivard*, Rec. Trav. chim., 1960, **79**, 688.
34. *G. W. Kenner and J. H. Seely*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 3259.
35. *J. S. A. Amaral, G. C. Barrett, N. H. Rydon, and J. E. Willett*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 807; *P. M. Hardy, H. N. Rydon, and R. C. Thompson*, Tetrahedron Letters, 1968, 2525.
36. *D. S. Kemp and J. Reczek*, Tetrahedron Letters, 1977, 1031.
37. *K. Hofmann, M. Z. Magee, and A. Lindenmann*, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 2814: *K. Hofmann, A. Lindenmann, M. Z. Magee, and N. H. Khan*, ibid., 1952, **74**, 470.
38. *R. A. Boissonnas, St. Guttman, and P. A. Laquenoud*, Helv. Chim. Acta, **1960**, **43**, 1349; *R. Schwyzer, E. Surbeck-Wegman, and H. Dietrich*, Chimia (Aarau), 1960, **14**, 366.
39. *E. Klieger and H. Gibian*, Annalen, 1962, **655**, 195.

40. *M. Itoh*, Chem. Pharm. Bull. (Japan), 1969, **17**, 1679.
41. *K. Hofmann, A. Rheiner, and W. D. Peckham*, J. Amer. Chem. Soc., 1953, **75**, 6083; *K. Hofmann, W. D. Peckham, and A. Rheiner*, ibid., 1956, **78**, 238; *H. O. Van Orden and E. L. Smith*, J. Biol. Chem., 1954, **208**, 751.
42. *L. Zervas, M. Winitz, and J. P. Greenstein*, Arch. Biochem. Biophys., 1956, **65**, 573; J. Org. Chem., 1957, **22**, 1515; J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 3300; *G. Losse and C. Rueger*, Z. Chem., 1973, **13**, 344; *E. Wunsch and G. Wendlberger*, Chem. Ber., 1967, **100**, 160.
43. *G. Jager and R. Geiger*, Chem. Ber., 1970, **103**, 1727.
44. *E. Schnabel and C. H. Li*, J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 457.
45. *J. R. Ramachandran and C. H. Li*, J. Org. Chem., 1962, **27**, 4006.
46. *D. Yamashiro, J. Blake, and C. H. Li*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 2855.
47. *D. Yamashiro and C. H. Li*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 1310.
48. *J. R. Beil and J. H. Jones*, J. C. S. Perkin I, 1974, 2336.
49. *V. du Vigneaud and O. K. Behrens*, J. Biol. Chem., 1937, **117**, 27.
50. *S. Shaltiel and M. Fridkin*, Biochemistry, 1970, **9**, 5122.
51. *T. Fujii and S. Sakakibara*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1974, **47**, 3416.
52. *F. Weygand, W. Steglich, and P. Pietta*, Chem. Ber., 1967, **100**, 3841.
53. *R. H. Sifferd and V. du Vigneaud*, J. Biol. Chem., 1935, **108**, 753; *H. S. Loring and V. du Vigneaud*, ibid., 1935, **111**, 385.
54. *S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi, and Y. Nobuhara*, Bull. Chem. Soc. Japan, 1964, **37**, 433.
55. *D. Yamashiro, R. L. Noble, and C. H. Li*, in «Chemistry and Biology of Peptides», Proceedings of the Thierd American Peptide Symposium, Boston, 1972, Ann Arbor Science Publishing, Ann Arbor, Michigan 1972, p. 197; *D. Yamashiro and C. H. Li*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 1310; *D. Yamashiro, R. L. Noble, and C. H. Li*, J. Org. Chem., 1973, **38**, 3561.
56. *L. Zevas and I. Photaki*, Chimia, 1960, **14**, 375; *R. G. Hiskey and J. B. Adams, Jr.*, J. Org. Chem., 1965, **30**, 1340; *R. W. Hanson and H. D. Law*, J. Chem. Soc., 1965, 7285; *I. Photaki, I. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis, and L. Zervas*, J. Chem. Soc. (C), 1970, 2683.
57. *G. Amiard, R. Heymes, and L. Velluz*, Bull. Soc. chim. France, 1956, 698.
58. *D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkewalter, and R. Hirschmann*, Tetrahedron Letters, 1968, 3017; *D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. Varga, R. G. Denkewalter, and R. Hirschmann*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 5456.
59. *P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Johl, B. Rimtker, and W. Rittel*, Helv. Chim. Acta, 1977, **60**, 27.
60. *H. Zahn and G. Schmidt*, Annalen, 1970, **731**, 91, 101.
61. *B. W. Erickson and R. B. Merrifield*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 3750.
62. *J. C. Sheehan and G. P. Hess*, J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 1067.
63. *J. Rebek*, «Peptides 1974», Proceedings of the 13th European Peptide Symposium, Israel, 1974, ed. Y. Wolman. Wiley New York, 1975, p. 27.
64. *M. C. Khosla, M. M. Hall, R. R. Smeby, and F. M. Bumpus*, J. Medicin. Chem., 1974, **17**, 431.
65. *G. W. Anderson and F. Callahan*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 2902.
66. *M. W. Williams and G. T. Young*, J. Chem. Soc., 1963, 881.
67. *W. Konig and R. Geiger*, Chem. Ber., 1970, **103**, 788, 2024, 2034, 2041.
68. *F. Weygand, D. Hoffmann, and E. Wünsch*, Z. Naturforsch., 1966, **21b**, 426.
69. *G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 1839.
70. *G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 178.
71. *R. Schwyzer*, Helv. Chim. Acta, 1954, **37**, 647; *R. Schwyzer, B. Iselin, and M. Feurer*, ibid., 1955, **38**, 69; *R. Schwyzer, M. Feurer, B. Iselin, and H. Kagi*, ibid., 1955, **38**, 80.
72. *M. Bodanszky*, Nature, 1955, **175**, 685; Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 1957, **10**, 335; *M. Bodanszky, M. Szelke, E. Tomorkeny, and E. Weisz*, Chem. Ind. (London), 1955, 1517; Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 1957, **11**, 179; *Th. Wieland and F. Jaenicke*, Annalen, 1956, **599**, 125.



73. *J. A. Farrington, G. W. Kenner, and J. M. Turner*, Chem. Ind. (London), 1955, 601; *J. A. Farrington, P. J. Hextall, G. W. Kenner, and J. M. Turner*, J. Chem. Soc., 1957, 1407; *G. W. Kenner, P. J. Thomson, and J. M. Turner*, ibid., 1958, 4148.
74. *Th. Wieland, W. Schafer, and E. Bokelmann*, Annalen, 1951, **573**, 99.
75. *J. Pless and R. A. Boissonnas*, Helv. Chim. Acta, 1963, **46**, 1609.
76. *M. Rothe and F. W. Kunitz*, Annalen, 1957, **609**, 88; *D. F. Elliott and D. W. Russell*, Biochem. J., 1957, **66**, 49 p.
77. *B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber, and R. Schwyzer*, Helv. Chim. Acta, 1957, **40**, 373.
78. *J. A. Farrington, G. W. Kenner, and J. M. Turner*, Chem. Ind. (London), 1955, 601; *J. A. Farrington, P. J. Hextall, G. W. Kenner, and J. M. Turner*, J. Chem. Soc., 1957, 1407; *G. W. Kenner, P. J. Thomson, and J. M. Turner*, ibid., 1958, 4148
79. *G. Kupryszewski, and M. Formela*, Roczniki Chem., 1963, **37**, 161; *J. Kovacs and A. Kapoor*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 118; *J. Kovacs, G. N. Schmit, and U. R. Ghatak*, Biopolymers, 1968, **6**, 817; *J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini, and R. H. Johnson*, Tetrahedron, 1969, **25**, 2555.
80. *L. Kisfaludy, J. E. Roberts, R. H. Johnson, G. L. Mayers, and J. Kovacs*, J. Org. Chem., 1970, **35**, 3563; *J. Kovacs, L. Kisfaludy, and M. Q. Ceprini*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 183; *L. Kisfaludy, M. Low, O. Nyeki, T. Sztrtes, and I. Schon*, Annalen, 1973, 1421.
81. *J. H. Jones and G. T. Young*, J. Chem. Soc. (C), 1968, 436.
82. *H. D. Jakubke*, Z. Naturforsch, 1965, **20b**, 273; *H. D. Jakubke*, Z. Chem., 1965, **5**, 453.
83. *F. Weygand, P. Huber, and K Weiss*, Z. Naturforsch., 1967, **22b**, 1084; *F. Weygand and C. DiBello*, ibid., 1969, **24b**, 314; *Th. Wieland, C. Birr, and F. Flor*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1971, **10**, 336; *Th. Wieland, F. Flor, and C. Birr*, Annalen, 1973, 1595; *F. Flor, C. Birr, and Th. Wieland*, ibid., 1973, 1601.
84. *M. Zaoral*, Coll. Czeh. Chem. Comm., 1962, **27**, 1273.
85. *Th. Wieland and H. Bernhard*, Annalen, 1951, **572**, 190; *R. A. Boissonnas*, Helv. Chim. Acta, 1951, **34**, 874; *J. R. Vaughan, Jr., and R. L. Osato*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 676.
86. *G. W. Kenner and R. J. Stedman*, J. Chem. Soc., 1952, 2069; *D. W. Clayton, J. A. Farrington, G. W. Kenner, and J. M. Turner*, ibid., 1957, 1398.
87. *R. G. Denkewalter, H. Schwam, R. G. Strachan, T. E. Beesley, D. F. Veber, E. F. Schoenewaldt, H. Barkemeyer, W. J. Paleveda, Jr., T. A. Jacob, and R. Hirschmann*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 3163; *R. Hirschmann, R. G. Strachan, H. Schwam, E. F. Schoenewaldt, H. Joshua, H. Barkemeyer, D. F. Veber, W. J. Paleveda, Jr., T. A. Jacob, T. E. Beesley, and R. G. Denkewalter*, J. Org. Chem., 1967, **32**, 3415; *R. Hirschmann*, Intra-Sci. Chem. Reports, 1971, **5**, 204.
88. *H. Hagenmaier and H. Frank*, Z. physiol. Chem., 1972, 353, 1973.
89. *J. R. Vaughan, Jr., and R. L. Osato*, J. Amer. Chem. Soc., 1951, **73**, 5553.
90. *M. A. Tilak*, Tetrahedron Letters, 1970, 849; *R. Sarges and B. Witkop*, J. Amer. Chem. Soc, 1965, **87**, 2020; *A. van Zon, and H. C. Beyerman*, Helv. Chim. Acta, 1973, **56**, 1729.
91. *H. Chantrenne*, Nature, 1947, **160**, 603; 1949, **164**, 576; Biochim. Biophys. Acta, 1948, **2**, 286; 1950, **4**, 484.
92. *J. C. Scheehan and V. S. Frank*, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 1312.
93. *G. W. Anderson, J. Blodinger, R. W. Young, and A. D. Welcher*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 5304; *G. W. Anderson and R. W. Young*, ibid., 1952, **74**, 5307; *G. W. Anderson, J. Blodinger, and A. D. Welcher*, ibid., 1952, **74**, 5309.
94. *A. G. Jackson, G. W. Kenner, G. A. Moore, R. Ramage, and W. D. Thorpe*, Tetrahedron Letters, 1976, 3627.
95. *H. Leuchs*, Ber., 1906, **39**, 857; *H. Leuchs, and W. Geiger*, ibid., 1908, **41**, 1721.

96. *F. Fuchs*, Ber., 1922, **55**, 2943; *C. J. Brown, D. Coleman, and A. C. Farthing*, Nature, 1949, **163**, 834; *V. Bruckner, T. Vajda, and J. Kovacs*, Naturwiss., 1954, **41**, 449.
97. *E. Katchalski*, Adv. Protein Chem., 1951, **6**, 123.
98. *Y. S. Klausner and M. Bodanszky*, Synthesis, 1974, 549.
99. *Y. S. Klausner and M. Bodanszky*, *Synthesis*, 1974, 549.
100. *K. Hofmann, M. Z. Magee, and A. Lindenmann*, J. Amer. Chem. Soc., 1950, **72**, 2814; *K. Hofmann, A. Lindenmann, M. Z. Magee, and N. H. Khan*, ibid., 1952, **74**, 470; H. Boshagen and J. Ulrich, Chem. Ber., 1959, **92**, 1478.
101. *R. B. Woodward and R. A. Olofson*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 1007; *R. B. Woodward, and R. A. Olofson*, Tetrahedron suppl., 1966, No. 7, 415; *R. B. Woodward, R. A. Olofson, and H. Mayer*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 1010; *R. B. Woodward, R. A. Olofson, and H. Mayer*, Tetrahedron Suppl., 1966, No. 8, Part 1, 321.
102. *D. S. Kemp and S. W. Chien*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 2743.
103. *B. Belleau and G. Malek*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 1651.
104. *T. Mukayama*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1976, **15**, 94.
105. *A. J. Bates, I. J. Galpin, A. Hallett, D. Hudson, G. W. Kenner, R. Ramage, and R. C. Sheppard*, Helv. Chim. Acta, 1975, **58**, 688.
106. *B. W. Erickson and R. B. Merrifield*, in «The Proteins», ed. H. Neurath, R. L. Hill, and C.-L. Boeder, Academic Press, New York, 1976, vol. 3, p. 257; *J. Meienhofer*, in «Hormonal Proteins and Peptides», ed. C. H. Li, Academic Press, New York, 1973, p. 46.
107. *R. B. Merrifield*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 2149.
108. *E. Atherton, D. L. J. Clive, and R. C. Sheppard*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 6584.
109. *B. Gutte and R. B. Merrifield*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 1922.
110. *M. Bodanszky, Y. S. Klausner, and M. A. Ondetti*, in «Peptide Synthesis», Wiley, New York, 2nd edn., 1976, p. 177.
111. *M. Bodanszky, M. A. Ondetti, S. D. Levine, and N. J. Williams*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 6753.
112. *G. W. Kenner and J. H. Seely*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 3259.
113. *S. Natarajan and M. Bodanszky*, J. Org. Chem., 1976, **41**, 1269.
114. *J. C. Anderson, M. A. Barton, R. A. Gregory, P. M. Hardy, G. W. Kenner, J. K. MacLeod, J. Preston, R. C. Sheppard, and J. S. Morley*, Nature, 1964, **204**, 933.
115. *J. C. Anderson, G. W. Kenner, J. K. MacLeod, and R. C. Sheppard*, Tetrahedron Suppl., 1966, No. 8, 39.
116. *J. C. Anderson, M. A. Barton, P. M. Hardy, G. W. Kenner, J. Preston, and R. C. Sheppard*, J. Chem. Soc. (C), 1967, 108.
117. *J. M. Davey, A. H. Laird, and J. S. Morley*, J. Chem. Soc. (C), 1966, 555.


## 23.7. КОНФОРМАЦИИ ПОЛИПЕПТИДОВ


*Дж. С. Баррет (Oxford Polytechnic)*


### 23.7.1. ВВЕДЕНИЕ И НОМЕНКЛАТУРА

#### 23.7.1.1. Введение

Обзорные данные по конформационным свойствам полипептидов и методам установления этих свойств позволяют лучше понять фундаментальные свойства ациклических молекул. Хотя понимание конформационного поведения этой группы природных соединений существенно при попытке объяснить их биологическую функцию, в частности взаимодействие олигопептидных гормонов с рецепторами и ферментативный катализ (см. гл. 24.1), этот обзор занимает должное место в этой книге еще и потому, что в нем рассмотрено влияние органических функциональных групп на то, какая конформация ациклических молекул является предпочтительной.



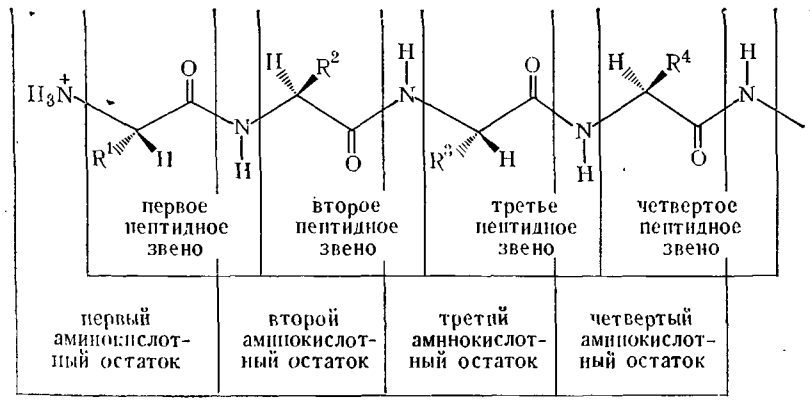



Рис. 23.7.1. Полипептид в растянутой конформации (остатки *L*-аминокислот).

#### 23.7.1.2. Первичные структуры и номенклатура

Структура полипептидов в общем виде (рис. 23.7.1) представляется как ряд линейно связанных между собой остатков аминокислот, ибо эта цепь возникает в результате последовательности конденсации аминокислот и расщепляется при гидролизе, давая аминокислоты. В другом, менее употребительном рассмотрении, цепь представляют как последовательность повторяющихся пептидных звеньев (см. рис. 23.7.1). И, наконец, иной альтернативный подход к изображению пептидной цепи — представление ее в виде «амидных единиц» —CONHCHR$^n$—, не употребляется в литературе, подобно определению «пептидная единица», которое нечетко, поскольку оно не учитывает группировки, находящиеся на каждом конце полипептидной цепи. Эта номенклатура несет в себе дополнительный источник неоднозначности, поскольку первая «амидная единица», например, включает боковой радикал из второго остатка. Поэтому в настоящем разделе принимается термин «аминокислотный остаток».

Принимается также такое расположение полипептидной цепи на странице книги, когда группа $+NH_3$— (*N*-конец) расположена слева, а группа $—CO_2^-$ (*C*-конец) расположена справа. С учетом этого на рис. 23.7.1 изображена полностью растянутая конформация.

#### 23.7.1.3. Обозначение атомов и торзионных углов

Пространственное изображение полипептида, построенного из остатков *L*-аминокислот, с обозначениями атомов и торзионных

углов приведено на рис. 23.7.2. Атомам, образующим полипептидный скелет, присвоены номера, соответствующие номеру аминокислотного остатка в полипептиде, начиная с *N*-конца (*N*-концевого звена). Атомы бокового радикала аминокислотного остатка имеют тот же номер, но обозначены буквами β, γ, δ и т. д. в зависимости от их относительного расположения от карбонильного атома (C′).

Торзионные углы в последовательности атомов —CONHCHRCO— и —NHCHRCONH—, обозначенные соответственно символами $\phi$ и $\psi$, составляют в полностью растянутой конформации 180° (рис. 23.7.2). Для нее торзионный угол ω, характеризующий вращение внутри амидной группировки, также равен 180° (т. е. это *транс*-амидная связь). Таким образом, для описания конформации скелета всей молекулы (т. е. ее вторичной структуры) необходим полный набор торзионных углов $\phi$, $\psi$ и ω для каждого аминокислотного остатка. Соответствующие данные для боковых радикалов (торзионные углы $\chi_1$ с номерами для обозначения связей, к которым относятся эти углы, в соответствии с Правилами последовательности [1]) завершают полное описание третичной структуры полипептида. Торзионные углы имеют знак «+» для связей правовращающей спирали и знак «—» — для левовращающей.

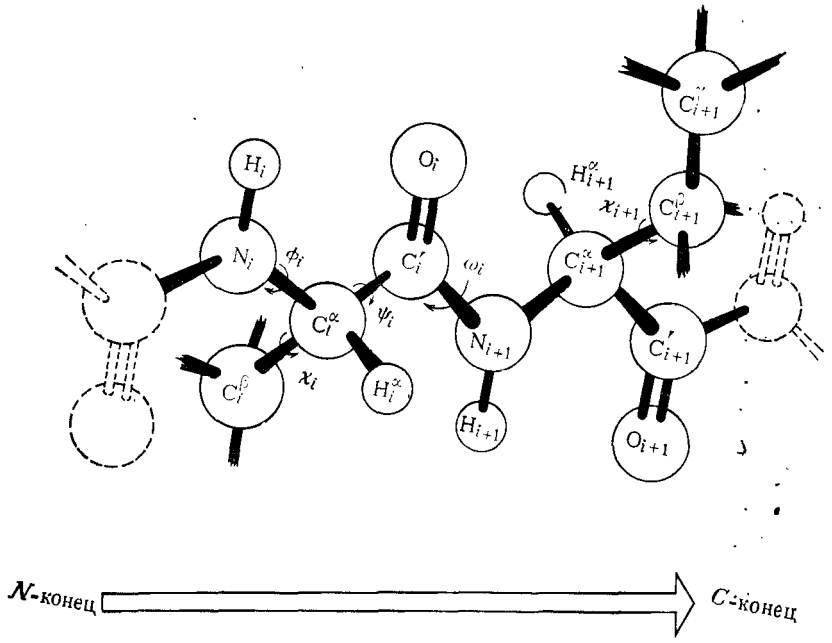



Рис. 23.7.2. Два *L*-аминокислотных остатка в полипептиде. Обозначения атомов и углов.



## 23.7.2. УПОРЯДОЧЕННЫЕ КОНФОРМАЦИИ ПОЛИПЕПТИДОВ

### 23.7.2.1. Общие конформационные свойства полипептидов

Характерной особенностью простейшего типа полипептида (см. рис. 23.7.1) является повторение одной и той же группировки —NHCHCO— по всему скелету молекулы. Такое характерное повторение определяет условие, благоприятствующее принятию молекулой упорядоченной конформации, и если два последующих условия структурной регулярности также выполняются, а именно (а) все хиральные центры имеют одну конфигурацию и (б) все боковые радикалы идентичны либо сходны по строению (например, по полярности) и невелики по размерам, то полипептид принимает одну из двух упорядоченных комформаций — либо спирали, либо плоской структуры, образованной из линейных участков.

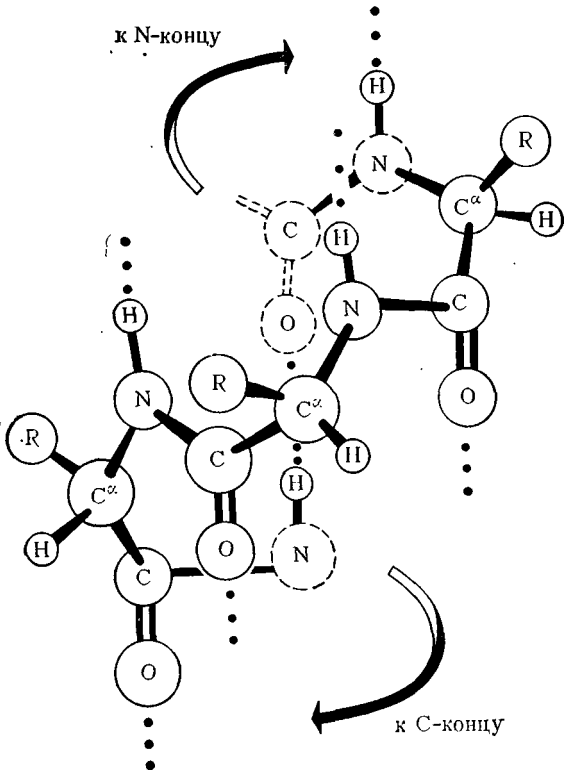



Рис. 23.7.3. Правая α-спираль (остатков *L*-аминокислот).

Некоторые стереорегулярные полиалкены в твердом состоянии также принимают спиральную конформацию [2], однако характерным отличием полипептидов является водородная связь,

возникающая между амидными группами и обеспечивающая упорядоченную конформацию как в твердом состоянии, так и в растворе. В правой α-спирали (рис. 23.7.3) водородная связь возникает между протоном амидной группировки N—H *i*-остатка и карбонильной группой (*i* — 4)-остатка. Примером, где выполняются требования для образования структуры с α-спиралью в растворе, служит поли-*L*-глутаминовая кислота в водном растворе при pH 4,3 [3].

В более общем случае, когда полипептид построен путем ступенчатого наращивания различных остатков аминокислот, влияние различия структуры боковых радикалов обычно сильнее, чем тенденция к принятию упорядоченной конформации, возникающей из-за структурной регулярности скелета молекулы. В общем случае молекула принимает «случайную» или «неупорядоченную» конформацию. Это справедливо и для глобулярных белков, включая ферменты, где молекула в целом не принимает упорядоченной конформации, но тем не менее отдельные участки полипептидной цепи имеют упорядоченную конформацию там, где комплементарные боковые радикалы группируются друг с другом.

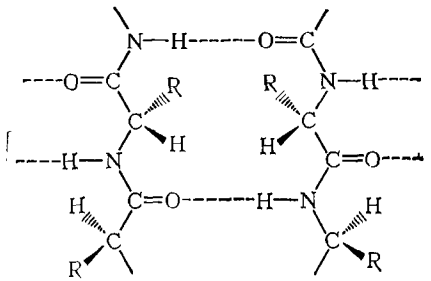


Рис. 23.7.4. Участок антипараллельной β-конформации (остатков *L*-аминокислот).

Например, отдельные участки молекулы инсулина «случайно спиральны» [4], сходно как и участки молекулы феррицитохрома *c* из сердца лошади («незначительно спиральны») [5], тогда как в других местах полипептидная цепь имеет конформацию «шпильки», что связано с образованием элементов β-конформации или «антипараллельных слоев» (рис. 23.7.4).

Имеются также и другие конформационные состояния, которые встречаются достаточно часто, и для них предложены специальные названия. Так, имеются «β-изгибы», или «β-повороты», или «$3_{10}$-изгибы» или «$3_{10}$-спираль», существующие в двух формах — первого и второго рода (рис. 23.7.5), причем второй род отличается от первого противоположным ходом спирали, в которой свернута последовательность атомов в цепи CHRNHCOCHR. Для некоторых полипептидов [6] впервые обнаружено независимое конформационное состояние в виде γ-поворота или 11-членного, связанного водородной связью, цикла (рис. 23.7.6). β-Поворот второго рода

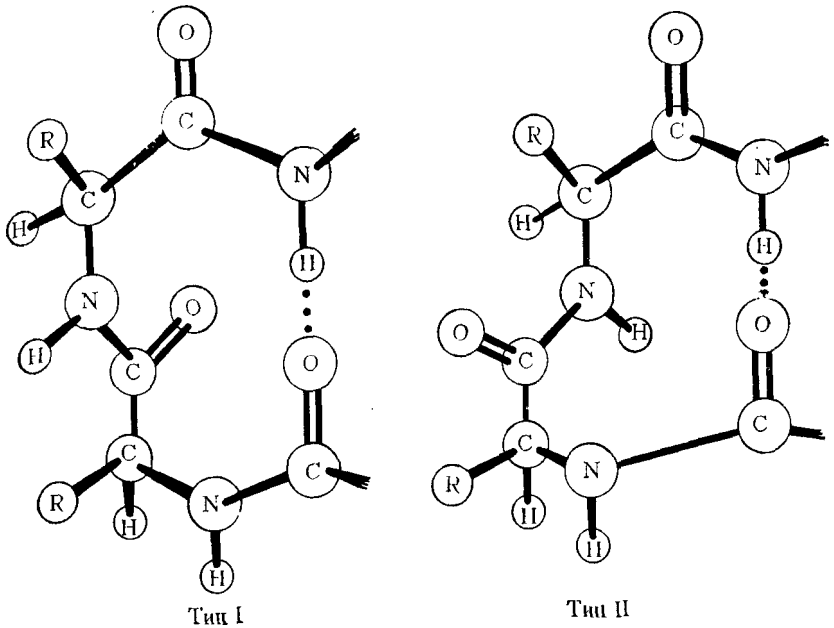



Рис. 23.7.5. β-Изгибы первого и второго рода.

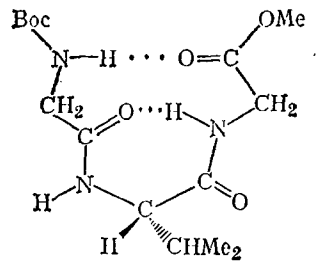


Рис. 23.7.6. γ-Поворот в пептиде Boc-Gly-*L*-Val-Gly-OMe.

встречается в трех участках α-химотрипсина [7], и «случайная спиральность» заканчивающейся карбоксилом половины А-цепи инсулина является следствием этой особенности. Тетрапептиды, содержащие остатки глицина, *L*-пролина и *L*-аспарагиновой кислоты, склонны к образованию этой стабилизованной водородной связью 10-членной конформации [8] в большей степени, чем к альтернативной — 7-членной системе (рис. 23.7.7), существующей в равновесии с небольшой долей неупорядоченной конформации в разбавленных растворах метилового эфира *N*-ацилаланилаланина в тетрахлорметане [9].

Наряду с данными, приводимыми в следующем разделе (краткий обзор конформаций полипептидов с длинной цепью) в последующих разделах приведены заключения о конформациях боль-

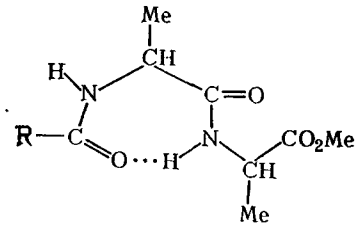


Рис. 23.7.7. Конформация Acyl-Ala-Ala-OMe.

шого числа малых пептидов, олигопептидов и полипептидов, а также обсуждение тех методов, с помощью которых были получены эти результаты.

### 23.7.2.2. Регулярные конформации полипептидов с длинной цепью. Иллюстрирующие примеры

Четкие результаты для большого числа белков, играющих жизненно важную биологическую роль, связанную с их нерастворимостью и механическими свойствами, были получены с помощью дифракции рентгеновских лучей, и эти результаты являются примером раннего использования техники, которая в последующее время была усовершенствована настолько, что с ее помощью были установлены полные структуры ряда кристаллических глобулярных белков. Растянутая или β-форма кератина демонстрирует пример β-слоев как с параллельным, так и с антипараллельным расположением пептидных цепей (см. рис. 23.7.4). Так, в фиброине шелка найдено только параллельное расположение этих цепей с близким к планарному расположением слоев, тогда как в кератине имеет место складчатая структура. Нерастянутая или α-форма кератина является примером α-спирали в ее наиболее компактной форме, в которой пять оборотов правой спирали включают 18 остатков аминокислот — следовательно, система может быть описана как спиральная конформация с шагом в 3,6 остатка. Из рассмотрения молекулярных моделей видно, что предпочтительна правая спиральность, поскольку по сравнению с положением в левой спирали полипептида, образованного из остатков *L*-аминокислот, боковые радикалы в правой спирали располагаются наружу от оси спирали, так что дестабилизирующие отталкивания, затрагивающие, в частности, карбонильные группы, сводятся к минимуму (см. рис. 23.7.3).

Структура коллагена — главного компонента волокон соединительной ткани — представляет собой тройную спираль с тремя пептидными цепями, скрученными по часовой стрелке относительно одной и той же оси (примерно 3,3 остатка аминокислоты на один поворот спирали). Эта необычная и оригинальная структура связана с высоким содержанием в белке глицина, пролина и гидроксипролина (см. следующий раздел).

### 23.7.2.3. Полипептиды, включающие иминокислоты

Среди обычных для белков аминокислот есть и вторичные аминокислоты (т. е. иминокислоты — *L*-пролин и гидрокси-*L*-пролин); кроме того, в некоторых природных пептидах встречаются *N*-метильные производные некоторых простых аминокислот. Два основных следствия замены протона группировки N—H на углерод состоят в том, что, во-первых, такая группировка уже не может принимать участие в водородной связи, стабилизующей конформацию (что делает, например, пролин неспособным к участию в образовании α-спирали) и, во-вторых, придает относительно повышенную устойчивость *цис*-амидной связи в случае третичных амидов.

### 23.7.2.4. Полипептиды, включающие трифункциональные остатки

Аминокислоты, несущие в боковом радикале функциональные группы, могут придавать содержащим их полипептидам необычные конформационные свойства, если находящаяся в боковом радикале функциональная группа конкурирует с амидной группировкой основной цепи в образовании водородной связи. Так, поли(*L*-лизин) [см. рис. 23.7.1, все боковые группы $-(CH_2)_4NH_2$] существует в растворе при pH 11,75 в виде стабильной спирали, более устойчивой, чем образуемая поли(*L*-орнитином) [см. рис. 23.7.1, все боковые группы $-(CH_2)_3NH_2$]. При этих условиях изменение pH раствора до 7 приводит к нарушению упорядоченности («денатурации») [10]. Диполь-дипольные взаимодействия между сложноэфирными группами и амидными группами скелета в поли(β-бензил-*L*-аспартате) способствуют образованию левой спирали, т. е. противоположной той, которую принимают другие, образующие спираль, поли(*L*-аминокислоты). В этом случае наблюдается удивительная зависимость конформации в растворе от растворителя; так переход от хлороформа к триметилфосфату приводит к обращению знака спирали (от левой к правой) [11].

Исследования структурно гомополипептидов, т. е. поли(*L*-аминокислот), дали также информацию о пространственном влиянии боковых групп на склонность определенных остатков в полипептидах участвовать в упорядоченных конформационных состояниях. Так, валин и изолейцин, имеющие объемистые изопропильную и *втор*-бутильную боковые группы соответственно, снижают тенденцию к образованию α-спиральных конформаций на отдельных участках глобулярных белков. Аналогично, аминокислоты с гетероатомом в боковом радикале, например серин, цистеин или треонин,

с трудом включаются в образование спирали. Спирали с наиболее сильными связями образуют поли(*L*-аланин) и поли(*L*-лейцин) (боковые группы — метил и изобутил соответственно), а также поли(γ-алкил-*L*-глутаматы) [12].

Полиглицин и полипролин представляют собой крайние случаи в том смысле, что спирали полиглицина содержат скорее межцепные, водородные связи в α-спирали [13], чем внутримолекулярные. В случае остатков пролина водородная связь вообще невозможна; тем не менее уже структурной и стереохимической регулярности достаточно для образования левой спирали. Эта спираль не является α-спиралью, но она обладает осью симметрии третьего порядка и *транс*-амидными связями (известен поли-*L*-пролин с *цис*-амидными связями). Случай полиглицина поучителен также тем, что здесь видна явная зависимость образования α-спирали от присутствия в боковом радикале групп более объемистых, чем водород.

Поли(*L*-глутаминовая кислота) подобно другим полиаминокислотам, имеющим ионизуемые боковые группы, легко растворима в воде и при значениях pH, достаточно низких, чтобы подавить ионизацию, принимает конформацию α-спирали. Дополнительная спирализация, образующаяся за счет сетки связанных водородными связями γ-карбоксильных групп, еще больше стабилизует структуру. Такой «сверхспирализации» способствует добавление к раствору диоксана или гидроксилсодержащих растворителей.

### 23.7.2.5. Влияние длины цепи олигопептида на принятие упорядоченной конформации

Выбор между упорядоченными конформациями, включающими межмолекулярную или внутримолекулярную водородные связи, обычно решается в пользу олигопептидов, имеющих внутримолекулярную водородную связь в растворе, причем для того, чтобы олигопептид мог принять какую-либо упорядоченную конформацию, обычно в нем должно быть не менее 5—7 остатков аминокислот.

Ранние исследования поли(γ-бензил-*L*-глутамата) показали, что тенденция к образованию α-спирали устанавливается, когда полипептид имеет не менее семи остатков. Олигомеры с более длинной цепью принимают конформации как α-спирали, так и β-формы [14]. Для образования первого витка спирали требуется минимум четыре остатка и последующие исследования показали [15, 16], что Boc-(*L*-аминокислота)$_n$OMe, структурно гомогенные олигопептиды (где Boc = $OCOCMe_3$, *L*-аминокислота = Ala, Ile, Val, Leu, Met, β-OMeAsp, γ-OMeGlu или Lys) в большинстве случаев существуют предпочтительно в виде конформации β-формы, особенно при высоких концентрациях, а также если в растворе присутствует вода. Концевые ацильные и сложноэфирные группировки пептидов были подобраны так, чтобы растворимость пептидов в таких растворителях, как хлороформ, могла возрастать. В результате установлено, что наличие семи остатков аланина, валина или изолейцина благоприятствует образованию β-формы в ряду этих олигопептидов [15—18] в растворе трифторэтана и восьми остатков — для производных β-метиласпартата в хлороформе). Другие производные склонны к образованию α-спирали (семь остатков в случае лейцина и метионина, девять для производных γ-метилглутамата и двенадцать для производных лизина). В целом для соединений этого ряда видна тенденция к предпочтительности α-спиральной конформации при длине цепи, большей отмеченных минимумов [18].

Олигопептиды последовательности H-(*L*-Tyr-*L*-Ala-*L*-Glu)$_n$OH в водных растворах при pH 7,4 находятся в неупорядоченной конформации до тех пор, пока длина цепи не достигает величины $n = 13$. Тогда доля α-спиральной конформации становится значительной.

В этом отношении олигоглицины и олигопролины существенно отличаются от только что описанных олиго(*L*-аминокислот), так как в случае пролина упорядоченность цепи начинается с трех остатков, хотя тогда и не вполне четко выражена. В случае производных глицина упорядоченность прослеживается при числе остатков меньше шести (для водных растворов) [18].

### 23.7.2.6. Конформации диастереомерных пептидов

Дипептид *L,L*-конфигурации существует в растворе в растянутой конформации. Несмотря на правомерность существования стабилизованного внутримолекулярной водородной связью восьмичленного цикла, в этом состоянии при принятии амидной группировкой энергетически выгодной *транс*-конфигурации возникают отталкивающие взаимодействия между двумя боковыми группами. Однако *DL*-диастереомер в оксиде дейтерия принимает более компактную стабилизованную внутримолекулярной водородной связью структуру (рис. 23.7.8а) [20]. Приложение этих принципов к олигопептидам большей длины показывает, что введение остатка *D*-аминокислоты в цепь из остатков *L*-аминокислот изменяет направление растянутой конформации или разрушает упорядоченную конформацию.

### 23.7.2.7. Конформационные взаимопревращения. Денатурация

Превращение конформации α-спирали в β-форму в пленке нерастворимых в воде поли(*L*-аминокислот) может достигаться путем растяжения при испарении. Процесс можно обратить, если пленку растворить в хлороформе (одном из «спиралеогенных» растворителей — тех, которые не являются акцепторами протона из группировки, что необходимо для создания водородной связи) [21]. О влиянии влаги в подобных случаях уже говорилось (см.

разд. 23.7.2.5); она способствует конформационным взаимопревращениям α-спираль—β-форма для водорастворимых поли(*L*-аминокислот). Для поли(*N*-пролина) возможны две спиралеобразные структуры; в одной из них амидные связи имеют *транс*-конфигурацию, в другой — *цис*. Высокое давление способствует переходу в растворе более устойчивого *транс*-изомера в более компактную *цис*-форму [22].

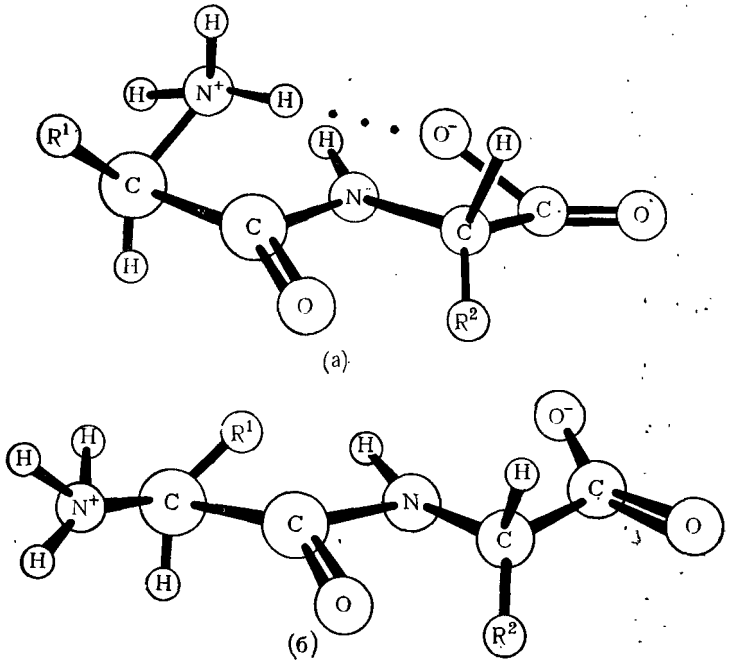



Рис. 23.7.8. Конформации *DL*-дипептида (а) и *LL*-дипептида (б) в $D_2O$.

В применении к олигопептидам взятый из обихода термин «денатурация», означающий для белков разупорядочение их глобулярной конформации, употребителен меньше, чем термин «разупорядочение» или «превращение спирали в неупорядоченные клубки». Имеющие основной или кислый характер боковые радикалы стабилизуют α-спиральные конформации в растворе при тех значениях pH, когда функциональная группа бокового радикала находится в неионизованной форме. Однако изменение pH приводит к потере упорядоченности. Изучение поведения поли(*L*-аминокислот) в спиралегенных растворителях позволило получить точную информацию о влиянии добавок разрушающих водородную связь растворителей (например, галогеноуксусных кислот), так как изменение упорядоченной конформации в сторону неупорядоченности может быть надежно прослежено с помощью спектроскопических



методов (см. разд. 23.7.3). Поли(*L*-аминокислоты), образующие прочные спирали [поли(*L*-аланин) и поли(*L*-лейцин)], сохраняют спиральную конформацию даже в дихлоруксусной кислоте, и для перевода этой спирали в неупорядоченное состояние необходима высокая концентрация трифторуксусной кислоты. В то же время не столь прочная спираль поли(β-бензил-*L*-аспартата) становится беспорядочной при добавлении к раствору в хлороформе 10 %-ного количества дихлоруксусной кислоты. Из этих данных следует полуколичественная информация о «гидрофобном притяжении» между углеводородными боковыми радикалами.

При высокой концентрации мочевины или гидрохлорида гуанидина в водном растворе происходит полная денатурация, которая в ряде случаев обратима после удаления денатурирующего вещества с помощью диализа. Отмеченные денатурирующие агенты находят широкое применение, поскольку можно достичь их высоких концентраций в водных растворах. Неупорядоченность вызывают также некоторые соли [23] и (в ограниченной степени) детергенты, например додецилсульфат [24]. Более широкие обобщения в этой области вряд ли возможны, поскольку для ряда аминокислот с функциональными группами в боковых радикалах наблюдались неожиданности, например, поли(1-бензил-*L*-гистидин) в растворах, содержащих небольшие количества простых минеральных кислот, принимает неупорядоченную конформацию, тогда как в присутствии стехиометрического количества хлорной кислоты он существует в виде α-спирали. Кроме того, сообщалось [26], что присутствие додецилсульфата увеличивает упорядоченность фермента субтилазы, начиная с довольно низкого уровня; удаление детергента диализом приводит к глобулярному белку в предпочтительной β-форме.

### 23.7.2.8. Влияние дисульфидных мостиков на конформации полипептидов

Внутримолекулярное связывание боковых радикалов двух остатков цистеина создает дисульфидный мостик, который обычно способствует упорядоченности конформации. Многие обладающие важными биологическими функциями полипептиды имеют первичную структуру, включающую дисульфидные мостики между остатками цистеина, которые отделены друг от друга в полипептидной цепи несколькими атомами, что приводит к образованию многочленных колец. Влияние дисульфидных мостиков на конформацию полипептидной цепи, находящейся между двумя остатками цистеина, легко видеть по возрастанию неупорядоченности, происходящему при расщеплении дисульфидных групп. Лизоцим после расщепления дисульфидных связей теряет около 50 % своих α-спиральных участков [27], однако расщепление полипептидной цепи в двух точках (по остаткам метионина) приводит к трем пептидным фрагментам, соединенным дисульфидными мостиками и ли-

шенным α-спиральных участков. Эти данные подтверждают мнение, что первичная структура (т. е. последовательность остатков аминокислот) является главным фактором, определяющим третичную структуру, и что дополнительные ковалентные связи, такие как дисульфидные мостики, играют лишь второстепенную роль. Расщепление дисульфидной петли в тирокальцитонине — полипептидном гормоне, содержащем 32 остатка аминокислот, мало влияет на упорядоченность полипептидной цепи: в воде α-спирализация незначительна, тогда как в 2-хлорэтаноле она возрастает примерно до 50 % [28].

### 23.7.3. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНФОРМАЦИЙ ПОЛИПЕПТИДОВ

#### 23.7.3.1. Общие замечания

Ранние данные, указывающие на то, что некоторые белки и поли(аминокислоты) могут принимать упорядоченные конформации в твердом состоянии, были получены с помощью дифракции рентгеновских лучей и метода инфракрасной спектроскопии. Эти физические методы с использованием относительно несложной аппаратуры позволили получить значительную часть важной на первоначальных этапах исследования информации о структуре.

Начиная с шестидесятых годов и вплоть до недавнего времени наиболее распространенными методами в этой области были дисперсия оптического вращения (ДОВ) и спектроскопия кругового дихроизма (КД) наряду с давшими важные результаты рентгеноструктурными исследованиями глобулярных белков (что, однако, дало немного информации о динамических свойствах полипептидов в растворе). Методы ДОВ и КД продолжают поставлять полезную информацию о влиянии физических изменений окружения полипептидов на их конформационное поведение как в растворе, так и (в более позднее время) для белковых мембран в твердом состоянии.

Широта использования метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для изучения конформаций полипептидов приближается или даже превосходит в последнее время ту, что исходит от методов ДОВ и КД, и это связано не только с возрастающей доступностью и усовершенствованием аппаратуры для ЯМР, но также и с тем обстоятельством, что ЯМР позволяет получить особую информацию о торзионных углах.

В данном разделе обсуждаются также и другие физические методы, дающие информацию о конформационных изменениях в полипептидах. Они включают, в частности, технику конформационных зондов, дающую информацию о конформационном поведении отдельных участков молекулы полипептида.



#### 23.7.3.2. Инфракрасные спектры

Колебательные спектры ориентированных пленок полипептидов имеют пик при 1630 $см^{-1}$, что указывает на структуру β-формы; дополнительный пик при 1685—1700 $см^{-1}$ связан с наличием антипараллельной упаковки. И наоборот, в случае α-спирали поглощение амидной полосы I находится при 1650 $см^{-1}$ в случае правой спирали (это несколько более высокая частота, чем в случае левой спирали [29]), хотя в неупорядоченном полипептиде соответствующая полоса расположена достаточно близко (1656 $см^{-1}$). Частоты для амидной полосы I одинаковы как для *цис*-, так и для *транс*-конфигураций, но для других деформационных колебаний имеются различия (*цис*: 1450; 1350 $см^{-1}$, *транс*: 1550, 1250 $см^{-1}$ для амидных полос II и III соответственно). Амидная полоса V характерна для растянутой конформации (700 $см^{-1}$), для α-спирали (620 $см^{-1}$) и для неупорядоченной формы (650 $см^{-1}$), хотя эти величины попадают в ту область ИК-спектров, где имеется много других пиков поглощения.

Инфракрасная спектроскопия менее информативна для изучения конформаций полипептидов в растворе по сравнению с более пригодными для этой цели другими спектроскопическими методами, однако оказалось возможным идентифицировать межмолекулярную водородную связь в пептидных моделях, основываясь на валентных колебаниях N—H. Характеристические частоты 3340 $см^{-1}$ (N—H, включенная в водородную связь) и 3420 $см^{-1}$ (N—H, не участвующая в водородной связи) относятся соответственно к конформациям с внутримолекулярной водородной связью, а частоты 3440 и 3460 $см^{-1}$ — к растянутой конформации N-метиламидов N-ацетиламинокислот [30]. Наличие всех четырех указанных пиков позволяет оценить количество каждого конформера для этих соединений. Для этих пиков, однако, имеются различные отнесения [31].

Амидные полосы I и III для конформации β-слоя, упомянутой выше, также характерны для этой конформации в растворе олигопептидов, и на этой основе произведены конформационные отнесения для олиго(γ-этил-*L*-глутаматов) [32]. В сочетании с данными КД (см. разд. 23.7.3.3) инфракрасные спектры дали информацию об упорядоченных структурах защищенных олигомеров *L*-аланина [15]. Использование Раман-спектроскопии для установления конформаций полипептидов ограничивается поли(*L*-аминокислотами), однако для этой цели могут быть использованы и характеристические частоты амидной полосы I, полученные в водных растворах с использованием лазерной Раман-техники [33].

#### 23.7.3.3. Оптическое вращение и круговой дихроизм

Изменение оптического вращения плоско поляризованного света с изменением длины волны называется дисперсией оптического вращения (ДОВ); тесно связанный с ним метод кругового дихроиз-

ма (КД) основан на зависимости от длины волны света дифференциальной абсорбции хиральной молекулой право- и лево-циркулярнополяризованного света. Поскольку КД наблюдают только в том диапазоне длин волн, где происходит поглощение света хиральными молекулами, что для амида соответствует длине волны менее 230 нм, применение этой техники для полипептидов не было возможно до тех пор, пока не появились приборы, измеряющие дифференциальную абсорбцию в пределах 180—230 нм. Они появились в начале шестидесятых годов, спустя несколько лет после исследований, установивших характеристические параметры ДОВ, что позволило распознавать различные упорядоченные конформации.

Оптическое вращение есть функция длины волны, которая в диапазоне 350—600 нм выражается однотермовым уравнением Друде (1). Для поли(аминокислоты), находящейся в растворе в неупорядоченной конформации, $i = 1$, тогда как для полипептида, существующего в виде α-спирали, уравнение является двухтермовым ($i = 2$). Когда длина волны $\lambda_0$ для определенной поли(аминокислоты) равна 212 нм, константа $b_0$ имеет значение —630 [34]. Используя эти величины, можно подсчитать, какая часть полипептида находится в виде правой спирали, найдя это математическим путем по данным оптического вращения в видимой части спектра. Положительное значение $b_0$ соответствует тем редким случаям, когда поли(аминокислоты) принимают конформацию левой α-спирали в том случае, когда эта величина составляет около 630, однако меньшие ее значения между +200 и —200 соответствуют конформации β-формы.

$$[\alpha] = \sum_i \left( \frac{b_0}{\lambda_i^2 - \lambda_0^2} \right) \qquad (1)$$

Хотя и существуют четкие правила определения различных конформаций полипептидов, они оказываются малопригодными для определения соотношений смешанных конформаций, которые принимают глобулярные белки, например в растворе. Проникнуть в область дальнего ультрафиолета, а именно в область поглощения амидного хромофора, стало возможным только в шестидесятых годах, когда были созданы более усовершенствованные спектрополяриметры, и для основных конформаций оказалось возможным увидеть соответствующие налагающиеся эффекты Коттона.

Спектры кругового дихроизма в целом легче интерпретируемы, так как различные эффекты Коттона могут быть отнесены к соответствующим электронным переходам амидного хромофора. И отсюда, определенные характеристические кривые могут быть отнесены к определенным упорядоченным конформациям, а неупорядоченные формы имеют свой собственный спектр КД. Суммарные данные о различных спектрах КД для поли(*L*-аминокислот) в различных растворителях, представленные в виде максимумов длин

*Таблица 23.7.1. Данные кругового дихроизма для поли(L-аминокислот) [36, 70]*

| Конформация | Для α-спирали | Для β-формы | Для неупорядоченной конф. |
|---|---|---|---|
| Положительные величины КД | Сильный положительный КД ($\varepsilon_{макс}$ 191 нм) | Сильный положительный КД ($\varepsilon_{макс}$ 195 нм) | Слабый положительный КД ($\varepsilon_{макс}$ 195 нм) |
| Нулевой КД | 180, 202, 250 нм | 180, 207, 250 им | 211, 234, 250 нм |
| Отрицательные величины КД | Сильный отрицательный КД ($\varepsilon_{макс}$ 208, 222 нм) | Средний по интенсивности КД ($\varepsilon_{макс}$ 217 им) | Очень слабый отрицательный КД ($\varepsilon_{макс}$ 238—240 нм) |
| | Средний по интенсивности КД ($\varepsilon_{макс} \sim 165$ нм) | Средний по интенсивности КД ($\varepsilon_{макс}$ 150 нм) | Сильный отрицательный КД ($\varepsilon_{макс}$ 197 нм) |

волн КД и точек перегиба между положительным и отрицательным эффектом Коттона, приведены в табл. 23.7.1.

Использование этих «стандартных спектров КД» для подсчета соотношений α-спирали, β-формы и неупорядоченных конформаций глобулярных белков с попыткой воссоздания экспериментально измеренного спектра КД белка по алгебраической сумме различных долей спектра из трех «чистых» конформаций стало главным применением этого спектроскопического метода в данной области. Достигаемая при этом точность зависит от того, насколько конформационно чистым является стандарт, и для этой цели были рекомендованы и несколько поли(*L*-аминокислот). Неопределенностью, однако, является то, в каких условиях эти поли(аминокислоты) становятся полностью конформационно неупорядоченными. В качестве стандарта с неупорядоченной конформацией предложен поли(*L*-серин) при высоких солевых концентрациях [23]. КД-спектры, вычисленные для миоглобина, лизоцима и рибонуклеазы на основе их третичных структур, которые ранее были установлены для этих глобулярных белков по данным рентгеноструктурного анализа, согласуются по всем характеристическим точкам с экспериментальными спектрами КД при использовании в качестве одного из стандартов поли(*L*-серина) [35]. Подобные данные по анализу соответствия кривых по нативным белкам и полипептидам многочисленны, и они дают информацию о степени конформационной упорядоченности этих веществ в растворах [36]. Эти данные не дают, конечно, ответа на вопрос, какая именно часть первичной структуры α-спирализована, какая отвечает β-форме и какая — неупорядоченной, однако основываясь на последовательности аминокислотных остатков белка или полипептида, можно строить рискованные предположения о том, где эти конформации локализованы. Как отмечалось в разд. 23.7.2.4, аминокислоты белков разделяются на те, которые при включении в полипептиды способствуют принятию упорядоченной конформации, и те, которые тому не способствуют. Такая информация получена при рассмотрении

известных из литературы трехмерных структур белков, установленных с помощью рентгеноструктурных исследований. В текущей литературе имеется много работ, включающих предсказание конформаций полипептидов по этим данным, а также о том, каким способом достигается биологически активная конформация в процессе синтеза белка на гене. Обзоры по этим двум вопросам приводятся в [37] и [38] соответственно.

ДОВ и КД позволяют прослеживать конформационные изменения, происходящие с изменением температуры, ионной силы, pH и т. д. Несмотря на то, что методы с использованием ЯМР во многих отношениях более точны, в присутствии различных добавок, нужных для исследований с помощью ДОВ и КД, сигналы ЯМР перестают быть различимыми. Например, с помощью ДОВ удалось показать, что α-спиральная конформация поли(*L*-глутаминовой кислоты) становится более устойчивой за счет связывания уксусной кислоты из водного раствора при таких величинах pH, при которых в случае минеральных кислот происходит денатурация [39].

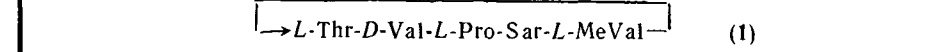
Эффекты Коттона от хромофоров боковых радикалов (т. е. от группировок, поглощающих при большей длине волны, чем амидные хромофоры цепи) могут быть использованы для выяснения некоторых локальных конформационных особенностей. Увеличение КД рибонуклеазы при 240—320 нм было отнесено за счёт влияния боковых радикалов остатков тирозина, расположенных тесно друг к другу и находящихся в глубине третичной структуры [40]. Введение хромофора в *N*-концевую группу олигопептида иллюстрирует этот же подход. Имеющие концевую *N*-тиобензоильную группу пептиды $PhC(S)NHCHR^1CO$ ..... имеют в спектрах КД поглощение около 390 нм, обусловленное возмущением тиобензамидного хромофора асимметрическими центрами в *N*-концевом и соседнем аминокислотном остатках. Данные спектров КД использованы для объяснения конформационных взаимоотношений между последним и предпоследним *N*-концевыми остатками [41].

### 23.7.3.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Конформационные исследования олигопептидов с помощью ядерного магнитного резонанса могут принять форму интерпретации данных по химическим сдвигам, чтобы выяснить эффект водородной связи и близкого соседства различных группировок, или уравнения типа Карплуса, связывающего $^1$H-константы расщепления с торзионными углами в группировке NH—$C^\alpha$H аминокислотных остатков пептидов [42]. Быстрый прогресс в конце шестидесятых годов поднял возможности приборов до такого уровня, когда резонанс каждого протона, даже в относительно сложном, не содержащем металла олигопептиде (например, в циклическом декапептиде — антаманиде [43]) может быть отнесен к определенному ядру и когда в благоприятных случаях могут быть определены торзионные углы. Данными $^1$H-ЯМР установлено, что в конформации, принятой антаманидом в растворе, все амидные карбонильные атомы кислорода обращены от молекулы в раствор, а боковые радикалы ориентированы в противоположную сторону [43]. Последующее развитие спектроскопии $^{13}$C-ЯМР основано на определении времен спин-решеточной релаксации [44] и исследовании ядерного эффекта Оверхаузера [45], что расширило применение ЯМР в изучении конформации полипептидов и предоставило информацию о большом числе соединений различной природы. Обладающий гипоталамическим эффектом трипептид — *L*-пролил-*L*-лейцилглицинамид принимает, например, компактную, но гибкую конформацию в водном растворе, что основывается на данных $^{13}$C-ЯМР по временам спин-решеточной релаксации [44], и этот вывод соответствует конформационным расчетам [46], указывающим на то, что молекула принимает конформацию β-витка второго рода.

Метод ЯМР особенно успешно применяется для определения конформаций малых пептидов, и текущие исследования включают большое число соединений, обладающих физиологически важными свойствами. Среди них пептидные гормоны млекопитающих и родственные по действию вещества, а также пептидные антибиотики, и несомненно, эти достижения прояснят подробности взаимодействия рецептора с молекулой (см. также разд. 23.7.3.7.).

Конформация антибиотика актиномицина стала предметом исследования, предпринятого несколькими группами; этот антибиотик (**1**) содержит пентапептидную макроциклическую лактонную группировку, в которой карбоксигруппа *N*-метилвалина этерифицирует гидроксил треонинового остатка. Появились данные ЯМР, оценивающие величины торзионных углов χ для связей $C^\alpha$—$C^\beta$ валильного и *N*-метилвалильного остатков [47]. Прежними исследованиями установлено наличие растянутой трансаннулярной водородной связи между *D*-валильным протоном группы NH и саркозильным атомом кислорода, а также величины торзионных углов $\phi + 120°$ для валильного остатка и $\chi + 90°$ для боковой группировки треонина и показано, что все амидные группы находятся в *транс*-конфигурации [48]. Однако имеются искажения и отклонения от полностью *транс*-конфигурации амидных групп, которые, наверное, возникают, чтобы избежать отталкивания между пролиновым кольцом и *N*-метильной группой саркозина.



(1)

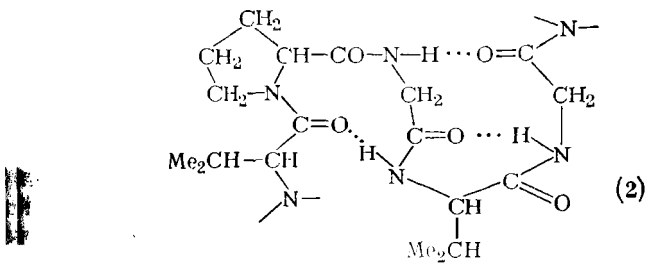
Циклические пептиды, вроде тех, которые были упомянуты в предыдущих разделах, изучались особенно интенсивно как в связи с их биологической значимостью, так и для оценки возможностей метода ЯМР в конформационном анализе. Соответствующие природные соединения, циклические депсипептиды, обсуждены вместе с циклическими олигопептидами в гл. 23.4. Изучались конформации

и синтетических аналогов — цикло(три-*L*-пролила) [49], цикло(*L*-Pro-*L*-Ser-Gly-*L*-Pro-*L*-Ser-Gly) [50], которые существуют в равновесии между двумя структурно схожими β-конформациями, а также цикло(*L*-Ser-*L*-Pro-Gly-*L*-Ser-*L*-Pro-Gly) [51], существующего в равновесии между β-конформацией и более компактной формой (обозначена $\Omega_c$) [51], в которой амидные группировки пролина имеют *цис*-конфигурацию.

По мере увеличения молекулы спектры ЯМР соответствующим образом усложняются, однако из них можно извлечь сведения о конформации, в особенности об изменении конформационных свойств с изменением физических свойств среды, в которой исследуется поведение полипептида. Сигнал протона группировки NH из трех кластеров протонированного бокового радикала аргинина в лизоциме становится более «острым» (в лизоциме семь остатков аргинина) еще до того, как это происходит с сигналами других протонов по мере того, как раствор фермента приводят к pH 2,8. Это явление связано со ступенчатостью процесса возрастания неупорядоченности белка, включающего развертывание кластеров аргинина еще до того, как это происходит с остальной частью молекулы [52]. В последующей части этой работы на основе изменения спектров ЯМР показано, что α-лактальбумин денатурирует легче, чем лизоцим [52].

Конформационные свойства нерастворимых белков можно иногда определить методом дифракции рентгеновских лучей, однако во многих важных областях приходится обходиться косвенными методами. Эластин — в значительной степени поперечно сшитый и нерастворимый белок эластичных волокон соединительной ткани, имеет растворимый предшественник (тропеластин), состоящий из длинной полипептидной цепи с повторяющейся последовательностью (-*L*-Val-*L*-Pro-Gly-*L*-Val-Gly-)$_n$. Методом ЯМР изучены модельные пептиды, имеющие близкую последовательность, и при этом показана четкая тенденция к образованию β-витка второго рода. Защищенные модельные пептиды Boc-Gly-*L*-Val-Gly-OMe, HCO-(*L*-Val-*L*-Pro-Gly-Gly)$_n$-*L*-Val-OMe, Boc-*L*-Val-*L*-Pro-Gly-*L*-Val-Gly-$NH_2$, использованные в этих исследованиях, имели, как показано, 11-членное, образованное водородной связью кольцо (γ-поворот, см. рис. 23.7.6) [6], β-поворот второго рода [53] и сетку водородных связей, включающую два 10-членных цикла и один 7-членный цикл, как показано в (2) [54].

ЯМР-спектры поли(*L*-аминокислот) имеют ряд отличительных особенностей для различных упорядоченных конформаций. Превращение α-спиральной конформации в неупорядоченную в неводных растворах вызывает слабопольный сдвиг резонанса $C^{\alpha}H$, и этот факт используется для получения структурной информации. Так, из ЯМР-данных адренокортикотропного гормона следует, что конформация олигопептидной цепи включает два удаленных друг от друга участка — остатки 1—10 и 11—24 [55]. Подобные константы расщепления NH—$C^{\alpha}H$, свойственные конформации α-спирали, в спектре грамицина A′ не найдены. Известно, что эта молекула имеет спиральную структуру и поэтому такую спираль следует считать «рыхлой» (обозначение $\pi_{L,D}$-спираль) [56]. $^{13}C$-ЯМР-спектр явно указывает на разрушение α-спирали поли(*L*-аминокислоты) и включает сдвиг в сторону сильных полей резонансов $C^{\alpha}$ (на 3,0 млн$^{-1}$) и C′ [на 2,7 млн$^{-1}$ для поли(γ-бензил-*L*-глутамата]




(2)

в хлороформе. Добавление трифторуксусной кислоты приводит к денатурации [57]. Данные ЯМР-спектров, касающиеся протонов боковых радикалов, интерпретируются с учетом взаимодействия функциональных групп, влияющего на конформацию. Так поли(β-бензил-*L*-аспартат) в хлороформе принимает конформацию левой α-спирали с не взаимодействующими бензильными группами и амидными группами цепи, тогда как правая α-спираль поли(β-бензил-*L*-глутамата) зависит от стабилизации, возникающей именно благодаря такому взаимодействию [58].

### 23.7.3.5. Флуоресцентная спектроскопия

Свойственная полипептидам и белкам, содержащим остатки тирозина и триптофана, естественная флуоресценция чувствительна к окружению этих остатков. Это обстоятельство можно в ряде случаев использовать, чтобы получить информацию о конформационной подвижности боковых радикалов остатков тирозина и триптофана в отношении близлежащих группировок в полипептидной цепи. Один пример — это истолкование изменений флуоресценции α-химотрипсина, возникающих при изменении состава растворителя, откуда следует достаточно близкое для протекания взаимодействия с переносом заряда расположение группировки —CONH— к остаткам тирозина и триптофана [59]. Доступность такого рода остатков тирозина в рибонуклеазе установлена в результате в основном качественного изучения флуоресценции [60]; три обращенных наружу остатка тирозина в ферменте теряют флуоресценцию после *O*-ацетилирования, в то время как боковые группировки трех других остатков тирозина «скрыты». Этот вывод подкрепляется увеличением флуоресценции после денатурации трис(*O*-ацетил)фермента [60].

Применение поляризованных световых импульсов и анализ интенсивностей параллельной и перпендикулярной компонент флуо-

ресценции в зависимости от времени дает информацию о конформационной подвижности флуоресцентного хромофора («флуорофора») [61]. Флуоресцентная анизотропия, связанная с интенсивностью параллельной и перпендикулярной компонент флуоресценции, является мерой деполяризации, быстро происходящей с незатрудненным флуорофором, и медленно, если флуорофор затруднен. В полипептидном гормоне глюкагоне имеется остаток триптофана наряду с 28 другими остатками, и данные флуоресценции подтверждают результаты ДОВ, указывающие на то, что доля α-спирализации молекулы в водном растворе возрастает по сравнению с чистой водой, если этот водный раствор содержит алифатические четвертичные аммониевые соли [62].

Другое применение измерений флуоресцентной анизотропии иллюстрирует изучение [63] декапептидного гормона лулиберина — 5-оксо-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-$NH_2$. Когда измерения проводили в вязкой среде, что сделано для уменьшения деполяризации, возникающей от теплового движения относительно свободно двигающихся ароматических боковых групп, то проходящая при этом передача энергии от находящегося в боковом радикале фенольного флуорофора тирозина к индольной группе триптофана указывает на то, что вытекающая из данных КД конформация β-витка включает область полипептида, содержащую остатки тирозина и триптофана [63].

### 23.7.3.6. Конформационные зонды: флуоресцентная спектроскопия и электронный парамагнитный резонанс

Примеры использования природной флуоресценции полипептидов для описания их конформационного поведения приведены в предыдущих разделах. В развитие этого подхода предложено вводить ковалентно связанные «информирующие» группы (флуорофоры [64, 65] или «спиновые метки» [66] — группировки, содержащие локализованные неспаренные электроны), что позволяет исследовать соседние с этими группами участки с помощью флуоресцентной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), соответственно. В разд. 23.7.3.3 приведены ссылки на работы по аналогичным исследованиям «меченых» пептидов методом КД.

Введение флуоресцентной 5-диметиламинонафталин-1-сульфонильной группы в белки мембран и последующий анализ флуоресцентных спектров указывает [63] на высокую степень неподвижности информирующей группы и приводит к выводу, что клеточные мембраны не столь «похожи» на жидкость, как это ранее считалось. Растворение некоторых мембранных белков, достигаемое действием детергента, сопровождается возрастанием подвижности «меченой» группы (см. также главу 25.3).

Профиль ЭПР-спектров полипептидов с введенной спиновой меткой может быть источником информации о вращательной подвижности меченой группы [65, 67]. Типичной группой, используемой для целей метки, является *N*-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-окси)малеимид [68], который ковалентно присоединяют к полипептиду по тиольным группам, а также 2,2,6,6-тетраметил-4-изоцианопиперидино-*N*-оксил [69], применяемый для специфического связывания с группой гема в цитохроме P-450 с целью исследования взаимосвязи между функцией гема и конформационными характеристиками соседнего полипептида.

### 23.7.3.7. Комплексное использование спектроскопических методов при исследовании конформаций пептидов

Хотя из всего набора спектроскопических методов — инфракрасной и рамановской спектроскопии, ДОВ, КД, ЯМР, флуоресцентной и ЭПР-спектроскопии, часто лишь одна (лучше остальных) подходит для определенного конформационного исследования, все же полученная с ее помощью информация почти неизменно успешно дополняется данными, полученными с использованием другого метода. В предыдущих разделах неоднократно указывалось на множество примеров применения более чем одного спектроскопического метода; примерами этого из области олигопептидов могут служить исследования защищенных олигомеров *L*-аланина (ИК и КД) [15, 70], аналогов *L*-валина и *L*-норвалина [70] и грамицидина А [56] (ЯМР и КД). Хороший растворитель для олигопептидов, полипептидов и белков, гексафторизопропанол, используется для сравнительных исследований с применением ИК, ДОВ и КД [71].

Использование в ЯМР-спектроскопии более концентрированных растворов по сравнению с применяемыми в других спектральных методах может снижать правомочность сопоставления данных различных методов, поскольку в некоторых случаях [72] высокая концентрация вещества благоприятствует определенным конформациям (например, β-форме). Применение физических методов для конформационного анализа полипептидов рассмотрено в обзорах [73—75].

### 23.7.3.8. Другие (неспектральные) методы

Некоторые физические параметры пептидов зависят от конформаций и, следовательно, они информативны для получения данных о структуре. Наиболее легко получаемая с помощью спектроскопических методов информация касается перехода упорядоченной конформации в неупорядоченную и наоборот. Это проявляется, например, при скачкообразном изменении инкремента показателя преломления в зависимости от состава исследуемого раствора [76]. Другое известное физическое свойство раствора — вязкость, оказалось чувствительным к размеру и форме растворенных молекул, что позволяет получать четкую информацию о конформационных переходах. Так, глюкагон (см. также разд. 23.7.3.5) принимает в

разбавленных водных растворах в основном сферическую форму, но при pH 11 он агрегирует и в концентрированных растворах образует гель за счет возникновения антипараллельной β-структуры вытянутых цепей [77].

Метод потенциометрического титрования менее пригоден, чем метод КД, для изучения влияния четвертичных аммониевых солей на превращение α-спиральной структуры поли(*L*-глутаминовой кислоты) [78] в неупорядоченную, тогда как с помощью первого метода возможно определить изменение свободной энергии и энтальпии, происходящие при образовании α-спиральных и β-конформаций поли(*L*-лизина) [10, 79]; дополнительная информация о структуре этой поли(аминокислоты) получена с помощью ДОВ и вискозиметрии.

### 23.7.4. КОНФОРМАЦИОННЫЕ РАСЧЕТЫ ПЕПТИДОВ

#### 23.7.4.1. Общие принципы

Характерной особенностью современных работ по конформационному анализу полипептидов является расчет предпочтительной конформации с использованием трехмерных структур белков, установленных ранее с помощью рентгеноструктурного анализа, что позволяет проверить правильность расчета. Полученные результаты существенно разнятся по достоверности ввиду неопределенностей, связанных с установлением минимума энергий конформации молекулы, как это показано на примере полипептидов.

#### 23.7.4.2. Энергетические карты

Отталкивание между атомами, входящими в состав аминокислотных остатков, удобно описывается энергетическими картами, выражающими зависимость потенциальной энергии этого остатка от величин торзионных углов $\psi$ и $\phi$. Простой пример (рис. 23.7.9) [80] показывает комбинации торзионных углов (заштрихованные области), при которых атомы остатка глицина сближаются настолько, что потенциальная энергия молекулы, частью которой обладает данный остаток, возрастает приблизительно на 4 ккал·моль$^{-1}$ ($\approx$17 кДж·моль$^{-1}$) по сравнению с ее минимальным значением; в то же время торзионные углы, соответствующие минимуму энергии конформации и близким к нему величинам, находятся в незаштрихованной части карты. В зависимости от допускаемых пределов, принятых для ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, можно изобразить на карте дополнительные контуры, отличающиеся по соответствующей величине энергии на 0,5 ккал·моль$^{-1}$ ($\approx$2 кДж·моль$^{-1}$). В случае аминокислот более сложного строения получаются менее симметричные энергетические карты, указывающие энергетические ямы, которые соответствуют предпочтительным торзионным углам для каждого остатка основной цепи. Соотношение между энергией и торзионными углами $\chi$ для связей C—C боковых радикалов также можно представить графически [81]; при этом находят отображение энергетические барьеры, которые следует преодолеть при вращении боковой цепи относительно пептидного скелета.

Расположение минимумов энергии для отдельно взятого аминокислотного остатка может иметь мало отношения к той конформации, которую принимает этот остаток в полипептиде. С первого взгляда можно подумать, что для каждой пептидной последовательности создается единственная в своем роде ситуация, но поскольку многие белковые аминокислоты сопоставимы с упорядоченной конформацией пептидного скелета (см. разд. 23.7.2.2), значительное число полипептидных структур описывается несколькими общими случаями. Пример вычислений по методу молекулярных орбиталей с использованием теории PCILO (возмущающих конфигурационных взаимодействий с учетом локализованных орбиталей) для оценки влияния соседней α-спирали на минимум конформационной энергии *L*-аланинового остатка, где в качестве модельного соединения был использован *N*-ацетил-(*L*-Ala)$_4$NHMe и где торзионные углы и энергетическая карта *C*-концевого остатка были использованы для характеристики предшествующего остатка, этот пример дал величины, характерные для α-спирали ($\phi$ — 57°; $\psi$ — 47°).

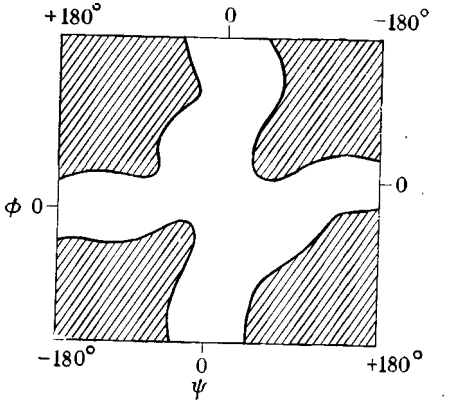


Рис. 23.7.9. Энергетическая карта глицинового остатка в полипептиде.

#### 23.7.4.3. Объекты конформационных расчетов

За период около 10 лет теоретические исследования конформаций пептидов прошли развитие, начав с расчетов отдельных аминокислотных остатков, затем изучались аминокислотные остатки в составе олигопептидов, взаимодействующие как с ближними участками, так и с боковыми радикалами полипептидного скелета, и далее были исследованы олигопептиды, имеющие важные биологические функции. Некоторые аспекты этих исследований отражены в обзорах [83, 84].

Общая конформационная энергия полипептида представляет сумму вкладов несвязанных взаимодействий, включающих отталкивание типа боковой радикал-боковой радикал и боковой радикал-полипептидный скелет; при этом фактором, упрощающим вычисления, стала жесткость амидной группы, которая удерживает

каждый остаток аминокислоты независимым от ее окружения [83]. Хотя для каждого полипептида с учетом внутримолекулярных взаимодействий может быть достигнут лишь один минимум конформационной энергии, отличительной особенностью недавних исследований стало рассмотрение нескольких конформаций в областях, близких к минимуму энергии, которые могут стать предпочтительными в результате учета эффекта сольватации и некоторых внутримолекулярных взаимодействий.

Расчеты по методу молекулярных орбиталей [83, 85] позволяют преодолеть некоторые ограничения, связанные с неопределенностью величин ван-дер-ваальсовых радиусов, используемых в конформационных подсчетах. Расширенный метод Хюккеля и метод CNDO/2 в определенной мере дополняют друг друга: первый из упомянутых методов позволяет надежно оценить барьеры вращений вокруг ординарных связей пептидного скелета, а второй — позволяет оценить силы отталкивания между соседними атомами. Соответствующая расчетная техника достигла высокого уровня, и для ряда олигопептидов вычисления дали подробную информацию. Опубликованы полные данные о методах расчета энергетических барьеров вокруг ординарных связей пептидного скелета [86]; расчетные данные использованы при установлении предпочтительной конформации лутеинизирующего гормона, высвобождающего гормон лулиберин [87], а также тетрапептидных фрагментов и деканептидных аналогов [88]. Примеры конформационных расчетов небольших пептидов включают трипептидный фактор гипоталамуса Pro-Leu-Gly-$NH_2$ [46] и *C*-концевой тетрапептидный фрагмент гастрина Trp-Met-Asp-Phe-$NH_2$ [89].

## ЛИТЕРАТУРА


1. IUPAC-IUB Recommendations 1971 (IUPAC Information Bulletin No. 10, 1971); Biochemistry, 1970, **9**, 3471; European J. Biochem., 1971, **17**, 193; «Amino-acids, Peptides, and Proteins», ed. G. T. Young, The Chemical Society, London, 1972, vol. 4, p. 455.
2. *G. Natta and P. Corradini*, J. Polymer Sci., 1959, **39**, 29.
3. *L. Velluz and M. Legrand*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1965, **4**, 838.
4. *D. C. Hodgkin*, Proc. Roy. Soc., 1974, **338**, 251; *T. L. Blundell, J. F. Cutfield, S. M. Cutfield, E. J. Dodson, G. G. Dodson, D. C. Hodgkin, D. A. Mercola, and M. Vijayan*, Nature, 1971, **231**, 506.
5. *R. E. Dickerson, T. Takano, D Eisenberg, O. B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, and E. Margoliash*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 1511.
6. *M. Abu Khaled, D. W. Urry, and K. Okamoto*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, **72**, 162.
7. *J. J. Birktoft, D. M. Blow, R. Henderson, and T. A. Steitz*, Phil. Trans. Roy. Soc. (B), 1970, **257**, 67.
8. *K. D. Kopple and A. Go*, Biopolymers, 1976, **15**, 1701.
9. *С. Л. Портнова и др.* ЖОХ, 1968, **38**, 428.
10. *P. Y. Chou and H. A. Scheraga*, Biopolymers, 1971, **10**, 657.
11. *V. Giancotti, F. Quadrifoglio, and V. Crescenzi*, J. Amer. Chem. Soc. 1972, **94**, 297.
12. *E. R. Blout*, in «Polyamino-acids, Polypeptides, and Proteins», ed. M. A. Stahmann, University of Wisconsin Press, Madison, 1962, p. 275.





13. *F. H. C. Crick and A. Rich*, Nature, 1955, **176**, 780.
14. *E. R. Blout and A. Asadourian*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 955; *J. C. Mitchell, A. E. Woodward, and P. Doty*, ibid., 1957, **79**, 3955.
15. *C. Toniolo and G. M. Bonora*, J. Polymer Sci., Polymer Chem. Edn., 1976, **14**, 515.
16. *C. Toniolo*, Biopolymers, 1971, **10**, 1707; *M. Goodman, F. Naider, and C. Toniolo*, ibid., p. 1719.
17. *U. Widmer and G. P. Lorenzi*, Chimia, 1971, **25**, 236.
18. *R. T. Ingwall and M. Goodman*, in «International Review of Science, Organic Chemistry Series Two», ed. H. N. Rydon, Butterworths, London, 1975, vol. 6, p. 153.
19. *B. Schechter, I. Schechter, J. Ramachandran, A. Conway-Jacobs, and M. Sela*, European J. Biochem., 1971, **20**, 301.
20. *B. Weinstein*, in «Peptides: Chemistry and Biochemistry», ed. B. Weinstein and S. Lande, Dekker, New York, 1970, p. 371.
21. *W. B. Gratzer, W. Rhodes, and G. D. Fasman*, Biopolymers, 1963, **1**, 319.
22. *J. M. Rifkind and J. Applequist*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 3650.
23. *H. Rosenkranz and W. Scholtan*, Z. physiol. Chem., 1971, **352**, 896.
24. *B. Jirgensons and S. Capetillo*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **205**, 1.
25. *A. Cosani, E. Peggion, M. Terbojevich, and M. Acampora*, Macromolecules, 1971, 214, 1.
26. *L. Visser and E. R. Blout*, Biochemistry, 1971, **10**, 743.
27. *Y. Ohta, Y. Hibino, K. Asaba, K. Sugiura, and T. Samejima*, Biochim. Biophys. Acta, 1971, **236**, 802.
28. *H. B. Brewer and H. Edelhoch*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 2402.
29. *E. M. Bradbury, B. G. Carpenter, and R. M. Stephens*, Macromolecules, 1972, **5**, 8.
30. *S. Mizishima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, T. Sugita, K. Kurosaki, N. Mataga, and R. Souda*, J. Amer. Chem. Soc., 1952, **74**, 4639.
31. *M. Avignon, P. V. Huong, J. Lascombe, M. Marraud, and J. Neel*, Biopolymers, 1969, **8**, 69; *A. Burgess and H. A. Scheraga*, ibid., 1973, **12**, 2177.
32. *M. Goodman, Y. Masuda, and A. S. Verdini*, Biopolymers, 1971, **10**, 1031.
33. *D. F. H. Wallach, J. M. Graham, and A. R. Oseroff*, FEBS Letters, 1970, **7**, 330.
34. *G. D. Fasman*, in «Methods in Enzymology», Academic Press, New York, 1963, vol. 6, p. 928; см. также сс. 35.
35. *Y. T. Yang*, in «Conformations of Biopolymers', Academic Press, New York, 1967, vol. 1, p. 173.
36. *G. C. Barrett*, in «MTP International Review of Science, Organic Chemistry Series One», ed. D. H. Hey and D. I. John, Butterworths, London, 1973, vol. 6, p. 77.
37. *B. Robson and E. Suzuki*, J. Mol. Biol., 1976, **107**, 327.
38. *B. Robson*, Trends Biochem. Sci., 1976, **1**, 55; *D. B. Wetlaufer and S. Rostow*, Ann. Rev. Biochem., 1973, **42**, 135.
39. *J. R. Cann*, Biochemistry, 1971, **10**, 3707.
40. *C. Sander and P. O. P. Ts'o*, Biochemistry, 1971, **10**, 1953.
41. *G. C. Barrett*, J. Chem. Soc. (C), 1969, 1123.
42. *A. E. Tonelli and F. A. Bovey*, Macromolecules, 1970, **3**, 410.
43. *A. E. Tonelli, D. J. Patel, M. Goodman, F. Naider, H. Faulstich, and T. Wieland*, Biochemistry, 1971, **10**, 3211.
44. *R. Deslauries and I. C. P. Smith*, $^{13}$Topics CN. M. R. Spectroscopy, 1976, **2**, 1.
45. *H. E. Bleich, J. D. Cutnell, and J. A. Glasel*, Biochemistry, 1976, **15**, 2455.
46. *S. Kang and R. Walter*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, **73**, 1203.
47. *P. De Santis, R. Rizzo, and G. Ughetto*, Tetrahedron Letters, 1971, 4309.
48. *H. Lacker*, Tetrahedron Letters, 1970, 2807, 3189; 1971, 2221; Chem. Ber., 1970, **103**, 2476.
49. *C. M. Deber, D. A. Torchia, and E. R. Blout*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 4893.
50. *D. A. Torchia, A. Di Corato, S. C. K. Wong, C. M. Deber, and E. R. Blout*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 609.

51. *D. A. Torchia, S. C. K. Wong, C. M. Deber, and E. R. Blout*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 616
52. *J. H. Bradbury and N. L. R. King*, Austral. J. Chem., 1971, **24**, 1703.
53. *D. W. Urry and M. M. Long*, Crit. Rev. Biochem., 1976, **4**, 1.
54. *D. W. Urry, L. W. Mitchell, T. Ohnishi, and M. M. Long*, J. Mol. Biol., 1975, **96**, 101.
55. *D. J. Patel*, Macromolecules, 1971, **4**, 251.
56. *J. D. Glickson, D. F. Mayers, J. M. Settine, and D. W. Urry*, Biochemistry, 1972, **11**, 477.
57. *L. Paolillo, T. Tancredi, P. A. Temussi, E. Trivellone, E. M. Bradbury, and C. Crane-Robinson*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 335.
58. *D. N. Silverman, G. T. Taylor, and H. A. Scheraga*, Arch. Biochem. Biophys., 1971, **146**, 587.
59. *R. W. Cowgill*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **200**, 18.
60. *R. W. Cowgill and N. K. Lang*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **214**, 228.
61. *P. Wahl, M. Kasai, and J.-P. Changeux*, European J. Biochem., 1971, **18**, 332.
62. *H. Bornet and H. Edelhoch*, J. Biol. Chem., 1971. **246**, 1785.
63. *P. Marche, T. Montenay-Garestier, C. Helene, and P. Fromageot*, Biochemistry, 1976, **15**, 5730, 5738.
64. *G. K. Radda*, Biochem. J., 1971, **122**, 385; см. также сс. 65.
65. *L. Stryer*, in «CIBA Foundation Symposium on Molecular Properties of Drug Receptors", ed. R. Porter, Churchill, London, 1970, p. 133.
66. *H. M. McConnell and B. G. McFarland*, Quart. Rev. Biophys., 1970, **3**, 91.
67. *V. P. Timofeev, O. L. Polianovsky, M. V. Volkenstein, and G. I. Lichtenstein*, Biochim. Biophys. Acta, 1970, **220**, 357.
68. *A. M. Gotto and H Koч*, Biochemistry, 1970, **9**, 4276.
69. *Л. М. Райхман, Б. П. Аннаев, Э. Г. Розанцев.* ДАН СССР, 1971, **200**, 387.
70. *J. S. Balcerski, E. S. Pysh, G. M. Bonora, and C. Toniolo*, J. Amer. Chem. Soc. 1976, **98**, 3470.
71. *J. R. Parrish and E. R. Blout*, Biopolymers, 1971, **10**, 1491.
72. *P. A. Temussi and M. Goodman*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, **68**, 1767.
73. "Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry", ed. S. J. Leach, Academic Press, New York, 1970.
74. *R. Wetzel*, Stud. Biophys., 1968, **8**, 127.
75. «Amino-acids, Peptides, and Proteins», vols. 1 (1969) to 4 (1972), ed. G. T. Young. vols 5 (1974) to 9 (1978), ed. R. C. Sheppard, The Chemical Society, London.
76. *K. DeGroot, J. Feyen, A. C. De Visser, G. Van de Ridder, and A. Bantjes*, Kolloid-Z., 1971, **246**, 578.
77. *R. M. Epand*, Canad. J. Biochem., 1971, **49**, 166.
78. *I. Steigman and A. Cosani*, Biopolymers, 1971, **10**, 357.
79. *T. V. Barskaya and O. B. Ptitsyn*, Biopolymers, 1971, **10**, 2181; *D Pederson, D. Gabriel, and I. Hermans*, Biopolymers, 1971, **10**, 2133.
80. *D. A. Brant, W. G. Miller, and P. J. Flory*, J. Mol. Biol., 1967, **23**, 47.
81. *J. Caillet, B. Pullman, and B. Maigret*, Biopolymers, 1971, **10**, 221.
82. *G. Jeronimidis and A. Damiani*, Nature New Biol. 1971, **229**, 150.
83. *H. A. Scheraga*, Chem. Rev., 1971, **71**, 195; Pure Appl. Chem., 1973, **36**, 1.
84. *M. Goodman, A. S. Verdini, N. S. Choi, and Y. Masuda*, Topics Stereochem., 1970, **5**, 69.
85. *H. A. Scheraga, F. A. Momany, R. F. McGuire, and J. F. Yan*, J. Phys. Chem., 1971, **71**, 2286.
86. *A. T. Hagler, L. Leiserowitz, and M. Tuval*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 4600.
87. *F. A. Momany*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 2990.
88. *F. A. Momany*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 2996.
89. *T. Yamada, H. Wako, N. Saito, Y. Isogai, and H. Watari*, Internat. J. Peptide Protein Res., 1976, **8**, 607.



ЧАСТЬ 24

# БЕЛКИ: ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

## 24.1. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ

*А. Дж. Кирби (University of Cambrige)*

### 24.1.1. ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Из всех известных катализаторов ферменты являются самыми мощными и эффективными, но в то же время самыми нестойкими и хрупкими. Они катализируют почти все реакции, проходящие в живых системах, в том числе такие, проведение которых для химика органика является трудным или невозможным. Ферменты же осуществляют эти реакции в наиболее мягких интервалах температуры и pH, в разбавленном водном растворе [1].

Ферменты могут также работать вне живой системы. Пищевая промышленность традиционно использует ферменты в таких производствах, как пивоварение и хлебопечение, и число таких приложений постоянно растет В клинической биохимии большая доля проводимых анализов основана на использовании ферментов. Химики-синтетики также все чаще обращаются к ферментам в реакциях, где важна стереоспецифичность [2] или где сложность введения защитных групп в полифункциональные молекулы делает неудобным применение обычных методов [3]. Наконец, наиболее важным для нас является накопление знаний о химическом аппарате клетки, что поможет правильно воздействовать на живую систему в случае ее выхода из строя. Известно, что при некоторых заболеваниях возникают особые биохимические расстройства, в том числе ферментов или ферментативных систем. Число таких примеров, несомненно, будет расти.

В связи с этим необычайно важно понять, как работают ферменты. В этой главе мы попытаемся охарактеризовать ферментативный катализ с точки зрения химика-органика. Установление механизма действия определенного фермента сводится, таким образом, к проблеме определения механизма органической реакции и может, в принципе, исследоваться методами физической органической химии. Это предполагает знание структур субстратов и продуктов рассматриваемой реакции. Детальная структурная инфор-

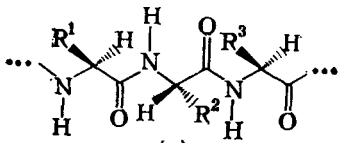
мация, ставшая доступной в последние годы благодаря рентгеноструктурному анализу, сделала задачу такого рода практически разрешимой.

### 24.1.1.1. Ферменты как белки

Ферменты представляют собой молекулы белков (см. гл. 23.1) с молекулярными массами в пределах от десяти тысяч до нескольких миллионов. Многие ферменты либо содержат, либо функционируют в комплексе с коферментами или ионами металлов, являющимися важными для каталитической активности ферментов. Многие из них представляют собой агрегаты одного, иногда двух типов индивидуальных белковых субъединиц. Некоторые ферменты организованы в группы из небольшого числа различных ферментов, существующие либо в растворе (полиферментные комплексы), либо более или менее жестко присоединенными к определенным субклеточным структурам [4]. Эти полиферментные системы могут, таким образом, имея по одному ферменту на каждую стадию последовательности, катализировать последовательность нескольких реакций.

Поскольку здесь рассматриваются общие химические черты ферментативного катализа, мы в большинстве случаев будем избегать подобных осложнений и ограничимся, где это возможно, только простейшим типом мономерного фермента. Белок этого типа — обычно большая молекула, состоящая из одной полипептидной цепи, содержащей, возможно, несколько сот аминокислот и свободно существующая в растворе внутри клетки. Такой белок можно очистить до степени гомогенности (по нескольким различным критериям), используя хроматографические и электрофоретические методы, пригодные для разделения заряженных макромолекул в водной среде [5]. На этой стадии очистки при благоприятных условиях белок можно закристаллизовать. Многие ферменты, таким образом, становятся доступными в качестве вполне определенных органических соединений, удовлетворяющих обычным критериям чистоты, и они, естественно, могут быть синтезированы [6]. Они также могут быть получены в значительных количествах. Все хорошо изученные ферменты — например, трипсин, химотрипсин, лизоцим и рибонуклеаза — доступны в граммовых количествах. Значительное число других доступны коммерчески в миллиграммовых количествах.

Специфические свойства такого белка (**1**) определяются исключительно природой и последовательностью составляющих его аминокислот, т. е. расположением и типом боковых групп (радикалов) $R^i$ (строение аминокислот суммировано в таблице в разд. 23.2.1). Полифенилаланин (**I**, $R^1=R^2=R^3=CH_2Ph$), например, исключительно нерастворим в воде, в то время как полимеры аминокислот, содержащих заряженные группировки в боковых группах: лизин, глутаминовая кислота и т. д. [7], — растворимы. Каждый белок-фермент состоит из уникальной, но, по-видимому, произвольной последовательности всех 20-ти обычных аминокислот. Некоторые части полипептидной цепи, содержащие незаряженные и особенно боковые углеводородные радикалы (например, $R=CH_2Ph$), являются весьма гидрофобными, в то время как заряженные группы функциональных боковых радикалов сильно сольватированы



**(1)**

водой (гидрофильны). В результате полипептидная цепь принимает такую конформацию, при которой оба типа групп попадают, по возможности, в предпочитаемый ими тип окружения. Гидрофобные боковые радикалы собираются вместе, формируя группу или группы у центра образовавшейся структуры, окруженного и тем самым защищенного от растворителя частями полипептидной

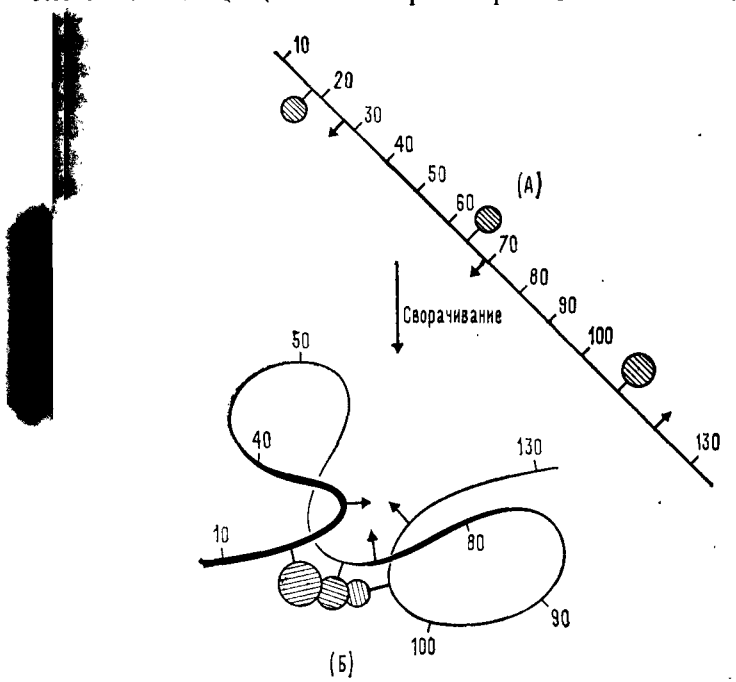



Рис. 24.1.1. Формирование активного центра.

*Линейный полипептид* (А), *образованный в результате биосинтеза белка*, сворачивается, принимая наиболее стабильную конформацию (Б) в воде. Гидрофобные группы (заштрихованные кружки) вступают в контакт друг с другом, что приводит также к сближению ближайших функциональных групп (стрелки). Стабильная структура поддерживается водородными связями, дисульфидными мостиками и т. д. (см. текст).

цепи, несущими гидрофильные боковые цепи, которые образуют поверхность глобулярного белка. Таким образом, поверхность глобулы состоит преимущественно из гидрофильных групп и молекула в целом сольватирована настолько, чтобы быть растворимой [8].

Эта грубая схема, во многом сходная с предложенным строением мицеллы детергента [9], достаточно ясно показывает, как удаленные части полипептидной цепи сближаются в наиболее выгодной конформации. Рассмотрим участок первичной структуры белка-фермента (рис. 24.1.1). Процесс сворачивания, вызывающий сближение гидрофобных групп, собирает в этих точках как полипептидную цепь, так и боковые радикалы близлежащих аминокислотных остатков. Если последние несут функциональные группы, то можно легко заметить, что на данном участке структуры белка может возникнуть весьма точное пространственное расположение нескольких таких групп. Таким образом, в процессе сворачивания в характеристическую стабильную конформацию линейного полипептида, образовавшегося в процессе биосинтеза белка, формируется активный центр фермента. По-видимому, именно таким образом возникли первые ферменты, когда оказывалось, что определенные расположения функциональных групп, случайно возникшие указанным выше путем, обладали важными каталитическими свойствами.

### 24.1.1.2. Ферменты как катализаторы

Хотя мы, как правило, будем рассматривать только одну ферментативную реакцию и большинство исследований механизмов проводится на очищенных ферментах, важно помнить, что реально ферменты действуют в таких условиях, когда одновременно протекают сотни химических реакций. Контроль этой огромной сети несвязанных и взаимосвязанных реакций достигается механизмами, регулирующими концентрации и эффективность индивидуальных ферментов. Эти *механизмы контроля* (см. ниже, разд. 24.1.6) зависят от высокой каталитической эффективности, так что малые изменения в концентрации могут сильно влиять на течение реакции, и от высокой специфичности, характерных для ферментативного катализа. Большинство ферментов катализируют одну и только одну реакцию одного и только одного субстрата, поэтому отдельные стадии определенных путей метаболизма могут контролироваться посредством контроля активности отдельных ферментов.

Первой стадией любой ферментативной реакции является встреча фермента и субстрата, происходящая обычно в результате случайного столкновения в растворе [и поэтому со скоростью ($k \approx \approx 10^8$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$), соответствующей взаимной диффузии большой и малой молекул в воде], в результате которой образуется нековалентный фермент-субстратный комплекс. Ферменты, которые в клетке свободно действуют в растворе, могут различать свои субстраты среди многих сотен различных соединений, присутствующих в том же растворе, и с которыми они сталкиваются со сходной частотой. Кроме того, очень часто их производительность близка к максимальной: как только фермент высвобождается в конце каталитического цикла, он захватывает другую молекулу субстрата. Очевидно, что используемые *механизмы связывания* высоко избирательны и эффективны и требуют наличия высокоразвитой трехмерной структуры белка, способной к специфическому узнаванию и связыванию субстрата. (Механизмы связывания и относящийся к ним вопрос ингибирования ферментов обсуждаются ниже, в разд. 24.1.4.)

После того как субстрат* связывается в активном центре, могут начинаться химические процессы. Субстрат превращается в продукт *по каталитическому механизму*, образуя комплекс фермент-продукт {схема (1)}. Процесс заканчивается, когда продукт удаляется из активного центра и образуется свободный фермент, готовый начать новый цикл. Не следует, однако, упускать из виду комплекс фермент-продукт. Ясно, что структура продукта весьма близка к структуре субстрата. Это фактически та же молекула, за исключением связей, образовавшихся или разорванных в процессе данной реакции. Однако важно, чтобы продукт, образующийся в центре, предназначенном для специфического и эффективного связывания субстрата, сам был связан как можно слабее, в противном случае его удаление и тем самым регенерация свободного фермента будут замедлены, и число каталитических циклов уменьшится. Эти требования подтверждают сложность механизма связывания.

### 24.1.1.3. Кинетика ферментативных процессов

Простейшая односубстратная ферментативная реакция представлена на схеме (1). Сделав предположение о стационарности концентрации комплексов E—S и E—P, мы можем вывести выражение (2) для общей скорости реакции (подробности см. в книге Диксона и Уэбба [10]).




(1)

(E — фермент, S — субстрат, P — продукт, E—S и E—P — комплексы)

* Или субстраты: большинство ферментативных реакций проходит между молекулами субстратов, одновременно связанных на ферменте. Здесь, в силу причин, которые будут ясны ниже, мы ограничиваемся обсуждением простейшего случая.

$$v = \frac{\kappa_3\kappa_5[E_0][S]}{(\kappa_3+\kappa_4+\kappa_5)} \Big/ [S] + \frac{\kappa_2\kappa_4+\kappa_2\kappa_5+\kappa_3\kappa_5}{\kappa_1(\kappa_3+\kappa_4+\kappa_5)} \qquad (2)$$

Если нас специально интересует каталитический механизм, то следует определить $\kappa_3$ из этого выражения. Во многих случаях этого можно достичь соответствующим подбором условий эксперимента * или с помощью предположений (которые могут быть как обоснованными, так и необоснованными) об относительных значениях различных констант скоростей. Например, если продукт диссоциирует быстро (т. е. $\kappa_5$ велика по сравнению с $\kappa_3$ и $\kappa_4$), выражение (2) может быть преобразовано в выражение (3).

$$v = \kappa_e[E_0][S] \Big/ \left([S] + \frac{\kappa_2+\kappa_3}{\kappa_1}\right) \qquad (3)$$

$$v = \kappa_{кат}[E_0][S]/([S] + K_м) \qquad (4)$$

Более сложные реакционные схемы с бо́льшим числом интермедиатов описываются более сложными уравнениями, сохраняющими, однако, ту же общую форму (4), где $\kappa_{кат}$ — константа стадии, определяющей скорость процесса, $K_м = (\kappa_2 + \kappa_3)/\kappa_1$ — константа Михаэлиса, мера сродства субстрата к ферменту. В простых случаях, когда связывание является быстрым предравновесным процессом (т. е. $\kappa_2 \gg \kappa_3$), $K_м$ становится равной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса. При высоких концентрациях субстрата, определяемых как $[S] \gg K_м$, выражение (4) упрощается в (5), где $V$ обозначает максимальную скорость, независимую от концентрации субстрата. Объединение выражений (4) и (5) позволяет определить $K_м$ как концентрацию субстрата, при которой скорость реакции достигает половины максимальной скорости $V$. При низких концентрациях субстрата ($[S] \ll K_м$) выражение (4) переходит в (6).

$$v \longrightarrow V = \kappa_{кат}[E_0] \qquad (5)$$

$$v = \kappa_{кат}[E_0][S]/K_м \qquad (6)$$

В этих условиях отношение $\kappa_{кат}/K_м$ представляет собой кажущуюся константу скорости второго порядка реакции между ферментом и субстратом.

Константы $\kappa_{кат}$ и $K_м$ легко определить, измеряя начальную скорость ферментативной реакции в зависимости от концентрации субстрата (рис. 24.1.2). Эти величины являются наиболее удобными показателями эффективности катализа для данного субстрата. Хороший субстрат прочно связывается и быстро реагирует, и поэтому характеризуется малой величиной $K_м$ и большой $\kappa_{кат}$. Однако за исключением самых простых случаев $\kappa_{кат}$ и $K_м$ — сложносоставные

* Мы уже произвели без колебаний такой подбор на схеме (1), не написав константу $\kappa_6$ для рекомбинации фермента и продукта. Это положение, в общем, правомерно, если мы измеряем начальные скорости реакции, когда концентрацией продукта можно пренебречь.



константы [сравните выражения (4) и (2)], и их детальная интерпретация, например значений $\kappa_{кат}$ для серий близких субстратов при изучении механизма, должна проводиться с большой осторожностью.

Наше рассмотрение ферментативной кинетики до сих пор ограничивалось реакциями, протекающими в стационарных условиях. Несмотря на очень высокие константы скоростей ферментативных реакций, обычно удается измерить скорость реакции, работая при очень низких концентрациях фермента (порядка $10^{-7}$ — $10^{-10}$ моль·л$^{-1}$). Измерения этого типа, легко выполнимые с помощью обычной аппаратуры, занимают бо́льшую часть опубликованных работ по ферментативной кинетике. Все большее значение, однако, приобретает использование современных методов исследования быстрых реакций, позволяющих получить информацию о короткоживущих состояниях [11, 12].

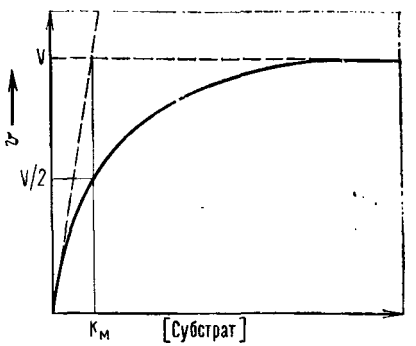



Рис. 24.1.2. График зависимости начальной скорости $v$ ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента $E_0$ (см. текст).

Метод остановленного потока (stopped-flow) [13] может дать информацию о процессах с временами жизни порядка миллисекунд, которые лимитируются лишь временем смешения реагентов в сосуде. Это позволяет использовать бо́льшие концентрации фермента (до $10^{-3}$ моль·л$^{-1}$) и изучать предстационарную стадию реакции, т. е. события, происходящие, когда субстрат первый раз сталкивается с ферментом. Таким образом, становится возможным изучение стадии связывания, а также других процессов, предшествующих стадии, определяющей скорость процесса.

Еще более быстрыми являются релаксационные методы, развитые преимущественно в работах Эйгена [14] с соавторами, которые позволяют измерять реакции, подобные переносу протона, с константами скоростей порядка $10^{10}$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$. Эти методы сводятся к наблюдению за возвращением системы к равновесию (релаксации) после внезапного возмущения; они ограничены в основном быстротой возмущения системы. Использование ЯМР [15] и метода температурного скачка позволяет достичь области временной постоянной порядка $10^{-6}$ с. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) — еще более быстрый метод ($10^{-9}$ с), но требует, как правило, специального введения спиновой метки в фермент или субстрат.

Каждому из этих методов присущи свои трудности в интерпретации получаемых данных, в частности, отнесение наблюдаемых

времен релаксации к константам скоростей определенных стадий. Тем не менее применение быстрых кинетических методов является в настоящее время важной частью прямого изучения ферментативного катализа.

### 24.1.2. КАТАЛИЗ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Хотя стадия связывания и каталитический процесс на практике взаимозависимы и неразделимы, полезно обсудить их по отдельности. В этом разделе мы начинаем рассмотрение химизма процессов, проходящих внутри фермент-субстратного комплекса, как проблему механизма органической реакции. Необходимо начать с предположения, что реакционная способность рассматриваемых групп хотя и значительна, но в данных условиях близка к обычной. Это означает, что если мы сможем каким-либо образом воспроизвести в эксперименте условия фермент-субстратного комплекса, то сможем воспроизвести и высокую реакционную способность.

В связи с этим необходимо ответить на два основных вопроса. 1. Какие механизмы приложимы к таким реакциям? 2. Почему они так эффективны? Первый вопрос является предметом данного раздела. Второй включает рассмотрение природы процессов связывания субстратов и механизмов катализа и обсуждается в разд. 24.1.4.

Для реакций, проходящих с участием коферментов, почти в любом случае можно предложить механизмы, опирающиеся на рабочие модельные системы. В отличие от этого ни для одной реакции, катализируемой «чистым» ферментом, детального механизма не сформулировано. Предметом исследования механизма органической реакции является установление всех ее промежуточных стадий — как переходных состояний, так и интермедиатов — с такими подробностями, которые нам известны для стабильных начальных соединений и продуктов. В настоящее время мы не можем ни для одной ферментативной реакции надежно идентифицировать все промежуточные состояния.

Вначале мы рассмотрим функциональные группы ферментов, затем на основе изучения модельных систем рассмотрим механизмы, по которым эти группы катализируют реакции типичных гр субстрата. В заключение будут обсуждены методы обнаружения и исследования ферментативных реакций (см. разд. 24.1.3).

#### 24.1.2.1. Каталитические группы ферментов

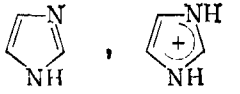
Молекула любого белка содержит сотни функциональных групп. Наиболее часто встречающимися являются амидные группы основной полипептидной цепи, а также аминокислот глутамина и аспарагина. Эти группы играют большую структурную роль как доноры и акцепторы водородных связей (см. гл. 27.3). Они имеют также большое значение для формирования и стабилизации конформации белка. Они могут играть аналогичную роль в стабилизации комплексов фермент-субстрат и фермент-переходное состояние. Однако считается, что они не принимают активного участия в катализе и, как правило, инертны.

Функциональные группы, участвующие в катализе, расположены в боковых радикалах аминокислотных остатков. Гуанидиногруппа аргинина * ($pK_a$ 12,5) является почти такой же слабой кислотой, как амидная группа, поэтому образованием свободного основания можно пренебречь. Эта группа является также важным донором водородной связи, особенно в отношении таких двухосновных групп, как карбоксилат и фосфат, и может рассматриваться как существенная в структурном аспекте, однако обычно не играет активной роли в катализе.

Всего лишь пять функциональных групп связаны с каталитической активностью большинства ферментов; они приведены в табл. 24.1.1. Карбоксильная группа встречается в обеих формах — кислотной и сопряженного основания — и является наиболее сильнокислой группой. Протонированная имидазольная группа гистидина с $pK_a$ близким к физиологическому значению pH также может выступать в роли слабой кислоты, однако его сопряженное основание является сильнейшим в обычных условиях, так как первичная аминогруппа лизина обычно полностью протонирована при pH около 7. Тем не менее протоны $+NH_3$-группы, так же как HS- и даже HO-групп, удаляются в процессе многих ферментативных реакций, и в большинстве случаев эти группы выступают как нуклеофилы.

Чтобы расширить рамки реакций, катализируемых пятью функциональными группами, следует сделать два важных добавления

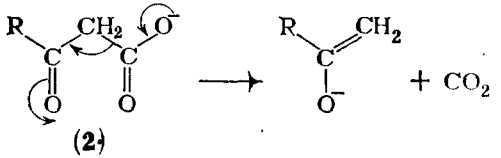
*Таблица 24.1.1. Каталитические группы ферментов*

| Группа | $pK_a$ * | Аминокислота ** |
|---|---|---|
| $CO_2H$, $CO_2^-$ | 4 | Аспарагиновая кислота<br>Глутаминовая кислота |
| OH | 14—15 | Серин<br>Треонин |
| SH | 10 | Цистеин |
| $NH^+$ | 10 | Лизин |
|  | 7 | Гистидин |

* Кажущиеся величины, ожидаемые в боковом радикале линейного пептида.
** Таблица структур аминокислот приведена в разд. 23.2.1.

* Структуры аминокислот сведены в таблицу в разд. 23.2.1.

к приведенной таблице. Эти добавления — коферменты и ионы металлов. Одним из очевидных упущений списка групп в табл. 24.1.1 является отсутствие эффективного аккумулятора электронов. Во многих органических реакциях, особенно включающих расщепление углерод-углеродной связи, требуется делокализация пары электронов, принадлежавших ранее этой связи, в подходящем электроотрицательном центре. Простым примером этого является декарбоксилирование β-кетокислоты (2) по схеме (7).



(2) (7)

Ферменты, катализирующие расщепление углерод-углеродных связей, часто используют коферменты, такие как тиаминпирофосфат и пиридоксаль, в качестве портативных аккумуляторов электронов. Другие коферменты играют близкие роли в тех реакциях, которые не могут эффективно катализироваться пятью основными функциональными группами *. В таблице отсутствует также какая-либо обратимая окислительно-восстановительная система, в частности для одноэлектронных переносов. И здесь коферменты, а во многих случаях и ионы металлов, помогают заполнить этот пробел. Разнообразные функции ионов металлов обсуждаются ниже (см. разд. 24.1.2.5). На химика пять функциональных групп табл. 24.1.1 не производят особого впечатления в качестве списка реагентов. В этом списке отсутствуют сильная кислота или основание (их, конечно, не может быть при pH около 7). Даже нуклеофилы, обладающие, по-видимому, наивысшей четко выраженной внутренней реакционной способностью, присутствуют обычно в виде сопряженных кислот. И все же именно эти группы ответственны за выдающиеся каталитические свойства ферментов. Для того чтобы представить себе, как это может быть, следует рассмотреть их химическое поведение.

### 24.1.2.2. Каталитические механизмы действия ферментов

В основе каждого ферментативного процесса лежит реакция между функциональной группой субстрата — сложным эфиром, амидом, ацеталем, фосфатом и т. д. — и одной, возможно двумя, иногда тремя каталитическими группами фермента. Поэтому любое квалифицированное обсуждение механизмов ферментативного катализа должно основываться на понимании того, как могут взаимодействовать эти группы. Такое понимание возникло за последние 15—20 лет в результате изучения подобных реакций в простых системах [16—18].

* Основные коферменты обсуждаются в гл. 24.3.



Поставим в начале частные вопросы. Как имидазольная группа взаимодействует с амидной группой? Может ли карбоксильная группа катализировать перенос фосфата? Постепенно стало ясно, что определенные группы хорошо соответствуют определенным реакциям. Например, в реакциях ацеталей всегда требуется кислый катализ, и среди пяти групп, которыми располагают ферменты, только карбоксильная группа представляется достаточно сильной кислотой. С другой стороны, гидролиз амидов — реакция, катализируемая большим числом ферментов, — может катализироваться четырьмя из этих пяти групп. Эти заключения были сделаны как на основании данных по идентификации каталитических групп соответствующих ферментов, так и на основании изучения модельных систем. Основные механизмы, с другой стороны, были первоначально идентифицированы исключительно в простых системах, и в связи с этим следует начать с описания развития этого подхода.

В процессе обсуждения удобно опираться на частный пример. Так как читателю ближе знакома химия, рассмотрим сложный эфир в качестве субстрата и карбоксильную группу в качестве катализатора. В данном случае предстоит ответить на вопрос, *как карбоксильная группа может катализировать гидролиз сложного эфира*? Экспериментальный подход весьма прост — необходимо наблюдать влияние карбоксильной группы на гидролиз эфира. Рассмотрим вначале наиболее простой пример: простейшее карбоксилсодержащее соединение, например уксусную кислоту, и простейший сложный эфир, например этилацетат. Первый эксперимент, таким образом, состоит в измерении скорости гидролиза этилацетата в воде (или в растворе, содержащем преимущественно воду), примерно при 37 °C в присутствии изменяющихся концентраций уксусной кислоты. Известно, что гидролиз сложных эфиров катализируется кислотами (см. рис. 24.1.3), поэтому pH не должен изменяться. Простейшее решение заключается в использовании буфера уксусная кислота — ацетат натрия для сохранения постоянства pH и изменении концентрации этого буфера. Еще одно преимущество использования буфера в том, что мы можем изучать эффект групп как $CO_2H$, так и $CO_2^-$. В обоих случаях результат почти всегда одинаков: ни уксусная кислота, ни ацетат-ион в заметной степени не катализируют гидролиз простого субстрата типа этилацетата. Мы не смогли обнаружить даже самой реакции, не говоря уже о механизме.

Тем не менее реакция безусловно возможна, хотя бы потому, что ферменты катализируют ее. Очевидно, в наших условиях ее скорость слишком мала для обнаружения. Одной из возможностей для ее увеличения могло бы быть повышение температуры, и действительно, многие реакции такого рода были впервые обнаружены при высоких температурах (100° и выше). Однако повышение

температуры с 25 или 37 до 100 °С для большинства из интересующих нас реакций повышает скорость реакции не более чем в $10^3$ раз. Для наблюдения реакций, идущих с подходящими для нас скоростями в мягких условиях, проще использовать более реакционноспособные субстраты.

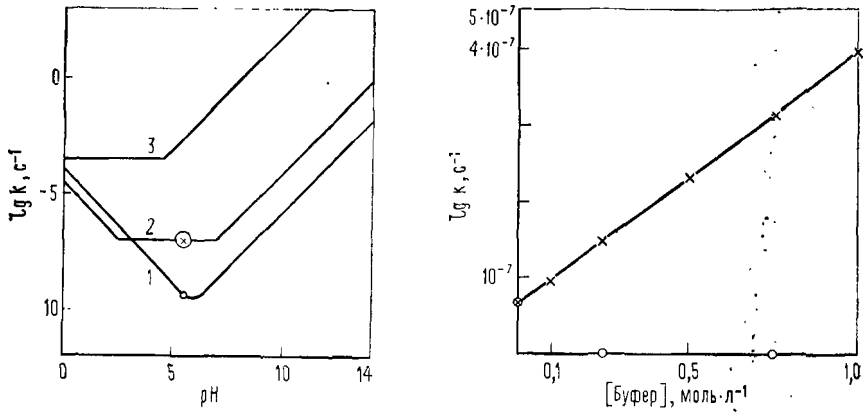



Рис. 24.1.3. Приблизительные зависимости константы скорости гидролиза этилацетата, фенилацетата и этилтрифторацетата (соответственно кривые 1—3) от pH при 25 °С.

Кривые *2* и *3* основаны на экстраполяциях к нулевой концентрации буфера (см. рис. 24.1.4).

Рис. 24.1.4. Зависимость константы скорости гидролиза фенилацетата (крестики) и этилацетата (кружки) от концентрации буфера уксусная кислота — ацетат.

Экстраполяция к нулевой концентрации буфера в реакции с фенилацетатом дает скорость спонтанного (или специфического катализируемого кислотой или основанием) гидролиза при данном pH(5,5) (крестик в кружке на зависимости $k$ от pH, см. рис. 24.1.3). Поскольку гидролиз этилацетата не катализируется буфером, точки с кружками только могут быть использованы при любой концентрации буфера.

Сложный эфир можно сделать более реакционноспособным, вводя электроноттягивающие заместители либо в ацильную часть, либо в уходящую группу. Рис. 24.1.3 иллюстрирует эти эффекты изменения скорости гидролиза от pH. Во всех случаях более электрофильный эфир несколько менее реакционноспособен к кислотному катализу, который для сильно электрофильных эфиров типа трифторацетатов вообще не удается зарегистрировать при pH выше 0 [19]. Такое соединение гораздо быстрее гидролизуется щелочью. Совершенно новой чертой является наличие независимого от pH участка в нейтральной области. Этот участок указывает на наличие спонтанной или катализируемой водой реакции. Эта реакция, по-видимому, слишком медленна по сравнению с катализируемыми $H_3O^+$ и $OH^-$ реакциями для того, чтобы проявиться при гидролизе простого соединения типа этилацетата даже при pH 5—7.

Вода не является мощным реагентом. Как кислота она слабее уксусной, а как основание и нуклеофил — слабее ацетат-иона. Поэтому, если вода может катализировать гидролиз сложного эфира



типа фенилацетата или этилтрифторацетата, мы вправе ожидать, что ацетатный буфер также способен на это. Повторим поэтому наш первый эксперимент с большей уверенностью, используя более реакционноспособный субстрат. В этом случае мы безусловно обнаружим, что скорость гидролиза сложного эфира *зависит от концентрации буфера*. Эта ситуация приведена на рис. 24.1.4, где показан график зависимости констант скорости гидролиза фенилацетата от концентрации буфера. График линеен относительно концентрации буфера, поэтому реакция имеет первый порядок либо по ацетату, либо по уксусной кислоте. Изменяя соотношение ацетат : уксусная кислота, можно легко определить, какое из этих двух соединений является активной формой. В данном случае буферы с большим содержанием ацетата более активны, поэтому активным катализатором является ацетат-ион.

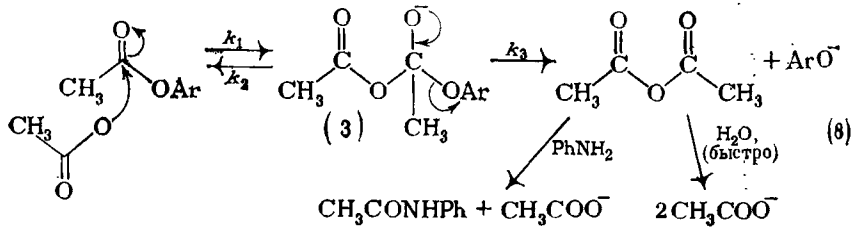
Итак, мы обнаружили нужный нам тип реакции. На этих относительно простых примерах можно детально выяснить механизм реакции. Более тщательная работа на системах этого типа позволила определить два типа механизмов, по которым карбоксильная группа может катализировать гидролиз реакционноспособных сложных эфиров. Оба этих механизма предусматривают участие карбоксилат-аниона.

Простейший механизм — *нуклеофильный катализ* {схема (8)}. Нуклеофильная атака арилацетата ацетатом вначале приводит к образованию продукта присоединения — тетраэдрического интермедиата, весьма нестабильного и не образующегося в значительных количествах, так как он может очень быстро распадаться либо за счет потери ацетата ($\kappa_2$) с образованием исходных веществ, либо с элиминированием арилоксида ($\kappa_3$). В последнем случае другим продуктом служит уксусный ангидрид, быстро гидролизующийся водой.

Образование ангидрида можно зарегистрировать, проводя реакцию в присутствии *низких* концентраций нуклеофильного агента, например анилина, который в условиях реакции не реагирует со сложным эфиром. Анилин — более сильный нуклеофильный агент по отношению к карбонильной группе, чем вода, и поэтому реакция протекает преимущественно с образованием ацетанилида [20], хотя скорость расхода сложного эфира не меняется.

Все пять функциональных групп в случае их расположения в активных центрах ферментов могут выступать в роли нуклеофилов. Они, как было показано, могут также действовать как нуклеофильные катализаторы в соответствующих модельных системах. Основные требования состоят в том, что образующийся интермедиат — ангидрид на схеме (8) — должен быть реакционноспособнее исходных соединений и нуклеофильный агент должен быстро замещать уходящую группу, т. е. $\kappa_3 \gg \kappa_2$ на схеме (8). В противном случае тетраэдрический интермедиат (**3**) будет просто распадаться на исходные вещества. Это требование ясно продемонстрировано на примере реакции, приведенной на схеме (8), гидролизе арил-

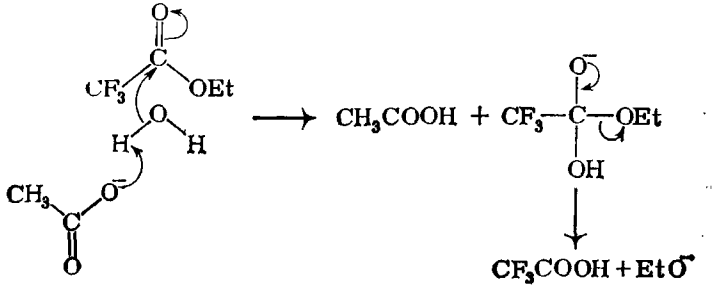
ацетатов, катализируемом ацетатом. Когда сложный эфир содержит очень хорошо уходящую группу, как в случае 2,4-динитрофенилацетата, метод слежения по анилину показывает, что реакция идет по механизму нуклеофильного катализа, ибо количество образующегося ацетанилида достаточно для такого вывода. В другом случае, как мы видели, ацетат не влияет на скорость гидролиза этилацетата. В этом случае уходящая группа, этоксид-ион, гораздо хуже ацетата, и нуклеофильный катализ не имеет места.




(8)

Второй тип механизма наблюдается в системах, где исключен нуклеофильный катализ. Например, гидролиз этилтрифторацетата катализируется ацетатом, хотя совершенно ясно, что в этих условиях ацетат не может замещать этоксид-ион. Такой механизм изображен на схеме (9) и известен как *общий основной катализ*.

В этом случае нуклеофильность *обобщенного основания* слишком слаба для протекания нуклеофильного катализа. Поэтому это основание способствует атаке молекулы воды по электрофильному центру. Удаляя протон из атакующей молекулы (которая в принципе может быть любой по нуклеофильности с диссоциируемым протоном в нуклеофильном центре), оно повышает основность и тем самым реакционную способность нуклеофила в переходном состоянии. С этой точки зрения для гидролиза сложного эфира, например по схеме (9), атака водой, катализируемая обобщенным основанием, мало отличается от атаки гидроксид-ионом. Конечно, существует заметная разница между простой нуклеофильной атакой и атакой, катализируемой обобщенным основанием. Эта разница заключается в том, что в последнем случае реакция тримолекулярна и поэтому энтропийно гораздо менее выгодна (энтропии активации для бимолекулярных реакций в водных растворах составляют примерно —80 Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$, тогда как для тримолекуляр-




(9)



ных процессов ее значение лежит в интервале —140 ... —200 Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$) [80].

Экспериментально не всегда просто отличить нуклеофильный катализ от общего основного. В случае сольволиза оба этих механизма имеют второй порядок — первый порядок по субстрату и первый — по обобщенному основанию или нуклеофилу, т. е. оба кинетически проявляются как общий основной катализ. Механизм общего основного катализа можно отличить от нуклеофильного на основе следующих пяти критериев. Все эти критерии необходимо последовательно применять до тех пор, пока один из них [обычно (а) или (б)] не дает однозначного ответа.

(а) Обнаружение или регистрация интермедиата является доказательством, что хотя бы часть наблюдаемой реакции идет по нуклеофильному механизму.

(б) Существенный дейтериевый изотопный эффект растворителя ($k_H/k_D \geqslant 2$) является доказательством, что на скоростьопределяющей стадии происходит разрыв связи с водородом, и таким образом, что это механизм общего основного катализа.

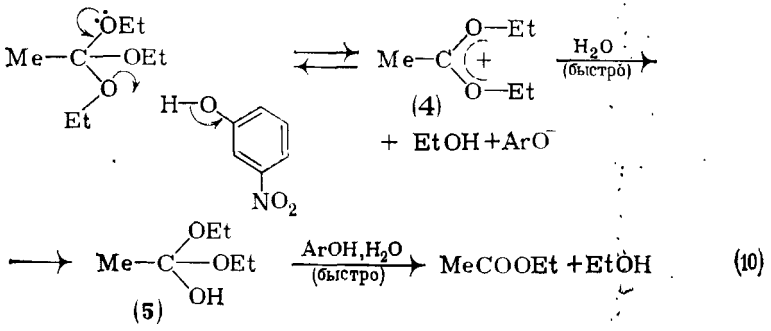
(в) Большая отрицательная энтропия активации (—140 Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$ или еще менее) указывает на тримолекулярное переходное состояние и, тем самым, на общий основной катализ.

(г) Если график Бренстеда (зависимость $\lg k_{кат}$ от p$K_a$ катализатора) является четкой прямой линией, то по-видимому, это общий основной катализ. Нуклеофильные реакции гораздо более чувствительны к стерическим эффектам, что ясно выражается в виде разброса точек на графиках этого типа.

(д) Если p$K_a$ сопряженной кислоты уходящей группы много выше соответствующей величины для нуклеофила, то ее замещение маловероятно. В таком случае любой наблюдаемый катализ скорее всего включает механизм общего основного.

Полезное обобщение, вытекающее из рассмотрения двух этих механизмов, заключается в том, что для данной ацильной группы механизм будет меняться от нуклеофильного до общего основного по мере изменения уходящей группы. Поэтому катализ ацетатом (p$K_a$ 4,76) на 100 % нуклеофилен для реакции с 2,4-динитрофенилацетатом (p$K_a$ уходящей группы 4,11), но на 100 % общий основной в случае фенилацетата (p$K_a$ фенола 10,0). Для реакции с нитрофенилацетатом (p$K_a$ уходящей группы равно 7,14) оба механизма одновременно присутствуют в сравнимых пропорциях [20]. Нуклеофил может замещать уходящую группу, p$K_a$ которой на 2—3 единицы выше его собственного p$K_a$, прежде чем общий основной катализ становится предпочтительным. Это явление может служить мерой выигрыша в энтропии бимолекулярного нуклеофильного каталитического механизма над общим основным. В простых системах при прочих равных условиях предпочтителен нуклеофильный катализ. В ферментативных реакциях энтропийные факторы такого рода играют гораздо меньшую роль, как мы убедимся ниже (см. разд. 24.1.5).

Нуклеофильный и общий основной катализ составляют два из трех механизмов, выявленных при работе в модельных системах. Третий механизм — это *общий кислотный катализ*. Этот механизм обычно не наблюдается в реакциях сложных эфиров, но имеет большое значение при гидролизе ортоэфиров и некоторых ацеталей [22]. Так, гидролиз этилортоацетата (4) катализируется кислым компонентом нитрофенольных буферов [23] и, как принято считать, протекает по механизму общего кислотного катализа [22] {схема (10)}. Согласно этому механизму, обратному общему основному катализу {превращение (4) в (5) и затем обратно (5) в (4) через одно и то же переходное состояние}, катализатор посредством протонирования превращает плохую уходящую группу в хорошую. В отличие от специфического кислотного катализа, который зависит только от pH и не зависит от концентрации обобщенной кислоты (в данном случае фенола), здесь стадии переноса протона и разрыва связи C—O согласованы.




(10)

Тетраэдрические интермедиаты, возникающие в процессе гидролиза сложных эфиров, представляют собой полуортоэфиры, например $MeC(OH)_2OEt$ при гидролизе этилацетата. Мы можем поэтому предполагать общий кислотный катализ, присущий гидролизу интермедиатов этого типа, на второй стадии этой и подобных ей реакций. Такой катализ обычно не удается наблюдать просто потому, что первая стадия общего основного катализа, безусловно, определяет скорость всего процесса. Распад тетраэдрического интермедиата происходит, таким образом, слишком быстро, чтобы вносить заметный вклад в кинетику реакции. С другой стороны, в реакциях гидролиза, катализируемых ферментами, стадия, определяющая скорость процесса, непременно будет ускорена, и другие, обычно быстрые процессы, должны также катализироваться. В противном случае они будут понижать эффективность всего процесса.

Установлено, что трем этим механизмам — общему кислотному, общему основному и нуклеофильному — подчиняются реакции, наблюдаемые между всеми пятью характерными для ферментов функциональными группами и всеми обычными группировками субстратов. Отсюда следует вывод, что реакции, протекающие внутри фермент-субстратного комплекса, подчиняются этим механизмам. Поэтому механизмы действия ферментов обсуждаются в рамках этих трех основных механизмов. Слабым местом в этой концепции, однако, является тот факт, что она опирается исключительно на данные, полученные в условиях активации субстрата. Мы, несомненно, должны предпочитать результаты, доказывающие, что те же механизмы характерны для реакций с неактивированными субстратами в модельных системах. Эти результаты получают при изучении внутримолекулярных реакций.

### 24.1.2.3. Внутримолекуляриый катализ

В тех случаях, когда каталитические и субстратные группы принадлежат одной и той же молекуле, может иметь место кардинальное увеличение реакционной способности [24, 25]. В табл. 24.1.2 проиллюстрирован эффект введения карбоксильной группы в ряд ароматических сложных эфиров. Скорости гидролиза этих соединений измеряли при очень низких концентрациях ($<10^{-4}$ моль·л$^{-1}$). Присутствие карбоксилсодержащих соединений, например ацетата, в таких низких концентрациях не должно в принципе существенно влиять на скорость реакции. Очевидно, что гидролиз сложноэфирной группы катализируется соседней карбоксилатной группой (активна, как обычно, ионизованная форма). «Эффективная мольность» этой группы несомненно много выше ее истинной концентрации в растворе. Этот параметр (последняя колонка в табл. 24.1.2) является наилучшей мерой эффективности данной группы во внутримолекулярном катализе по сравнению с межмолекулярным. Эта величина равна отношению констант первого и второго порядков и имеет в силу этого размерность мольности. Она может быть определена как мольность внешнего катализатора (в данном случае ацетата), необходимая для протекания реакции с той же скоростью, с какой она идет при наличии катализатора, «встроенного» в субстрат. Все эффективные мольности в табл. 24.1.2. превышают предел растворимости ацетата в воде, так что эта величина (мольность внешнего катализатора) является гипотетической. Данный параметр учитывает внутреннюю реакционную способность каталитической группы: в рассматриваемой системе эффективная мольность хорошего катализатора, по-видимому, совпадает с соответствующей величиной для плохого катализатора (ср. эффективные мольности групп $Me_2N$— и $—CO_2^-$ для номеров 2 и 6, а также 3 и 7, табл. 24.1.2)*. В связи с этим иногда более показательным параметром эффективности катализа являет-

* Данные по катализу имидазолом могли бы быть более интересными, чем для диметиламиногруппы, однако кинетические осложнения [26] затрудняют прямое сравнение. Известно, однако, что имидазольная группа обладает большей реакционной способностью в отношении карбонила сложноэфирной группы [26, 27].

*Таблица 24.1.2. Относительные скорости гидролиза арильных сложных эфиров в воде при pH, близком 7, и 25 °C*

| № | Сложный эфир | $k_{отн}$ * | Эффективная мольность **, моль/л |
|---|---|---|---|
| 1. | $PhO_2CMe$ | 1 | |
| 2. | $PhO_2C(CH_2)_3CO_2^-$ [25a] | 150 | 25 |
| 3. | $PhO_2C(CH_2)_2CO_2^-$ [25a] | 23 000 | 4000 |
| 4. | $PhO_2CCH_2CO_2^-$ [33] | 50 | 9 |
| 5. | $PhO_2CC_6H_4CO_2^-$-2 [33] | $1{,}1 \cdot 10^6$ | $2 \cdot 10^5$ |
| 6. | $PhO_2C(CH_2)_4NMe_2$ [28] | $10^6$ | 490 |
| 7. | $PhO_2C(CH_2)_3NMe_2$ [28] | $2{,}5 \cdot 10^6$ | 1260 |
| 8. | $MeO_2CC_6H_4CO_2^-$-2 | 50 | 9 |

* $k_{гидр}/k^0_{гидр}$, где $k^0_{гидр}$ — константа скорости первого порядка pH-независимой (катализируемой водой) реакции гидролиза фенилацетата ($6{,}6 \cdot 10^{-8}$ с$^{-1}$) [20].

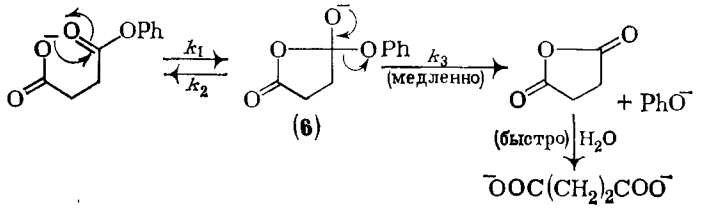
** $k_{гидр}/k_2$, где $k_2$ — константа скорости второго порядка катализа ацетатом [20] или триметиламином [28] гидролиза фенилацетата.

ся отношение скоростей реакций в присутствии и в отсутствие внутримолекулярного катализатора. При таком сравнении более эффективный катализатор будет давать большее ускорение реакции (ср. $k_{отн}$ для тех же пар субстратов 2 и 6, а также 3 и 7 в табл. 24.1.2).

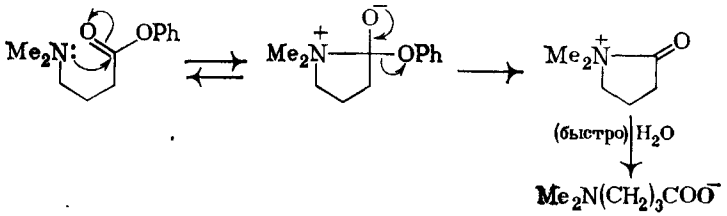
Все внутримолекулярные реакции, приведенные в табл. 24.1.2, протекают в соответствии с механизмом нуклеофильного катализа {схемы (11), (11а)}. Этот механизм ожидается для внутримолекулярного катализа диметиламиногруппой, так как межмолекулярный катализ гидролиза фенилацетата сильным основанием — триметиламином, также нуклеофилен (реакции 6 и 7 табл. 24.1.2). (Значения констант Гаммета ρ для ряда уходящих групп, представляющих собой замещенные фенолы, равны 2,2 в случае межмолекулярной реакции с триэтиламином; в случае внутримолекулярного процесса эти параметры очень близки и составляют 2,5 [28]. Катализ гидролиза фенилацетата ацетат-ионом, с другой стороны, предполагает участие ацетата в качестве общего основания. Внутримолекулярное протекание реакции делает, очевидно, нуклеофильный механизм предпочтительным в сравнении с общим основным. Возможное объяснение этому заключено в структуре тетраэдрических интермедиатов, например (6) {см. схему 11}. Группа $CO_2^-$ является лучшей уходящей группой по сравнению с $PhO^-$ (т. е. $k_2 > k_3$) в силу более низкой основности, вследствие чего скоростьопределяющей стадией реакции является распад (6) на продукты ($k_3$). На этой стадии происходит высвобождение феноксид-иона и, таким образом, из одной молекулы образуются две. Для такого процесса характерна особенно выгодная энтропия ак-



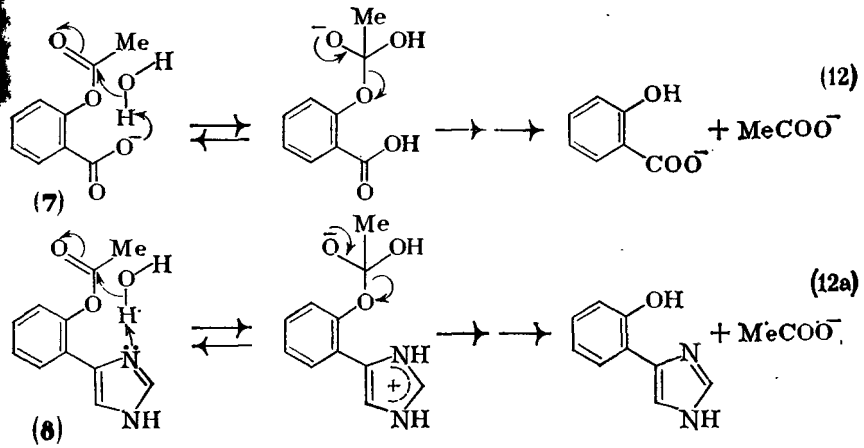
тивации. В тех случаях, когда удаление уходящей группы происходит каким-либо другим путем, для внутримолекулярных реакций также наблюдается общий основной катализ [11, 12]. В таких реакциях с участием аспирина [24, 29] (7) {схема (12)} и его имидазольного аналога (8) {схема (12а)} [30], хотя и возможен нуклеофильный катализ, однако общий основной механизм предпочтительнее по тем же причинам, что и в случае межмолекулярных реакций (подробнее см. выше на с. 462, а также [24]).




(11)




(11а)

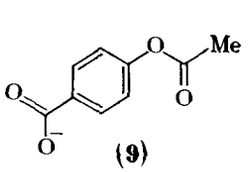



(12)

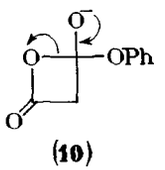
(12а)

За исключением специальных случаев такого рода общим правилом является совпадение механизма внутримолекулярной реакции с соответствующей межмолекулярной реакцией, проходящей между теми же группами. Обычными исключениями из этого правила являются те случаи, когда группы вообще не могут вступать во взаимодействие друг с другом ввиду структурных особенностей молекулы. Очевидно, что карбоксильная группа ацетата

*n*-гидроксибензойной кислоты (**9**) не может катализировать гидролиз сложноэфирной группы, так как не может достаточно сблизиться с последней. Гидролиз (**9**) по существу представляет удобную контрольную систему для гидролиза аспирина, так как электронные эффекты группы $CO_2^-$ в *пара*-положении те же, что и у *орто*-карбоксилата. Более запутанным, но все же идентифицируемым исключением является гидролиз монофенилового эфира малоновой кислоты (см. позицию 4 в табл. 24.1.2). В этом случае нуклеофильный каталитический механизм должен предполагать участие четырехчленного циклического ангидрида. В обратимых реакциях соединения с четырехчленными циклами, как правило, не образуются, поэтому тетраэдрический интермедиат (**10**) будет исключительно превращаться в исходное соединение. Поэтому реакция должна проходить по механизму внутримолекулярного общего основного катализа, что и находит подтверждение при рассмотрении ее кинетических параметров [31].

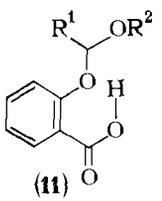



(**9**)

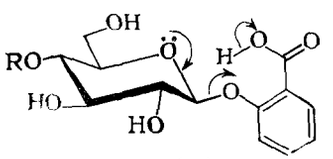



(**10**)

Внутримолекулярный общий кислотный катализ удобно проиллюстрировать на примере гидролиза ацеталей (**11**), образованных из салициловой кислоты и альдегидов, в качестве которых могут выступать простые соединения типа формальдегида и бензальдегида или альдегидные формы углеводов. Реакции последних (**12**) представляют особый интерес в связи с изучением механизма действия ферментов, гидролизующих гликозиды [24, 32] (см. разд. 24.1.4.4).




(**11**)



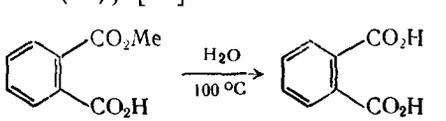

(**12**)

Зависимость реакционной способности от структуры во внутримолекулярном катализе относительно проста. В отсутствие напряжения две группы одной молекулы будут реагировать друг с другом тем более эффективно, чем ближе друг к другу они расположены. Если каталитические и субстратные группы соединены друг с другом конформационно мобильной цепочкой атомов, они будут сталкиваться тем чаще, чем короче эта цепочка. Для достаточно длинных цепочек такие столкновения будут происходить немногим чаще, чем в случае, если бы эти группы принадлежали разным молекулам. Однако в тех случаях, когда в реакции принимают участие 8-, 7-, 6- и 5-членные циклические переходные состояния, частота таких столкновений резко возрастает. Наблюдаемые факторы скоростей зависят от природы участвующих групп: в случае взаимодействий карбоксилат-сложный эфир (см. табл. 24.1.2) введение в цепочку дополнительной группы $CH_2$ понижает эффективность катализа примерно в 200 раз. Эффективность, с другой стороны, возрастает в случае конформационно жестких систем, как, например, для сложных эфиров фталевой кислоты, где каталитическая и субстратная группы постоянно сближены.

Эти простые эффекты сближения находят свое отражение в энтропии активации реакции. Величины энтропий активации эффективных внутримолекулярных реакций примерно на 80 Дж·моль$^{-1}$·К$^{-1}$ более положительны, чем те же параметры соответствующих межмолекулярных процессов, так как включение реагирующих групп в одну и ту же молекулу понижает молекулярность реакции до единицы. Энтальпии активации, с другой стороны, в этих случаях не обязательно сильно различаются. Известно много примеров, когда последние параметры для внутри- и межмолекулярных реакций совпадают в пределах ошибки эксперимента.

В тех случаях, однако, когда в основном или переходном состояниях внутримолекулярной реакции имеет место напряжение, энтальпия активации реакции изменяется. Неправильная жесткая конформация может препятствовать протеканию реакции или вовсе ее предотвращать. Слишком сильное сближение групп также может давать подобный эффект, как в случае монофенилового эфира малоновой кислоты (см. выше и табл. 24.1.2). В разделе 24.1.5 мы вернемся к этому вопросу.

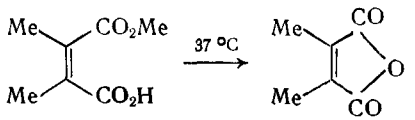
Все рассмотренные до сих пор внутримолекулярные реакции протекали с участием активированных субстратных групп и представляли собой просто внутримолекулярные аналоги реакций, рассмотренных в предыдущем разделе. Перейдем теперь к реакциям с неактивированными субстратными группами. Из рассмотренных в табл. 24.1.2 примеров систем сложный эфир-карбоксил наибольшей реакционной способностью в системе обладает моноэфир фталевой кислоты. Рассмотрим теперь гидролиз не монофенилового, а монометилового эфира этого соединения. Мы вновь обнаружим катализ, хотя реакция протекает гораздо медленнее. Период полупревращения в случае гидролиза монофенилфталат-аниона составляет примерно 30 мин при 30 °С, в то время как монометилфталат совершенно стабилен даже при 100 °С. В этом случае, однако, гидролизуется *кислотная* форма с периодом полупревращения около 1 ч при 100 °С {схема (13)} [33].




(**13**)

Каким бы ни был в данном случае механизм реакции, кинетически это внутримолекулярный общий кислотный катализ карбоксильной группой, поскольку эта группа входит в уравнение скорости реакции. Здесь мы впервые сталкиваемся с общим кислотным катализом гидролиза сложного эфира, причем неактивированного. Этот пример иллюстрирует важный принцип: с повышением реакционной способности исследуемой системы мы вправе ожидать появления новых механизмов — или по крайней мере новых скоростьопределяющих стадий, — которые в случае менее реакционноспособных соединений не наблюдаются. Поскольку областью наших интересов является в первую очередь ферментативный катализ, где скорости химических реакций намного превышают рассмотренные до сих пор, становится ясной необходимость изучения возможно более реакционноспособных простых систем.

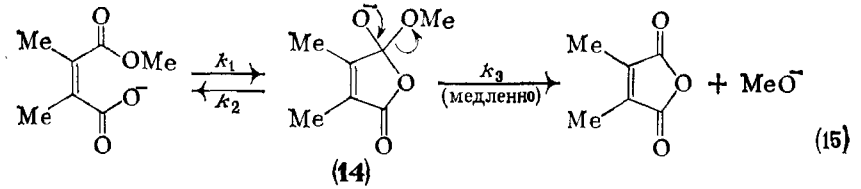
В случае гидролиза сложных эфиров, катализируемого карбоксильной группой, наиболее реакционноспособными из известных соединений являются производные диметилмалеиновой кислоты. Монометиловый эфир диметилмалеиновой кислоты (**13**) гидролизуется с периодом полупревращения всего 30 с при 37 °С [34], по-видимому по тому же механизму, что и монометиловый эфир фталевой кислоты; продуктом является диметилмалеиновый ангидрид {схема (14)}. В этом случае, однако, система настолько реакционноспособна, что наблюдается также реакция аниона. Эфир (**13**) при высоких pH гидролизуется с периодом полупревращения 2 ч при 37 °С {схема (15)}. Здесь мы впервые сталкиваемся с внутримолекулярным катализом неактивированного сложного эфира ионизованной карбоксильной группой. Механизм этого процесса оказывается весьма простым [34], а именно: внутримолекулярный катализ карбоксилатной группой {схема (15)} *через* тетраэдрический интермедиат (**14**), для которого характерна наименьшая сопротивляемость к элиминированию алкоксид-иона из всех других рассмотренных нами ранее интермедиатов. Тем не менее нет сомнения, что элиминирование метоксида является скоростьопределяющей стадией реакции. Эта реакция (скоростьопределяющее отщепление плохой уходящей группы из полуортоэфира), как мы и полагали, показывает признаки общего кислотного катализа (см. с. 464). Гидролиз монометилдиметилмалеат-аниона действительно подчиняется механизму общего кислотного катализа (например, катализ уксусной кислотой *) [16].




(13) (14)

* И, следовательно, $H_3O^+$. Поскольку $H_3O^+$-катализируемая реакция аниона сложного эфира кинетически неотличима от реакции его кислоты, можно предположить, что механизм катализа гидролиза этой формы (**13**) включает общий кислотный катализ распада тетраэдрического интермедиата (**14**) ионом $H_3O^+$.






(14) (15)

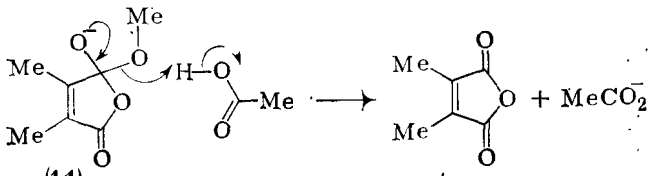
Механизм этого процесса представляет собой, таким образом, общий кислотный катализ внутримолекулярного нуклеофильного катализа и подразумевает на скоростьопределяющей стадии реакции одновременное действие двух каталитических групп. Одна из этих групп — соседний карбоксилат-ион, вторая — неионизованная карбоксильная группа. Тщательное изучение пути, по которому карбоксилат может катализировать гидролиз сложного эфира, указывает на особое требование ко второй каталитической группе в случае очень реакционноспособной системы и позволяет предположить механизм, по которому будет действовать фермент, катализирующий гидролиз сложного эфира. Перейдем теперь к рассмотрению особых свойств систем с двумя каталитическими группами.

### 24.1.2.4. Бифункциональный катализ

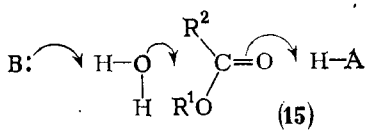
В активных центрах ферментов содержится обычно две или более каталитических групп. Они могут воздействовать на субстратную группу двумя совершенно различными путями. Один из них заключается в том, что нуклеофильный, или общий основной катализ протекает одновременно с общим кислотным, в одном и том же переходном состоянии. Механизм этого типа, приложимый к гидролизу сложных эфиров, представлен в (**15**). Этот механизм часто постулировался в качестве вероятной модели катализа более чем одной функциональной группой, однако при исследовании модельных систем не было получено серьезных свидетельств в его поддержку [32]. Для реакций, подверженных нуклеофильному или общему основному катализу, общий кислотный катализ не характерен (и наоборот). Другой способ предусматривает действие двух каталитических групп по отдельности на различных стадиях сложной реакции. Если одна из групп специфично действует на скоростьопределяющей стадии такой реакции, в результате чего скоростьопределяющей становится уже следующая стадия, то именно на последней необходимо действие второй каталитической группы (примером такого процесса является описанный в предыдущем разделе гидролиз сложных эфиров диметилмалеиновой кислоты).

Мы не можем наблюдать проявления бифункционального катализа первого типа, как в (**15**), в простых межмолекулярных реакциях, так как энтропия активации требуемого столкновения трех

или четырех частиц будет явно невыгодна. В связи с этим типичный экспериментальный подход заключается в изучении эффекта введения второй каталитической группы в известную внутримолекулярную реакцию. Результаты такого подхода лучше всего проиллюстрировать на примере изменений, наблюдаемых в зависимостях скорости реакции от pH.




(16)




Как мы уже убедились, в случае гидролиза сложного эфира, катализируемого соседней карбоксильной группой, активной формой внутримолекулярного катализатора является $CO_2^-$. Поэтому соединение, содержащее сложноэфирную и ионизованную кислотную группы, гидролизуется быстрее соответствующей недиссоциированной формы. Зависимость константы скорости гидролиза от pH представлена на рис. 24.1.5. При высоких и низких значениях pH наблюдаются реакции специфического кислотного и основного катализа. Скорость реакции в pH-независимой области (A) выше, чем в случае отсутствия карбоксильной группы в этом соединении. Величина такого ускорения [(B) на рис. 24.1.5] является мерой эффективности внутримолекулярного катализа. Если группа $CO_2H$ не катализирует реакцию, то при низких значениях pH ускорения не наблюдается. Поэтому в области $pK_a$ группы $CO_2H$ с понижением pH скорость реакции падает пропорционально понижению концентрации реакционноспособной ионизованной формы. В другом случае, если группа $CO_2H$, напротив, активна, а $CO_2^-$ неактивна или менее активна, скорость реакции возрастает при низких значениях pH (рис. 24.1.6). Таким образом, по виду pH-зависимости можно сделать вывод об относительной реакционной способности двух ионных форм каталитической группы, а также о ее константе диссоциации.

В случае введения второй каталитической группы необходимо рассматривать реакционную способность трех различных ионных форм {схема (17)}.

$$H_2A \overset{K_1}{\rightleftarrows} HA^- \overset{K_2}{\rightleftarrows} A^{2-} \qquad (17)$$

Если реакционноспособной является только недиссоциированная форма $H_2A$, то для нее наблюдается pH-зависимость, аналогичная изображенной на рис. 24.1.6. Если реагирует только $A^{2-}$, то



форма кривой близка к изображенной на рис. 24.1.5, так как концентрации этих форм зависят от pH в основном так же, как в случае сопряженной кислоты и основания соответствующей одноосновной кислоты (рис. 24.1.7). Концентрация моноаниона $HA^-$ зависит от pH совершенно по-другому, повышаясь от нуля при очень

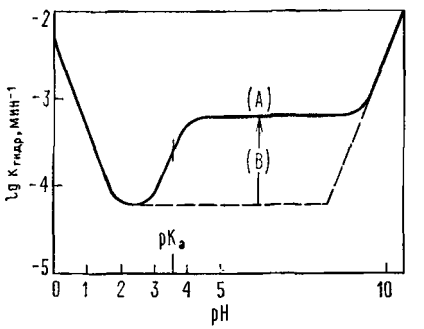



Рис. 24.1.5. Катализ группой $CO_2^-$. Зависимость гидролиза аспирина (7) от pH [29] при 39 °C.

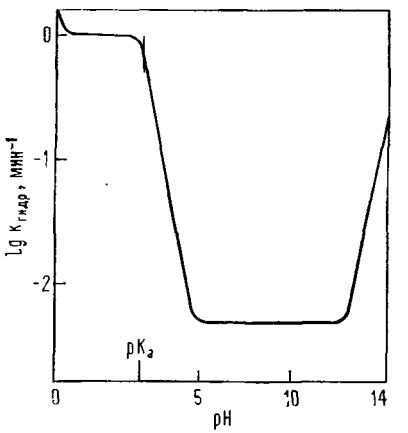



Рис. 24.1.6. Катализ группой $CO_2H$. Зависимость [34] гидролиза метилдиметилмалеата от pH при 39 °C.

высоких и очень низких значениях pH к максимуму, лежащему посередине между первым и вторым $pK_a$ (рис. 24.1.7, кривая 3). Кривые на рис. 24.1.7 построены для случая, когда два $pK_a$ различаются между собой примерно на одну единицу. Из колоколообразной кривой на рис. 24.1.7 следует, что концентрация моноаниона в максимуме составляет 61 % от исходной концентрации добавленного соединения. Если величины $pK_a$ различаются меньше, эта пропорция понижается (до минимума в 33 %, когда $K_1 = K_2$). При $pK_{a1}$ и $pK_{a2}$, значительно удаленных друг от друга, соединение может полностью перейти в форму моноаниона, в результате чего возникает кривая pH-зависимости с плоской вершиной [35].

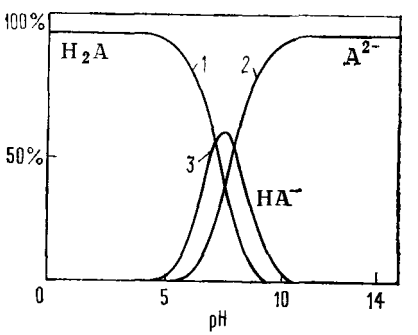


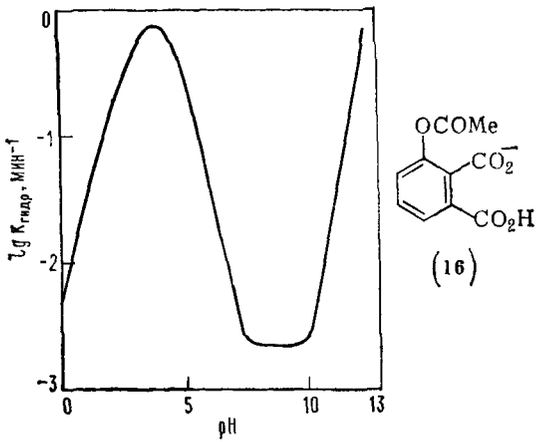

Рис. 24.1.7. Зависимость от pH содержания каждой из трех форм двухосновной кислоты $H_2A$ с кажущимися $pK_a$ 7 и 8

Общая зависимость скорости гидролиза такого соединения от pH представляет собой сумму вкладов гидролиза всех его возможных ионных форм {выражение (18)} (два последних слагаемых

соответствуют реакциям специфического кислотного и основного катализа)*

$$v = \kappa_0 [H_2A] + \kappa_1 [HA^-] + \kappa_2 [A^{2-}] + \kappa_H [H_2A] + \kappa_{OH} [A^{2-}] \quad (18)$$

Форма pH-зависимости определяется, таким образом, тем, какое из слагаемых является преобладающим. Так, если $\kappa_0 \gg \kappa_1, \kappa_2$, кривая имеет вид, аналогичный рис. 24.1.6. Если преобладает процесс с константой $\kappa_1$, реакция идет в соответствии с концентрацией $[HA^-]$, в результате чего возникает колоколообразная pH-зависимость. Примером pH-зависимости этого типа является гидролиз 3-ацетоксифталата (рис. 24.1.8), который определяется реакцией







(16)

Рис. 24.1.8. Катализ одновременно группами $CO_2H$ и $CO_2^-$. Зависимость гидролиза 3-ацетоксифталата (16) от pH при 25 °C [36].

моноаниона (16), поскольку наиболее эффективный механизм предполагает участие одной карбоксильной группы в форме $CO_2^-$, а второй — в форме $CO_2H$ [24, 36].

### 24.1.2.5. Катализ металлами

Многие ферменты содержат прочно связанные ионы металлов (обычно переходных). Еще большее число ферментов активируется определенными металлами. Все содержащиеся в белках функциональные группы являются потенциальными лигандами, поэтому возможно образование широкого спектра комплексов, в которых металл связан с кислородом, азотом или серой, выступающими в качестве доноров [37].

* Реакции других ионных форм, специфически катализируемые кислотой или основанием, кинетически неотличимы от одного из трех первых слагаемых.



Свойства такого металла в первую очередь зависят от характера связанных лигандов, но обычно он действует как кислота Льюиса или как электрофильный катализатор *, акцептируя и тем самым оттягивая электроны с донора, который в результате становится более электрофильным. Этот процесс в некоторых чертах напоминает общий кислотный катализ, однако соответствующий ион металла значительно многообразнее протона по своим свойствам и может быть более эффективен в катализе по крайней мере по трем причинам. Во-первых, концентрация электрофила может быть много выше концентрации протона, которая при pH выше 7 составляет менее $10^{-7}$ моль·л$^{-1}$. Во-вторых, ион металла может координировать более одного лиганда. Вследствие этого его эффективная концентрация при связывании вблизи субстратной группы может повышаться, подобно любой другой группе, путем, недоступным для протона. В-третьих, положительный заряд на ионе металла может вдвое или втрое превышать таковой для протона и вследствие этого не нейтрализовываться единственным отрицательно заряженным лигандом. Отсюда и возникает определение ионов металлов как «суперкислотных» катализаторов.

Хорошо описанные примеры электрофильного катализа металлами включают реакции декарбоксилирования и гидролиза производных аминокислот. Декарбоксилирование оксалилацетата катализируется некоторыми металлоферментами и ионами металлов в водном растворе. Наиболее исследован катализ ионами Cu(II) [39], включающий образование комплексов металл-оксалилацетат (17) {схема (19)}.

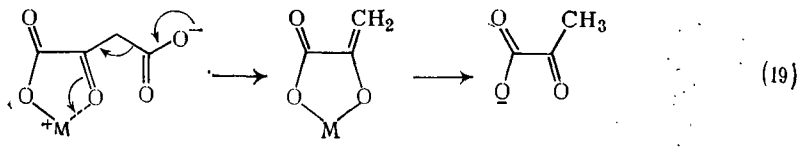
В начале комплексованию подвергается α-карбоксильная группа (если последняя этерифицирована, реакция не идет). В результате этого металл приобретает способность связывать более слабый кислородный донор — кетогруппу, делая последнюю более электрофильной, и тем самым способствует декарбоксилированию. Комплексообразование способствует также енолизации. В первых исследованиях, ясно продемонстрировавших, что пируват первоначально образуется в енольной форме (18), был использован диметилоксалилацетат, неспособный к енолизации [39а].

Очень похожий процесс имеет место и при катализируемой ионом металла нуклеофильной атаке производных аминокислот. Здесь за первоначальной стадией комплексообразования со свободной аминогруппой следует образование хелата с карбонильным кислородом того же аминокислотного остатка (19) (в реакции пептидов, таким образом, специфически участвует их *N*-конец). В силу этого карбонильная группа активируется по отношению к нуклеофильной атаке более чем в $10^6$ раз ** [40].

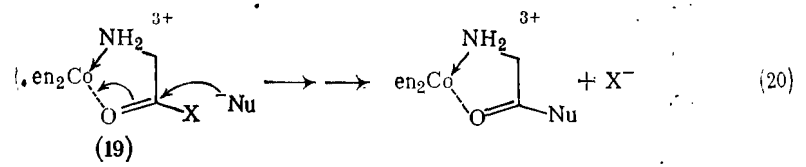
* Реакции кобамидных ферментов [38] представляют собой редкий пример противоположного процесса, где металл (Co) действует в качестве нуклеофила.

** Наиболее предпочтительным для этого является октаэдрический Co(III), так как лабильность лигандов осложняет работу с другими, например двухвалентными, металлами.

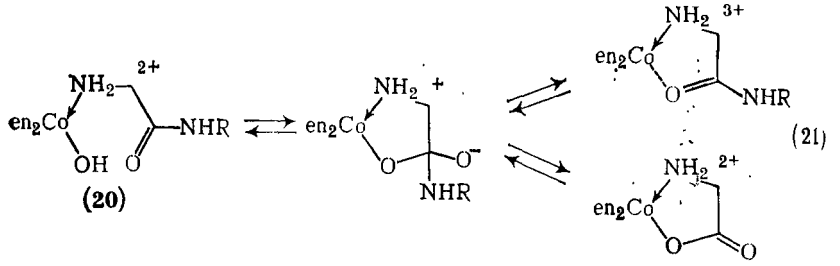
Другой, также очень эффективный механизм гидролиза наблюдается, когда производное аминокислоты связывается одной связью, в то время как другое координационное положение остается заполненным $H_2O$ или $^-OH$. В этом случае внутримолекулярная атака (20) связанным гидроксид-ионом может дать ускорение по сравнению с бимолекулярной атакой примерно в $10^{10}$ раз [41].



(17) (18) (19)



(19) (20)



(20) (21)

Оба этих механизма, вероятно, существенны для ферментативных реакций, когда стабильность комплексов в них может контролироваться трехмерной структурой белка (в известной степени справедливо противоположное утверждение, поскольку сведение лигандов из различных участков цепи в координационную сферу иона металла может играть структурирующую роль).

Наконец, ионы металлов играют очень важную роль агентов транспорта электронов [37], в особенности в одноэлектронных переносах, где обычно используются окислительно-восстановительные системы типа $Fe(II) \rightleftarrows Fe(III)$ и $Cu(I) \rightleftarrows Cu(II)$. Окислительно-восстановительный потенциал является чувствительной функцией связывания лигандов. Во многих случаях (гемоглобин, цитохромы, хлорофилл, витамин $B_{12}$) металл комплексуется не только с белком, но и с макроциклическими тетрадентатными лигандами (например, порфирин в геме), которые оставляют свободным только одно координационное место с весьма специфическими и тщательно контролируемыми свойствами [42].



### 24.1.3. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ФЕРМЕНТАМИ

Мы начали эту часть, решив попытаться выяснить механизм действия ферментов как проблему механизма любой другой органической реакции. Каталитические механизмы, используемые ферментами, можно, безусловно, рассматривать в терминах взаимодействия небольшого числа функциональных групп внутри фермент-субстратного комплекса. Однако немалую трудность представляет выяснение того, какие именно группы фермента участвуют в катализе. Белок содержит множество функциональных групп, избирательно реагирующих с большинством реагентов. Для того, чтобы специфически затронуть группы активного центра, можно полагаться только на реакции с субстратами. Поэтому первым важным шагом в изучении специфической ферментативной реакции является идентификация функциональных групп, вовлеченных в каталитический механизм.

#### 24.1.3.1. Идентификация каталитических групп

Простейшим подходом является определение зависимости константы скорости данной реакции от pH. Скорости всех ферментативных реакций зависят от pH среды и для большинства характерны колоколообразные зависимости с четко выраженным оптимумом pH (рис. 24.1.9). Факт, что определенная ионная форма фермента должна быть наиболее активной, не является удивительным, и так как белок содержит множество ионизуемых групп, естественно, что активность должна падать при более высоких или более низких значениях pH. Тем не менее активность в общем определяется состоянием ионизации индивидуальных групп в активном центре или вблизи него. Мы уже видели (см. разд. 24.1.2.4), что колоколообразная pH-зависимость объясняется механизмом только с двумя ионизованными группами и как форма зависимости зависит от значений $pK_a$ этих групп. Возможно анализировать формы pH-зависимостей ферментативных реакций [43], предполагая, что они отра-

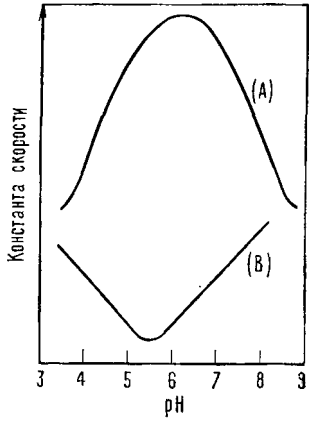



Рис. 24.1.9. Зависимость ферментативного гидролиза от pH.

Кривая (A) — колоколообразная зависимость реакции гидролиза этилового эфира *N*-бензоиларгинина, катализируемой папаином; построена по параметру $\kappa_{кат}/K_м$. Кривая (B) — ожидаемая pH-зависимость гидролиза этого сложного эфира. Ясно виден контраст между ферментативным и специфическим кислотно-основным катализом. Масштаб в условных единицах, однако ферментативная реакция, естественно, протекает на много порядков быстрее.

*Таблица 24.1.3. Влияние окружения на константы диссоциации групп*

| (1) Влияние среды (43а) | $pK_a$ | |
|---|---|---|
| | в воде | в 90%-ном EtOH |
| $CH_3CO_2H$ | 4,7 | 7,1 |
| $HO_2C$⟋⟍$^+NH_3$ | 2,35<br>9,8 | 3,8<br>10,0 |
| $EtNH_3^+$ | 10,8 | 9,8 |

| (2) Влияние Н-связывания (43б) | $pK_1$ | $pK_2$ |
|---|---|---|
| $HO_2C$⟋⟍$CO_2H$ | 4,19 | 5,54 |
| $HO_2C$(CMe$_3$)(CO$_2$H)CMe$_3$ | 2,20 | 10,3 |
| $HO_2C$⟋=⟍$CO_2H$ | 3,02 | 4,38 |
| $HO_2C$⟋=⟍$CO_2H$ | 1,92 | 6,34 |
| $CO_2H$, $CO_2H$ | 1,12 | 7,63 |

жают ионизацию специфических функциональных групп, и определять значения их $pK_a$. Поскольку характеристические значения $pK_a$ определяют пять потенциально возможных каталитических групп, полученные числовые значения могут быть существенными для идентификации каталитической группы. Например, кажущееся значение $pK_a$ около 7 может предполагать наличие имидазольной группы гистидина в активном центре.

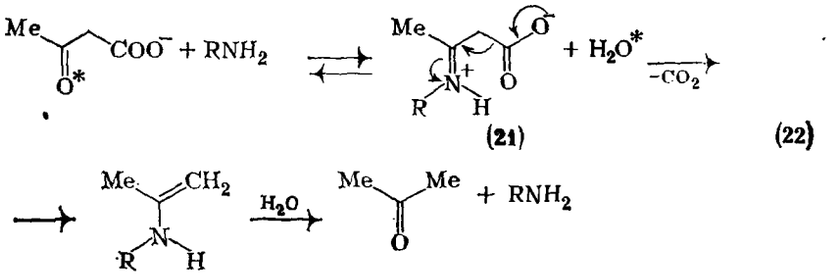
На практике картина не столь проста. Кажущееся значение $pK_a$ около 7, например, встречается часто, в том числе в том случае, когда гистидин определенно не содержится в активном центре. Это может происходить в силу того, что константы диссоциации групп зависят от окружения и могут, если группа «погружена» в белок, существенно отличаться от соответствующих величин для свободных аминокислот или их простых производных, полученных в растворе. Эти эффекты показаны в табл. 24.1.3.

Обычно эффект менее полярной среды выражается в подавлении ионизации, так как заряженные частицы менее стабильны в этих условиях. Этим объясняется повышенное значение $pK_a$ уксусной кислоты и пониженное значение $pK_a$ этиламина в 90 %-ном



водном этаноле. Отметим, что в обоих случаях происходит смещение $pK_a$ к нейтральным значениям. Если ситуация осложняется близлежащими протонсодержащими группами, которые могут быть вовлечены во внутримолекулярное сольватирование, как в случае глицина, можно наблюдать меньшие, но менее легко предсказуемые эффекты. Когда соседняя группа может образовывать очень прочную водородную связь с основной формой одной из ионизуемых групп, как в случае рацемической ди-*трет*-бутилянтарной кислоты, избирательно стабилизуется монокислотно-моноосновная форма, и $pK_1$ и $pK_2$ смещаются в сторону от нейтральности. В случае белков следует ожидать сильные эффекты микроокружения и образования водородных связей, откуда ясно, что кажущиеся константы диссоциации сами по себе не позволяют достаточно строго идентифицировать каталитические группы *.

Наиболее известным примером такого рода является фермент ацетоацетатдекарбоксилаза [44], катализирующий декарбоксилирование ацетоацетата и зависящий от основной группы с кажущимся $pK_a$ 5,9. Этой группой является ε-$NH_2$-группа остатка лизина, в обычных условиях имеющая $pK_a$ около 10. *In vitro* эта реакция катализируется вторичными аминами и анилином через образование основания Шиффа (**21**). Полагают, что ферментативная

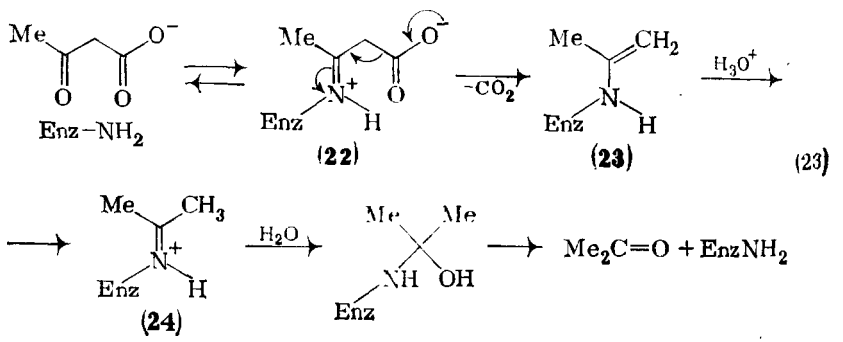



реакция идет по сходному механизму {схема (22)} (например, кетонный карбонил ацетоацетата, обогащенный $^{18}O$, теряет всю метку в процессе декарбоксилирования). Аминогруппа активного центра фермента, катализирующая реакцию {$RNH_2$ на схеме (22)} — это ε-аминогруппа остатка лизина, и первая стадия образования основания Шиффа требует атаки ею карбонильной группы субстрата. Амин поэтому должен находиться в форме свободного основания. Группа с нормальным значением $pK_a$ около 10 при pH 6 будет протонирована на 99,99 %. Если же $pK_a$ сдвигается до 5,9, она при pH 6,0 существует главным образом в виде свободного основания, в результате чего достигается увеличение эффективности катализа примерно в $10^4$ раз.

* Термодинамические параметры, в особенности теплоты ионизации, меньше зависят от окружения и также характеристичны для ионизующих групп. Такая дополнительная информация может сделать первоначальное утверждение более строгим.

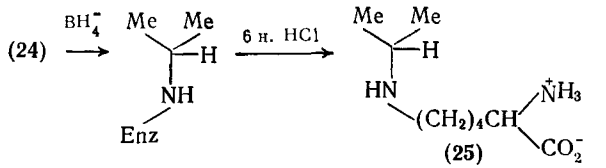
Существуют, таким образом, весьма веские основания для сдвига $pK_a$ группы в специфическом микроокружении фермент-субстратного комплекса. Кажущиеся значения $pK_a$, полученные на основании зависимостей скорости реакции от pH, могут рассматриваться только как часть полезной информации. Такая ситуация является совершенно нормальной в работах по изучению механизмов, где большинство утверждений построено на эмпирических сравнениях. Доказательство определенного механизма должно опираться на результаты как можно большего числа независимых тестов. Время от времени, однако, становится возможным провести единственный решающий эксперимент. В частности, иногда удается зарегистрировать интермедиат и доказать тем самым, что он присутствует в условиях реакции. (Может, однако, потребоваться отдельное доказательство того, что интермедиат образуется по основной схеме реакции.) Такой эксперимент является буквально бесценным в случае ферментативной реакции ввиду гораздо большей сложности последней. Работа с декарбоксилированием ацетоацетата представляет собой пример успешного применения этого подхода.

Механизм по схеме (22) расширен на схеме (23) [45]. Известно, что основание Шиффа (22) легко восстанавливается гидридными донорами. Подходящим агентом, который можно использовать в водном растворе, является борогидрид натрия. Поэтому можно было надеяться зафиксировать интермедиат (22), восстанавливая его в стабильный вторичный амин при проведении реакции в присутствии $NaBH_4$. Эксперимент проводили с использованием $^{14}C$-меченного ацетоацетата, и фермент инактивировался, как и предполагалось для случая, если $NH_2$-группа активного центра превращается во вторичный амин ($NaBH_4$ не инактивирует фермент в отсутствие субстрата). Неактивный белок, выделенный из реакционной смеси, содержит, как и предполагалось, один эквивалент $^{14}C$ на молекулу. Затем белок был подвергнут деградации обычными методами и изучен его аминокислотный состав (эти методы обсуждаются в части 23). Аминокислотный анализ показал в сравнении с нативным ферментом исчезновение одного остатка лизина и появление новой аминокислоты. Последняя была идентифицирована как ε-*N*-изопропиллизин (25) {схема (24)}; по-видимому, борогидрид восстанавливал не (22) (схема 23), а иминный интермедиат (24), вовлеченный в гидролиз (23) после декарбоксилирования.




(23)






(24)

Этот эксперимент идентифицирует лизин в качестве функциональной группы активного центра ацетоацетатдекарбоксилазы и показывает, что (24) присутствует в условиях реакции, надежно подтверждая таким образом весь механизм, приведенный на схеме (23).

Тот факт, что восстановление (24) полностью подавляет активность фермента, является существенным доказательством того, что это соединение является истинным интермедиатом реакции. Дальнейшие эксперименты позволяют поместить данный остаток лизина в первичную последовательность белка и в случае известной трехмерной структуры могут привести к идентификации активного центра.

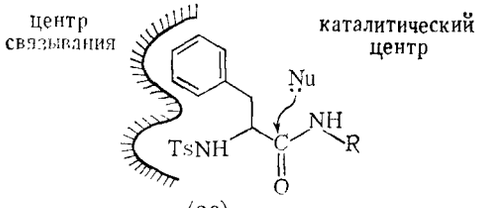
Эксперименты по фиксации интермедиатов являются, таким образом, весьма мощным приемом в работе по изучению механизмов действия ферментов, и борогидрид был использован в ряде случаев для регистрации таких интермедиатов. Мы не можем, однако, ожидать, что неспецифичный реагент обычно будет способен вмешиваться в химию процессов фермент-субстратного комплекса. Борогидрид — особый случай, так как это очень маленькая молекула, почти такого же размера и формы, как $H_2O$. Ферменты обычно способны оставлять посторонние молекулы *вне* активного центра. Наилучший способ поместить реагент в активный центр — это «замаскировать» его под субстрат, т. е. использовать аналог субстрата, располагающий структурными особенностями, необходимыми для связывания, но несущий также функциональную группу, предназначенную для необратимой реакции с группами активного центра. (Поэтому такие реагенты пригодны больше для идентификации функциональных групп активного центра, чем для регистрации интермедиатов.) Далее мы детально опишем подход с применением аналогов субстратов, используя некоторые из многочисленных примеров, доступных из работ по химотрипсину.

Этот дешевый и легко доступный фермент явился «испытательной площадкой» для многих реагентов и методов. В наши дни, естественно, исследование активного центра, проведенное целиком в одной лаборатории, было бы более коротким и более убедительным, главным образом в силу ставшей известной из рентгеноструктурного анализа трехмерной структуры фермента. Такая информа-

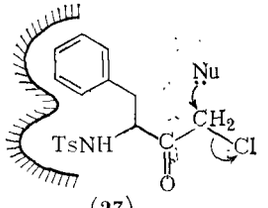
ция, однако, доступна только для ограниченного числа ферментов, и подход с применением аналогов субстрата до сих пор является одним из наиболее полезных направлений изучения активных центров.

### 24.1.3.2. Активный центр химотрипсина

Этот фермент [46] катализирует гидролиз пептидных амидных связей, особенно включающих такие аминокислотные остатки, как фенилаланин и триптофан, т. е. содержащих ароматические боковые группировки. Эта особенность химотрипсина связана с тем, что он содержит центр связывания, специфичный к таким группировкам (см. разд. 24.1.3.3). Фермент обладает довольно широкой специфичностью и может также катализировать гидролиз амидных и сложноэфирных связей многих более простых соединений, включая производные *N*-толуол-*n*-сульфонилфенилаланина (*N*-тозилфенилаланина). Реакция схематично представлена структурой (26); ароматический остаток связывается таким образом, что карбонильная группа амида располагается вблизи каталитической группы (или групп) активного центра.




(26)



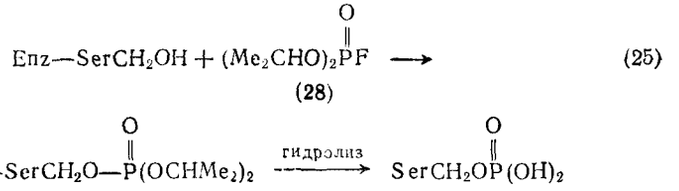

(27)

Удачным аналогом субстрата в этом случае является ТРСК [(*N*-тозилфенилаланил)хлоркетон] (27), легко получаемый из *N*-тозиламинокислоты через диазокетон. ТРСК также связывается с химотрипсином. Затем реакционноспособная α-хлоркетонная группа, фиксированная вблизи каталитических групп благодаря специфической ориентации, возникающей в результате связывания, алкилирует одну из них, тем самым инактивируя фермент. Эксперименты по деградации белка, подобные описанному ранее для ацетоацетатдекарбоксилазы, привели к идентификации модифицированной аминокислоты — *N*-алкилгистидин-57. Таким образом, в активном центре содержится остаток имидазола, весьма вероятно, вовлеченный в каталитический механизм.

Были получены также доказательства того, что серин также может присутствовать в активном центре. Известно, что диизопропилфторфосфат (28) — нервнопаралитический газ и фосфорилирующий агент — инактивирует фермент в процессе реакции в соотношении 1 : 1. Эта реакция представляет собой фосфорилирование серина,



что было доказано соответствующими экспериментами по деградации.




Диизопропилфторфосфат, безусловно, не является специфическим субстратом, но по-видимому, в некотором отношении подобен ему, так как другие более специфичные ацилирующие агенты реагируют аналогично. Можно показать, например, что реакция с очень реакционноспособным *n*-нитрофениловым эфиром *N*-ацетилтриптофана (29) может быть представлена как двухфазная (в случае, если исследуются первые несколько миллисекунд реакции, рис. 24.1.10). (*n*-Нитрофенол является наиболее удачным реагентом с экспериментальной точки зрения, так как его анион сильно поглощает в видимой области при 400 нм, и его высвобождение легко регистрируется спектрофотометрически).

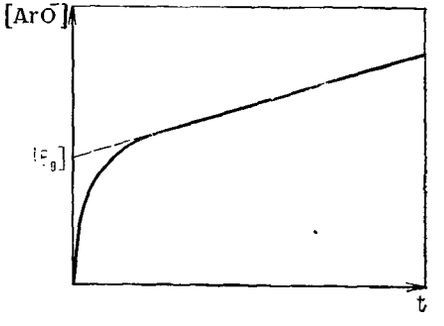
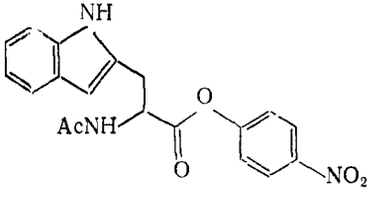
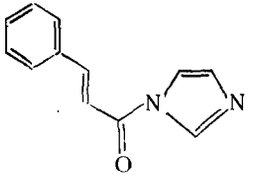



Рис. 24.1.10. Зависимость высвобождения *n*-нитрофенола из сложного эфира $RCO_2Ar$, катализируемого химотрипсином (см. текст).




(29)




(31)

Объяснение начального «всплеска» состоит в том, что реакция включает ацилирование фермента {схема 26}. Ацилирование блокирует нуклеофильную группу активного центра, поэтому фермент остается неактивным, пока образовавшийся ацилфермент (30) не гидролизуется. Если вторая стадия реакции является скоростьопределяющей, первоначальная атака сложного эфира свободным ферментом может привести к быстрому замещению $ArO^-$, но последующая стадия протекает с меньшей скоростью. Этот механизм постулирует, что концентрация *n*-нитрофеноксида, образовавшегося в начальном «всплеске» реакции, будет равна концентрации

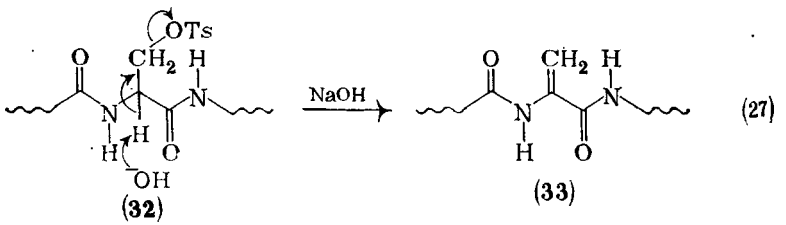
использованного фермента, что и подтверждается экспериментом.

$$Enz + RCO_2Ar \longrightarrow \underset{(30)}{Enz{-}COR} + ArO^- \qquad (26)$$

$$\underset{(30)}{Enz{-}COR} \xrightarrow[\text{медленно}]{H_2O} Enz + RCO_2^-$$

Реакция, таким образом, идет, по-видимому, по двухстадийному механизму, каждая из стадий которого включает нуклеофильную атаку карбонильной группы субстрата, и большинство известных примеров согласуется с этим положением. Две эти стадии можно изучать по отдельности, исследования по предстационарной кинетике с **(29)**, например, дают информацию об образовании ацилфермента. Удобным методом исследования гидролиза ацилфермента является использование хромофорной ацильной группы. Циннамоилимидазол **(31)** быстро ацилирует химотрипсин при соотношении 1 : 1, причем ультрафиолетовое поглощение циннамоильного хромофора можно наблюдать на ферменте. Это позволяет получать ацилфермент и исследовать его гидролиз независимо от стадии ацилирования.

Хотя доказательства механизма с образованием ацилфермента весьма многочисленны, существует лишь немного четких указаний на то, что центром ацилирования является гидроксильная группа серина, а не, например, азот имидазола. Наиболее четким доказательством обязательного участия серина является, пожалуй, эксперимент, в котором HO-группа удаляется. Это возможно ввиду того, что атом кислорода серина может быть ацилирован и тем самым превращен в хорошую уходящую группу такими неспецифичными реагентами, как диизопропилфторфосфат (см. выше) и толуол-*n*-сульфонилфторид. Тозиловый эфир **(32)**, полученный таким способом, отщепляет толуол-*n*-сульфоновую кислоту при обработке 0,1 н. NaOH в течение 4 ч при 0 °C, давая ангидрохимотрипсин **(33)** {схема 27}. Модифицированный таким образом фермент отличается от нативного только отсутствием гидроксильной группы серина; он, например, совершенно нормально связывает субстрат. Однако он полностью неактивен, что согласуется с важнейшей ролью отсутствующей гидроксигруппы в ферментативном катализе.




**(32)** **(33)** (27)

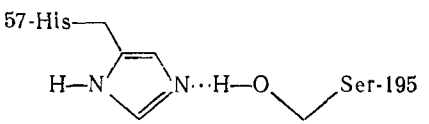
Химические доказательства, однако, редко бывают столь определенны, как приведенные выше. В действительности требуются детальные структурные данные о составе и расположении функциональных групп в активном центре. До сих пор наиболее детальной и полезной информацией этого рода являлась трехмерная структура фермента, определенная рентгеноструктурным анализом.

### 24.1.3.3. Данные рентгеноструктурного анализа

К настоящему моменту (середина 1977 г.) определены структуры более 100 белков, большинство которых являются ферментами. Точность этих измерений не настолько велика, как в случае малых органических молекул, так как все кристаллы белков обладают определенной долей неупорядоченности, вследствие чего разрешение ограничивается 0,2 нм. Это означает, что боковые радикалы с одинаковой геометрией различить не удается (например, валин от треонина или амидную группу от карбоксильной в остатках глутамата и аспартата). По этим данным, таким образом, нельзя определять полные аминокислотные последовательности. Идентификация таких спорных аминокислот должна быть поэтому основана на обычных методах определения последовательности (см. часть 23). Эти ограничения, однако, являются второстепенными для метода, дающего информацию о структуре и не имеющего себе равных по степени точности и объему [47].

Важно также быть уверенным в том, что трехмерная структура, определенная для кристалла, сильно не отличается от структуры фермента в растворе. Два типа данных показывают, что это именно так. Кристалл белка содержит большое количество кристаллизационной воды, и в некоторых случаях субстраты могут диффундировать через кристалл, нормально реагируя по мере диффузии. Аналогичным образом прямые структурные исследования белков в растворе методом ЯМР показывают там, где сравнение возможно (например, в случае лизоцима [48]), близкое соответствие структуре, полученной методом рентгеноструктурного анализа.

Таким образом, если нам известна аминокислотная последовательность и идентифицирован (или, возможно, модифицирован) участок активного центра, становится возможным определить активный центр в трехмерной структуре и «увидеть», какие еще функциональные группы, если таковые имеются, в нем присутствуют. Например, гидроксигруппа серина-195 в химотрипсине действительно связана водородной связью с имидазольной группой гистидина-57 **(34)** (см. разд. 24.1.3.4).




**(34)**

Ясно, что данные такого рода об активном центре очень ценны. В принципе, они почти наверняка указывают нам, какие функциональные группы наиболее вероятно участвуют в катализе,

определяя тем самым характер реакции. Более того, на основании данных о трехмерном расположении групп, можно сделать некоторые предположения о механизме катализа. Так, в случае (34), имидазол располагается именно так, чтобы играть роль обобщенного основания, помогая атаке HO-группы серина по электрофильному центру. С другой стороны, часто на основании трехмерной структуры активного центра никаких предположений

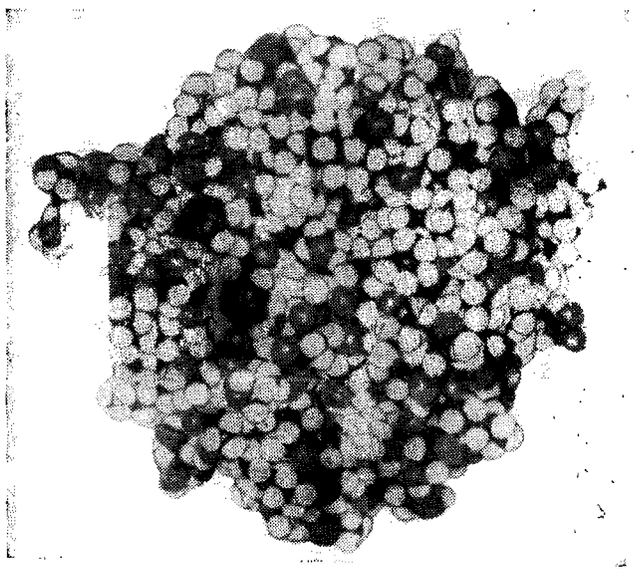


Рис. 24.1.11. Пространственная модель α химотрипсина.

Обратите внимание на то, что в основном полярные группы (главным образом атомы O, а также некоторое количество N и совсем немного C) располагаются на поверхности молекулы, в контакте с растворителем. Активный центр легко локализовать по атомам S, видным близ центра молекулы (см. текст и рис. 24.1.13).

о механизме сделать нельзя. Все, что действительно выявляют эти данные, это точная структура (одного из) исходных соединений реакции, но такого рода информацию мы всегда надеемся иметь в самом начале исследования механизма. Те, кто полагали, что знание трехмерных структур ферментов может решить большую часть проблемы их механизмов действия, были разочарованы. Тем не менее эта информация является важной составной частью в исследовании механизма ферментативного катализа, подтверждая многие важные идеи, которые первоначально были только гипотезами, и представляя твердый базис для строгого обсуждения механизма.

Мы будем использовать примеры, взятые из данных по изучению структуры химотрипсина, для демонстрации того, какого рода результаты могут быть получены, а также для демонстрации действительного объема проблем, связанных с определением структуры, и трудностей интерпретации. На рис. 24.1.11 представлена пространственная модель α-химотрипсина, построенная на основе координат атомов, вычисленных из данных рентгеноструктурного анализа. Эта модель (вид со стороны подхода субстрата) дает ясное представление о преимущественно полярном характере

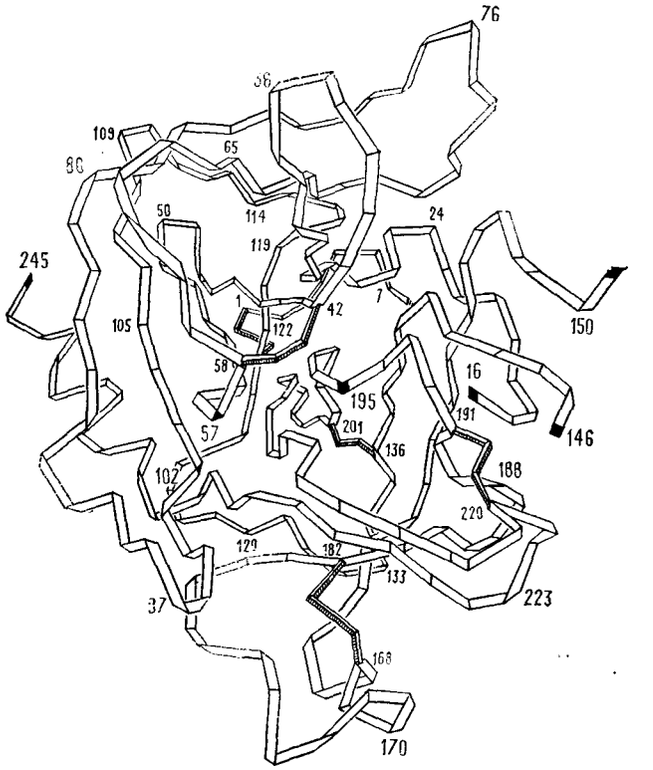



Рис. 24.1.12. Схематическое изображение полипептидной цепи α-химотрипсина, с той же точки обзора, что и рис. 24.1.11.

Отметьте три сегмента цепи (остатки 1—13, 16—146 и 149—245), соединенные пятью дисульфидными мостиками (например, 42—58). Следует проходить последовательность с *N*-конца, 1 (близ центра), до *C*-конца, 245 [46а].

поверхности белка, состоящей в большинстве из атомов кислорода и водорода. Удобными ориентирами являются атомы серы, образующие дисульфидные мостики между остатками 42 и 58, а также (немного правее) атом серы метионина-192. Активный центр лежит чуть ниже этих атомов серы: даже на таком расстоянии можно заметить (ниже серы метионина-192) углубление, соответствующее центру связывания ароматической группы субстрата. Рис. 24.1.12 представляет собой другой тип изображения. Его

задача — почти с той же точки обзора представить изгибы главной цепи. (Точнее, цепей, когда α-химотрипсин образуется из предшественника, химотрипсиногена, остатки зимогена 14—15 и 147—148 теряются. Остов химотрипсина, таким образом, разделяется на три части, цепи A, B и C, состоящие из остатков 1—13, 16—146 и 149—245 соответственно [49].) Пять дисульфидных мостиков усиливают связывание первоначальной цепи, так что каждый из указанных сегментов ковалентно связан с другим, а дисульфидные мостики, располагающиеся вблизи остатков 57 и 195 активного центра, четко являются факторами, определяющими геометрию каталитического центра.

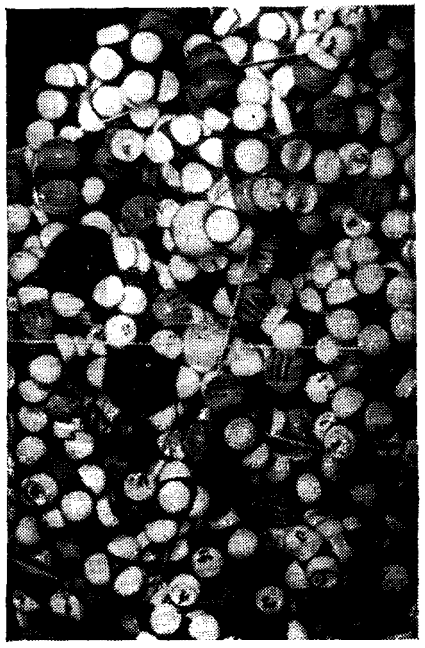


Рис. 24.1.13. Увеличенное изображение области активного центра пространственной модели α-химотрипсина (см. рис. 24.1.12).

Ясно виден гидрофобный карман (справа под единичным атомом серы метионина-192). $CH_2OH$-группа серина-195 располагается между углублением и атомом серы цистеина-42; ее атом водорода связан водородной связью с атомом азота имидазольной группы гистидина-57 (см. текст).

Рис. 24.1.11 — это увеличенное изображение пространственной модели, где представлена примерно половина видимой на рис. 24.1.11 поверхности. Используя в качестве ориентиров те же атомы серы, можно яснее видеть углубления ароматического центра связывания. Это углубление, как можно видеть, сравнимо по размеру с двумя бензольными кольцами в верхней части рисунка. На границе этого углубления в направлении атома серы цистеина-42 расположена HO-группа серина-195, связанная водородной связью с атомом азота имидазольного кольца, повернутого почти под прямым углом к поверхности. Это боковая группа гистидина-57. Вне видимости под этим имидазольным кольцом находится карбоксильная группа аспарагиновой кислоты-102, связанная, вероятно, водородной связью с H-группой гистидина. Ни одна другая функциональная группа не располагается вблизи пары гистидин-серин, так, что каталитический механизм, вероятно, определяется этими тремя остатками. Каталитический участок, часто называемый системой переноса электрона в химотрипсине, определенный на основе данных рентгеноструктурного анализа, детально изображен на рис. 24.1.14. В этот



рисунок включена также аминокислота, находящаяся рядом с серином активного центра, аспарагиновая кислота-194. Водородная связь между карбоксильной группой этой аминокислоты и $^+NH_3$-группой *N*-концевого изолейцина B-цепи (отсутствующая в зимогене), по-видимому, действует в качестве устройства, придающего напряжение, и является важным фактором создания правильной стереохимии в активном центре.

Ниже мы обсудим механизм катализа химотрипсином (см. разд. 24.1.3.4), однако здесь необходимо сделать одно важное за-

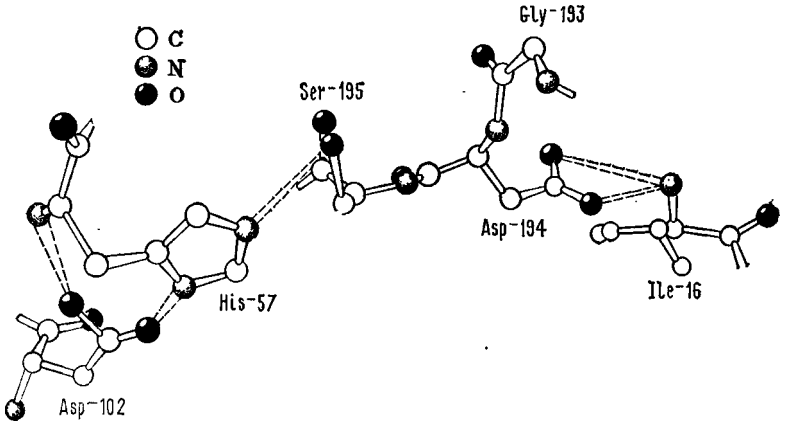



Рис. 24.1.14. Расположение групп в активном центре α-химотрипсина по данным рентгеноструктуриого анализа (см. текст) [46a].

мечание. Возможно, единственным наиболее важным заключением, полученным на сегодняшний день из всех данных рентгеноструктурного анализа ферментов является тот факт, что каталитический участок, обнаруженный в химотрипсине, характерен также для других ферментов. Всегда существовала надежда, возможно даже разумное предположение того, что не все из множества ферментов, катализирующих данную реакцию, используют разные каталитические механизмы. Это множество ферментов, катализирующих, как известно, гидролиз амидных связей, подразделяется на четыре основных класса: металлоферменты, из которых наиболее хорошо известна карбоксипептидаза, карбоксильные ферменты, подобные пепсину, HS-ферменты типа папаина и сериновые протеиназы. Последняя группа включает химотрипсин, трипсин, эластазу и тромбин. Изучение первичных структур показывает, что эти ферменты являются очень похожими друг на друга белками с явной близостью в аминокислотной последовательности. В трипсине и химотрипсине, например, 40% их аминокислотных остатков идентичны [50]. В частности, все они содержат одну

и ту же последовательность* вокруг серина активного центра (35).

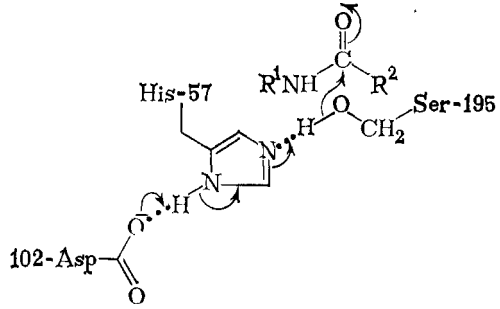
Gly-Asp-Ser-Gly-Pro (35)

Трехмерные структуры, теперь известные для некоторых из этих сериновых протеиназ (трипсин, химотрипсин, эластаза), показывают, что они имеют одинаковое пространственное строение активного центра с системой переноса заряда, аналогичной найденной у химотрипсина (см. рис. 24.1.14). Этот факт, возможно, не удивителен, так как, по-видимому, все эти ферменты происходят от общего предшественника. Логическим продолжением явилось бы развитие эффективного каталитического механизма после эволюции субстратной специфичности, поэтому ферменты, следующие друг за другом в эволюционной цепи, должны иметь одинаковый каталитический участок, но различное строение центров связывания и, возможно, других участков молекулы.

Тот факт, что другая сериновая протеиназа, субтилизин, белок, не обладающий структурной близостью к группе химотрипсина, содержит, тем не менее, тот же каталитический участок, явился ошеломляющим открытием. Из трехмерной структуры субтилизина следует, что в последнем также имеется система водородных связей аспарагиновая кислота-32 ... гистидин-64 ... серин-221, аналогичная найденной в химотрипсине [51] (см. рис. 24.1.14). Этот факт означает, что каталитические механизмы, используемые обоими этими ферментами, также идентичны. Отсюда, безусловно, следует заключение, что две линии в эволюции ферментов пришли к одному и тому же решению проблемы гидролиза амидной связи. Если это заключение справедливо для сериновых протеиназ, оно может быть справедливо и для протеиназ, в механизмах действия которых участвуют другие аминокислотные остатки, и вообще для ферментов, катализирующих любую данную реакцию. Эти данные, таким образом, могут служить косвенным доказательством нашего предположения о том, что очень большое число ферментов, участвующих в жизненных процессах, может использовать значительно меньшее число каталитических механизмов.

### 24.1.3.4. Каталитический механизм действия сериновых протеиназ

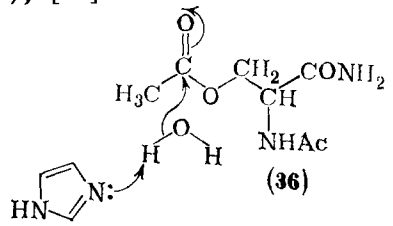
На основе расположения функциональных групп в активных центрах сериновых протеиназ можно сделать вполне обоснованное предположение о том, что гидроксильная группа серина является нуклеофильным центром, атакующим карбонильную группу субстрата (см. рис. 24.1.14). Имидазольное кольцо гистидина, действующее в качестве общего основания, способствует этому процессу. Все приведенные выше данные и еще большее количество не упоминавшихся данных согласуются с этим механизмом. Нуклеофильную атаку принято считать первой стадией каталитического процесса. Не следует, по-видимому, недооценивать также значения карбоксильной группы аспарагиновой кислоты, входящей в систему переноса заряда всех сериновых протеиназ; положение этой группы также идеально для выполнения роли общего основания, вследствие чего первую стадию катализа следует изобразить как на схеме (28).




(28)

Хотя схема (28) удовлетворительно описывает механизм, из нее не ясно, почему данная реакция столь эффективна. Неясным остается также химия осуществляемого ферментом процесса. Вследствие этого механизм (28) необходимо рассмотреть в свете данных, полученных при изучении известных реакций этого типа, и далее изучить последовательность событий этой первой стадии [52].

На схеме (28) представлен алкоголиз амида, катализируемый общим основанием; последующий гидролиз ацилфермента является катализируемым общим основанием гидролизом сложного эфира. Последняя реакция нам уже знакома: это обычный механизм гидролиза сложных эфиров с плохими уходящими группами. Примером, наиболее соответствующим гидролизу ацилхимотрипсина, является гидролиз *N*,*O*-диацетилсеринамида (36). При pH около 7 эта реакция протекает очень медленно, но при 100 °C можно показать и охарактеризовать общий основной катализ имидазолом {схема (29)} [53].



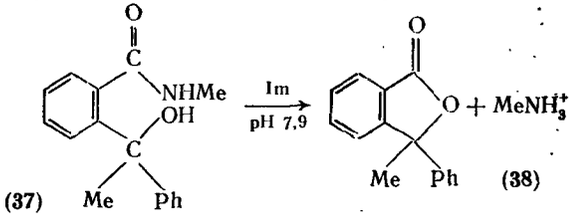
(29)

(36)

Амиды — еще менее реакционноспособные субстраты, однако при благоприятных условиях можно наблюдать внутримолекулярный

* Конечно, серин в этой короткой последовательности не обладает какой-то особой реакционной способностью. В результате синтеза олигопептидов активных центров обычно получаются соединения, каталитически менее активные, чем простые молекулы, содержащие боковые группы, участвующие в катализе.

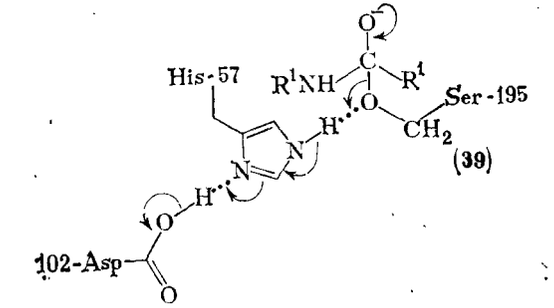
алкоголиз последних. Наибольшей реакционной способностью из известных примеров обладает гидроксиамид (**37**), который превращается в лактон (**38**) со скоростью, не намного уступающей соответствующей реакции химотрипсина с субстратом {схема (30)} [54]. В отличие от более медленных реакций этого типа образование фталида катализируется имидазолом. Эффективная концентрация гидроксигруппы в (**37**), по-видимому, сравнима с концентрацией сериновой гидроксильной группы химотрипсина в фермент-субстратном комплексе. Эффективность катализа имидазолом такова, что эффективной концентрации бокового радикала гистидина-57 в фермент-субстратном комплексе, не превышающей 20 моль·л$^{-1}$, достаточно для достижения наблюдаемой скорости реакции химотрипсина с амидными субстратами.



(30)

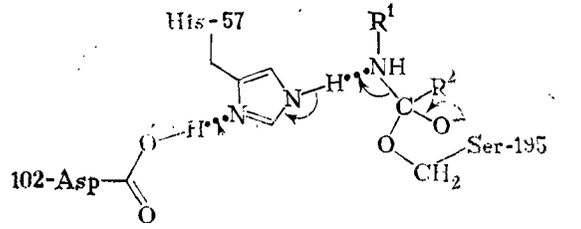
Первая стадия ферментативной реакции {схема (28)} включает образование тетраэдрического интермедиата (**39**), который, образовавшись, может быстро переходить в исходные соединения {схема (31), стрелки}. Соединения типа (**39**) слишком реакционноспособны, в силу чего в обычных условиях зарегистрировать их не удается. Существует, однако, структурное доказательство их образования в процессе реакций, катализируемых сериновыми протеиназами. Природные белковые ингибиторы трипсина образуют весьма стабильные комплексы с ферментом. Трехмерные структуры таких комплексов [55] показывают, что нормальная реакция расщепления пептида, по-видимому, «замораживается» на стадии образования тетраэдрического интермедиата {схема (31), $R^2CONHR^1$ в данном случае ингибитор, а не субстрат}. Очевидно, что в фермент-ингибиторных комплексах этого типа интермедиат не может трансформироваться ни в прямом, ни в обратном направлениях, по-видимому, вследствие слишком прочного связывания ингибитора. Прямая реакция, распад тетраэдрического интермедиата, включает расщепление связи C—N, что может иметь место в случае протонирования атома азота, т. е. превращения последнего в удовлетворительную уходящую группу. Вероятным источником необходимого для этого протона является имидазольная группа системы переноса заряда. Подобный процесс может иметь место в том случае, если конформация тетраэдрического интермедиата изменяется по сравнению с показанной на схеме (31) (что дает важный дополнительный выигрыш, заключающийся в предотвращении обратной реакции) так, как это показано на схеме (32).





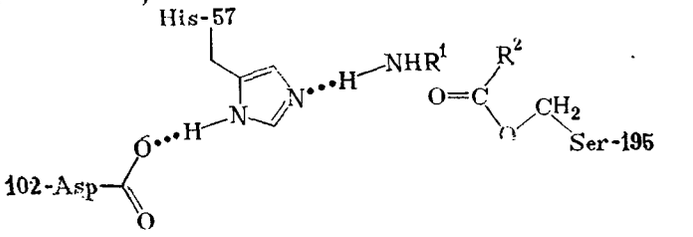
(31)

{схема (31)→}



(32)

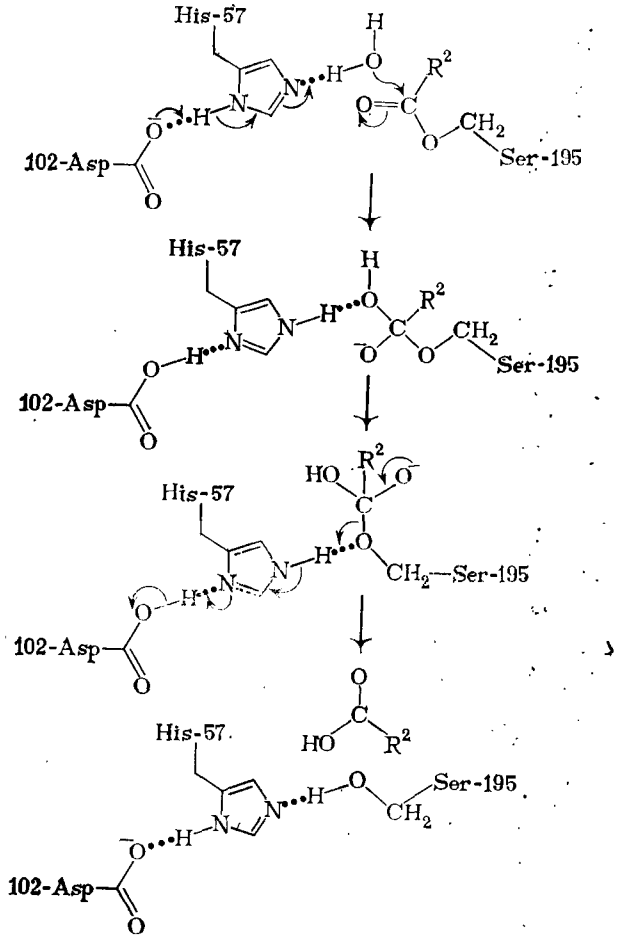
{схема (32)→}



(33)

Тетраэдрический интермедиат может теперь распадаться с образованием ацилфермента {схема (33)} и свободного амина $RNH_2$ (*C*-концевой фрагмент исходного субстрата). На данном этапе становится важным ослабление связи уходящей группы с ферментом, в противном случае эффективность реакции будет падать. Первоначально положение вновь образовавшегося амина таково, что вся последовательность событий, изображенная на схемах (28)—(33), может пойти в обратном направлении. При протекании реакции по нормальному механизму амин диффундирует с фермента (после чего быстро протонируется растворителем) и замещается молекулой воды. Механизм гидролиза ацилфермента {схема (34)} представляет собой последовательность событий, обратную описанной выше, где в качестве нуклеофила выступает вода. В конце этой последовательности остающийся

фрагмент субстрата, *N*-конец ($R^2CO_2H$) может диффундировать с фермента, оставляя последний свободным для связывания следующей молекулы субстрата.




(34)

Механизм, изображенный на схемах (28)—(34), опирается главным образом на известную трехмерную структуру химотрипсина и известную химию основных реакций. В связи с этим необходимо привести ряд данных о механизме непосредственно ферментативной реакции.

Образование и гидролиз ацилфермента (ацилирование и деацилирование фермента) можно изучать отдельно, при соответствующим образом подобранных условиях или субстратах. Обе стадии зависят от основной группы с $pK_a$ около 7, соответствующей имидазольной группе системы переноса заряда. Ацилирование (и только оно) зависит также от кислотной группы с $pK_a$

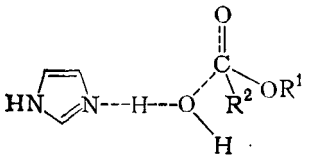


около 8,8. Эта стадия, а также полная реакция, таким образом, показывают наличие колоколообразной зависимости скорости от pH. Попытка отнесения константы диссоциации этой группы к какому-либо аминокислотному остатку была источником споров в течение ряда лет. В настоящее время принято считать, что эта группа представляет собой концевую $+NH_3$-группу B-цепи, принадлежащую изолейцину-16. Эта группа связана водородной связью с карбоксильной группой бокового радикала аспарагиновой кислоты-194, расположенной вблизи серина активного центра {см. схему (34)}. Потеря протона $+NH_3$-группой приводит к разрушению водородной связи. Этот «солевой мостик», очевидно, играет важную роль в контролировании стереохимии определенного участка активного центра, окружающего первый тетраэдрический интермедиат {см. схемы (31), (32)}. (Здесь интерпретатора подстерегает потенциальная западня: реакция зависит от диссоциации группы, не участвующей в химическом катализе и даже не поддающейся идентификации в активном центре.)

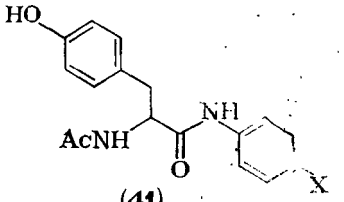
Другой легко измеряемый (хотя и не всегда легко интерпретируемый) параметр — это дейтериевый изотопный эффект растворителя. Как на стадиях ацилирования, так и для дезацилирования имеет место общий основной катализ. Можно полагать, что в $D_2O$ реакция будет проходить в 2—3 раза медленнее (см. выше). В этом случае экспериментальные данные четко соответствуют предложенному механизму. Проведение стадии ацилирования реакционноспособным (нитрофениловым) сложноэфирным субстратом дает возможность выделить образование тетраэдрического интермедиата {см. схему (28)}, так как распад последнего {схема (32)} включает потерю хорошей (нитрофениловой) уходящей группы, протекающую быстро и без общего основного катализа. Дейтериевый изотопный эффект растворителя $k_H/k_D$, наблюдаемый с относительно малореакционноспособным субстратом, *n*-нитрофенилпивалатом $Me_3CCO_2C_6H_4NO_2$-*n* [56] в $D_2O$ по сравнению с $H_2O$, равен 2,2, как это и предполагалось для скоростьопределяющей атаки DO-группой серина, катализируемой общим основанием. Аналогично, для дезацилирования циннамоилфермента в $D_2O$ $k_H/k_D$ равен 2,5 [57], что также попадает в пределы, характерные для реакций, протекающих в соответствии с механизмом общего основного катализа (например, в случае гидролиза *N*,*O*-диацетилсеринамида, катализируемого имидазолом {схема (29)}, $k_H/k_D$ равен 2,0).

Информация, получаемая в результате изучения зависимостей типа структура-реакционная способность, очень важна для исследования органических реакций. Однако в случае ферментов диапазон ограничен в силу специфичности последних [58]. Химотрипсин тем не менее обладает достаточно широкой специфичностью, и получены линейные зависимости свободных энергий для нескольких серий его субстратов. Так, для стадии дезацилирования возможно измерение параметров Гамметта ρ, так как возможно

получение ряда замещенных бензоилхимотрипсинов [59]. Полученное значение $\rho = 2{,}1$ близко к таковому ($\rho = 2{,}3$), найденному для щелочного гидролиза аналогичного ряда алкилбензоатов. Этого следует ожидать, когда нуклеофил отличается от свободного гидроксид-иона (т. е. от частицы, связанной сильной водородной связью с тремя молекулами воды) только наличием частичной связи с протоном, переносимым к общему основанию (40).



(40)



(41)

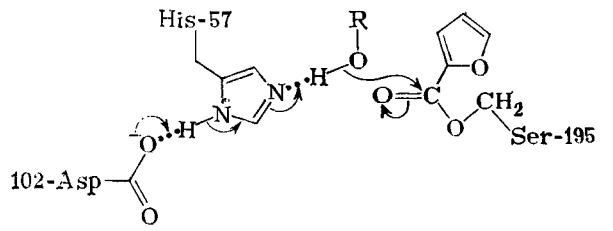
Параметр Гамметта $\rho = 1{,}8$, полученный при ацилировании фермента рядом замещенных фенилацетатов [60], соответствует скоростьопределяющей нуклеофильной атаке карбонильной группы сложного эфира, однако не позволяет выяснить механизм такой атаки или природу принимающей в ней участие нуклеофильной группы. Интереснее результаты, полученные для серии анилидов RCONHAr. Поскольку гидролиз серии анилидов *N*-ацетилтирозина слабо зависит от параметра $\sigma$, следует полагать, что атом азота уходящей группы в переходном состоянии, как и в основном состоянии, несет частичный положительный заряд. Такой вывод явно не согласуется с положением о скоростьопределяющем характере образования тетраэдрического интермедиата {см. схему (28)}. Если же скоростьопределяющей стадией является распад последнего, указанный вывод вполне приемлем, ибо эта стадия включает протонирование азота уходящей группы {см. схему (29)}. Эти исследования дают наглядный пример возможных ловушек, подстерегающих исследователя при такого рода работе с ферментами. В ряде работ были обнаружены довольно неожиданные и поэтому особенно интересные вариации в реакционной способности в зависимости от структуры анилиновой уходящей группы (например, заместителя X) в анилидах *N*-ацетилтирозина (41).

Объяснение этого явления, как оказалось, совершенно не связанного с химическим механизмом, состоит в следующем [61]. Если заместитель гидрофилен ($X = COMe$, $^{+}NMe_3$), (41) является нормальным субстратом. В случае же гидрофобного заместителя ($X = Cl$) ароматическое кольцо уходящей группы связывается в ароматическом центре связывания субстрата на ферменте лучше, чем остаток тирозина, что, безусловно, может привести к существенному изменению эффективности катализа.

Для дезацилирования фермента можно использовать и отличные от воды нуклеофильные агенты. Так, спирты и первичные



амины реагируют с фуроилхимотрипсином [62]. В этом случае нуклеофил, вероятно, занимает место молекулы воды в нормальном механизме гидролиза {см. схему (34)}, в результате чего образуется амид или сложный эфир {схема (35)}.



(35)

Реакционная способность нуклеофила четко зависит от степени его связывания, но практически не изменяется от основности (коэффициент Бренстеда $\beta = 0$) [62]. Это связано с синхронностью переноса протона в реакции общего основного катализа. В случае ферментативного процесса это явление превращается в большое преимущество, так как реакционная способность слабого нуклеофила типа воды здесь лишь ненамного ниже таковой более основных реагентов. В случае простых карбонильных соединений нуклеофильность таких реагентов обычно гораздо выше.

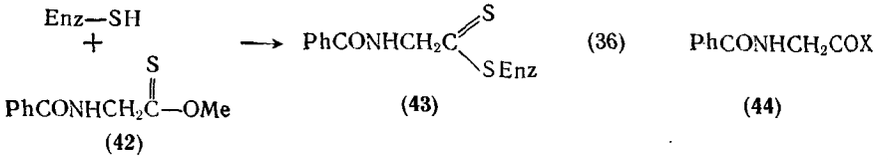
Механизм действия сериновых протеиназ в настоящее время понят лучше механизма любого другого типа ферментов и может служить иллюстрацией некоторых важных моментов, касающихся ферментативного катализа. Гидролиз амида может показаться не слишком сложной реакцией химику-органику. В случае же ферментативного катализа для обеспечения успешного протекания реакции необходимо очень строгое обеспечение тех стадий, которые химик может счастливо игнорировать. В противном случае будет происходить замедление реакции. Даже механизм, приведенный на схемах (28)—(34) и насчитывающий 9 отдельных стадий, является, безусловно, упрощенным. [В качестве иллюстрации можно отметить, что в последних исследованиях механизма действия химотрипсина с использованием методов быстрой кинетики в водном диметилсульфоксиде при —90 °C показано наличие *четырех* процессов, предшествующих образованию тетраэдрического интермедиата {см. схему (28)}. Первым из этих процессов является связывание субстрата, остальные, по-видимому, представляют собой индуцированные субстратом конформационные изменения в ферменте, необходимые для обеспечения правильной стереохимии катализа] [63]. Нетрудно понять, почему для катализа распада такой высоко энергетической частицы, как тетраэдрический интермедиат, требуется особое «обеспечение»: такие стадии могут в конце концов быть скоростьопределяющими в самых простых реакциях. Однако в связи с тем, что для эффективного протекания ферментативного катализа необходимы очень

высокие скорости, даже такие стадии, как перенос протона и конформационные изменения, энергии активации которых могут быть малы (12—16 кДж·моль$^{-1}$), потенциально медленны. На практике ферменты действительно способны «обеспечивать» мельчайшие детали химического механизма катализа, в результате чего эффективность последнего зачастую лимитируется не скоростью какой-либо химической стадии, а физическими факторами типа конформационных изменений или, что особенно часто, диффузией продукта из активного центра фермента [64].

### 24.1.3.5. Механизмы действия других протеолитических ферментов

Механизм, используемый сериновыми протеиназами,— не единственное решение природой задачи гидролиза амидной связи. Ранее были упомянуты три других главных класса протеолитических ферментов; каждый из трех различных типов их механизмов действия представляет особый интерес.

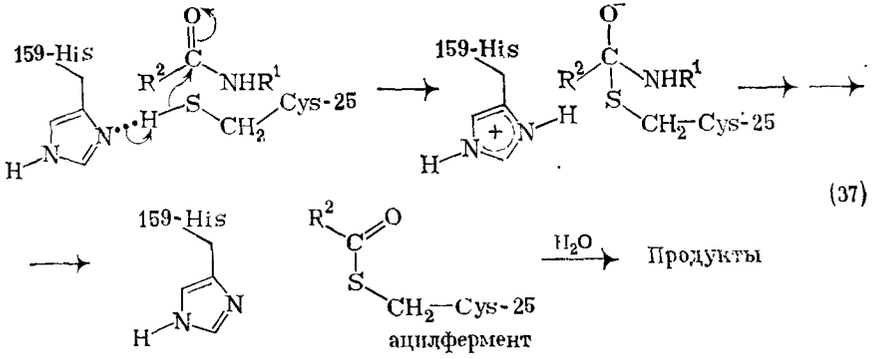
Цистеиновые протеиназы [65] очень сходны с сериновыми. Объектом большинства работ служил папаин. В настоящее время известна трехмерная структура этого фермента [66]. Папаин состоит из одной полипептидной цепи почти того же размера (212 остатков), что и у химотрипсина, с характерной глубокой «впадиной», содержащей участок связывания субстрата. Папаин инактивируется иодуксусной кислотой, которая, как известно, алкилирует тиоловые группы. Так как шесть из семи остатков цистеина фермента связаны в дисульфидные мостики, в реакции принимает участие единственная свободная HS-группа цистеина-25. Имеется убедительное доказательство образования ацилферментного интермедиата: как и в случае химотрипсина, можно приготовить циннамоилпапаин. Последующий его гидролиз проходит без осложнений, вносимых на стадии ацилирования [67]. Более того, УФ-спектр ацилфермента, полученный в реакции папаина с тиоэфиром **(42)**, соответствует ожидаемому спектру дитиоэфира **(43)** [68].




(42) (43) (36) (44)

Параметры Гамметта ρ в случае ацилирования папаина фениловыми эфирами гиппуровой кислоты (**44**, X = OAr) [69] и ее анилидами (**44**, X = NHAr) [70] составляют 1,2 и —1,04 соответственно, что предполагает скоростьопределяющее образование тетраэдрического интермедиата в случае эфирного субстрата и его скоростьопределяющий распад в случае амида (протекающий с общим основным катализом), подобно описанным выше близким реакциям химотрипсина. Ацилирование, а также алкилирование иодуксусной кислотой зависят от групп с кажущимися p$K_a$ 4,2 и 8,2 (колоколообразный профиль зависимости от pH), в то время как дезацилирование зависит только от остатка с p$K_a$ около 4. Возникает обоснованное и в этом случае справедливое заключение, что группа с большим p$K_a$ представляет собой HS-группу остатка цистеина активного центра, который в процессе реакции ацилируется и поэтому отсутствует в ацилферменте.

Указанные свойства качественно очень близки соответствующим свойствам сериновых протеиназ, и механизмы катализа этими ферментами также очень близки. Данные рентгеноструктурного анализа показывают, что HS-группа в активном центре папаина контактирует с имидазольной группой остатка гистидина на противоположной стороне «впадины» (гистидин-159), связанного водородной связью через удаленный кольцевой атом азота с амидной группой аспарагина-175. Так как амидная группа в мягких условиях не может действовать в качестве общего основания, близость в строении активных центров химотрипсина и папаина не дает все же возможности предложить и для последнего полную систему переноса заряда, однако принятый механизм [71], кратко суммированный на схеме (37), все же мало отличается от приведенного выше механизма действия химотрипсина {см. схемы (28)—(34)}.

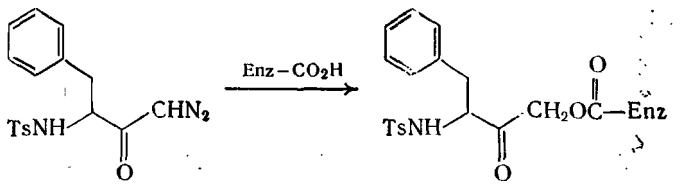



(37)

Основная группа с p$K_a$ около 4, от которой зависят как ацилирование, так и дезацилирование, почти наверняка соответствует имидазолу гистидина-159. Структурные исследования свидетельствуют также в пользу участия этой группы в качестве общего основного катализатора на первой стадии процесса ацилирования. Есть основания также полагать, что и дезацилирование подчиняется механизму общего основного катализа. При гидролизе циннамоилпапаина [67] и α-*N*-бензоил-*L*-аргинилового эфира [72] обнаруживается большой дейтериевый изотопный эффект растворителя, $k_H/k_D \approx 3$. Этот факт согласуется с общим основным ка-

тализом атаки ацилфермента водой, но не позволяет однозначно идентифицировать каталитическую группу как имидазольную.

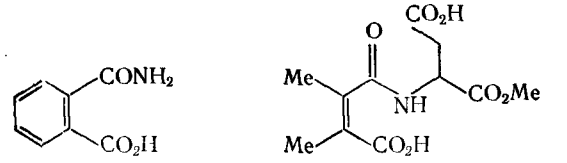
Для двух оставшихся классов протеолитических ферментов характерны совершенно другие механизмы действия. Пепсин [73] является основным компонентом группы протеолитических ферментов, активных в желудке при низких значениях pH. Хотя пепсин был вторым по времени ферментом, полученным в кристаллическом состоянии (1926 г.), детали его трехмерной структуры стали известны только в последнее время. Свиной пепсин содержит одну полипептидную цепь из 327 аминокислотных остатков известной последовательности. Для нее характерно наличие большого количества (29) аминокислотных остатков, содержащих карбоксильную группу, и, как полагают, две или три из них принимают участие в катализе. Так, фермент инактивируется диазометаном при pH 5,5, хотя для этого и требуется избыток реагента, а для полной инактивации необходима этерификация пяти карбоксильных групп. Более специфичными ингибиторами являются диазокетоны — аналоги субстрата. Тозил-*L*-фенилаланилдиазометан (45), например, быстро ингибирует фермент в соотношении 1 : 1 [74] {схема (38)}.

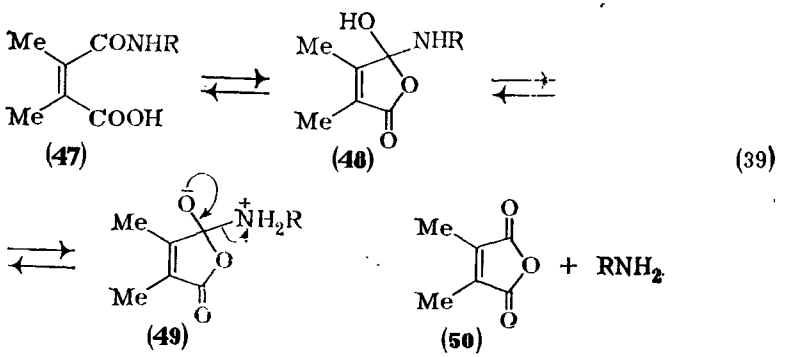



(45) (38)

На графике зависимости скорости гидролиза ацетилдипептидов от pH отмечаются оптимум pH около 2 и зависимость от групп с кажущимися p$K_a$, близкими к 1 и 4. Эти значения приписываются карбоксильным группам активного центра, причем одна из них, с очень низким значением p$K_a$, возможно участвует в образовании весьма прочной водородной связи (ср. с последней дикарбоновой кислотой в табл. 24.1.3).

Хотя детали каталитического механизма действия пепсина все еще не ясны, хорошо известно, что гидролиз амидной связи подвергается эффективному нуклеофильному катализу близлежащей карбоксильной группой. Например, гидролиз моноамида фталевой кислоты (46) проходит примерно в $10^6$ раз быстрее гидролиза бензамида [75]. Эта реакция весьма чувствительна к изменениям структуры. Гидролиз наиболее реакционноспособных соединений (например, кислых амидов диметилмалеиновой кислоты (47), имеющих период полупревращения при 37 °C менее 1 с) подчиняется общему основному катализу. Механизм этой реакции (39) указывает на то, как должен проходить ферментативный гидролиз.




Для образующегося вначале тетраэдрического интермедиата (48) возможен только распад на исходные соединения. Однако после переноса протона (48)→(49) может проходить элиминирование $RNH_2$. Этот перенос протона не может идти непосредственно (участвующие группы чрезмерно сближены), и требуется общий кислотный катализ [76]. В случае фермента, естественно, можно полагать, что в качестве требуемого общего кислотного катализатора будет выступать одна из находящихся в активном центре карбоксильных групп. Введение карбоксильной группы возможно и в модельное соединение. Для гидролиза (51), полученного в результате такого введения, уже не требуется межмолекулярного катализа. Очень быстрый гидролиз (51) катализируется его собственными двумя карбоксильными группами, действующими на отдельных стадиях реакции. Одна из них должна находиться в форме кислоты; вторая, катализирующая, по-видимому, стадию переноса протона [соответствующую (48)→(49) на схеме (39)], действует в форме группы $CO_2^-$, предположительно в качестве общего основного катализатора. В результате гидролиз (51) показывает колоколообразный профиль зависимости от pH [77], качественно близкий наблюдаемому при гидролизе пепсином.

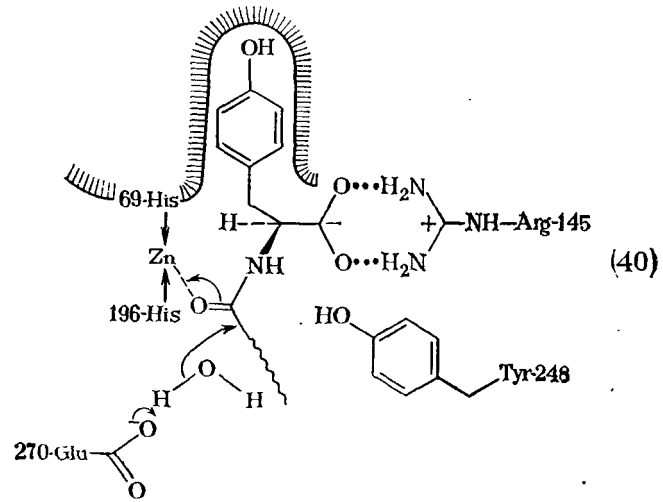
Наиболее известным металлоферментом, катализирующим гидролиз пептидной связи, является карбоксипептидаза. В этом случае доступна детальная структурная информация [78]. Фермент специфичен в отношении пептидной связи у *C*-концевого аминокислотного остатка полипептидной цепи и требует свободной кон-

цевой карбоксильной группы субстрата. Фермент из поджелудочной железы быка представляет одну полипептидную цепь, состоящую из 307 аминокислотных остатков, и содержит один атом Zn. Фермент показывает колоколообразный профиль зависимости скорости реакции гидролиза пептидов от pH с оптимумом около 7,5. pH-Зависимость сложна и вычисленные значения кажущихся величин $pK_a$, равные $6{,}7 \pm 0{,}2$ и $8{,}5 \pm 1{,}0$, не позволили отнести их к определенным группам активного центра.

Сочетание рентгеноструктурных и химических данных позволило идентифицировать группы, связывающие Zn в активном центре. Среди них два имидазола, принадлежащие к остаткам гистидина-69 и -196, и карбоксильная группа глутаминовой кислоты-72. Ион цинка можно обменивать на ионы других металлов, вновь полученные металлоферменты обладают собственными характерными реакционными способностями (или не обладают вовсе) в отношении амидных (и сложноэфирных) субстратов, но апофермент, не содержащий иона металла, полностью неактивен, как и следует полагать, если ион металла играет важную роль в катализе. Современные взгляды на механизм действия фермента частично опираются на химические данные, но особенно на кристаллографические работы, включающие трехмерные структуры не только нативного фермента, но также его комплекса с глицил-*L*-тирозином, полученным при диффузии дипептида в кристаллы фермента [78].

Обнаружено, что существенная для связывания карбоксильная группа субстрата образует солевой мостик с гуанидиновой группой аргинина-145, тем самым, а также предпочтительными положениями связывания боковых радикалов, приводя подлежащую расщеплению амидную связь в контакт с атомом Zn. Теперь единственными другими функциональными группами, близкими к этой амидной связи, являются карбоксильная группа глутаминовой кислоты-270, которая (как и аргинин) сдвигается на 0,2 нм по сравнению со свободным ферментом, и фенольный гидроксил тирозина-248. Последняя группа не является одной из пяти групп, которые, как полагают, обычно участвуют в ферментативном катализе. Имеются также химические доказательства важности тирозина в карбоксипептидазе. Примечательно наблюдение, что эта группа не содержится вблизи цинка активного центра нативного фермента. Связывание глицил-тирозина, однако, вызывает весьма существенный конформационный сдвиг, в процессе которого фенольная группа тирозина-248 сдвигается не менее, чем на 1,2 нм с поверхности белка к новому положению вблизи пептидной связи субстрата. В результате этого движения происходит закрывание углубления, в котором находится активный центр, так что последний, по-видимому, не находится более в равновесии с растворителем.

Согласно предложенному механизму {схема (40)}, электрофильный катализ (см. разд. 24.1.2.5) металлом способствует нуклеофильной атаке на амидную группу субстрата. В качестве нуклеофила служит либо карбоксильная группа глутаминовой кислоты-270, либо молекула воды, как показано на схеме. В последнем случае карбоксильная группа действует в качестве общего основания, катализируя атаку водой [78, 79]. (Не существует строгих доказательств ни за, ни против ангидридного интермедиата, действующего в том случае, если карбоксильная группа выступает в качестве нуклеофила.) Фенольному гидроксилу тирозина-248 приписывается роль общей кислоты, протонирующей азот уходящей группы, по-видимому в процессе распада тетраэдрического интермедиата, образующегося на первой стадии, показанной на схеме (40). (Гидролиз некоторых сложных эфиров, содержащих хорошо уходящие группы, не требующие протонирования, не зависит от гидроксильной группы фенола [80].)




(40)

### 24.1.4. МЕХАНИЗМЫ СВЯЗЫВАНИЯ

До сих пор мы рассматривали очень простую картину действия типичного фермента: отдельную молекулу белка в воде. В этом и последующих разделах мы постепенно должны будем отходить от этой простой схемы, так как белок в растворе, и в особенности белок в растворе при физиологических условиях, редко, если вообще когда-либо, бывает один в своей сольватной оболочке, подобно простой органической молекуле [81]. Поверхность белка в целом гидрофильная, весьма разнообразна по природе, в результате чего на ней более или менее прочно связываются все типы лигандов, от маленьких противоионов до других макромолекул. В любой момент времени несколько таких лигандов могут присоединяться или удаляться с поверхности; время их пребывания на поверхности зависит от силы связывающих взаимодействий. Эти взаимодействия могут изменяться в широких преде-

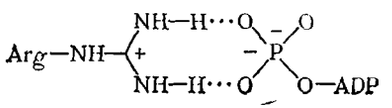
лах: от отрицательного связывания (т. е. отталкивания) до связывания с энергиями порядка 80 кДж·моль$^{-1}$ (это соответствует низким константам диссоциации $10^{-14}$—$10^{-15}$), как в случае связывания lac-репрессора с ДНК [82] или природных белковых ингибиторов с ферментами типа трипсина [83]. Связывание фермента с субстратом, таким образом, является только одним (хотя наиболее важным) из многих типов взаимодействий белок-лиганд, и мы, в первую очередь, кратко рассмотрим виды сил, участвующих в этих взаимодействиях.

### 24.1.4.1. Силы, действующие в водном растворе

Силы, действующие между молекулами в водном растворе [84], конечно, те же самые, что и силы, которые действуют между удаленными друг от друга частями белковой цепи, которые могут вступать в контакт в результате специфического сворачивания. Почти во всех случаях наибольшее внимание уделяется не силе взаимодействия между лигандами и белком, а силам взаимодействия по отдельности между водой и белком, с одной стороны, и лигандом и водой, с другой.

Группы типа амидных, например, легко образуют водородные связи друг с другом в неполярных средах, но не способны на это в разбавленном водном растворе, так как в данном случае для этих групп энергетически более выгодно образовывать водородные связи с водой. (Только тогда, когда большая часть воды удалена, как, например, внутри белковой глобулы и как в случае активного центра или центра связывания, заполненного лигандами, водородные связи между амидными группами становятся более важны).

Подобные рассуждения приложимы и к электростатическим взаимодействиям. Ионные пары между моновалентными ионами существенны в неполярных растворителях, однако их стабильность в воде мала. Значительные эффекты наблюдаются в том случае, когда один из ионов является полиэлектролитом [85], в этом случае могут образовываться стабильные комплексы с полиэлектролитами противоположного заряда. Полилизин, например (поликатион при нейтральном pH), образует нерастворимый комплекс с ДНК (полианионом) [86]. Во многих внутрибелковых и фермент-субстратных взаимодействиях электростатические силы усиливают водородные связи, как в солевом мостике $CO_2^- \cdots H_3N^+$, описанном выше для химотрипсина, а также в случае бифункциональных взаимодействий (52) между карбоксилат- или фосфат-анионом и гуанидиновой группой аргинина, наблюдаемых, например, в активном центре креатинкиназы [87].



(52)



Фактором, определяющим силу взаимодействия между двумя молекулами, возможно, даже более важным, чем водородная связь или электростатическое притяжение, является гидрофобное связывание [8, 84]. Молекулы или части молекул, недостаточно сольватируемые водой, разрушают сеть водородных связей, составляющую структуру растворителя. Это разрушение снижается в случае сближения таких молекул, в результате чего уменьшается общая площадь контакта неполярной поверхности с водой. Углеводороды, например, образуют отдельную вторую фазу, в то время как детергенты, обычно представляющие собой длинноцепочечные углеводороды с полярными группами с одного конца, образуют мицеллы [9]. Последние представляют собой шарообразные агрегаты молекул с заряженными концевыми группами на поверхности, сольватированными водой и с углеводородными цепочками внутри, в контакте только друг с другом. Маленькие неполярные участки или полости на поверхности белка также слабо сольватированы водой, однако они не контролируют состояния агрегации молекулы в целом. Эти участки могут, однако, взаимодействовать с гидрофобными молекулами или частями молекул близкого размера, соединяясь с ними, в результате чего уменьшается общая площадь контакта неполярной поверхности с водой, как это указано выше. При обсуждении трехмерной структуры химотрипсина уже рассматривался пример такого рода (см. с. 488). Вблизи активного центра этого фермента располагается образованный гидрофобными группами карман [46], размер которого позволяет связыванию в нем индольного бокового радикала остатка триптофана. Сам индол прочно связывается в этом кармане (энергия связывания 60 кДж·моль$^{-1}$) [88]. Селективность действия химотрипсина в отношении той или иной пептидной связи в большой степени определяется комплементарностью соответствующего бокового радикала аминокислоты этому гидрофобному карману.

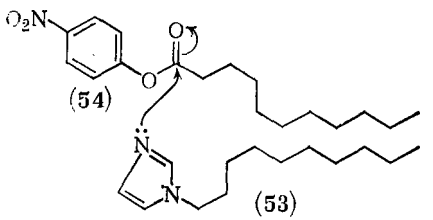
Большая часть энергии гидрофобного связывания, таким образом, является следствием уменьшения невыгодной энергии взаимодействия указанных молекул с водой. После возникновения контакта между такими молекулами начинают играть роль другие силы, действующие на коротких расстояниях, что может приводить к существенному увеличению общей кажущейся энергии взаимодействия. Силы, повышающие притяжение между молекулами, представляют собой силы ван-дер-Ваальса, или силы дисперсии Лондона, возникающие между зарядами, диполями и индуцированными диполями.

### 24.1.4.2. Катализ как результат ассоциации

В настоящее время удается достичь скоростей реакций, близких к ферментативным, в простых внутримолекулярных системах, в первую очередь активированных посредством напряжения в

основном состоянии (см. разд. 24.1.5.2). Создание эффективных моделей связывания для межмолекулярных процессов, позволяющих достичь сравнимых реакционных способностей, оказалось гораздо более трудной задачей. Известно, однако, несколько примеров в которых каталитическая эффективность повышается в результате предварительной ассоциации молекул катализатора и субстрата.

Простейшим случаем является эквимольное взаимодействие между молекулами с гидрофобными боковыми радикалами. *N*-Алкилимидазолы с неразветвленной цепью (**53**) реагируют с *п*-нитрофенилдеканоатом (**54**) примерно в 200 раз быстрее, чем *N*-метилимидазол [89, 90]. Эффект не наблюдается, если углеводородная цепочка короче *н*-бутила; для более длинных радикалов свободная энергия активации понижается пропорционально увеличению длины углеводородной цепи. При добавлении в систему значительного количества этанола эффект полностью исчезает. В этих простых реакциях второго порядка, по-видимому, имеют место гидрофобные взаимодействия между боковыми радикалами. За счет такого взаимодействия молекулы сложного эфира и имидазола (так же, как две молекулы сложного эфира и т. д.) достаточно долго находятся в сближении, что приводит при наличии правильной ориентации к превращению бимолекулярной реакции в эффективную внутримолекулярную




По мере повышения концентрации сложного эфира (**54**) достигается критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) и происходит образование мицелл. (Для детергентов с полярными концевыми группами такого типа ККМ составляет обычно $10^{-2}$—$10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ [8].) В результате происходит дальнейшее увеличение каталитической эффективности. Последнее имеет место в силу того, что в мицелле взаимодействие между сложным эфиром и имидазолом более эффективно. На рис. 24.1.15 схематически изображена сферическая мицелла заряженной молекулы детергента. Углеводородное ядро диаметром около 2 нм окружено сферическим слоем Штерна толщиной в несколько десятых нм, содержащем заряженные или полярные концевые группы, прочно связанную сольватационную воду и противоионы. Бо́льшая часть противоионов, однако, обнаруживается в более толстом внешнем слое. Там эти противоионы независимо сольватируются и свободно обмениваются с другими ионами, содержащимися в растворителе.



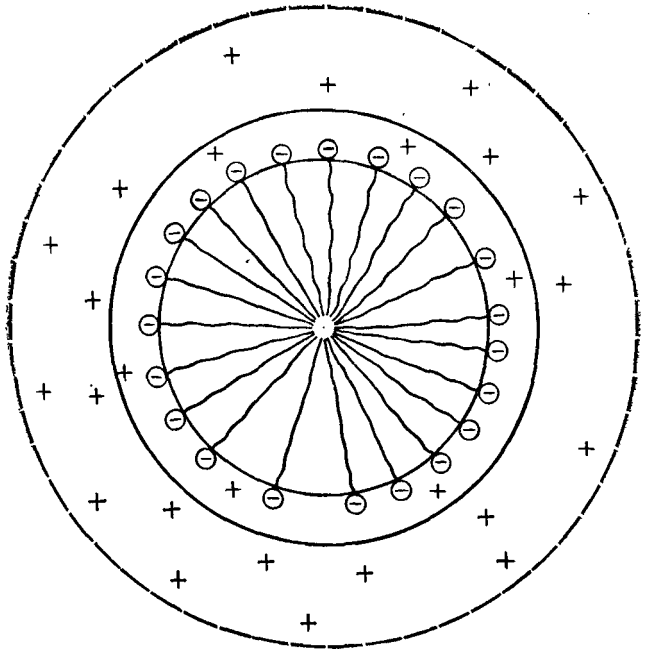


Рис. 24.1.15. Схематическое изображение мицеллы анионного детергента (см. текст).

Углеводородное ядро мицеллы создает любой гидрофобной молекуле или ее части более благоприятное по сравнению с водой окружение. Так, боковой радикал *N*-алкилимидазола (**53**) будет более эффективно связываться с мицеллой, чем с одиночной молекулой (**54**). В случае благоприятного связывания боковая группа поглощается ядром, а полярная концевая группа, таким образом, располагается среди полярных «головок» детергента, в данном случае сложноэфирных (**54**). Связывание в данном случае не только более прочно, но включает также специфическую ориентацию «субстрата», заключающуюся в сближении сложноэфирных и имидазольных групп на поверхности мицеллы.

Функциональные мицеллы не относятся к числу наиболее известных примеров мицеллярного катализа, главным образом потому, что заряженные концевые группы обычных детергентов представляют собой сопряженные основания сильных кислот или тетраалкиламмониевые катионы, в силу чего их реакционная способность ниже, чем у нуклеофилов или общих оснований. Анионная мицелла (см. рис. 24.1.15) может катализировать реакции специфического кислотного катализа, такие как гидролиз ацеталей или ортоэфиров с гидрофобными группами, путем связывания субстрата таким образом, что полярная функциональная группа

помещается в слой Штерна. В этом слое происходит концентрирование (по сравнению с растворителем) ионов $H_3O^+$, и большой избыток отрицательных зарядов может стабилизовать катионное переходное состояние, подобно тому, как это имеет место при гидролизе ацеталей (см. с. 464). Анионная мицелла может существенно *ингибировать* щелочной гидролиз сложного эфира, так как присутствие гидроксид-ионов в слое Штерна маловероятно. Последняя реакция катализируется катионными мицеллами, где противоионом является гидроксид, а превалирующий заряд положителен. Оба эффекта понижаются по мере повышения концентраций солей, которые замещают большую часть противоионов нереакционноспособными анионами или катионами [8].

Таким образом, налицо явная близость механизмов связывания и катализа мицеллами и ферментативных реакций; эта близость распространяется и на кинетику, которая в большинстве случаев мицеллярного катализа подчиняется механизму Михаэлиса-Ментена. Последний факт объясняется насыщением мицеллы субстратом. Катализ водными мицеллами, однако, обычно не слишком эффективен, скорость реакции редко увеличивается более чем в 100 раз. Степень субстратной специфичности также относительно мала. Все это объясняется тем, что связывающие взаимодействия сами относительно слабы и неспецифичны. В связи с этим одной из важнейших целей современных исследований является поиск простых систем, специфично связывающих субстрат.

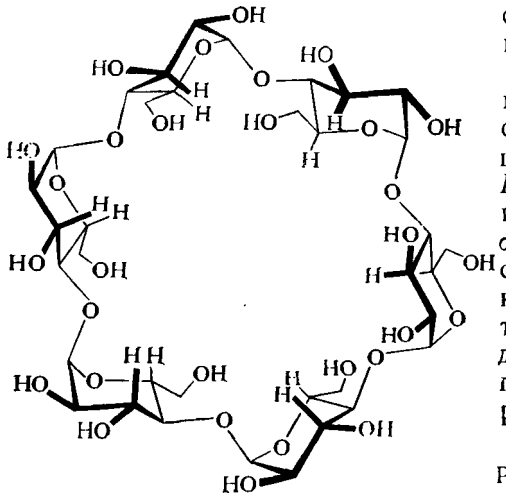


Рис. 24.1.16. Структура α-циклодекстрина.

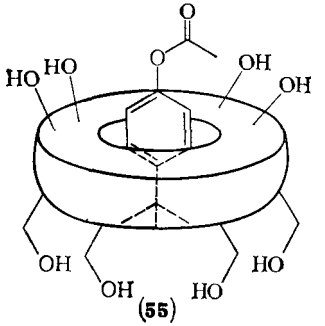
Наиболее известным примером таких систем являются циклодекстрины [91] — циклические олигомеры 1,4-*D*-глюкозы, получаемые из природных источников. α-Циклодекстрин, например, содержит шесть таких глюкозных остатков. Его структура известна в деталях из данных рентгеноструктурного анализа. α-Циклодекстрин представляет собой циклическую молекулу (тор), по форме напоминающую пончик. Глюкозные звенья в ней находятся в *C*1-конформации, что означает, что вторичные 2- и 3-гидроксигруппы сахара находятся на одной стороне тора, а первичные 6-гидроксигруппы — на другой (рис. 24.1.16). Тор окружает полость диаметром около 0,5 нм



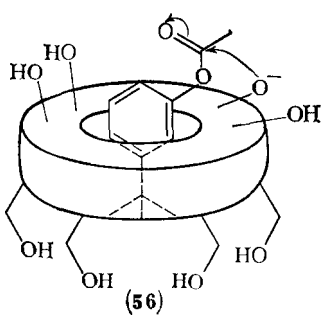
(0,7 нм для гептамера, β-циклодекстрина, и 1 нм для октамера), «выложенную» аксиальными атомами водорода и отдельными парами гликозидных атомов кислорода. Полость, таким образом, гораздо менее полярна, чем вода, и может связывать ряд главным образом гидрофобных молекул подходящего размера. В результате такого связывания в водном растворе может образовываться эквимольный (1 : 1) комплекс включения, и если связавшееся соединение является соответствующим субстратом, возможна внутрикомплексная реакция с участием гидроксигрупп циклодекстрина.

Одна из таких реакций — гидролиз замещенных фенилацетатов [91]. Наиболее яркий результат получен с *трет*-бутильным заместителем. Гидролиз *п-трет*-бутилфенилацетата в присутствии α-циклодекстрина при pH 10,6 протекает на 20 % быстрее, в то время как гидролиз *м-трет*-бутилфенилацетата ускоряется в 260 раз. Объяснение этого эффекта становится очевидным при рассмотрении структур **(55)** и **(56)**.

В обоих случаях ароматическое кольцо субстрата связывается в полости циклодекстрина, причем ориентация связывания контролируется *трет*-бутильной группой. Для *пара*-соединения **(55)** окружение оказывает незначительный эффект, но в случае *мета*-заместителя *О*-ацетильная группа оказывается сближенной с 2- и 3-гидроксигруппами циклодекстрина. При достаточно высоких значениях pH будет время от времени происходить ионизация этих групп и образующийся алкоксид-анион будет осуществлять нуклеофильную атаку сложноэфирной группы, с легким освобождением уходящей фенолятной группы **(56)**. Ацильная группа, таким образом, переносится на циклодекстрин, образуя интермедиат (как и в случае любого нуклеофильного катализатора, от ацетата до химотрипсина), который должен гидролизоваться на второй, особой стадии. При использовании хромофорной ацильной группы этот интермедиат можно идентифицировать.



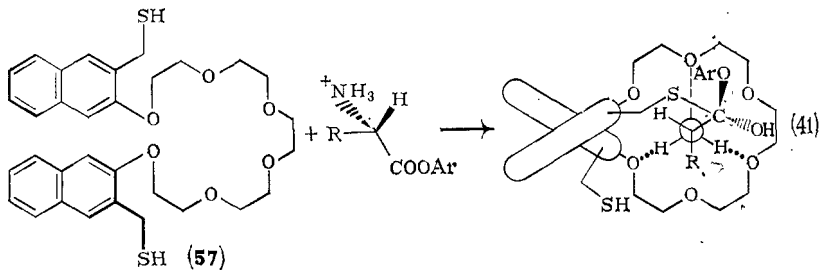
**(55)**



**(56)**

Циклодекстрины, таким образом, являются весьма удачными моделями реакций между ферментом и субстратом. Образованные из звеньев *D*-глюкозы они в принципе являются асимметрич-

ными катализаторами и обладают небольшой энантиомерной специфичностью [92]. Последняя, однако, очень слаба по сравнению со 100%-ной энантиомерной специфичностью фермента типа химотрипсина. Недавние исследования привели к синтезу специально сконструированных молекул «хозяина», способных к связыванию и реагированию с одним из энантиомеров субстрата с большей эффективностью, чем со вторым [93]. Так, циклический полиэфир (57), основу которого составляет асимметричное бинафтильное звено, связывает катионы сложных эфиров аминокислот в неполярной среде. HS-Группы действуют в качестве нуклеофильного катализатора сольволиза связанного сложного эфира* [94]. Хиральная специфичность системы зависит от размера бокового радикала R аминокислоты и для $R = CHMe_2$ может достигать 9—10. {В том случае, если энантиомерный эфир *D*-аминокислоты связывается в соответствии со схемой (41), R должен быть сближен с бинафтильной группой.} Эта система особенно интересна также и тем, что связывающее взаимодействие имеет скорее характер водородной, а не гидрофобной связи. И в этом случае, однако, каталитический эффект исчезает при добавлении значительного количества воды.




### 24.1.4.3. Связывание специфических субстратов ферментами

Наиболее важным отличием ферментативного катализа от обычного химического является наличие стадии связывания, приводящей к образованию фермент-субстратного комплекса. Как мы уже видели, при попытках достижения скоростей и специфичностей, характерных для ферментативного катализа, в бимолекулярных реакциях между простыми соединениями эта стадия наиболее трудна в воспроизведении. Ясно, что связывающие центры ферментов должны иметь высокоорганизованную структуру. В связи с этим наиболее полную информацию об этих центрах можно получить, как это и можно предположить, из данных рентгеноструктурного анализа.

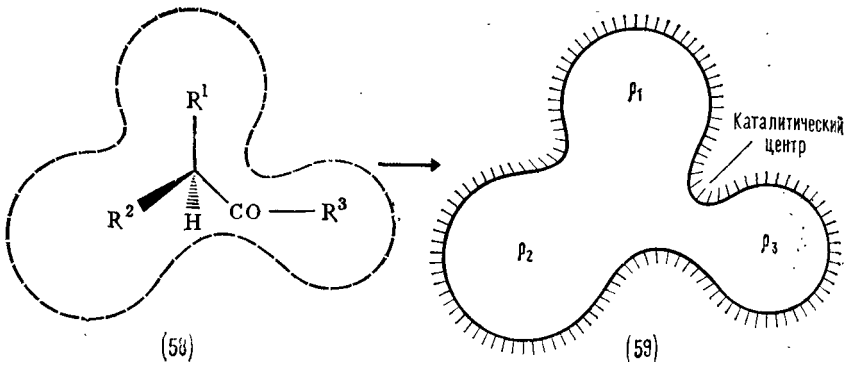
В теории связывания субстрата долгое время доминировала идея Фишера, выдвинутая еще в 1894 г. [95]. Согласно этой идее, субстрат подходит к ферменту подобно ключу к замку. Корни этой идеи, однако, много старше. 2000 лет назад Лукреций весьма близко описал эту ситуацию [96]: «Вещи, в которых их ткань совпадает взаимно с другою, так что, где выпуклость есть, у другой оказалась бы там же впадина, — эта их связь окажется самою тесной».

Оперируя понятиями сил, действующих в водном растворе и контролирующих связывание ферментом субстрата, мы можем теперь сказать, что эта специфичность определяется взаимодействиями, действующими на малых расстояниях. Это, в первую очередь, дисперсионные силы ван-дер-Ваальса, изменяющиеся с расстоянием по закону $r^{-6}$. Чисто связывающие взаимодействия, следовательно, решающим образом зависят от размера и формы участвующих молекул.

Исследования фермент-субстратных взаимодействий, особенно проведенные в последние 25 лет, подтвердили и расширили эти идеи. Ферменты, обладающие подлинной специфичностью и использующие только один субстрат, трудны для систематических исследований. Существует, однако, много ферментов с весьма широкой специфичностью. Для них становится возможным измерение влияния изменения структуры субстрата на $\kappa_{кат}$ и $K_м$ в условиях, оптимальных для природного субстрата. Другим полезным подходом является использование соединений — конкурентных ингибиторов реакции. Последние представляют собой соединения, связывающиеся в том же участке фермента, что и субстрат, обычно в силу близости их структур, и тем самым мешающие протеканию реакции между ферментом и субстратом, так как занимают места, в обычных условиях занимаемые субстратом. Эффект ингибирования четко зависит от концентрации, и каждый отдельный ингибитор можно охарактеризовать, измеряя влияние изменения его концентрации на скорость ферментативной реакции. Эффективность процесса выражается посредством константы ингибирования $K_i$, которая, подобно $K_м$, в пределе равняется константе диссоциации.

Изменяя структуру субстрата или ингибитора, можно определить, какие черты молекулы важны для связывания, и, следовательно, какие группы субстрата специфически связываются ферментом. Становится возможным, используя достаточное количество данных, представить себе геометрию центра связывания, предполагая его комплементарным структурам молекул субстрата или ингибитора, связывающихся наилучшим образом; иными словами, вывести геометрию замка из формы ключа. Весьма детальные исследования такого рода в случае химотрипсина привели к формулированию требований ко всем четырем положениям, окружающим тетраэдрический α-углеродный атом аминокислотного остатка, атакуемого серином активного центра [97, 98] {заместители обозначены в соответствии с (58)}.

* Реакцию проводили в смеси метиленхлорид:этанол (4 : 1), забуференной тетраметиламмонийацетатом-уксусной кислотой.




(58) (59)

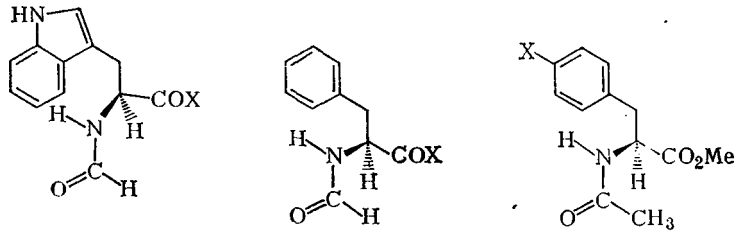
Установлено, что хороший субстрат должен содержать α-водородный атом, ациламиногруппу $R^1$, уходящую группу $R^3$ в правильном положении, как это обозначено в (**58**) и достаточно (но не слишком) большую гидрофобную группу в боковом радикале $R^2$, который не должен иметь разветвлений у первого (β) углеродного атома. Сумма этих требований привела к заключению, что в химотрипсине имеются три связывающих центра $\rho_1$, $\rho_2$ и $\rho_3$ (**59**) для групп $R^1$, $R^2$ и $R^3$ соответственно, и что их относительные положения и в какой-то степени их формы и размеры комплементарны группам $R^1$ лучших субстратов.

Реализация указанного подхода требует длительного времени, однако он весьма ценен, так как дает информацию о связывании субстрата в условиях нормального функционирования фермента. Этот подход все же не может дать детальных сведений о взаимодействии групп, участвующих в связывании, подобных тем, какие стали доступными в последние годы благодаря рентгеноструктурным данным. Рентгеноструктурные исследования обычно неприменимы к фермент-субстратным комплексам, поскольку времена жизни последних слишком малы, и должны поэтому проводиться на неработающих ферментах. Однако рентгеноструктурные данные, полученные для комплексов ферментов с ингибиторами или плохими субстратами, дали большой объем информации о деталях связывания малых и больших молекул ферментами, который в удачных случаях можно безусловно перенести на связывание субстрата. Структура комплексов химотрипсина с *N*-формилтриптофаном и *N*-формилфенилаланином (**60**) и (**61**) (X = OH, продукты гидролиза специфических субстратов) почти наверняка близка к соответствующим фермент-субстратным комплексам (**60**), (**61**) (X = NHR), так как фермент катализирует обмен $^{18}O$ с карбоксильной группы *N*-ацильных производных этих соединений в растворитель — воду [99].

Определяющим структурным требованием к хорошему субстрату или ингибитору химотрипсина является наличие ароматической группы {$R^2$ в (**58**)}. Центр связывания этой группы можно легко распознать в трехмерных структурах комплексов фермента,



например с соединениями (**60**) и (**61**) и ацилферментов, включая упоминавшийся выше тозилфермент и индолакрилоилфермент [46а, 100]. Ароматическая группа в каждом случае попадает в гидрофобный карман, расположенный близ активного центра



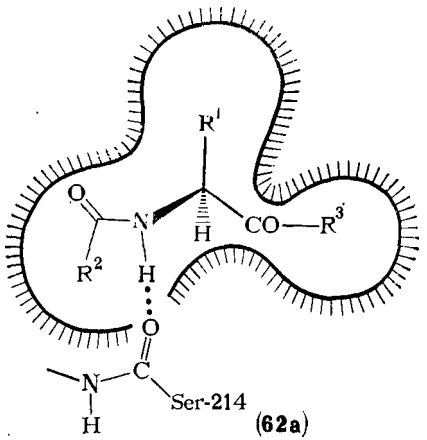
(**60**) (**61**) (**62**)

(см. рис. 24.1.11 и 24.1.12). Хотя фенильная и *n*-гидроксифенильная группы фенилаланина и тирозина (**62**, X = OH) хорошо помещаются в гидрофобном кармане, ароматические группы с большими заместителями в *пара*-положении не способны на это. Этим, как полагают [46а], объясняется сильное понижение реакционной способности у производных *n*-иод-*L*-фенилаланина и *O*-алкилированного тирозина (**62**, X = I, OMe, OEt, $OCHMe_2$) [101]. Эти соединения связываются лишь немногим менее эффективно, чем хорошие субстраты (**62**, X = H, OH), но $\kappa_{кат}$ при этом резко снижается. Бо́льшая ароматическая группа, по-видимому, наилучшим образом связывается в гидрофобном кармане, однако ее «хвост», включающий α-углеродный атом в (**58**), выступает из кармана слишком далеко, в силу чего нарушается правильная ориентация других групп, в частности атакуемой пептидной связи, относительно каталитических групп активного центра.

Ациламиногруппа [$R^1$ в (**58**)] также участвует в создании правильной ориентации для реакции [102]. *N*-Метильные соединения ($R^1 = R^4CONMe$), например, являются плохими субстратами [101]. В кристаллической структуре комплекса химотрипсина с *N*-формил-*L*-триптофаном NH-группа образует водородную связь с (пептидным) карбонильным кислородом серина-214 {см. (**62а**)} [103]. Это взаимодействие фиксирует позицию α-углеродного атома и тем самым амидной группы субстрата {$COR^3$ в (**58**)} [46а].

Можно теперь представить, как возникает хиральная специфичность химотрипсина (**62а**). Если $R^1$ прочно связывается в гидрофобном участке $\rho_1$, а ациламиногруппа располагается в центре специфичности $\rho_2$, то положения остающихся заместителей H и $COR^3$ фиксируются. Производные *L*-аминокислот связываются в реакционноспособной конфигурации, показанной на (**62а**), но в случае производных *D*-аминокислот группы H и $COR^3$ меняются местами, в силу чего карбонильная группа субстрата более не находится в контакте с нуклеофильными группами активного центра. Производные *D*-аминокислот могут связываться ферментом —

иногда даже прочнее природных субстратов, однако это непродуктивное связывание не приводит к катализу.




(62a)

После идентификации центра связывания субстрата в химотрипсине большой интерес представляло изучение механизмов связывания, используемых родственными химотрипсину сериновыми протеиназами, трипсином и эластазой. Каталитический механизм действия этих ферментов тот же, что и для химотрипсина (см. разд. 24.1.3.3), но специфичности сильно различаются между собой. В то время как химотрипсин атакует карбонильные группы аминокислотных остатков, содержащих ароматические боковые радикалы, трипсин специфичен к положительно заряженным аминокислотам — лизину и аргинину [104], а эластаза, хотя ее специфичность менее выражена, все же предпочитает алифатические аминокислоты, в частности аланин [105]. Это различие в специфичности объясняют различием в трехмерных структурах ферментов, соответствующих области связывающего кармана химотрипсина. Этот карман различим в двух указанных выше ферментах, но в каждом случае модифицирован. В структуре эластазы [105] гидрофобные боковые радикалы двух аминокислот, валина-216 и треонина-226, отсутствующие в химотрипсине, ограничивают доступ к гидрофобному карману, предотвращая связывание ароматических групп. Производные *L*-аланина, с другой стороны, хорошо связываются в этом кармане в той же конформации, что и в случае продуктивного связывания химотрипсином. При этом метильная группа аланина находится в пределах ван-дер-ваальсового контакта с боковыми радикалами аминокислотных остатков, образующих вход в гидрофобный карман. Связывающий карман, присутствующий в трехмерной структуре трипсина, уже не является гидрофобным [55, 106]. Один из аминокислотных остатков, образующих этот карман, соответствующий серину-189 в химотрипсине, в трипсине заменяется на аспарагиновую кислоту-189. В результате этой замены в карман специфичности помещается карбоксильная группа и становится возможным образование удаленного из растворителя прочного карбоксилгуанидинового солевого мостика, как в (52), с боковым радикалом остатка аргинина субстрата (и аналогично с $^{+}NH_3$-группой остатка лизина).



Эта изменчивость в центрах связывания субстрата дает возможность полагать, что семейство сериновых протеиназ возникло в процессе эволюции от общего предка и относительно недавно. Структурную близость, обнаруженную в ряде ферментов, использующих кофермент никотинамидадениндинуклеотид NAD [107] (см. гл. 24.3), объясняют гораздо более далекими и древними эволюционными взаимоотношениями. В некоторых случаях такие ферменты, включая лактат-, малат- и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, имеют очень близкие трехмерные структуры в участках связывания кофермента, в то время как другие участки структуры совершенно различны. Этот «участок связывания динуклеотида» присутствует в широко варьируемых участках первичной структуры этих ферментов и состоит из двух очень близких звеньев связывания мононуклеотида, одно из которых специфично к адениновой половине кофермента. Гораздо большее число ферментов катализирует реакции адениновых нуклеотидов, AMP, ADP и ATP (см. гл. 24.3), и можно полагать, что в процессе эволюции более вероятно образование связывающего звена для AMP, а не обычного «участка связывания динуклеотида». Действительно, имеются данные о существовании такого звена в киназах, и что это звено родственно мононуклеотид-связывающему звену дегидрогеназ. Отсюда вытекает интригующее предположение о том, что участок связывания нуклеотида во всем множестве существующих ферментов происходит от общего «изначального нуклеотид-связывающего белка» [107].

### 24.1.4.4. Теория индуцированного соответствия

Хотя выдвинутая Фишером гипотеза «ключа и замка» оказалась весьма плодотворной и объясняет многие общие закономерности субстратной специфичности, по мере накопления в последние годы детальной информации о взаимодействиях типа фермент-молекула ее недостатки становились все более очевидными. В буквальном смысле эта теория подразумевает наличие жесткого центра связывания. В то же время имеется большое число данных, как рентгеноструктурных, так и прямых спектрофотометрических и кинетических исследований ферментов в растворе, о конформационной мобильности белков. Мы видели, что тирозин-248 карбоксипептидазы при связывании глицилтирозина сдвигается не менее чем на 1,2 нм, явно меняя природу и форму как участка связывания, так и каталитического центра (см. разд. 24.1.3.4). Это, возможно, крайний случай, однако при наличии рентгеноструктурных

данных о структуре комплексов ферментов с аналогами субстрата или ингибиторами, как правило, можно наблюдать значительные конформационные различия по сравнению со структурой нативного фермента.

Теория индуцированного соответствия [108—110] предполагает, что подобные конформационные изменения, происходящие при связывании субстрата ферментом, могут играть важную роль в катализе. Последнее может иметь место, если конформационные изменения, индуцированные связыванием субстрата, влияют на относительную геометрию каталитических групп активного центра, подобно описанному выше случаю с карбоксипептидазой. Поскольку ясно, что каталитические группы в реагирующем фермент-субстратном комплексе должны находиться в оптимальных положениях, то в указанных выше случаях в нативных ферментах эти положения не оптимальны. Те же рассуждения приложимы и к геометрии связывающего центра, который в процессе связывания также должен «подстраиваться» для наилучшего соответствия субстрату.

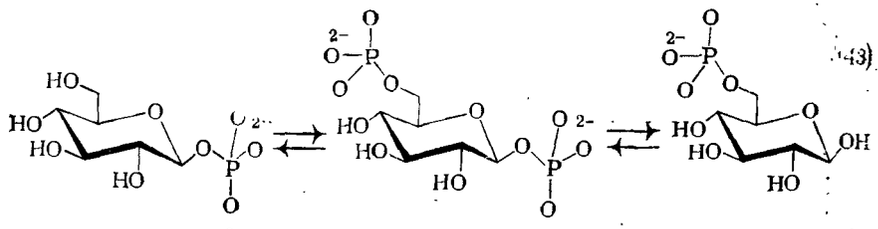
Существует множество примеров зависимости катализа и связывания от конформационных изменений. Участок связывания химотрипсина решающим образом зависит от наличия солевого мостика между аспарагиновой кислотой-194 и концевой аминогруппой изолейцина-16 (см. рис. 24.1.14). В неактивном предшественнике химотрипсина, химотрипсиногене, например, каталитические группы расположены так же, как и в нативном ферменте, но гидрофобный карман отсутствует [49]. Последний формируется в результате индуцированных образованием солевого мостика изменений конформации аспарагиновой кислоты-194 и соседних остатков аминокислот — глицина-193 и метионина-192. Согласно кинетическим экспериментам, проведенным на химотрипсине, нечто подобное происходит при протонировании свободной формы ($NH_2$) изолейцина-16. Форма фермента, характерная для высоких значений pH, неактивна, так как она не способна связывать субстрат. При быстром понижении pH раствора неактивной формы фермента с 12 до 7 связывание наблюдается, но только по прошествии определенного отрезка времени (менее секунды), во время которого фермент принимает активную конформацию [111]. В этом случае конформационное изменение должно предшествовать связыванию и явно слишком медленно для того, чтобы являться частью нормального механизма.

Изучение случаев, в которых при связывании субстрата изменяется геометрия каталитического участка, часто является более легкой задачей. Простой, но примечательный пример представляет эффект ингибиторов химотрипсина на скорость гидролиза ацетилфермента. Ацетильная группа слишком мала, чтобы достигать гидрофобного кармана с серина-195, поэтому связывание в данном случае неспецифично. В то же время, если ацильная группа принадлежит субстратной аминокислоте и ее боковой радикал связывается в гидрофобном кармане, имеет место правильная ориентация для катализа гидролиза: *N*-ацетил-*L*-тирозинфермент, например, гидролизуется в 12 000 раз быстрее ацетилхимотрипсина [112]. Причиной этого эффекта не может быть только ориентация сложноэфирной группы, так как скорость гидролиза ацетилхимотрипсина удваивается в присутствии индола [113], являющегося в обычных условиях конкурентным ингибитором фермента. Индол, по-видимому, связывается в незанятом гидрофобном кармане ацетилфермента и явно влияет на взаимодействие между сложноэфирной группой ацилфермента и общими основными группами активного центра.

Особое значение индуцированное соответствие имеет для целого ряда ферментов, переносящих ацильные или фосфорильные группы из одного нуклеофильного центра в другой. Ацилхимотрипсины служат примером случая низкой специфичности в отношении нуклеофила. Ацетил- [114] и фуроилхимотрипсин [62] легко реагируют, наравне с водой, со всеми типами спиртов, перенося ацильную группу на ROH с образованием сложного эфира. Неспецифический ацильный перенос такого рода, очевидно, неприемлем в тех случаях, когда целью действия фермента является перенос ацильной группы на специфический рецептор, но, поскольку размер молекулы любого спирта превышает размер молекулы воды, полностью удалить последнюю из активного центра невозможно. В этой ситуации фермент должен выбрать между ROH и HOH путем гарантирования того, что HOH в реакцию не вступит, и индуцированное соответствие обеспечивает механизм специфичности этого типа. Ярким примером такой специфичности является перенос фосфорильной группы на глюкозу, катализируемый фосфоглюкомутазой и гексокиназой.

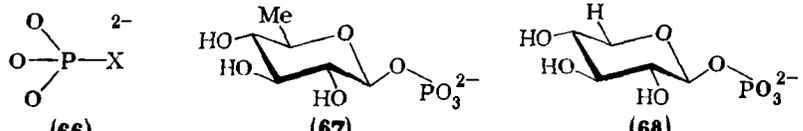
Фосфоглюкомутаза катализирует взаимопревращение глюкозо-1- и -6-фосфатов (**63**) и (**64**), перенося фосфорильную группу с фосфорилированного остатка серина фермента на другой глюкозофосфат с образованием глюкозо-1,6-дифосфата (**65**) {схема (43)}. Фосфорилирование такого слабого нуклеофила, как спирт, обычно требует наличия реакционноспособного фосфорильного соединения, и поскольку константа скорости переноса фосфорильной группы с фермента на 6-гидроксильную группу глюкозо-1-фосфата ($\kappa_1$, схема 40) очень велика (около 1000 $с^{-1}$) [115], ясно, что фосфосериновая группа фермента весьма значительно активирована, предположительно каталитическими группами активного центра. Если этот высокоактивированный фосфорилсерин доступен для 6-гидроксильной группы такой большой молекулы, как глюкозо-1-фосфат (**63**), то он неизбежно становится доступным и для воды растворителя. Однако константа скорости *гидролиза* фосфорилфермента в отсутствие субстрата составляет только $3 \cdot 10^{-8}$ $с^{-1}$, т. е. меньше константы скорости переноса более чем в $10^{10}$ раз. Но даже эта очень медленная скорость все же в 300 раз выше скорости гидролиза фосфосерина в этих условиях (pH 7,5),

так что фосфосерин фермента слегка активирован и в отсутствие субстрата. Ясно, однако, что основная часть высокой каталитической эффективности этого фермента зависит от наличия субстрата; возможно даже вызывается связыванием последнего. Так, оказалось возможным отнести значительные эффекты к связыванию отдельных частей глюкозо-1-фосфата [115].



(63) + $EnzOPO_3^{2-}$ (65) + EnzOH (64) + $EnzOPO_3^{2-}$ (43)

Одной из групп, для которой весьма вероятно наличие специфического участка связывания на ферменте, является концевой фосфат. Добавление неорганического фосфата (66, X = OH) вместо субстрата повышает скорость гидролиза фосфорилфермента в 50 раз, в то время как добавление простых фосфатных эфиров (66, X = OMe, OEt) *или неорганического фосфита* (66, X = H) приводит к ускорению в несколько сот раз. Кажется очевидным, что эти эффекты связывания фосфорильного соединения в участке, лежащем на расстоянии нескольких длин связей от каталитического центра, должны включать изменения в трехмерной структуре фермента. Бо́льшая часть разницы в $10^{10}$ раз в реакционной способности между фосфоферментом и фосфофермент-субстратным комплексом должна покрываться за счет связывания остатка глюкозы. В присутствии 6-дезоксиглюкозо-1-фосфата (67) не наблюдается сколько-нибудь заметного ускорения гидролиза фосфорилфермента, без сомнения, потому, что аналог субстрата предотвращает проникновение воды в активный центр. В присутствии α-*D*-ксилозо-1-фосфата (68), однако, когда беспрепятственный проход воды все еще кажется маловероятным, скорость гидролиза фосфорилфермента сильно возрастает (в $2 \cdot 10^5$ раза) [115].



(66) (67) (68)

Последний эффект представляет очень веское свидетельство в пользу индуцированного соответствия. Сходным случаем является реакция, катализируемая гексокиназой (для последней также доступны рентгеноструктурные данные). Гексокиназа [116]



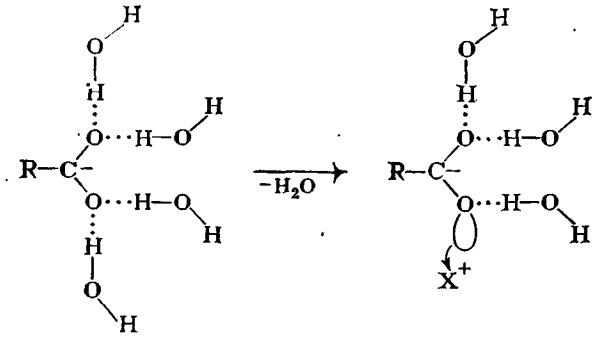
катализирует перенос концевой фосфатной группы со связанной ферментом молекулы ATP на ту же 6-гидроксильную группу *D*-глюкозы, и в этом случае скорость переноса фосфорильного остатка на гидроксильную группу субстрата в десятки тысяч раз выше скорости его переноса на воду. В этом случае как для самого фермента [117], так и для ряда его комплексов с субстратами и их аналогами [118], имеются рентгеноструктурные данные. Фермент состоит из двух идентичных субъединиц, несимметрично связанных друг с другом нековалентными взаимодействиями. Нуклеотид связывается в участке, расположенном между субъединицами, близ молекулы углевода-рецептора, связанной в свою очередь в глубокой впадине мономера. Хотя участки связывания субстратов и не перекрываются явным образом, связывание одного из субстратов в своем специфическом участке явно влияет на связывание во втором центре. Так, ADP связывается в нуклеотидном центре только в том случае, если глюкоза уже связана и не связывается, если последняя отсутствует. Аналогично, связывание нуклеотида изменяет связывание углевода [118]. По мере накопления данных рентгеноструктурного анализа высокого разрешения становится возможной идентификация подлинных конформационных изменений, протекающих при индуцированном соответствии, и связанных с ним механизмов.

### 24.1.5. ИСТОЧНИКИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Имеющиеся в настоящее время данные предполагают, что используемые ферментами каталитические механизмы в деталях близки к изучаемым физической органической химией в простых системах. В рассматриваемых механизмах реакций нет, таким образом, никаких особых или неожиданных аспектов, которые могли бы отвечать за необычайно высокие скорости ферментативных реакций. Поэтому для объяснения каталитической эффективности мы должны обратить внимание на стадию связывания субстрата. Мы только теперь начинаем понимать всю сложность процесса связывания, но ясно, что не существует какого-либо единичного фактора, отвечающего за каталитическую эффективность фермента. Мы, скорее, должны рассматривать несколько не вполне независимых друг от друга факторов, и каждый индивидуальный случай будет по-разному зависеть от этих факторов.

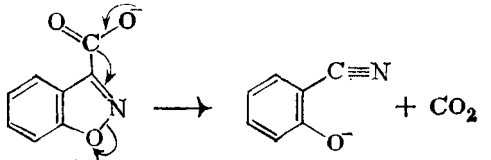
Наиболее часто обсуждаемые в этой связи факторы — энтропия и напряжение, и мы рассмотрим их ниже по отдельности. Напряжение — это неопределенный термин, обычно относящийся к искажению структуры субстратов по сравнению с их наиболее стабильной геометрией основного состояния. В отдельных случаях, однако, другие типы дестабилизации могут играть не менее важную роль. Особенно интересной возможностью для этого является десольватация. Хорошо известно, что полярные молекулы и, в частности, ионы сильно сольватированы в воде. По сравнению со

свободными энергиями активации реакций, протекающих со значительной скоростью в мягких условиях, энергии сольватации велики, так что сольватация представляет собой важный фактор стабилизации основного состояния. Например, прежде чем нуклеофил типа $RCO_2^-$ сможет атаковать электрофильный центр, по крайней мере одна из неподеленных пар электронов одного из атомов кислорода должна стать свободной, что означает разрыв сольватной оболочки и, в частности, разрыв водородной связи с молекулой сольватной воды {схема (44)}.



(44)

В диполярных апротонных растворителях анионы, которые в этих условиях сольватированы незначительно, во много раз более реакционноспособны, чем в воде (более чем в $10^6$ раз для анионов из атомов элементов первого и второго рядов [120], включающих те, которые имеют важное биологическое значение). Нуклеофильность и основность нуклеофилов может, таким образом, сильно возрастать в результате их эффективной десольватации при связывании на ферменте. Повышение таким путем энергии основного состояния также ускоряет мономолекулярные реакции заряженных частиц, проходящие через переходное состояние, заряд в котором менее локализован, чем в основном. Примерами являются реакции декарбоксилирования и дефосфорилирования, очень близкие процессы, которые при наличии соответствующего нуклеофила приводят к переносу $CO_2$ или фосфорила. Декарбоксилирование аниона бензизоксазолкарбоновой-3 кислоты (**69**), например, проходит в диполярных апротонных растворителях примерно в $10^8$ раз быстрее, чем в воде [121]. Распад дианиона фосфата с хорошей уходящей группой, такой как в (**70**), также ускоряется в диполярных апротонных растворителях [122]. В этих условиях

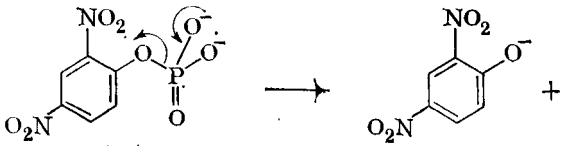


(69)

(45)



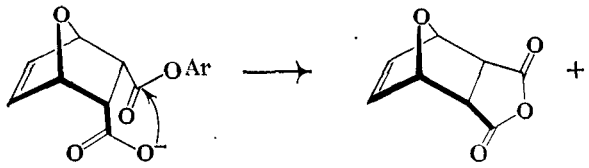
эффект несколько меньше (хотя данные не вполне сопоставимы), без сомнения, из-за двойного отрицательного заряда как основного, так и переходного состояний реагента.



(70)

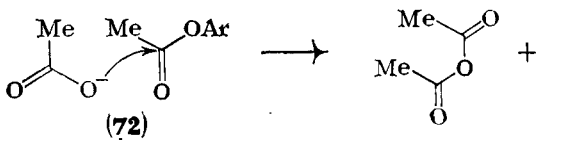
(46)

В противоположность этим четким результатам, полученным для мономолекулярных реакций, предполагаемые эффекты десольватации нуклеофила в сравнимых внутримолекулярных реакциях в водной среде не были доказаны. Возможность таких реакций возникает в силу того, что в соединениях типа (**71**), как показывают молекулярные модели, карбоксильные и сложноэфирные группы должны находиться в прямом контакте, так как молекула воды просто не поместится между ними [123, 124].



(71)

(47)



(72)

(48)

Бимолекулярная нуклеофильная атака ацетатом соответствующих замещенных фенилацетатов (**72**) протекает в диметилсульфоксиде в $10^5$ раз быстрее, чем в воде, как и предполагалось, так как свободный ацетат-ион намного реакционноспособнее сильно сольватированного иона в водном растворе. Внутримолекулярная реакция (**71**) еще быстрее (эффективная мольность карбоксильной группы составляет в воде до $10^8$ моль·л$^{-1}$) [123], поэтому большая часть возросшей реакционной способности соседней группы $CO_2^-$ может происходить за счет усиленной десольватации. Эта возможность проверена измерением скорости внутримолекулярной реакции в ДМСО. Если часть высокой реакционной способности соединения (**71**) действительно объясняется частичной десольватацией карбоксильной группы, то возрастание скорости при переносе в ДМСО должно соответственно уменьшаться. На самом деле как внутри-, так и межмолекулярные реакции при переносе из воды в ДМСО ускоряются в одинаковой

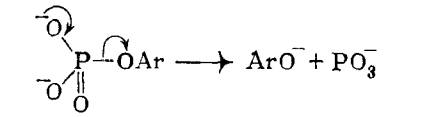
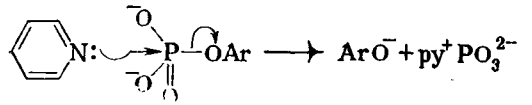
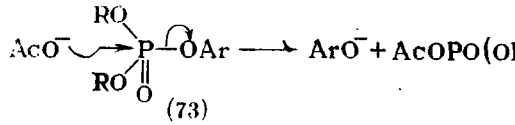
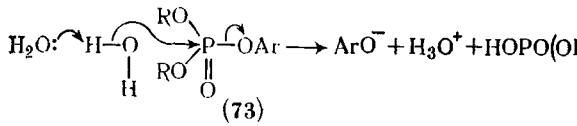
степени, так что десольватация основного состояния не является важной особенностью этой и других изученных моделей [127]. Тем не менее в реакциях фермента с субстратом этот механизм исключать не следует.

### 24.1.5.1. Энтропийные факторы

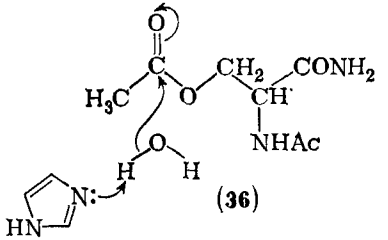
В разд. 24.1.3 мы видели, как каталитические механизмы, по которым, как полагают, действуют некоторые ферменты, могут в ряде случаев наблюдаться в простых системах. Так, общий основной катализ имидазолом, например, гидролиза *N,O*-диацетилсеринамида (**36**) [53] представляет собой модель реакции химотрипсина со сложноэфирным субстратом. В ионной реакции этого типа переходное состояние каталитической реакции стабилизуется за счет делокализации заряда на нескольких центрах. В этом случае фиксация положительного заряда на нуклеофильной гидроксильной группе нейтрализуется делокализацией на азотах имидазола. В результате происходит понижение энергии активации реакции за счет затрат повышенной энтропии активации (см. разд. 24.1.22). Данные табл. 24.1.4 иллюстрируют это положение: мономолекулярная реакция отщепления 2,4-динитрофеноксида от соответствующего фосфатного моноэфира-дианиона имеет высокую энтальпию активации, однако реакция протекает достаточно легко из-за ее весьма благоприятной энтропии активации. Нуклеофильный катализ этой реакции пиридином характеризуется несколько меньшей энтальпией активации, так как азот пиридина может принимать на себя положительный заряд в переходном состоянии, в результате чего удается избежать образования высокоэнергетического интермедиата — метафосфата [$PO_3^-$]. Тем не менее участие молекулы пиридина отражается в виде намного менее выгодной энтропии активации. Близкие активационные параметры наблюдаются и в случае нуклеофильного катализа ацетатом гидролиза триэфира (**73**) также бимолекулярной реакции. Нейтральный гидролиз (**73**) проходит, как полагают, по механизму тримолекулярного общего основного катализа (см. табл. 24.1.4). Эта реакция протекает относительно медленно исключительно за счет энтропийного вклада, еще менее выгодного в этом случае. Энтальпия активации, впрочем, для тримолекулярного процесса несколько ниже, поскольку делокализация заряда на трех молекулах еще больше уменьшает его фиксацию в каком-либо одном центре.

Аналогичные рассуждения применимы и к реакции соединения (**36**) по схеме (49). Наиболее значительное отличие этой реакции от соответствующей реакции химотрипсина с эфирным субстратом в том, что модельная реакция (49) протекает на много порядков медленнее. Это проистекает, в первую очередь, в силу малой вероятности для трех отдельных молекул, каждая из которых обладает независимыми степенями свободы поступательного и вращательного движения, одновременно сойтись в одном и том же месте и в правильной ориентации, способствующей трансформации комплекса в переходное состояние. Статистические факторы такого рода и определяют энтропию активации реакции. Брюс [124] нашел *среднее* (экспериментальное) значение ($-T\Delta S^{\#}$/кинетический порядок), равное $18{,}4 \pm 3{,}3$ кДж·моль$^{-1}$, что соответствует снижению скорости в $1{,}7 \pm 0{,}3 \cdot 10^3$ раза на каждую дополнительную частицу, входящую в уравнение скорости и, следовательно, в переходное состояние. Дженкс [119] оценил *максимальную* эффективную мольность во внутримолекулярной реакции примерно в $10^8$ моль·л$^{-1}$ {близка к наблюдаемой в случае (**71**)}, что соответствует проигрышу в энтропии активации в 146 Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$ в реакции с *одним* дополнительным участником в переходном состоянии. В случае химотрипсина имидазол и нуклеофильная HO-группа серина принадлежат одной и той же молекуле и фиксированы друг относительно друга сетью водородных связей системы переноса заряда. Специфические суб-

*Таблица 24.1.4. Зависимость энтропии активации от молекулярности в реакциях переноса фосфорильного остатка* [53a] [Ar = $C_6H_4(NO_2)_2$-2,4, $R_2 = (CH_2)_3$]

| | $\Delta H^{\neq}$, кДж·моль$^{-1}$ | $\Delta S^{\neq}$, Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$ |
|---|---|---|
| Мономолекулярная | | |
|  | 107,4 | +27,6 |
| Бимолекулярная | | |
|  | 70,2 | −81,1 |
|  (73) | 75,7 | −72,3 |
| Тримолекулярная | | |
|  (73) | 60,2 | −148,8 |

страты также связываются в определенном положении и ориентации. Таким образом возникает возможность того, что три группы в фермент-субстратном комплексе лишаются независимых вращательных степеней свободы и явно не имеют поступательных. Потери в энтропии при переходе из основного в переходное состояние в би- или тримолекулярном процессе, таким образом, исчезают, в то время как благоприятная энтальпия активации сохраняется, что приводит к многократному ускорению ферментативной реакции. Последний фактор может в принципе быть эквивалентен эффективной мольности для каждой из участвующих групп вплоть до $10^8$ моль·л$^{-1}$.




(36) (49)

На практике такие большие ускорения наблюдаются только в реакциях циклизации и поэтому, вероятно, приложимы только к нуклеофильному катализу [119]. Внутримолекулярный общий основной катализ эффективен в гораздо меньшей степени [119] (до 100 моль·л$^{-1}$ в известных примерах [125]), поэтому максимальный выигрыш в энтропии в случае химотрипсина над реакцией по схеме (49) может достигать порядка $10^{10}$ моль$^2$·л$^{-2}$ (реакция третьего порядка по сравнению с первым порядком).

Энтропийные факторы, таким образом, могут являться причиной очень больших ускорений и, безусловно, представляют собой один из наиболее общих факторов, связанных с высокой эффективностью ферментативного катализа. Однако и в простых внутримолекулярных реакциях могут наблюдаться эффективные мольности, намного превышающие те, которые можно было бы ожидать, учитывая только энтропийный фактор. В этих случаях имеет место, по-видимому, напряжение в основном состоянии. Связь этого явления с ферментативным катализом будет рассмотрена в следующем разделе.

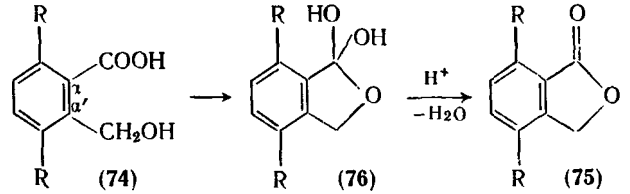
### 24.1.5.2. Напряжения

Самыми быстрыми внутримолекулярными реакциями являются реакции циклизации, в которых происходит исчезновение сильных нековалентных взаимодействий. Простой пример такой реакции — лактонизация 2-гидроксиметил-3,6-диметилбензойной кислоты (74, R = Me) {схема (50)}. Последняя переходит во фталид (75, R = Me) в 300 раз быстрее, чем незамещенное соединение (74, R = H) [126].

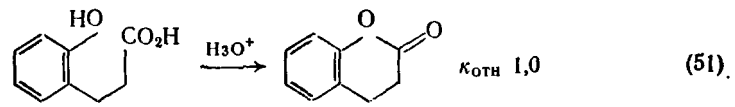


В продукте, тетраэдрическом интермедиате, а также в переходном состоянии реакции нековалентные взаимодействия между заместителями 1,2,3,4-тетразамещенного бензола (74, R = Me) ослабляются, так как образование пятичленного кольца включает уменьшение углов $\alpha, \alpha'$. Два внутренних заместителя в процессе реакции сближаются, ослабляя нековалентные взаимодействия с внешними метильными группами. Таким образом, напряжение представляет собой часть движущей силы реакции.

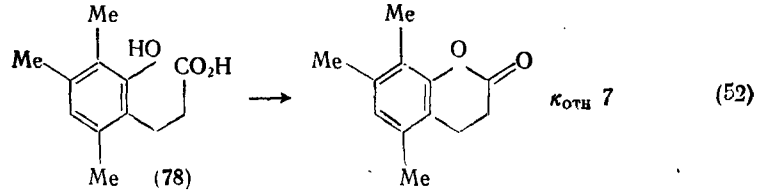
Крайним случаем является аналогичная реакция 2-гидроксифенилпропионовой кислоты (77). Здесь лактонизация приводит к образованию шестичленного цикла, и введение внешних метильных групп (78) приводит лишь к небольшому эффекту. Однако возрастание стерического фактора путем превращения α-углеродного атома пропионовой кислоты в третичный (79) повышает скорость образования лактона в $10^{11}$ раз [127].



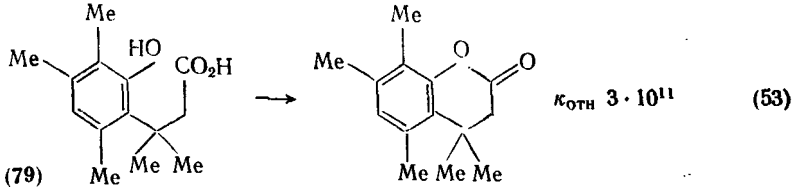

(53)




(51)




(52)




(53)

Сравнение с приближенной расчетной скоростью образования фенилацетата из фенола и уксусной кислоты в тех же условиях дает значение эффективной концентрации соседних групп в (79) более чем $10^{15}$ моль·л$^{-1}$. Эта величина на несколько порядков превышает ту, какую могло бы дать максимальное ускорение в силу наиболее выгодной энтропии активации внутримолекулярной реакции. В данном случае в качестве основной движущей

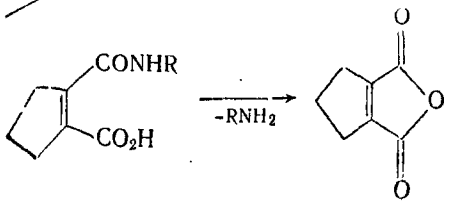
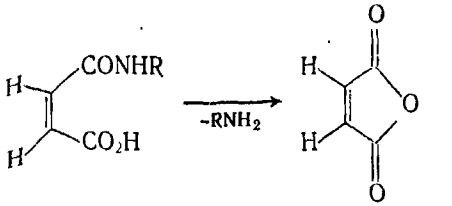
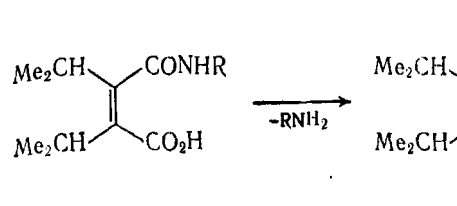
силы реакции также определенно выступает снятие напряжения в основном состоянии [128].

Можно полагать, что эффект напряжения будет влиять на энтальпию активации. Для гидролиза амидов аналогов малеиновой кислоты соответствующие параметры были измерены и приводятся в табл. 24.1.5 [76, 129]. Эта реакция характеризуется нуклеофильным катализом соседней карбоксильной группой, в результате чего через тетраэдрический интермедиат возникает пятичленный циклический ангидрид. Образование пятичленного кольца из тетразамещенного этилена (82) ослабляет нековалентные взаимодействия между четырьмя копланарными группами наподобие того, как это имеет место в обсуждавшихся выше реакциях 1,2,3,4-тетразамещенных бензолов. В отсутствие двух алкильных заместителей эффект исчезает {углы $\alpha,\alpha'$ в основном состояния (81) составляют около 130°, а в (82) — 120°} [130]. В случае (80) ангидрид и ведущее к нему переходное состояние более напряжены, чем основное состояние, так как заместители при двойной связи, эндоцикличные относительно пятичленного цикла, в данном случае раздвигаются {$\alpha,\alpha'$ в (80) составляют около 130°}, и для образования второго пятичленного цикла должны быть вынужденно сближены. Данные табл. 24.1.5. ясно показывают, как напряжение этого типа влияет на энтальпию активации. Энтропии активации в этом ряду изменяются лишь в незначительной степени и более благоприятны для менее реакционноспособных соединений.

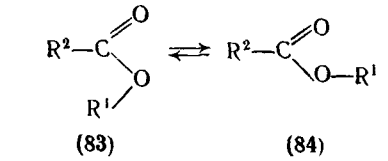
В результате связывания с ферментом в субстрате могут индуцироваться напряжения разных типов [119]. Субстрат может быть связан таким образом, что нуклеофильный атом окажется на расстоянии, меньшем ван-дер-ваальсового контакта, от электрофильного центра, а также приводить к локальным деформациям углов связей, повышающим энергию основного состояния. К аналогичному результату приводит и связывание в менее выгодной конформации. Так, многие лактоны в $10^3$—$10^4$ раз реакционноспособнее обычных сложных эфиров [131], в основном за счет их закрепления в невыгодной *цис*-конформации (83), в то время как ациклические сложные эфиры существуют в более стабильной *транс*-конформации (84). Ни в том, ни в другом случае не происходит потери энергии делокализации сложноэфирной группы; такой эффект приводил бы к гораздо более значительному приросту энергии основного состояния, как, например, в лактаме (85) [132]. Каркасная структура этого соединения фиксирует неподеленную пару электронов азота в плоскости карбонильной группы, что делает делокализацию невозможной. В результате (85) ведет себя не как амид, а как амин с прилежащей электроноотгягивающей группировкой. Так, для него характерна карбонильная полоса поглощения в ИК-спектре при 1762 $см^{-1}$ и гораздо большая по сравнению с подлинным амидом основность ($pK_a$ 5,33). Последнее свойство позволяет легко получить гидро-



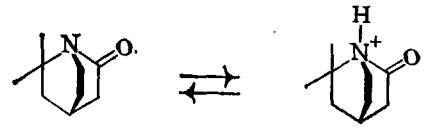
*Таблица 24.1.5. Влияние напряжения в основном состоянии на энтальпию активации* [76]

| Реакция | $v_{отн}$ | $\Delta H^{\neq}$, кДж·моль$^{-1}$ | $\Delta S^{\neq}$, Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
|  (80) | 1,0 | 142 | +46 |
|  (81) | $2{,}4\times10^4$ | 105 | +38 |
|  (82) | $6\times10^8$ | 79 | +17 |

хлорид (85) ($\nu_{макс}$ 1799 $см^{-1}$). Карбонильная группа (85) весьма реакционноспособна; соединение гидролизуется в разбавленной кислоте с периодом полупревращения около 15 мин при 20 °С, т. е. в условиях, когда обычные амиды совершенно стабильны.



(83) (84)



(85)

Реакционная способность сложноэфирного или амидного субстрата может, таким образом, существенно повышаться при связывании на ферменте в непланарной или просто в *цис*-конформации. Подобные эффекты возможны для многих других групп, реакционная способность которых чувствительна к конформации или к небольшим изменениям в геометрии молекулы.

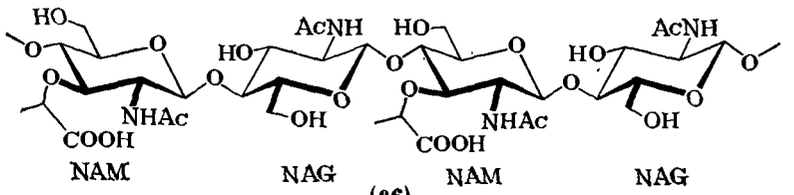
Такие деформации, безусловно, могут иметь место в силу взаимодействия между субстратом и трехмерной структурой белка и, поскольку последний не является жестким образованием, его структура также будет деформироваться. Деформации стабильных структур основного состояния приводят к тому, что такого рода взаимодействия осуществляются с затратой энергии и понижают общую энергию связывания. Поэтому деформации возможны только в случае значительного положительного связывания с другими частями молекулы субстрата (что, по-видимому, позволяет исключить этот механизм в случае очень маленьких молекул). Все это означает, что общая энергия связывания понижается; однако пока она остается достаточно высокой для эффективного связывания, т. е. полного формирования фермент-субстратного комплекса при физиологических концентрациях субстрата, эффективность катализа не уменьшается.

### 24.1.5.3. Связывание специфических субстратов лизоцимом

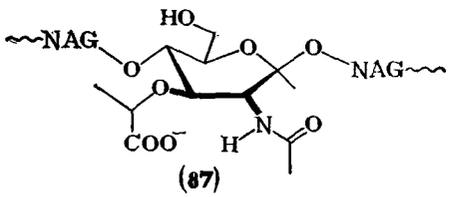
Многие из указанных выше эффектов можно прекрасно проиллюстрировать на примере механизмов связывания и катализа, осуществляемых ферментом лизоцимом. Лизоцим занимает особое место в истории энзимологии, поскольку его трехмерная структура была первой из структур белков, определенных методом рентгеноструктурного анализа [134]. Это маленький белок, состоящий из одной полипептидной цепи длиной в 129 аминокислотных остатков, катализирует гидролиз гликозидных связей углеводного компонента клеточной стенки бактерий (как часть защитного механизма против бактериальной инфекции). Природным субстратом лизоцима является чередующийся сополимер (**86**) *N*-ацетил-β-*D*-мурамовой кислоты (NAM) и *N*-ацетил-β-*D*-глюкозамина (NAG), связанных β-1→4-гликозидными связями, однако большая часть работ по изучению механизма была проведена на более простых субстратах. Так, поли-*N*-ацетилглюкозамин также гидролизуется ферментом, однако эффективность этой реакции существенно зависит от размера субстрата и трисахарид $(NAG)_3$ фактически является ингибитором лизоцима. Сравнение трехмерных структур фермента и комплекса последнего с $(NAG)_3$ показывает, что трисахарид связывается во впадине фермента. Такое сравнение позволяет детально исследовать связывание трех моносахаридных звеньев $(NAG)_3$ в участках A, B и C фермента, которое осуществляется посредством комбинации гидрофобных взаимодействий и водородных связей. {Как отмечалось при об-



суждении свойств циклодекстринов (см. разд. 24.1.4.2), у остатков глюкозы имеются гидрофобные торцы с расположенными по краям полярными группами. Дно связывающей впадины лизоцима имеет ярко выраженный гидрофобный характер, в то время как способные к формированию водородных связей боковые радикалы аминокислот располагаются ближе к поверхности фермента [135]}. Трисахарид покрывает только часть длины этой впадины, и исследования по связыванию модельных соединений показали, что связываться могут субстраты вплоть до гексасахарида. На основе изучения связывающих взаимодействий, наблюдаемых при связывании моносахаридных звеньев $(NAG)_3$, которое было использовано как базис для отнесения групп трех дополнительных остатков к участкам фермента D, E и F, была выведена вероятная конформация связанного гексасахарида $(NAG)_6$.




(**86**)




(**87**)

Таким образом оказалось возможным построить приемлемую модель структуры комплекса фермент-гексасахарид, которая, как можно полагать, близка к структуре продуктивного фермент-субстратного комплекса, поскольку гексасахарид расщепляется ферментом. Согласно этой модели [135], пять из шести углеводных остатков связываются в участках A, B, C, E и F в стабильной конформации кресла [как в (**86**)]. Для того, чтобы происходило связывание пятого и шестого остатков в участках E и F (см. ниже), четвертое звено с невосстанавливающего* конца гексасахарида (в участке D фермента) должно искажаться, переходя в конформацию полукресла (**87**). Кроме того, аминокислотные остатки, окружающие 2-гидроксигруппу углеводного остатка, $(NAG)_6$ в участке C слишком близко подходят к ней и тем самым делают невозможным связывание в этом участке большого бокового радикала молочной кислоты, принадлежащей остатку NAM. Можно, таким образом, предположить, что NAM-звенья природного

* Восстанавливающим концом в углеводе называют полуацетальную (альдегидную) группу, т. е. правый конец молекулы (**86**).

субстрата связываются в участках B, D и F, а NAG-звенья — в участках A, C и E. Известно, что в результате гидролиза концевым (восстанавливающим) звеном становится NAM, поэтому расщепляться должна связь между остатками NAM и NAG, связанными в участках D и E соответственно (так как комплекс с трисахаридом в участках A — C стабилен). Гидролизоваться, таким образом, должна гликозидная связь остатка NAM, связанного в искаженной конформации (87) в участке D.

Независимое доказательство искажения конформации углевода в участке D было получено в результате изучения связывания аналогов субстрата. Так, сила связывания олигомеров $(NAG)_n$ возрастает вплоть до $(NAG)_3$ [136]. Однако для тетрамера, пентамера и гексамера дальнейшего увеличения энергии связывания не наблюдается, а $(NAG\text{-}NAM)_2$ связывается даже хуже, чем NAG-NAM-NAG [137]. Эти отклонения легко объяснимы в рамках предложенной выше модели, выведенной на основе структурных данных. Каждый из участков A, B и C может связывать углеводный остаток, поэтому при связывании трисахарида наблюдается максимальная энергия связывания. Четвертое моносахаридное звено тетрасахарида не будет связываться в основной конформации с участком D до тех пор, пока подвижность обоих концов олигосахарида не ограничивается в силу дальнейшего связывания остатков 5 и 6 в участках E и F, после чего четвертый остаток «сдвигается» в участок D (рис. 24.1.17). Выигрыш в энергии связывания в участках E и F при этом в большой степени нейтрализуется невыгодным связыванием в участке D, где происходит искажение конформации остатка NAM, проходящее с затратой энергии. В результате этот остаток приобретает конформацию (87) с относительно высокой энергией, которая и фиксируется на ферменте. В этой связи особенно интересно то, что продукт окисления $(NAG)_4$, лактон (88), который содержит планарный атом C-1 и поэтому находится в конформации полукресла, связывается с лизоцимом более прочно, чем трисахарид $(NAG)_3$ [138], что предполагает связывание природного субстрата в конформации полукресла *.

Эти замечания непосредственно относятся к вопросу эффективности катализа, поскольку известные механизмы гидролиза ацеталей подразумевают участие оксокарбониевых интермедиатов. Известно, что в катализируемой лизоцимом реакции происходит разрыв гликозидной связи C—O, поэтому в качестве интермедиата ферментативной реакции предполагается циклический оксокарбониевый ион (89). Последний содержит планарный $sp^2$-гибридизованный атом C-1, так же как и (88), и можно предположить, что (89) также принимает конформацию полукресла. Таким образом, в результате искажения субстрата при его связывании в участке D происходит переход этого остатка в конформацию, близкую к постулированной для высокоэнергетического интермедиата реакции, и тем самым к таковой для переходного

* Более поздние данные [139] предполагают, что искажение конформации углеводного остатка в участке D происходит главным образом за счет взаимодействия с боковым радикалом молочной кислоты NAM-звена, а остаток NAG свободно связывается в этом участке. Это может означать, что вклад искажения конформации в катализ менее значителен, чем это предполагалось ранее.



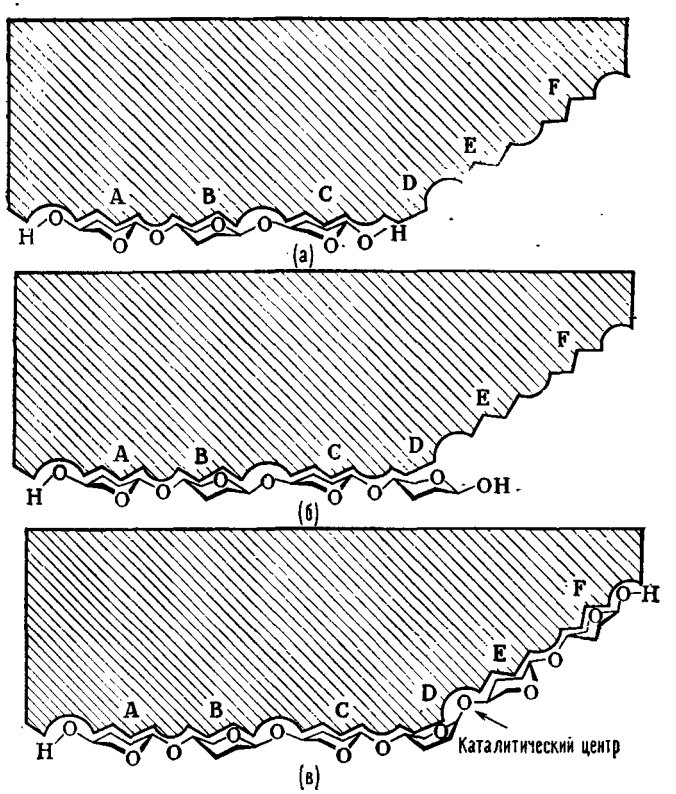
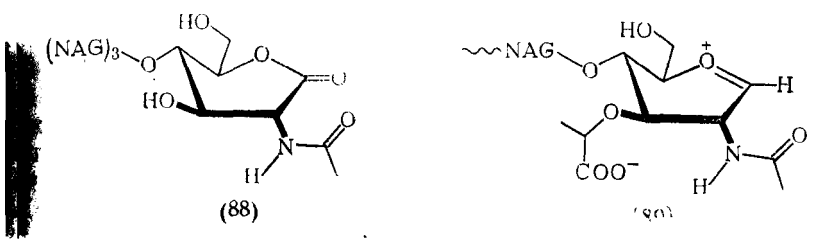



Рис. 24.1.17. Упрощенное изображение связывания олигосахаридов лизоцимом (см. текст).

A, B, C, E и F — участки, положительно связывающие углеводный остаток, поэтому трисахарид в целом связывается прочно (*а*). Четвертый остаток, прежде чем связаться в центре D, должен принять невыгодную конформацию, поэтому тетрасахарид связан также только в центрах A, B и C (*б*). Однако дополнительное связывание остатков 5 и 6 гексасахарида приводит к конформационному изменению (*в*), в результате чего гликозидный центр четвертого остатка принимает правильную ориентацию в каталитическом центре.



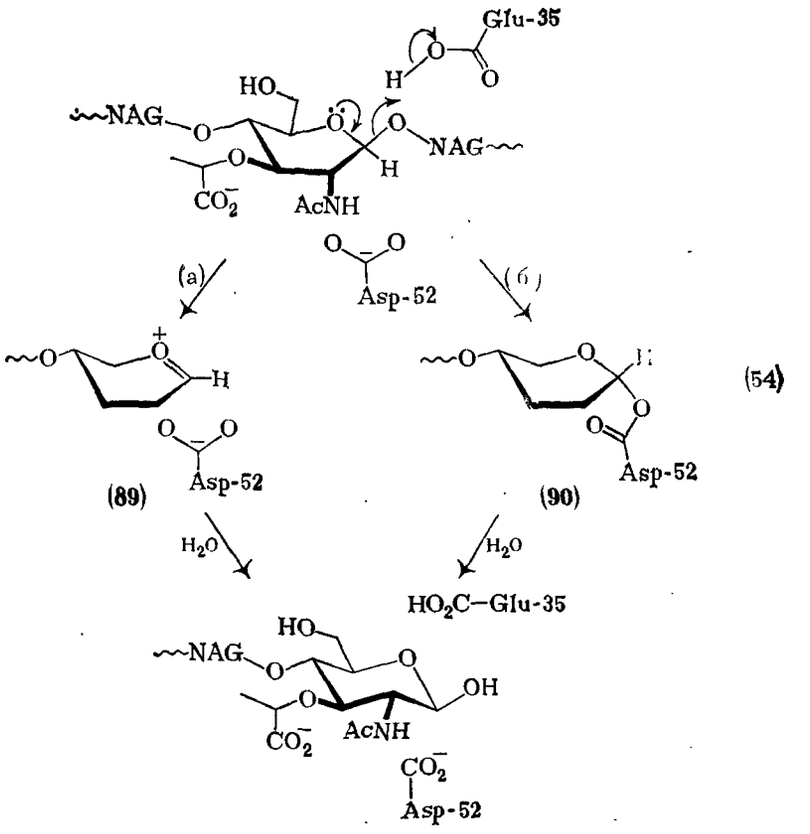
состояния. Часть энергии связывания затрачивается на увеличение энергии основного состояния, что приводит к понижению свободной энергии активации и, следовательно, к ускорению реакции (более детально эти вопросы обсуждаются в [119] и [140].

Ключи к познанию действительного механизма катализа лежат в структурных исследованиях. В описанной выше модели комплекса фермент-$(NAG)_6$ только две каталитические группы располагаются вблизи расщепляемой гликозидной связи. Это карбоксильные группы глутаминовой кислоты-35, которая, как полагают, в активном ферменте находится в $CO_2H$-форме, и аспарагиновой кислоты-52, находящейся предположительно в виде иона $CO_2^-$. Первая из этих групп расположена вблизи кислорода уходящей группы и действует, согласно общепринятым представлениям, в качестве общего кислотного катализатора, способствуя удалению уходящей группы скорее в НО-форме, чем в форме О- {путь (а) на схеме (54)} [133, 143]. Согласно другой гипотезе {путь (б)}, карбоксилатная группа может выступать в роли нуклеофила, образуя ковалентный интермедиат (90), гидролизующийся скорее всего по ацетальному, а не по сложноэфирному центру, поскольку известно, что при этом сохраняется конфигурация гликозидного центра [144]. В настоящее время не существует каких-либо убедительных данных, позволяющих подтвердить или опровергнуть каждый из представленных на схеме (54) механизмов [141].

Все данные, обсуждавшиеся в этом и предыдущем разделах, с очевидностью показывают, что процессы связывания и катализа взаимозависимы сложным образом. Например, утверждение, что наилучшими субстратами являются наиболее прочно связывающиеся соединения, неверно. Трисахарид очень хорошо связывается лизоцимом, производные *D*-аминокислот — химотрипсином, однако оба они субстратами не являются; первый из них связывается не в том месте, а вторые — не в той ориентации. Более того, индуцируемое при связывании напряжение в молекуле субстрата может повышать скорость каталитической реакции, понижая в то же время эффективность связывания. Приводились данные такого рода в поддержку предположения, что каталитическая эффективность фермента, по крайней мере частично, зависит от его способности связывать субстрат в переходном состоянии более прочно, чем в основном состоянии [145]. Последнее может иметь место из-за невыгодных взаимодействий между ферментом и субстратом в основном состоянии, снимающихся, как в случае лизоцима, в переходном состоянии. Другой причиной этого явления может быть действительное хорошее положительное связывание переходного состояния. Только последняя ситуация непременно приводит к более эффективному катализу [140], хотя при правильных условиях обе приводят к одинаковому результату.

Индуцированное соответствие представляет собой пример сложных взаимоотношений между связыванием и катализом. Оно






(54)

является важным элементом контроля реакций, включающих образование ковалентных фермент-субстратных интермедиатов типа фосфорилфермента, обсуждавшегося в разд. 24.1.4.4. Это явление представляет механизм повышения специфичности. Само по себе индуцированное соответствие, однако, не вносит вклада в каталитическую эффективность, ибо большая часть энергии связывания затрачивается на превращение неактивной формы фермента в фермент-субстратный комплекс с каталитическими группами, находящимися в оптимальных позициях.

Каталитическая способность фермента зависит, таким образом, от четырех главных факторов.

1. Связывания субстрата таким образом, что он вступает в правильный контакт с каталитическими группами активного центра.

2. Понижения энтальпии активации данной реакции в результате последовательного участия одной или нескольких каталитических групп, что исключает образование высокоэнергетических интермедиатов.

3. Благоприятной энтропии активации. Это положение является прямым следствием п. 1 и означает, что участие дополнительных каталитических групп не должно «оплачиваться» большой отрицательной энтропией активации.

4. Повышения при связывании энергии основного состояния субстрата. Это повышение может происходить посредством нескольких механизмов, например десольватации и индуцирования напряжения при связывании, которые используют часть энергии связывания на понижение свободной энергии активации реакции. Вероятно, в некоторых случаях применимо еще одно положение:

5. Понижение свободной энергии активации реакции посредством выгодных связывающих взаимодействий с переходным состоянием субстрата.

Более детальный разбор этих вопросов можно найти в обзоре Дженкса [119].

### 24.1.6. РЕГУЛЯЦИЯ И КОНТРОЛЬ ФЕРМЕНТОВ *

Биохимический аппарат клетки представляет собой невероятно сложную систему многих сотен химических и физико-химических реакций и процессов, каждый из которых вносит вклад в общее динамическое равновесие, которое нельзя существенно сдвинуть без нарушения работоспособности организма. Это равновесие, разумеется, не может быть результатом случайного одновременного действия сотен различных реакций, участвующих в метаболизме, поскольку многие организмы могут адаптироваться к весьма широкому спектру условий и могут справляться с внезапными изменениями окружающей среды. Огромное большинство таких процессов представляет собой ферментативные реакции. В последнее время становится ясным, что активность ферментов интактного организма является объектом очень строгого контроля посредством набора механизмов, не менее сложных, чем механизмы связывания и катализа.

До сих пор мы рассматривали фермент и его субстрат как изолированную систему, отделенную от других фермент-субстратных систем высокой специфичностью механизмов связывания. В живой клетке, однако, каталитическая активность любого отдельно взятого фермента зависит от много большего числа факторов, чем только от используемых им механизмов связывания и катализа, а также от концентрации субстрата. Субстрат в этой ситуации обычно бывает продуктом другой, а возможно более чем одной ферментативной реакции, и может служить также субстратом для одного или нескольких других ферментов. Аналогично, продукт реакции может служить субстратом для одного или нескольких других ферментов и т. д. Очевидно, что концентрация субстрата может играть важную роль; однако контроль достигается главным образом посредством изменения концентраций и активностей ферментов. В этом разделе будут рассмотрены оба эти фактора.

* См. [146—148].



#### 24.1.6.1. Регуляция концентрации ферментов

Концентрация отдельного фермента зависит от относительных скоростей его синтеза и деградации. В обычных условиях концентрация остается стационарной, но может четко «подстраиваться» посредством изменения скорости любого из этих процессов. Так, уровень аргиназы в печени крысы в зависимости от содержания белка в диете может изменяться в три раза. При диете с высоким содержанием белка концентрация фермента в течение 14 дней увеличивается вследствие увеличения скорости биосинтеза аргиназы. В течение первых нескольких дней голодания после принятия низкобелковой диеты концентрация аргиназы также увеличивается, но в этом случае в силу замедления разрушения фермента, хотя его синтез продолжается [149].

Биосинтез белков является объектом генетического контроля. В бактериях, во всяком случае, он проявляется на уровне синтеза информационной РНК посредством взаимодействия особого («регуляторного») белка со специфическим участком ДНК (см. часть 22 и разд. 24.2.3). В тканях животных на механизмы, контролирующие уровень ферментов, влияют также ингибиторы синтеза РНК [149]. Детали этих механизмов контроля не важны в контексте данного раздела. Важным моментом является факт, что существуют механизмы регуляции концентрации ферментов на определенном метаболитическом пути посредством конечного продукта этого пути. Так, в бактериальных системах хорошо изучены индуцируемые ферменты. Пока субстраты этих ферментов присутствуют в среде, биосинтеза ферментов не происходит. Часто синтез нескольких ферментов какого-либо одного метаболитического пути индуцируется присутствием субстрата первого фермента этого пути. Индукция субстратом, таким образом, представляет собой механизм повышения концентрации системы ферментов по мере появления «рабочей необходимости». Соответствующий механизм, понижающий избыточную концентрацию фермента, если последний или система ферментов производит слишком большие количества определенного метаболита, получил название репрессии по принципу обратной связи. Классическим примером этого механизма является ингибирование биосинтеза гистидина в *Salmonella typhimurium* высокими концентрациями гистидина. Концентрации всех десяти ферментов биосинтетической цепи в ответ на изменение концентрации гистидина изменяются совершенно одинаково [150].

Деградация ферментов в обычных условиях имеет, по-видимому, более случайный характер. Для каждого отдельного фермента существует своя скорость деградации, однако последняя

в целом зависит от размера белка: большие белки деградируют быстрее, как это и должно быть, поскольку скорость зависит от частоты случайных столкновений с протеолитическими ферментами. (Наблюдается также общая корреляция между скоростью деградации белков *in vivo* и скоростью их расщепления протеолитическими ферментами, трипсином и химотрипсином, *in vitro*). Вследствие удивительно постоянной скорости деградации и строго контролируемой скорости синтеза полупериоды жизни различных ферментов в тканях животных изменяются от минут до нескольких дней.

### 24.1.6.2. Регуляция активности ферментов

Контроль концентраций ферментов безусловно является очень удобным способом адаптации организма к относительно долговременным изменениям условий, однако не подходит для быстрого ответа на эти изменения. Остановка синтеза фермента с периодом полужизни в несколько дней, например, не оказывает немедленного эффекта на скорость удаления его субстрата или скорость образования его продуктов. В связи с этим неудивительно, что получили развитие и другие механизмы, а именно механизмы регуляции *активности* определенных ферментов.

Наиболее простым примером такой регуляции является, пожалуй, синтез ферментов в форме неактивного предшественника. Больше всего известны в этой связи мощные протеолитические ферменты процесса пищеварения. Понятно, что в клетках, производящих эти ферменты, проявление их активности было бы нежелательным. В связи с этим пепсин, трипсин и химотрипсин синтезируются в виде неактивных «зимогенов». Пепсиноген затем секретируется в желудок, где совместное действие высокой концентрации кислоты и в особенности протеолитическая активность уже присутствующего там пепсина приводит к удалению 44-членного пептидного фрагмента и образованию активного фермента. Активацию трипсиногена, заключающуюся в удалении гексапептида, осуществляет фермент энтерокиназа, а также (автокаталитически) уже образовавшийся трипсин, в то время как химотрипсин получается из химотрипсиногена посредством протеолитического действия трипсина, высвобождающего в результате важную для активности химотрипсина концевую $+NH_3$-группу изолейцина-16 (см. разд. 24.1.3.4).

Более гибким механизмом является обратимое взаимопревращение активных и неактивных форм ферментов. Яркий пример такого механизма представляет собой реакция фосфорилазы. Фермент катализирует обратимое присоединение глюкозы (в виде глюкозо-1-фосфата) к полисахариду гликогену, представляющему собой ту молекулярную форму, в которой животные запасают углеводы и тем самым легко доступные источники энергии. Фосфорилаза, таким образом, «держит ключи» от этого склада энергии и действует согласно весьма сложному механизму контроля. Фермент существует в виде двух различных форм, фосфорилаз (*a*) и (*b*). Фосфорилаза (*b*) неактивна (по крайней мере в отсутствие AMP — см. ниже) и существует в виде димера. Посредством фосфорилирования определенного остатка серина в каждой из субъединиц белка, катализируемого ферментом киназой фосфорилазы, фосфорилаза превращается в (*a*)-форму*. Обратная реакция катализируется отдельным ферментом — фосфатазой фосфорилазы.

Опуская дальнейшие детали этого очень сложного процесса [148], можно видеть, как система такого рода может обеспечить весьма чувствительный механизм контроля процесса потребления глюкозы из ее хранилища — гликогена. Одна молекула фосфорилазы (*a*) катализирует высвобождение тысяч молекул глюкозы, а одна молекула киназы фосфорилазы может активировать тысячи молекул фосфорилазы**. Если добавить к этому, что киназа фосфорилазы также существует в активной и неактивной формах и активируется посредством фосфорилирования еще одним ферментом, киназой киназы фосфорилазы, который к тому же регулируется по совершенно другому механизму, то только тогда становится ясным, какими сложными и чувствительными могут быть механизмы контроля этого типа.

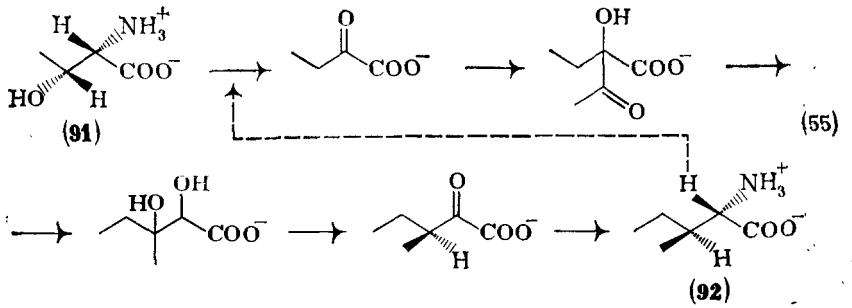
В принципе, простейшим механизмом контроля, хотя и не столь уж простым с молекулярной точки зрения, является ингибирование по принципу обратной связи [148]. Во многих полиферментных системах конечный продукт метаболитической цепи может специфически ингибировать фермент, находящийся в начале этой цепи или близ ее начала, так что скорость образования продукта, чье образование требует полной последовательности реакций, контролируется его концентрацией. В результате, в случае начала накапливания избытка продукта, скорость его образования почти немедленно уменьшается. Примером такого процесса является биосинтетическая последовательность образования изолейцина (**92**) из треонина (**91**) {схема (55)}. Добавление *L*-изолейцина вызывает специфическое ингибирование треониндегидратазы, фермента, катализирующего первую из пяти стадий последовательности. Треониндегидратаза должна в связи с этим располагать особыми чертами, благодаря которым она является эффективным регуляторным ферментом.

Типичный регуляторный фермент представляет собой белок относительно большого молекулярного веса, возможно состоящий из четного числа субъединиц (часто четырех), полностью или попарно идентичных. Такие ферменты часто высокоспецифичны как

---

* Фосфорилаза (*a*) агрегирует далее и образует тетрамер.

** Эта стадия усиления («амплификации») очень напоминает эффекты электронных цепей. Принцип обратной связи и другие используемые ферментами механизмы стимулировали дискуссию по этим вопросам [151].




в отношении субстрата, так и ингибитора, имеющих обычно совершенно различные трехмерные структуры и, таким образом, «*аллостеричных*» [152]. Последнее непременно предполагает невозможность для ингибитора связываться в активном центре, подобно классическим (изостерическим) ингибиторам. Большое число данных, включая рентгеноструктурные, подтверждают предположение, что в регуляторных ферментах имеются отличающиеся друг от друга каталитические (субстрат-связывающие) и аллостерические (ингибитор-связывающие) центры. Эффект связывания ингибитора в аллостерическом центре передается через белок — *посредством* ряда конформационных изменений (часто путем легко регистрируемого взаимодействия между субъединицами) и в конечном счете влияет на активный центр. Таким путем не участвующие в реакции, катализируемой определенным ферментом, метаболиты могут регулировать его активность *, модифицируя либо связывание субстрата, либо каталитическую функцию, либо, наконец, оба этих процесса [147, 148].

Изучение регуляции и контроля ферментов — молодая и быстро развивающаяся область биохимии, уже установившая, однако, ряд весьма сложных механизмов. Представляется возможным различить механизмы, общие для всех ферментов, такие как субстратная специфичность, оптимум pH и т. д.; механизмы, общие для всех организмов, включающие ингибирование и репрессию по принципу обратной связи; и механизмы, характерные для высших организмов, где существуют другие виды регуляции активности ферментов, например посредством действия гормонов. Приведя только один, уже известный нам пример, можно отметить, что вся сложная система описанных выше реакций, кульминацией которой является высвобождение глюкозы из гликогена, может приводиться в действие несколькими молекулами адреналина [148].

Столь сложную схему можно полностью осмыслить только в результате выполнения большого объема исследований с использованием методов целого ряда дисциплин, от физики до медицины (через химию и биологию).

* Позитивно или негативно; данный механизм одинаково пригоден как для активации, так и для ингибирования.



## ЛИТЕРАТУРА


1. Все отсылки на биохимические книги в этих разделах ориентированы на ферменты. Для рассмотрения химического аспекта см.: *H. R. Mahler and E. H. Corder*, «Biological Chemisty», Harper and Row, New York, 2nd edn, 1972. Прекрасное однотомное издание *M. Dixon and E. C. Webb*, «Enzymes», Longmans, London, 2nd edn., 1964 (новое издание 1978 г., имеется русский перевод: *М. Диксон, Э. Уэбб*. Ферменты. М., Мир, 1982. Т. 1—3). Авторитетная многотомная серия «Enzymes», Academic Press, в 1970—1975 опубликовано 13 томов серии и многие из индивидуальных работ, цитированных ниже.
2. *F. H. Westheimer*, Adv. Enzymol., 1962, **24**, 441. *G. Popjak*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol II, 1970, p. 115.
3. *A. Pollac, R. L. Baughn, and G. M. Whitesides*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 2366.
4. *L. J. Reed and D J. Cox*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. 1, 1970, p. 213.
5. 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, vol. IV. 1962; H. Neurath and R. L. Hill, 'The Proteins', Academic Press, New York, 1975.
6. (См. гл. 23.6) *B. Gutte and R. B. Merrifield*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 501; *R. G Denkewalter, D. F. Veber, F. W. Holly, and R. Hirschmann*, ibid., pp. 502, 503.
7. *E. Katchalski*, Adv. Protein Chem., 1951, **6**, 123; *E. Katchalski and M. Sela*, ibid., 1958, **13**, 243.
8. *C. Tanford*, 'The Hydrophobic Effect', Wiley, New York, 1973.
9. *J. H. Fendler, and E. J. Fendler*, 'Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems', Academic Press, New York, 1975.
10. *M. Dixon and E. C. Webb*, 'Enzymes', Longmans, London, 1958, p. 110; см. сс. 1.
11. *D. N. Hague*, 'Fast Reactions', Wiley, London, 1971.
12. *G. G. Hammes and P. R. Schimmel*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. II, 1970, p. 67.
13. *H. Gutfreund*, 'An Introduction to the Study of Enzymes', Blackwell, Oxford, 1965.
14. *M. Eigen and L. de Maeyer*, in 'Technique of Organic Chemistry', ed. S. L. Friess E. S. Lewis, and A. Weissberger, Wiley, New York, 2nd edn., vol. VIII, 1963, p. 895.
15. *A. F. Casy*, 'PMR Spectroscopy in Medicinal and Biological Chemistry', Academic Press, New York, 1971. *T. L. James*, 'NMR in Biochemistry', Academic Press, New York, 1975.
16. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, «Bioorganic Mechanisms», Benjamin, New York, 1975 (*Т. Брюс, С. Бенкович*. Механизм биоорганических реакций Мир, 1970)
17. *W. P. Jencks*, 'Catalysis in Chemistry and Enzymology', McGraw-Hill, New York, 1969 (*В. П. Дженкс*, Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972).

18a. *M. L. Bender*, «Mechanisms of Homogeneous Catalysis From Protons to Proteins', Wiley-Interscience, New York, 1971.

18б. *M. L. Bender and L. J. Brubacher*, 'Catalysis and Enzyme Action', McGraw-Hill, New York, 1973.

19. *A. J. Kirby*, in 'Comprehensive Chemical Kinetics', ed. C. H. Bamford and C. F. H. Tipper, Elsevier, Amsterdam, 1972. vol. 10. chapter 2.
20. *V. Gold, D. G. Oakenfull and T. Riley*, J. Chem. Soc. (B), 1968, 515.
21. *L. L. Schaleger and F. A. Long*, Adv. Phys. Org. Chem., 1963, **1**, 1.

22. *E. H. Cordes*, Progr. Phys. Org. Chem., **1967**, **4**, 1; *E. H. Cordes and H. G. Bull*, Chem. Rev., 1974, **74**, 581.
23. *J. N. Bronsted and W. F. K. Wynne-Jones*, Trans. Faraday Soc., 1929, **25**, 59.
24. *A. R. Fersht and A. J. Kirby*, Progr. Bioorganic Chem., 1971, **1**, 1.
25. 'Neighbouring Group Participation', ed. B. Capon, Plenum Press, New York. vol. 1, 1976.
25a. *E. Gaetjens and H. Morawetz*. J. Amer. Chem. Soc., 1960, **82**, 5328.
26. См. сс. 16, p. 128.
27. *W. P. Jencks and M. Gilchrist*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 2622.
28. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, J. Amer. Chem. Soc., 1963, **85**, 1.
29. *A. R. Fersht and A. J. Kirby*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 4857.
30. *G. A. Rogers and T. C. Brucie*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 2463.
31. *A. J. Kirby and G. J. Lloyd*, J. C. S. Perkin II, 1976, 1753.
32. *T. H. Fife*, Adv. Phys. Org. Chem., 1975, **11**, 1.
33. *J. W. Thanassi and T. C. Bruice*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 747.
34. *M. F. Aldersley, A. J. Kirby and P. W. Lancaster*, J. C. S. Perkin II, 1974, 1504.
35. *M. Dixon and E. C. Webb*, 'Enzymes', Longmans, London, 1958, p. 125.
36. *A. R. Fersht and A. J. Kirby*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 5833.
37. *M. L. Bender and L. J. Brubacher*, ref. 18b; *A. S. Mildvan*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. II, 1970, p. 446.
38. *B. M. Babior*, Accounts Chem. Res., 1975, **8**, 376; R. H. Abeles and D. Dolphin, ibid., 1976, **9**, 114.
39a. *R. Steinberger and F. H. Westheimer*, J. Amer. Chem. Soc., 1951, **73**, 429.
39б. *N. V. Raghavan and D. L. Leussing*, ibid., 1976, **98**, 723.
40. *D. A. Buckingham, D. M. Foster, and A. M. Sargeson*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 5701; *D. A. Buckingham, J. Dekkers, A. M. Wein*, J Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 4032.
41. *D. A. Buckingham, F. R. Keene, and A. M. Sargeson*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 4981.
42. 'Porphyrins and Metalloporphyrins', ed. K. M. Smith, Elsevier, Amsterdam, 1975.
43. *M. Dixon and E. C. Webb*, Ref. 35, p. 133.
43a. *J. E. Cohn and J. T. Edsall*, «Proteins, Amino-acids and Peptides as Ions and Dipolar ions», ACS Monograph 90, Reinhold, New York, 1943, p. 109.
43б. *L. Eberson*, in «The Chemistry of Carboxylic Acids and Amides» ed. S. Patai, Wiler-Interscience, New York, 1969, p. 274.
44. *I. Fridovich*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. VI, 1972, p. 255.
45. *G. Hammons, F. H. Westheimer, K. Nakaoka, and R. Kluger*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 1568.
46a. *D. M. Blow*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III 1970, p. 185.
46б. *G. P. Hess*, ibid, p. 213.
47. *D. Eisenberg*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. I, 1970, p. 1; *D. M. Blow*, Ann. Rev. Biochem., 1970, **39**, 63.
48. *R. A. Dwek*, 'Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry: Application to Enzyme Systems', Oxford University Press, 1973, p. 101.
49. *J. Kraut*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 165.
50. *B. S. Hartley*, Phil. Trans. Roy. Soc. London, 1970, **B257**, 77.
51. *J. Kraut*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 547.
52. *D. M. Blow*, Accounts Chem. Res., 1976, **9**, 145.
53. *B. M. Anderson, E. H. Cordes, and W. P. Jencks*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 455.
53a. *A. J. Kirby and A. G. Varvoglis*, J. Chem. Soc. (B), 1968, 135; *S. A. Kahn and A. J. Kirby*, ibid., 1970, 1172.



54. *K. N. G. Chiong, S. D. Lewis, and J. A. Shafer*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 418
55. *R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhoffer, and W. Steigemann*, J. Mol. Biol., 1974, **89**, 73; *R. M. Sweet, H. T. Wright, J. Janin, C. H. Chothia, and D. M. Blow*, Biochemistry, 1974, **13**, 4212.
56. *M. L. Bender and G. A. Hamilton*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 2570.
57. *M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kezdy, and H. d'A. Heck*, J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 3680.
58. *J. F. Kirsch*, in 'Advances in Linear Free Energy Relationships', ed. N. B. Chapman and J. Shorter, Plenum Press, London, 1972, p. 369.
59. *M. Caplow and W. P. Jencks*, Biochemistry, 1962, **1**, 883.
60. *M. L. Bender and K. Nakamura*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 2577; *A. Williams*, Biochemistry, 1970, **9**, 3383.
61. *J. Fastez and A. R. Fersht*, Biochemistry, 1973, **12**, 1067.
62. *P. W. Inward and W. P. Jencks*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 1986.
63. *A. L. Fink*, Biochemistry, 1976, **15**, 1580.
64. *W. W. Cleland*, Accounts Chem. Res., 1971, **8**, 145.
65. *A. N. Glazer and E. L. Smith*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 502.
66. *J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, and B. G. Wolthers*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 484.
67. *L. J. Brubacher and M. L. Bender*, J. Amer. Chem. Soc., 1966, **88**, 5871.
68. *G. Lowe and A. Williams*, Biochem. J., 1965, **96**, 189.
69. *G. Lowe and A. Williams*, Biochem. J., 1965, **96**, 199.
70. *G. Lowe and Y. Yuthavong*, Biochem. J., 1971, **124**, 117.
71. *G. Lowe*, Tetrahedron, 1976, **32**, 291.
72. *J. R. Whitaker and M. L. Bender*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 2728.
73. *J. S. Fruton*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 119; Adv. Enzymology, 1976, **44**, 1.
74. *G. R. Delpierre and J. S. Fruton*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1966, **56**, 1817.
75. *M. L. Bender, Y.-L. Chow and F. Chloupek*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 5380.
76. *M. F. Aldersley, A. J. Kirby, P. W. Lancaster, R. S. McDonald and C. R. Smith*, J. C. S. Perkin II, 1974, 1487.
77 *A. J. Kirby, R. S. McDonald and C. R. Smith*, J. C. S. Perkin II, 1974, 1495.
78. *J. A. Hartsuck and W. H. Lipscomb*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 1.
79. *R. Breslow and D. Wernick*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 259.
80. *B. L. Vallee, F. F. Riordan, and J. E. Coleman*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **49**, 109.
81. *G. Weber*, Adv. Protein Chem., 1972, **26**, 243.
82. См. разд. 24.2.3.
83. *J. P. Vincent and M. Lazdunski*, Biochemistry, 1972, **11**, 2967.
84. См. сс. 17, part. II.
85. См. сс, 17, p. 356.
86. *M. Yarus*, Ann. Rev. Biochem., 1969, **38**, 841.
87. *A. C. McLaughlin, J. S. Leigh, and M. Cohn*, J. Biol. Chem., 1976, 251, 2777.
88. *D. D. F. Shiao and J. M. Sturtevant*, Biochemistry, 1969, **8**, 4910.
89. *C. A. Blyth and J. R. Knowles*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 3021.
90. *D. G. Oakenfull and D. E. Fenwick*, Austral. J. Chem., 1974, **27**, 2149.
91. См. сс. 18a, p. 373.
92. *F. Cramer and W. Dietsche*, Chem. Ber., 1959, **92**, 378, 1739.
93. *D. J. Cram, R. C. Helgeson, L. R. Sousa, J. M. Timko, M. Newcomb, P. Moreau, F. de Jong, G. W. Gokel, D. H. Hofman, L. A. Domeier, S. C. Peacock, K. Madan, and L. Kaplan*, Pure Appl. Chem., 1975, **43**, 327.
94. *Y. Chao and D. J. Cram*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 1015.
95. E. Fischer, Ber., 1894, 27, 2985.

96. *Lucrettus*, 'De Rerum Natura', Book VI, lines 1086—1084, перевод H. A. J. Munro, Bell, London, 1886. (Лукреций Кар. О природе вещей М., Изд. АН СССР,1958.)
97. *L. Cunningham*, Comprehensive Biochemistry, 1965, **16**, 85.
98. *G. Hein and C. Niemann*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 4495.
99. *M. L. Bender and K. C. Kemp*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 116.
100. *R. Henderson*, J. Mol. Biol., 1970, **54**, 341.
101. *R. L. Peterson, K. W. Hubele, and C. Niemann*, Biochemistry, 1963, **2**, 942.
102. *D. W. Ingles and J. R. Knowles*, Biochem. J., 1968, **108**, 561.
103. *T. A. Steitz, R. Henderson, and D. M. Blow*, J. Mol. Biol., 1969, **46**, 337.
104. *B. Keil*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 250.
105. *B. S. Hartley and D. M. Shotton*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. III, 1970, p. 322.
106. *M. Krieger, L. M. Kay, and R. M. Stroud*, J. Mol. Biol., 1974, **83**, 209.
107. *M. G. Rossmann, A. Liljas, C. I. Bränden, and L. J. Banaszak*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. XI, 1975, p. 61.
108. *D. E. Koshland*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Academic Press, New York, 2nd edn., vol. I, 1959, p. 305; *D. E. Koshland*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1958, **44**, 98.
109. *D. E. Koshland and K. E. Neet*, Ann. Rev. Biochem., 1968, **37**, 359.
110. *N. Citri*, Adv. Enzymol., 1973, **37**, 397.
111. *A. R. Fersht and Y. Requena*, J. Mol. Biol., 1971, **60**, 279.
112. *T. Spencer and J. M. Sturtevant*, J. Amer. Chem. Soc., 1959, **81**, 1874.
113. *E. Awad*, Dissertation, University of Washington, Seattle, 1969; заимствовано из сс. 97.
114. *R. J. Foster*, J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2461.
115. *W. J. Ray and J. W. Long*, Biochemistry, 1976, **15**, 3993; *W. J. Ray, J. W. Long and J. D. Owens*, ibid., p. 4006.
116. *S. P. Colowick*, in 'The Enzymes', ed. P. D Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. IXB, 1973, p. 1.
117. *T. A. Steitz, R. J. Fletterick, W. F. Anderson, and C. M. Anderson*, J. Mol. Biol., 1976, **104**, 197.
118. *W. F. Anderson and T. A. Steitz*, J. Mol. Biol., 1975, **92**, 279.
119. *W. P. Jencks*, Adv. Enzymol, 1975, **43**, 219.
120. *C. D. Ritchie*, in 'Solute-Solvent Interactions', ed. J. F. Coetzee and C. D. Ritchie, Dekker, New York, 1969, p. 219.
121. *D. S. Kemp and K. G. Paul*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 2553; ibid., 1975, **97**, 7305.
122. *A. J. Kirby and A. G. Varvoglis*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 415.
123. *T. C. Bruice and A. Turner*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 3422.
124. *T. C. Bruice*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. II, 1970, p. 217.
125. *A. J. Kirby and G. J. Lloyd*, J. C. S. Perkin II, 1976, 1753.
126. *J. F. Bunnett and C. F. Hauser*, J. Amer. Chem. Soc., 1965, **87**, 2214.
127. *S. Milstien and L. A. Cohen*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 9158.
128. *C. Danforth, A. W. Nicholson, J. C. James, and G. M. Loudon*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 4275; *R. E. Winans and C. F. Wilcox*, ibid., p. 4281.
129. *A. J. Kirby and P. W. Lancaster*, J. C. S. Perkin II, 1972, 1206.
130. *A. J. Kirby and G. J. Lloyd*, J. C. S. Perkin II, 1976, 1753.
131. *R. Huisgen and H. Ott*, Tetrahedron, 1959, **6**, 253.
132. *H. Pracejus*, Chem. Ber., 1959, **92**, 988.
133. *T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, and J. A. Rupley* in 'The Enzymes', ed P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. VII, 1972, p. 665.
134. *C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma*, Nature, 1965, **206**, 757; *L. N. Johnson and D. C. Phillips*, ibid., 761.



135. *C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R Sarma*, Proc. Rov. Soc. (*B*), 1967, **167**, 378; *D. C. Phillips*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1967, **57**, 484.
136. *J. A. Rupley, L. Butler, M. Gerring, F. J. Hartdegen, and R. Pecoraro*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1967, **57**, 1088; *D. M. Chipman, V. Grisaro, and N. Sharon*, J. Biol. Chem., 1967, **242**, 4388.
137. *N. Sharon*, Proc. Roy. Soc. (*B*), 1967, **167**, 402.
138. *I. I. Secemski, S. S. Lehrer, and G. E. Lienhard*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 4740.
139. *M. Schindler, Y. Assaf, N. Sharon, and D. M. Chipman*, Biochemistry, 1977, **16**, 423.
140. *A. R. Fersht*, Proc. Roy. Soc. (*B*), 1974, **187**, 397
141. *B. M. Dunn and T. C. Bruice*, Adv. Enzymol., 1973, **37**, 1.
142. *C. A. Vernon*, Proc Roy. Soc. (*B*), 1967, **167**, 389.
143. *T. H. Fife*, Adv. Phys. Org Chem., 1975, **11**, 1.
144. *M. A. Raftery and T. Rand-Meir*, Biochemistry, 1968, **7**, 3281.
145. *J. B. S. Haldane*, 'Enzymes', Longmans, London, 1930 (*Дж. Б. С. Холден.* Энзимы. М. Госхимиздат, 1938).
146. *A. B. Pardee*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, H. A. Lardy, and K. Myrbäk, Academic Press, New York, 2nd edn., vol. 1, 1959, p. 681.
147. *D. E. Koshland*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. 1, 1970, p. 342.
148. *E. R. Stadtman*, in 'The Enzymes', ed P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. 1, 1970, p. 398.
149. *R. T. Schimke*, Adv. Enzymol., 1973, **37**, 135.
150. *B. N. Ames and R. G. Martin*, Ann. Rev. Biochem., 1964, **33**, 235.
151. *D. E. Atkinson*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edn., vol. 1, 1970, p. 461.
152. *J. Monod, J. P. Changeux, and F. Jacob*, J. Mol. Biol., 1963, **6**, 306.

## 24.2. ХИМИЯ ДРУГИХ БЕЛКОВ

*Д. Т. Илмор (The Queen's University of Belfast)*

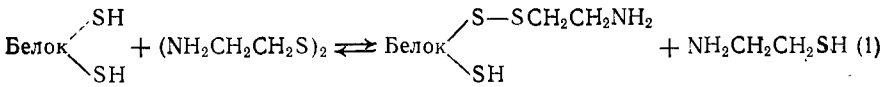
### 24.2.1. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

После завершения процесса трансляции на рибосомах белки могут претерпевать дальнейшие модификации. Последние различаются по степени сложности от образования дисульфидных мостиков в результате окисления близко расположенных пар тиольных групп и введения в молекулу белка малых групп, таких как гидроксил, метил, ацетил, карбоксил и фосфат, до присоединения достаточно больших олигосахаридных звеньев. Многие белки, напротив, синтезируются и хранятся в виде биологически неактивных молекул, из которых в результате ограниченной и контролируемой протеолитической деградации образуются ферменты или полипептидные гормоны.

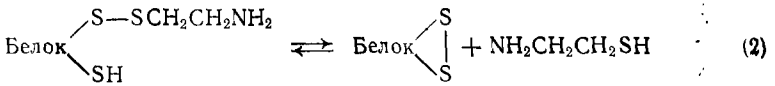
#### 24.2.1.1. Модификация белков без деградации

Восстановленная форма белков, содержащих цистин, имеет конформацию, вероятно, сходную с таковой для окисленных форм, имеющих пары тиольных групп, находящихся в положениях, благоприятных для спаривания. Предполагалось, что в качестве окис-

лителя выступает окисленный глутатион, однако в клетках благодаря наличию глутатионредуктазы, в избытке присутствует глутатион в восстановленной форме. Известно, что цистеамин (**1**) окисляется цистеаминоксидазой до цистамина (**2**) в эндоплазматическом ретикулуме близ клеточного центра биосинтеза белка. Более того, дисульфидные связи в большей степени присутствуют во внеклеточных, чем во внутриклеточных белках, и наивысшие концентрации цистеаминоксидазы содержатся в тканях, производящих внеклеточные белки. В связи с этим было предположено [1], что цистамин участвует в реакциях дисульфидного обмена (см. разд. 23.3.8) со вновь синтезируемым белком, содержащим тиольные группы, по схеме (1). Образующийся дисульфид (**3**) подвергается далее реакции внутреннего обмена {схема (2)}. Обе обменные реакции, как полагают, катализируются ферментами.

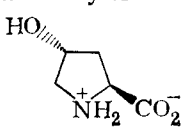


(2) (3) (1) (1)

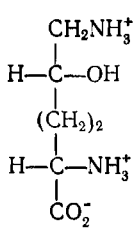


(2)

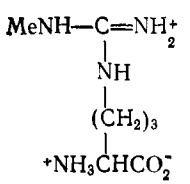
В посттрансляционном гидроксилировании принимают участие пролин и лизин. Из первого обычно образуется 4-гидроксипролин (**4**); в колагене, однако, в небольшом количестве присутствует также 3-гидроксипролин. Лизин при гидроксилировании дает 5-гидроксилизин (**5**). Важно, что обе аминокислоты имеют (*S*, *S*)-конфигурацию. Гидроксилированные остатки пролина содержатся в последовательностях типа -Gly-X-Pro-Gly-. Фермент, катализирующий эту реакцию, пролилгидроксилаза, требует наличия кислорода, ионов $Fe^{2+}$, α-кетоглутаровой и аскорбиновой кислот. Предполагаемый механизм гидроксилирования [2] представлен на



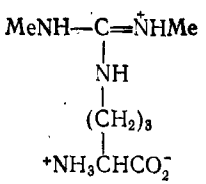
(4)



(5)



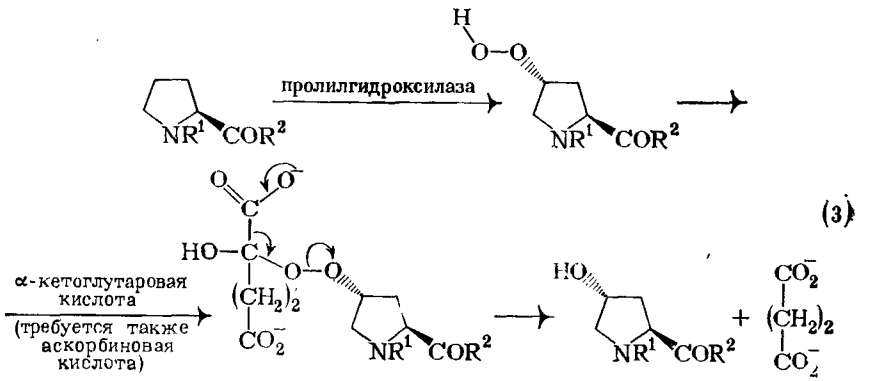
(6)



(7)



схеме (3). В коллагене, но не в эластине, гидроксилируются также некоторые из остатков лизина в триплетах -Gly-X-Lys-. В наиболее богатом гидроксилизином источнике, костном коллагене, содержатся 5—15 остатков этой аминокислоты на каждую тысячу остатков. Недостаток лизилгидроксилазы у человека приводит к разновидности синдрома Элерса-Данлоса, при котором нарушаются механические свойства тканей.




(3)

Посттрансляционное метилирование [3] определенных остатков лизина и аргинина имеет место в гистонах и основном белке миелина. В богатом аргинином гистоне IV в положении 20 полипептидной цепи присутствует ε-*N*-диметиллизин. В основном белке A1, главном компоненте миелина, Arg-107 монометилируется либо диметилируется, образуя соответственно остатки $N_G$-метиларгинина (**6**) или $N_G$,$N_G$-диметиларгинина (**7**). Этот белок особенно интересен, так как он индуцирует при инъекции аллергический энцефаломиелит, причем антигенной детерминантой является последовательность (**7а**)

114 115 116 117 118 119 120 121
Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Gly-Gln-Arg (**7а**)

Присутствие метилированного аргинина, по-видимому, непосредственно не отвечает за энцефалитогенное поведение. Метилирование остатков лизина и аргинина осуществляется различными ферментами. Остатки лизина метилируются ферментом в ядре, в то время как фермент метилирования аргинина обнаружен в цитозоле. Однако оба фермента в качестве источника метильных групп используют *S*-аденозилметионин.

В некоторых белках происходит ацетилирование α-аминогрупп и ε-аминогрупп остатков лизина. Субстраты ацетилирования различаются по размеру от меланоцит-стимулирующего гормона (**7б**) до цитохрома *c* и гистонов. В гистоне IV из тимуса теленка ацетилируются α-аминогруппа концевого остатка серина и боковой радикал Lys-16. Были выделены специфические ацетилазы, использующие в качестве молекулы-донора ацетил-CoA. Следует

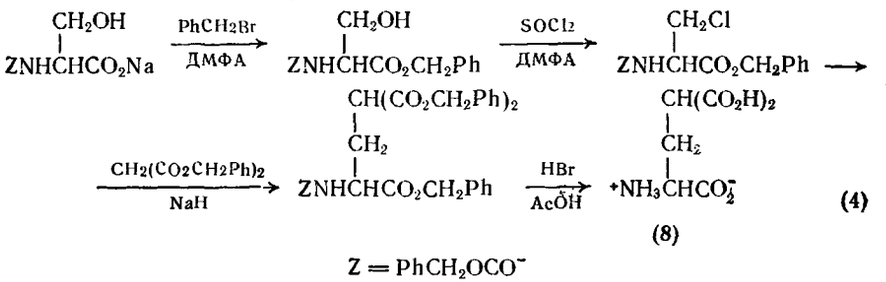
отметить, что ацетилирование α-аминогруппы защищает белок от гидролиза аминопептидазами в клетке.

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-$NH_2$ (7б)

Недавно открыт другой тип посттрансляционной модификации белков. В течение долгого времени было известно, что недостаток витамина К выводит из строя механизм свертывания крови. Для продления времени коагуляции у пациентов, страдающих коронарным тромбозом, в качестве антагонистов витамина К использовались производные кумарина. По данным анализа системы свертывания крови, одним из компонентов системы коагуляции, на которые оказывает влияние недостаток витамина К, является фактор II (протромбин). Однако стандартный аминокислотный анализ нормального и анормального белков не выявил каких-либо существенных различий в их составах. Протромбин представляет собой гликопротеин; недостаток витамина К не вызывает явных изменений в структуре углеводного компонента. Иммунохимический анализ показал, что кровь животных с нехваткой витамина К содержит нормальные количества белка, реагирующего с антителами к протромбину, что означает, что процессы транскрипции и трансляции при этом остаются неизменными. Активированные нефизиологическими катализаторами типа трипсина или ядом *Echis carinatus* нормальный и анормальный протромбины дают одинаковые количества тромбина с полной коагуляционной активностью в отношении фибриногена. Было установлено одно четкое различие: нормальный протромбин связывает 10—12 ионов $Ca^{2+}$, в то время как протромбин из крови животных с дефицитом витамина К связывает $Ca^{2+}$ очень мало или не связывает вовсе. Ионы кальция, как известно, необходимы для свертывания крови, и донорскую кровь хранят обычно в присутствии антикоагулянтов — цитрат- или оксалат-ионов. В процессе определения первичной структуры протромбина был получен (в результате расщепления бромцианом) пептид, содержавший первые 72 аминокислотных остатка с *N*-конца. Этот пептид связывает ионы кальция, а соответствующий пептид из анормального протромбина не способен на это; тем не менее, аминокислотные составы обоих пептидов оказались идентичными. В результате дальнейшей деградации под действием трипсина был получен пептид, содержащий остатки 4—10 последовательности протромбина. Электрофоретическая (анодная) подвижность пептида из нормального белка превышала ту, которая ожидалась на основании данных аминокислотного анализа. После деградации аминопептидазой М и карбоксипептидазой В был получен тетрапептид состава (по данным аминокислотного анализа) Ley-Glu-Glu-Val, хотя его анодная электрофоретическая подвижность намного превышала подвижность синтетического тетрапептида того же состава. ЯМР-спектры синтетического и природного тетрапептидов показали, что последний не содержал протонов у γ-углеродного атома Glu, или,



если таковой и был, то быстро обменивался с растворителем. Окончательно проблема была решена с помощью масс-спектрометрии ацетилированного и перметилированного тетрапептида. Установлено, что каждый остаток глутаминовой кислоты содержал дополнительную карбоксильную группу и, согласно данным ЯМР, последняя должна находиться на γ-углеродном атоме. Поскольку этот остаток представляет собой 1,1-дикарбоновую кислоту, во время кислотного гидролиза перед аминокислотным анализом происходило его декарбоксилирование. Удивительно, в виду такого долгого поиска этой таинственной аминокислоты, что для полного гидролиза белка не была использована смесь протеолитических ферментов (см. разд. 23.3.2). Подтверждение структуры новой аминокислоты, γ-карбоксиглутаминовой кислоты (8) (Gla), получено встречным синтезом {схема (4)} [4]. Исследования других пептидных фрагментов протромбина аналогичными методами показали, что в первых 33 аминокислотных остатках белка содержится 10 остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты [5]. Белки системы свертывания крови, отличные от протромбина, связывают $Ca^{2+}$, что является обязательной стадией в нормальном механизме биоактивации. Имеются данные, что факторы коагуляции IX и X содержат γ-карбоксиглутаминовую кислоту в положениях, гомологичных таковым в протромбине (табл. 24.2.1).




Прямое участие витамина К в биосинтезе биологически активного протромбина продемонстрировано [6] посредством измерения включения в белок $^{14}C$-бикарбоната. Опыты проводились на фракциях печени крыс, дефицитных по витамину К. Все инкубации проводились в присутствии циклогексимида в целях ингибирования биосинтеза белка *de novo*. Включение изотопа существенно возрастало в присутствии добавленного витамина К. Более того, наличие нормального протромбина в инкубационной смеси было продемонстрировано посредством активации фактором Xa, фактором V, фосфолипидом и ионами $Ca^{2+}$. В процессе кислотного гидролиза $^{14}C$-меченного протромбина элиминировалось 50 % радиоактивности, а аминокислотный анализ показал, что остаток радиоактивности входил в состав глутаминовой кислоты, что доказывало участие витамина К во включении бикарбоната в остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты. Наконец, показано [7],

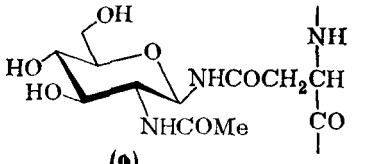
*Таблица 24.2.1. N-Концевые последовательности протромбина, фактора IX и фактора X*

| | |
|---|---|
| Протромбин быка | Ala-Asn-Lys-Gly-Phe-Leu-Gla-Gla- -Val- |
| Фактор IX | Tyr-Asn-Ser-Gly-Lys-Leu-Gla-Gla-Phe-Val- |
| Фактор X | Ala-Asn-Ser- -Phe-Leu-Gla-Gla- -Val- |
| Протромбин быка | -Arg-Lys-Gly-Asn-Leu-Gla-Arg-Gla-Cys-Leu- |
| Фактор IX | -Arg- -Gly-Asn-Leu-Cys- |
| Фактор X | -Lys-Gln-Gly-Asn-Leu-Gla-Arg-Gla-Cys-Leu- |
| Протромбин быка | -Gla-Gla-Pro-Cys-Ser-Arg-Gla-Gla-Ala-Phe- |
| Фактор X | -Gla-Gla-Ala-Cys-Ser-Leu-Gla-Gla-Ala-Cys- |

что протеаза из клеток плода быстро и специфично отщепляет пептид, содержащий первые 41 остаток аминокислот с *N*-конца протромбина, в том числе все остатки Gla, в результате чего протромбин становится неактивным. Аналогичный результат был получен и с фактором X.

Весьма широко распространено посттрансляционное присоединение углеводов к белкам. Все известные белки плазмы крови, например, представляют собой гликопротеины (за исключением альбумина и преальбумина). Гликопротеины несут разнообразные функции, в частности структурные (коллаген), ферментативные (тромбин) и гормональные (тироглобулин). Содержание углеводов меняется от 0,5% в коллагене до примерно 85 % в групповых веществах крови. В гликопротеинах, однако, присутствует лишь относительно небольшое число типов углеводов, включающее *D*-галактозу, *D*-маннозу, *D*-глюкозу, *L*-фукозу, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин и сиаловые кислоты. В некоторых растительных гликопротеинах содержится *L*-арабиноза.

Наиболее подробно изученные гликопротеины содержат углеводы, присоединенные к боковым радикалам аспарагина, серина, треонина и гидроксилизина; известны также случаи присоединения к цистеину и гидроксипролину [8]. В случае аспарагина присоединенным углеводным звеном служит *N*-ацетилглюкозамин, а способом присоединения — *N*-β-гликозидная связь с амидной группой аспарагина (**9**). Аспарагин, по-видимому, всегда входит в последовательность типа Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, как в структурах (**9а**)—(**9г**).




(**9**)

-Val-Pro-Lys-Asn-Ile-Thr-Ser- лютеинизирующий гормон из гипофиза овцы
(**9а**)

-Arg-Val-Glx-Asn-His-Thr-Glx- лютеинизирующий гормон из гипофиза овцы
(**9б**)

-Glu-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu- лютеинизирующий гормон из гипофиза овцы
(**9в**)

Ser-Asn-Ala-Thr бычья дезоксирибонуклеаза
(**9г**)

Часто углеводный компонент содержит только маннозу и *N*-ацетилглюкозамин. Известны и более сложные примеры, включающие в дополнение к указанным выше сиаловую кислоту, галактозу и фукозу. Общая структура и биосинтетический путь для простого случая показаны на схеме (5) [9]. На большей части стадий донором гексозы является уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) или гуанозиндифосфатманноза (GDP-Man); отметим также роль фосфатного эфира долихола, группы полипренолов $C_{80}$ — $C_{110}$.

Обязательных шаблонов, относящихся как к структурам олигосахаридов, так и к аминокислотным последовательностям вокруг гликозилируемых серина и треонина, не существует (за исключением того, что для *O*-гликозидов этих аминокислот имеется тенденция к α-конфигурации (**10**)). Некоторые примеры аминокислотных последовательностей вокруг места присоединения углеводов в гликопротеинах приведены в структурах (**10а**)—(**10в**) (подчеркнуты остатки, по которым присоединяются углеводы). В щелочных условиях *O*-гликозиды серина и треонина легко претерпевают β-элиминацию.

-Ser-Glu-Asp-Gly(Ala, Thr)- α-амилаза из *A. oryzae*
(**10а**)

Ser-Lys-Pro-Thr-Cys-Pro-Pro- иммуноглобулин G кролика
(**10б**)

Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala- белок-«антифриз» из антарктической рыбы *Trematomus borchgrevinski*
(**10в**)

В коллагене углеводный остаток присоединен к гидроксилизину; типичный фрагмент структуры показан в (**11**).

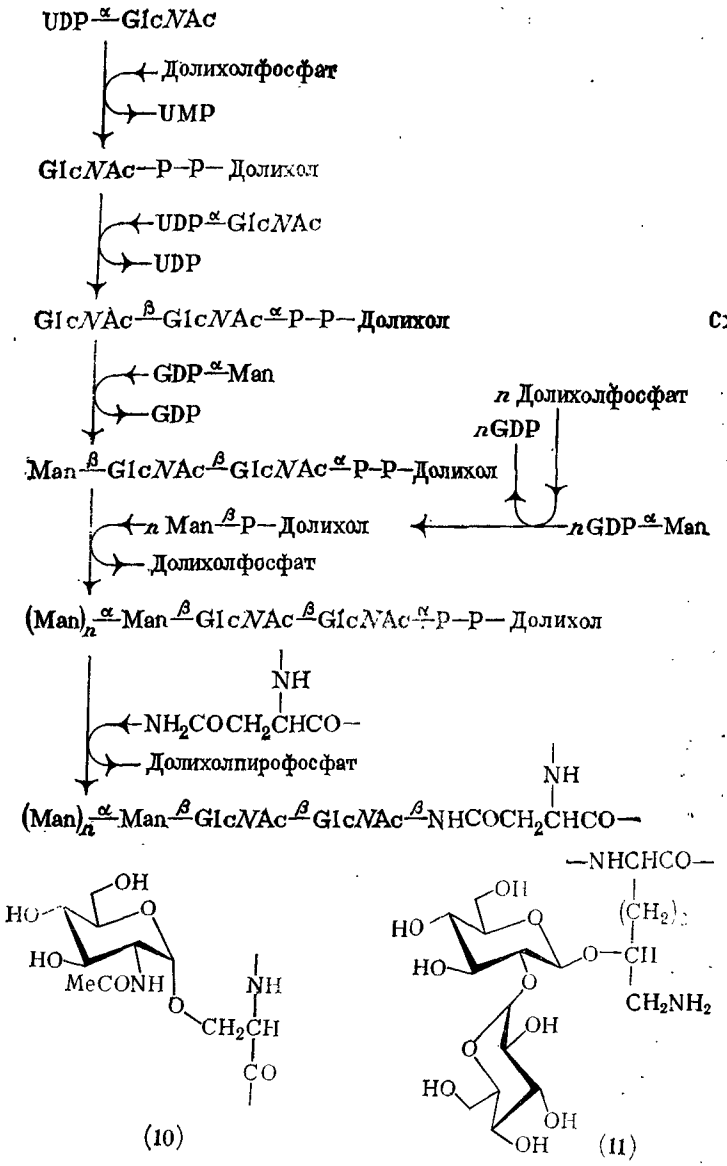



Схема (6)

Последним из рассматриваемых типов модификаций без деградации является фосфорилирование. При этом обычно подразумевается образование фосфомоноэфира бокового радикала серина или треонина, катализируемое специфическими протеинфосфокиназами [10]. Гликогенфосфорилаза, катализирующая перенос глюкозильных остатков с гликогена на фосфат с образованием *D*-глюкозо-α-1-фосфата, существует в двух формах. Менее активная фосфорилаза (*b*) превращается в более активную фосфорилазу (*a*) в результате фосфорилирования серинового остатка в последовательности (**11а**).

Реакцию фосфорилирования катализирует фермент киназа фосфорилазы. Сама киназа фосфорилазы превращается из менее активной в более активную форму посредством фосфорилирования в результате реакции, требующей ATP, цикло-AMP и ионы $Mg^{2+}$, так же как и фермента киназы киназы фосфорилазы.

Фосфорилированные ферменты встречаются также в качестве интермедиатов в реакциях, катализируемых фосфатазами и некоторыми фосфат-переносящими ферментами. Некоторые фосфатазы фосфорилируются просто при их помещении в фосфатный буфер. Наличие фосфорилированной фосфатазы в качестве истинного интермедиата в реакции гидролиза фосфомоноэфиров показывает, что эта реакция подчиняется механизму типа «пинг-понг». В структурах (**11б**), (**11в**) приводятся последовательности у центров фосфорилирования в щелочной фосфатазе *E. coli* и фосфоглюкомутазе из мышц кролика.

Arg Ile
Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg (**11а**)
Val-Thr-Asp-Ser-Ala-Ala-Ser- (**11б**)
Thr-Ala-Ser-His-Pro-Gly (**11в**)

### 24.2.1.2. Модификация белков с деградацией

Общеизвестно, что биологически активные белки, особенно секретируемые клетками, такие как ферменты и полипептидные гормоны, синтезируются в виде молекул неактивных предшественников, активируемых посредством специфического гидролитического удаления пептидных фрагментов в результате действия протеолитических ферментов. Этот ограниченный протеолиз вызывает конформационное изменение, в результате которого важные для активности группы занимают правильное пространственное взаимное расположение. Иногда расщепление пептидной связи может высвободить существенную для активности амино- или карбоксильную группу. Одним из простейших примеров ограниченного протеолиза является активация трипсиногена до трипсина, катализируемая энтерокиназой и автокатализируемая самим трипсином. Процесс активации заключается в отщеплении гексапептида от *N*-концатрипсиногена (**12**).

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ile-Val-Gly (**12**)

Активация химотрипсиногена А более сложна {схема (6), структуры даны схематически и не отражают молекулярных конформаций}. Процесс включает расщепление четырех связей — одной трипсином и трех автокаталитически химотрипсином и удаление двух дипептидов Ser-14-Arg-15 и Thr-147-Asn-148 из внутренней части одноцепочечного зимогена. Дисульфидные связи

между Cys-1 и Cys-122 и Cys-136 и Cys-201 делают возможным образование трехцепочечного фермента. В обоих ферментах протонированная α-аминогруппа *N*-концевого изолейцина образует ионную связь с карбоксилат-ионом бокового радикала остатка аспарагиновой кислоты. Этот процесс стимулирует малые конформационные изменения, приводящие к окончательному корректированию активного центра.

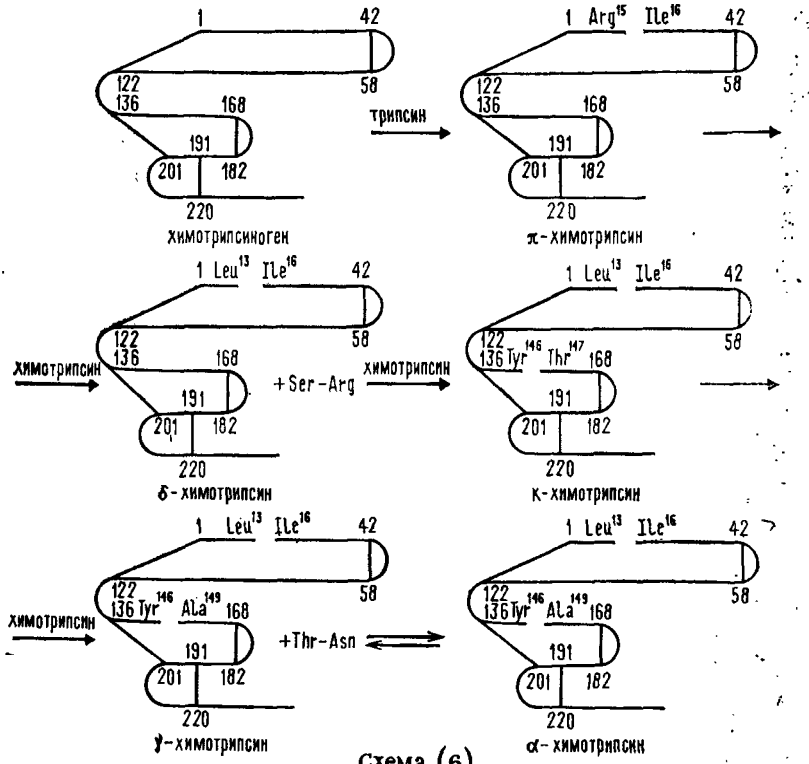



Схема (6)

Большинство компонентов системы свертывания крови [11] и системы комплемента [12] синтезируется в виде неактивных предшественников по вполне ясным с биологической точки зрения причинам. Для иллюстрации достаточно привести два примера. Выше была указана важность остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты в *N*-концевой последовательности протромбина (см. разд. 24.2.1.1). Протромбин претерпевает три расщепления: одно автокаталитически, тромбином и два фактором Xa, приводящие к образованию двухцепочечной молекулы, соединенной единственной дисульфидной связью {схема (7)}.

Интересно, что один из фрагментов, удаляемых в процессе активации, фрагмент 1.2, ускоряет расщепление фактором Xa по-



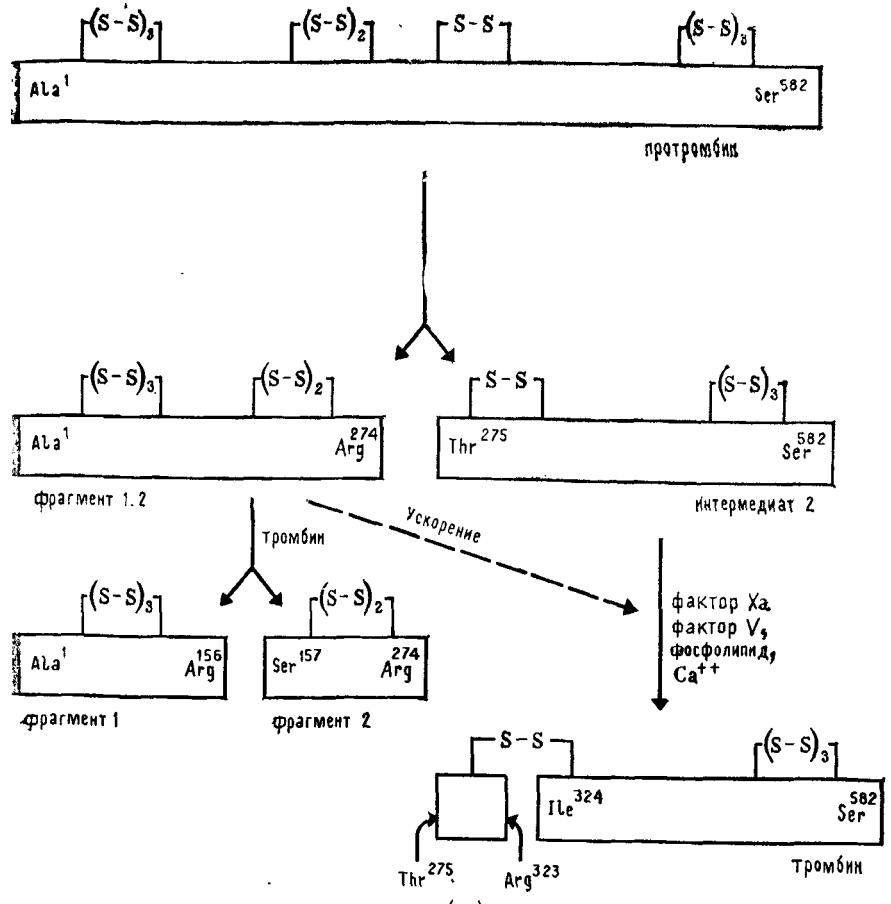



Схема (7)

следней связи Arg-Ile. Другой пример из системы свертывания крови касается фибриногена, субстрата тромбина. В этом белке содержится шесть полипептидных цепей: две цепи A, две B и две C, соединенных между собой 28-ю дисульфидными связями. Превращение фибриногена в фибрин в процессе свертывания включает отщепление двух пептидов с *N*-концов A- и B-цепей. В обоих случаях расщепляется связь Arg-Gly. Интересно, что эти два пептида, фибринопептиды A и B, в различных тканях различаются по размеру и последовательностям (табл. 24.2.2). Фибриноген был выбран для приложения высокой скорости эволюции как молекула, пригодная для составления филогенетических древ [13].

В результате ограниченного протеолиза больших молекул происходит также высвобождение некоторых меньших пептидов и

*Таблица 24.2.2. Аминокислотная последовательность фибринопептидов* A *(пять верхних) и* B *(пять нижних)*

Остаток Ser-3 в первом фибриногене A (человека) присутствует в виде *O*-фосфата; в фибриногенах B остатки Tyr-6 (бык), Tyr-5 (овца), Tyr-4 (свинья) присутствуют в виде *O*-сульфатов

| | |
|---|---|
| Человек | Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg |
| Бык | Glu-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Pro-Ser-Gly-Asp-Phe-Leu-Thr-Glu-Gly-Gly-Val-Arg |
| Овца | Ala-Asp-Asp-Ser-Asp-Pro-Val-Gly-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg |
| Свинья | Ala-Glu-Val-Gln-Asp-Lys-Gly-Glu-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg |
| Кошка | Gly-Asp-Val-Gln-Glu-Gly-Glu-Phe-Ile-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg |
| Человек | Pyr-Gly-Val-Asn-Asp-Asn-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg |
| Бык | Pyr-Phe-Pro-Thr-Asp-Tyr-Asp-Glu-Gly-Glu-Asp-Arg-Pro-Lys-Val-Gly-Leu-Gly-Ala-Arg |
| Овца | Gly-Tyr-Leu-Asp-Tyr-Asp-Glu-Val-Asp-Asp-Asn-Arg-Ala-Lys-Leu-Pro-Leu-Asp-Ala-Arg |
| Свинья | Ala-Ile-Asp-Tyr-Asp-Glu-Asp-Glu-Asp-Gly-Arg-Pro-Lys-Val-His-Val-Asp-Ala-Arg |
| Кошка | Ile-Ile-Asp-Tyr-Tyr-Asp-Glu-Gly-Glu-Glu-Asp-Arg-Asp-Val-Gly-Val-Val-Asp-Ala-Arg |

белков. Инсулин состоит из двух цепей, соединенных двумя дисульфидными мостиками. В A-цепи содержится 21 аминокислотный остаток и дополнительный внутримолекулярный дисульфидный мостик, в B-цепи — 30 остатков. Хотя химически были синтезированы с удовлетворительным выходом обе цепи с защищенными боковыми радикалами цистеина, снятие защит и окисление с целью образования дисульфидных связей дали очень плохие результаты. Имело место, по-видимому, существенное смешение дисульфидных связей, а также полимеризация. Этот случай заметно отличается от случая рибонуклеазы (см. разд. 23.3.9), когда при окислении восстановленного белка были получены высокие выходы фермента. Теперь известно, что в процессе биосинтеза образование инсулина происходит не в результате окислительного соединения A- и B-цепей. Инсулин образуется из большего по размеру одноцепочечного предшественника, проинсулина, дисульфидные связи в котором образуются до начала протеолиза. Происходит, по-видимому, правильное сворачивание образующейся полипептидной цепи, необходимое для правильного образования дисульфидных связей. Последовательность проинсулина приведена в табл. 24.2.3 (см. также с. 290).

*Таблица 24.2.3. Аминокислотная последовательность проинсулина человека*

Дисульфидные связи образуются между остатками $Cys^{7}$ и $Cys^{68}$, $Cys^{19}$ и $Cys^{81}$, $Cys^{67}$ и $Cys^{72}$

Остатки 1—30 образуют B-цепь, остатки 62—82 образуют A-цепь инсулина человека

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-

 16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30
-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-

 31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45
-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-

 46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-

 61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73  74  75
-Gln-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-

 76  77  78  79  80  81  82
-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
```

Ангиотензин II — октапептид, сильно повышающий кровяное давление. Действие специфической протеиназы, ренина, в почке приводит к образованию из гликопротеина крови декапептида ангиотензина I {схема (8)}. Обработка гликопротеина трипсином

или щелочью в мягких условиях высвобождает тетрадекапептид, и было предположено, что боковой радикал *C*-концевого остатка серина этого пептида образует сложноэфирную связь с карбоксильной группой остатков лизина или аргинина в гликопротеине. Тетрадекапептид может также быть расщеплен *in vitro* с образованием ангиотензина I. Ни тетрадекапептид, ни декапептид не проявляют гипертензивных свойств. Специфический фермент, высокий уровень которого отмечен в легких, но в меньших концентрациях распространенный в других тканях и в плазме крови, отщепляет *C*-концевой дипептид, в результате чего образуется ангиотензин II.

Гликопротеин
|
Arg-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser ⟶

ренин ⟶ Arg-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu ⟶
ангиотензин I

ангиотензин-превращающий фермент ⟶ Arg-Asp-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (8)
ангиотензин II

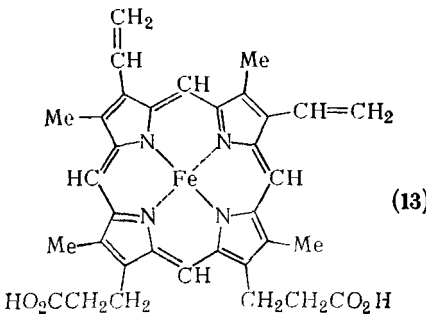
Брадикинин — нонапептид, повышающий кровяное давление и вызывающий боль и сужение бронхов. Он имеет последовательность (12a)

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (12a)

и образуется под действием калликреина плазмы, фермента, по специфичности напоминающего трипсин, из кислого гликопротеина плазмы крови. Другая разновидность калликреина, из подчелюстной железы, производит каллидин, декапептид, состоящий из брадикинина с дополнительным остатком лизина на *N*-конце (см. также с. 293).

### 24.2.2. БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

Два белка, миоглобин и гемоглобин, играют дополняющую друг друга роль в транспорте и фиксации кислорода. Миоглобин (Mb) состоит из одной полипептидной цепи, примерно на 78 % спирализованной, и содержит 153 аминокислотных остатка и одну гемовую группу (13). Гемоглобин HbA содержит четыре полипептидные цепи: две α (141 аминокислота) и две β (146 аминокислот), каждая из которых ассоциирована с гемом. Fe(II) обычно гексакоординирован; в оксигенированных формах гемопротеинов пятое и шестое координационные места заняты $O_2$ и атомом азота имидазольного кольца (His-93 в Mb, His-87 в Hbα и His-92 в Hbβ). Атом Fe(II) диамагнитен и лежит в плоскости порфиринового кольца. В дезоксигемоглобине, однако, Fe(II) пентакоординирован, парамагнитен и выступает из плоскости порфиринового кольца в направлении атома азота имидазола. Как будет видно из последующего изложения, это небольшое изменение вызывает намного более значительные конформационные перестройки. В гемоглобине плода (HbF) две β-цепи замещены γ-цепями той же длины. В крови взрослого организма присутствует также дополнительный минорный компонент, $HbA_2$, содержащий вместо β-цепей две δ-цепи. Анализ гомологий между различными цепями позволил предположить, что все они произошли от одного и того же примата, гена-предшественника. Считают, что самым старым белком является одноцепочечный миоглобин; существенно, что четырехцепочечная структура гемоглобина не появляется (по-видимому, за счет удвоения гена) до образования в процессе эволюции таких существ, как миноговые. Сравнение α-цепей с β-, γ- и δ-цепями показывает 76—95 различий. Сравнение γ-цепей с β- и δ-цепями выявляет 36—48 различий, в то время как β- и δ-цепи человека различаются всего десятью остатками. В связи с этим можно предположить, что субъединицы ранних гемоглобинов состояли из α-цепи и предшественника β-, γ- и δ-цепей. Впоследствии из этого предшественника произошла γ-цепь и позже β- и δ-цепи.




(13)

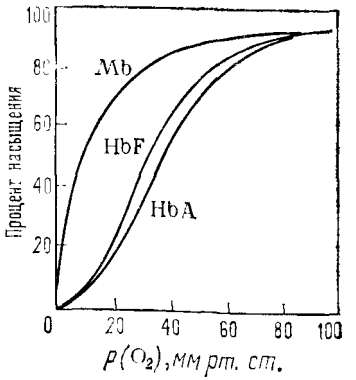



Рис. 24.2.1. Кривые насыщения кислородом миоглобина (Mb), гемоглобина взрослого (HbA) и гемоглобина плода (HbF).

Кривая связывания кислорода миоглобином представляет собой ректангулярную гиперболу, в то время как для гемоглобина она сигмоидальна ввиду аллостерического характера связывания (рис. 24.2.1). За счет этого достигается преимущество в биологической функции, поскольку присоединение и освобождение кислорода происходит в небольшом интервале $p(O_2)$. Реоксигенация в легких и перекачка кислорода с гемоглобина на миоглобин в тканях представляют собой, таким образом, эффективные процессы. Заметим при этом, что кривая связывания для HbF лежит левее таковой для HbA.

Это означает, что при значениях $p(O_2)$, обычно характерных для плаценты, кислород будет переходить с HbA на HbF с выгодой для плода. Кооперативность связывания кислорода гемоглобином А выражена настолько явно, что, если молекула HbA уже связала три молекулы кислорода, то вероятность связывания четвертой молекулы в 70 раз превосходит вероятность приобретения дезоксигемоглобином одной молекулы кислорода.

Кривая связывания кислорода гемоглобином зависит от pH; при данной величине $p(O_2)$ сродство к кислороду уменьшается по мере уменьшения pH (эффект Бора). Гликолиз представляет собой анаэробный процесс, приводящий к образованию молочной кислоты и диоксида углерода. Оба эти соединения имеют тенденцию к понижению pH и способствуют высвобождению кислорода из оксигемоглобина там, где в этом есть необходимость. В дезоксигемоглобине, напротив, содержатся немного более основные, чем у оксигемоглобина, группы (азот имидазола His-146 в β-цепях и His-122 в α-цепях, а также аминогрупп Val-1 в α-цепях), в силу чего дезоксигемоглобин связывает протон после высвобождения кислорода, что важно для обратного транспорта диоксида углерода к легким. Карбоангидраза катализирует образование бикарбоната в эритроцитах из диоксида углерода и воды, и ионы бикарбоната могут связываться с протонированными группами дезоксигемоглобина. В легких дезоксигемоглобин перезаряжается кислородом, эффект Бора вызывает высвобождение бикарбоната, из которого под действием карбоангидразы образуется диоксид углерода, который затем выдыхается. Транспорт диоксида углерода дезоксигемоглобином приводит также к образованию производных карбаминовой кислоты с аминогруппами белка {схема (9)}. Хотя оксигемоглобин также связывает диоксид углерода, у дезоксигемоглобина эта способность выше ввиду большей доступности аминогрупп.

$$Hb \sim NH_2 + CO_2 \rightleftarrows Hb \sim NHCO_2H \qquad (9)$$

Дезоксигемоглобин (но не оксигемоглобин) связывает 2,3-дифосфоглицериновую кислоту. Это соединение образуется в эритроцитах из 1,3-дифосфоглицериновой кислоты в боковой ветви схемы гликолиза. Анаэробные условия, следовательно, способствуют гликолизу и образованию 2,3-дифосфоглицерата. Повышенная концентрация последнего приводит к смещению равновесия и образованию дезоксигемоглобина с высвобождением кислорода.

Ранее отмечалось, что связывание кислорода атомом железа гема переводит последний из непланарной в планарную конфигурацию. Этот процесс запускает другие конформационные изменения, которые приводят к такому кооперативному взаимодействию между субъединицами гемоглобина, что, как только некоторое количество кислорода связывается, связывание последующих молекул облегчается. Следует теперь рассмотреть этот процесс в деталях. Предпоследним аминокислотным остатком как в α-, так и



β-цепи является остаток тирозина. В дезоксигемоглобине ароматические боковые радикалы Tyr-140 и Tyr-145 (в α- и β-цепях соответственно) погружены в гидрофобные «карманы». Когда в результате связывания кислорода атом Fe(II) смещается в плоскость порфиринового кольца, боковой радикал предпоследнего тирозинового остатка той же субъединицы смещается из «кармана» и становится доступным для растворителя. В дезоксигемоглобине имеет место электростатическое связывание двух α-цепей, включающее $+NH_3$-группу Val-1 одной цепи и карбоксильную группу Arg-141 другой. Имеется также электростатическое взаимодействие между α- и β-цепями. ε-$+NH_3$-группа Lys-40 α-цепи сближена с карбоксильной группой His-146 β-цепи. Как только происходит связывание молекулы кислорода одной из субъединиц, нарушается электростатическое взаимодействие между цепями. В соответствии с законами термодинамики соседние субъединицы вынуждены принять конформации оксигенированной формы. В связи с этим становится очевидной причина кооперативного характера связывания гемоглобином кислорода. Перутц, определивший трехмерные структуры и аллостерическое поведение этого белка [14], дал удачное определение гемоглобина как «молекулярного легкого» [15].

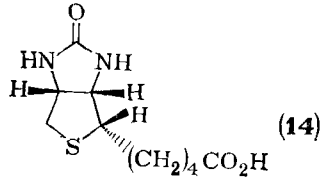
Определены первичные структуры многочисленных анормальных гемоглобинов человека; некоторые из них изучены методом рентгеноструктурного анализа, что сделало возможным объяснение патологических следствий генетических ошибок на молекулярном уровне. Серповидная анемия, названная так вследствие того, что эритроциты пациентов при низких значениях $p(O_2)$ сплющиваются, приобретая форму серпа, является причиной смерти примерно 80 000 детей ежегодно. Анормальный гемоглобин HbS содержит в β-цепи Val-6 вместо Glu-6. Деоксигенированная форма HbS, по-видимому, агрегирует с образованием нерастворимого полимера. Один из предложенных методов лечения анемии заключается во введении низких концентраций цианат-иона, что, как полагают, вызывает карбомоилирование аминогруппы *N*-концевых остатков валина-1 в α- и β-цепях. Первый из этих остатков участвует в межцепочечном взаимодействии в дезоксигемоглобине, а второй образует электростатическую связь с 2,3-дифосфоглицератом. Карбамоилирование предотвращает оба типа взаимодействий, способствуя тем самым сдвигу в сторону конформации оксигемоглобина и уменьшению риска агрегирования.

Для некоторых из анормальных гемоглобинов характерно повышенное или пониженное сродство к кислороду. В окси-HbA амидная группа Asn-102 β-цепи участвует в водородной связи с карбоксильной группой Asp-94 α-цепи, а в дезокси-HbA такая связь отсутствует. В $Hb_{Kansas}$ Asn-102 β-цепи замещен треонином, не способным к образованию водородной связи с Asp-94 α-цепи. Вследствие этого оксигенированная форма $Hb_{Kansas}$ имеет аномально низкое сродство к кислороду. Для $Hb_{Kempsey}$, напротив, характерно необычайно высокое сродство к кислороду, возникающее вслед-

ствие замены Asp-99 на Asn-99 в β-цепи. В дезокси-HbA карбоксильная группа Asp-99 связана водородной связью с фенольной гидроксильной группой тирозина-42 α-цепи, а в окси-HbA боковой радикал Asp-99 в такой связи не участвует. В дезокси-$Hb_{Kempsey}$ амидная группа Asn-99 неспособна к спариванию с Tyr-42 α-цепи, вследствие чего дезокси-форма относительно нестабильна.

Некоторые аномальные гемоглобины связаны с заболеванием метгемоглобинемией. Fe(II) в таких гемоглобинах окислено до Fe(III), в силу чего эти белки уже не могут функционировать как переносчики кислорода. В связи с этим особенную важность представляют мутации, касающиеся His-87 α-цепи или His-92 β-цепи, являющихся лигандами железа гема. В $Hb_{Iwate}$ His-87 в α-цепи замещен на Tyr, а в $Hb_{Hyde\ Park}$ Tyr замещает His-92 в β-цепи. В обоих случаях фенольный гидроксил тирозина, по-видимому, образует электростатическую связь с $Fe^{3+}$, стабилизируя тем самым это валентное состояние.

Яркий контраст гемоглобину составляет авидин [16], белок, на долю которого приходится около 0,05 % яичного белка. Являясь, подобно гемоглобину, тетрамерным белком, авидин связывает биотин (**14**) гораздо более прочно ($K \approx 10^{-15}$ моль·л$^{-1}$), чем гемоглобин связывает кислород. Более того, для авидина не показана кооперативность. Биологическая функция авидина неясна, хотя он может использоваться в качестве антибактериального агента. Интересно, что некоторые представители *Streptomyces* производят белок стрептавидин, связывающий биотин и обладающий антибактериальной активностью против *грам*-отрицательных бактерий. Первичная структура, определенная для авидина, имеет некоторое сходство со структурой лизоцима, фермента, выделяемого из различных источников, в том числе из яичного белка, и вызывающего лизис бактериальных клеток. В авидине содержится 128 аминокислотных остатков, в лизоциме — 129. Если принять, что в лизоциме имеется два дополнительных остатка на *N*-конце и одна делеция на *C*-конце, то в двух белках из куриного яичного белка содержится 15 идентичных положений аминокислотных остатков и примерно столько же консервативных замен. Авидин в отличие от лизоцима представляет собой гликопротеин, содержащий углеводный компонент неизвестной структуры, присоединенный к Asn-17. Природа центра связывания в авидине не выяснена, однако модификация бромсукцинимидом или мягкое окисление периодатом, а также изучение дифференциальных ультрафиолетовых спектров



(**14**)



позволяет предположить, что в его функционировании принимает участие триптофан. Было определено сродство авидина к многочисленным аналогам биотина, и поскольку связывание претерпевают даже простые аналоги типа мочевины или гексановой кислоты, вероятно, что почти все атомы биотина участвуют в связывании с белком.

Характер связывания альбуминов плазмы крови отличается как от гемоглобина, так и от авидина. Этот мономерный белок способен связывать большое число катионов, анионов и нейтральных малых молекул При этом связываются не только нормальные компоненты плазмы, такие как $Ca^{2+}$, жирные кислоты и тироксин, но также и многие необычные компоненты типа барбитуратов, сульфонамидов и пенициллина. Альбумин является основным компонентом плазмы и служит, по-видимому, в качестве общей транспортной системы, а также помогает поддерживать правильное осмотическое давление плазмы для сохранения клеточных компонентов крови.

Многочисленные белки связывают ионы металлов. Некоторые из них действуют как биологические хранилища металлов, в то время как другие служат для их транспорта. Ферритин запасает железо, главным образом в печени и селезенке, в виде оксигидроксифосфата Fe(III) с приблизительным составом $Fe(OOH)_8$, $FeO$, $PO_4H_2$. Это соединение образует ядро диаметром 7 нм, окруженное 24 белковыми субъединицами, давая в результате сферическую молекулу общим диаметром около 12 нм. Трансферин, с другой стороны, является белком плазмы, переносящим ионы $Fe^{3+}$ и $Cu^{2+}$. Имеются данные, что в состав центра связывания металла входят тирозин и гистидин. Так, в спектре поглощения белка имеется пик при 465 нм, соответствующий переносу заряда между фенолят- и $Fe^{3+}$-ионами.

Многие белки в противоположность приведенным выше примерам связывают ионы металлов либо временно, либо в течение всего времени их существования в организме. Ранее уже упоминался пример временного связывания $Ca^{2+}$ в связи с протеолитической активацией протромбина и других компонентов системы свертывания крови (см. разд. 24.2.1.2). Иной случай представляют щелочные фосфатазы и фосфокиназы, где, по-видимому, для экранирования отрицательных зарядов фосфатной группы для облегчения атаки атома фосфора нуклеофилом требуется ион двухвалентного металла типа $Mg^{2+}$ или $Zn^{2+}$. Более постоянное связывание ионов металлов белками может служить для выполнения одной из указанных ниже целей. Ионы $Ca^{2+}$ предохраняют трипсин от автолиза. Конкавалин А (см. ниже) не связывает производных глюкозы до тех пор, пока не свяжет предварительно один ион $Ca^{2+}$ и один ион $Mn^{2+}$ на субъединицу. В данном случае катионы, по-видимому, осуществляют «подгонку» конформации молекулы, образуя центр связывания глюкозы. Ионы металлов принимают также участие в формировании активных центров ферментов. По-

скольку эти ионы являются кислотами Льюиса, они могут осуществлять эффективный кислотный катализ. Ионы цинка, которые, как полагают, действуют именно таким образом, содержатся в карбоангидразе, карбоксипептидазе А, карбоксипептидазе В и термолизине. В качестве трех лигандов иона цинка в этих ферментах выступают боковые радикалы глутаминовой кислоты или гистидина; четвертым лигандом является вода или субстрат. В оксидоредуктазах могут функционировать ионы переходных металлов благодаря их различным валентным состояниям. Так, в аскорбатоксидазе медь осциллирует между валентными состояниями Cu(I) и Cu(II).

В качестве последнего примера белков, связывающих малые молекулы, уместно рассмотреть лектины. Эти белки, чаще всего встречающиеся в растениях (но не только в них), связывают производные углеводов со значительной степенью стереоспецифичности. Впервые лектины привлекли внимание исследователей своей способностью агглютинировать эритроциты посредством связывания гликопротеинов мембран. Некоторые лектины специфичны к индивидуальным групповым веществам крови. Интерес к ним увеличился после того, как было обнаружено, что некоторые из лектинов агглютинируют преимущественно злокачественные клетки. Посредством иммобилизации на нерастворимом носителе типа агарозы лектины могут быть использованы для очистки гликопротеинов методом афинной хроматографии. Наиболее изученным лектином является конкавалин А; для этого белка определены аминокислотная последовательность из 238 остатков и трехмерная структура. Конформация конкавалина А весьма примечательна. Семь участков его единственной полипептидной цепи формируют антипараллельную складчатую структуру, а шесть последующих участков образуют другую антипараллельную структуру, перпендикулярную первой. Ион $Mn^{2+}$ координирован с двумя молекулами воды и боковыми радикалами His-24, Glu-8, Asp-10 и Asp-14, образуя октаэдр. Ион $Ca^{2+}$, расположенный на расстоянии 0,5 нм от $Mn^{2+}$, делит с ним два последних лиганда, а также связан с карбонильным кислородом Tyr-12, боковым радикалом Asn-14 и двумя молекулами воды и также образует октаэдрическую конфигурацию. Остатки глюкозы и маннозы связываются в глубоком «кармане» размером $0{,}6 \times 0{,}75 \times 1{,}8$ нм, образованным, как это ни удивительно, гидрофобными остатками.

### 24.2.3. БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

Полипептидные гормоны циркулируют в чрезвычайно низких концентрациях. Для реализации их регулярного эффекта этим гормонам не нужно проникать внутрь клетки. На клеточных мембранах расположены специфические рецепторы гормонов; в результате связывания гормональный сигнал многократно усиливается (часто посредством фермента аденилатциклазы) и передается вто-



*Таблица 24.2.4. Аминокислотная последовательность глюкагона человека и быка (верхняя) и секретина свиньи (нижняя)*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| His | Ser | Gln | Gly | Thr | Phe | Thr | Ser | Asp | Tyr | Ser | Lys | Tyr | Leu | Asp | - |
| 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | | |
| Ser | Arg | Arg | Ala | Gln | Asp | Phe | Val | Gln | Trp | Leu | Met | Asn | Thr | | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| His | Ser | Asp | Gly | Thr | Phe | Thr | Ser | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Asp | - |
| 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | | | | |
| Ser | Ala | Arg | Leu | Gln | Arg | Leu | Leu | Gln | Gly | Leu | Val | $NH_2$ | | | |

ричным мессенджером типа цикло-AMP. О химии гормональных рецепторов известно мало; они, по-видимому, являются белками или конъюгатами белков. В случае глюкагона (табл. 24.2.4), стимулирующего гликогенолиз в печени, имеются некоторые данные об аминокислотных остатках, ответственных за биологическую активность. Так, глюкагон, лишенный *N*-концевого остатка гистидина, связывается с рецептором в печени, но не активирует аденилатциклазу. Фрагменты глюкагона, содержащие остатки 1—21 и 20—29, не связываются рецептором и не активируют фермент. His-1, по-видимому, важен для биологической активности. Интересно, что секретин (см. табл. 24.2.4), также содержащий *N*-концевой гистидин, и глюкагон стимулируют аденилатциклазную систему в жировых клетках крыс, но посредством различных рецепторов. Взаимодействие между глюкагоном и рецептором, по крайней мере частично, осуществляется посредством гидрофобных остатков близ *C*-конца гормона. Однако в отличие от других полипептидных гормонов типа β-кортикотропина и гастрина в случае глюкагона важна, по-видимому, вся структура.

Другой весьма специфичный тип белок-белкового взаимодействия представлен ингибированием трипсина маленьким белковым ингибитором из поджелудочной железы быка. Последний белок состоит из 58 аминокислотных остатков, образующих весьма компактную структуру, содержащую три дисульфидных связи. Вследствие такой компактности белок не очень чувствителен к протеолитической атаке. Боковой радикал Lys-15, однако, полностью экспонирован и представляет собой участок взаимодействия с трипсином, а также его ингибирования. Обычный каталитический механизм действия «сериновых протеиназ», представителем которых является трипсин, предполагает образование нековалентного комплекса, за которым следует ацилирование Ser-195 фермента карбонильной группой лизина или аргинина и высвобождение первого продукта реакции. Завершает процесс деацилирование ацилфермента.

В процессе взаимодействия трипсина с ингибитором трипсина из бычьей поджелудочной железы Lys-15 молекулы ингибитора располагается в «кармане специфичности» трипсина, а атом углерода карбонильной группы этого остатка образует ковалентную связь с атомом кислорода бокового радикала Ser-195 фермента. Тем не менее карбонильный атом углерода Lys-15 по-прежнему остается связанным с амидным азотом Ala-16 ингибитора. Образуется, по всей видимости, тетраэдрический продукт, распад которого до ацилфермента, содержащего $sp^2$-атом углерода, предотвращается за счет сохранения связи с атомом азота Ala-16. Реакция не идет в силу нескольких причин. Одна из них заключается в положении имидазольного цикла His-57, участвующего в системе переноса заряда активного центра «сериновых протеиназ». В тозилхимотрипсине и индолакролеилхимотрипсине N атом гистидина-57 направлен в сторону атома кислорода ацилирующих групп и связанной водородной связью молекулы воды, в то время как в тетраэдрическом комплексе трипсина с бычьим панкреатическим ингибитором трипсина этот атом азота направлен в сторону атома кислорода бокового радикала Ser-195. Кроме того, между поверхностями белков, контактирующими в тетраэдрическом комплексе, не остается места для молекулы воды. И, наконец, NH-группа Ala-16 ингибитора является донором водородной связи по отношению к карбонильному кислороду Gly-36 ингибитора. В случае трансформации тетраэдрического комплекса в ацилфермент эта связь должна разрушаться.

Последний из рассматриваемых примеров белок-белковых взаимодействий касается антител или иммуноглобулинов (IgG). Эти белки производятся В-лимфоцитами в тех случаях, когда «чужая» макромолекула типа белка или углевода попадает в организм. «Чужая» макромолекула, называемая антигеном, может проникать туда в составе поражающих бактерий или вирусов через кожу (случайно, в результате ранения или намеренно при иммунизации) или через кишечник при пищевой аллергии. Если ковалентно присоединить к белку малую молекулу (гаптен) и затем ввести его в организм, обычно вырабатываются антитела к гаптену. Такое быстрое продуцирование антител подопытными животными является основой различных иммунологических методов, в частности радиоиммунодиагностических.

Принципиальная структура IgG представлена на рис. 24.2.2. Молекула состоит из двух идентичных легких (*L*) (М. м. 22500) и двух (Н) тяжелых цепей (М. м. 50 000—75 000), соединенных дисульфидными и нековалентными связями, в результате чего образуется молекула двойной симметрии. Антигены очень прочно связываются антителами в участках, охватывающих первые 110—120 аминокислотных остатков с *N*-конца L- и Н-цепей. Аминокислотные последовательности этих участков, составляющие около половины L- и около четверти Н-цепей, различны для каждого из антител. Они обозначаются как $V_L$ и $V_H$ соответственно. Некоторые последовательности внутри $V_L$- и $V_H$-участков (24—34, 50—55, 89—96 в $V_L$ и 31—35, 50—65 и 95—102 в $V_H$) являются гипервариабельными. Именно эти участки ответственны за специфичность, необходимую для связывания антигенов. Отметим, что в антителах имеется по два центра связывания антигена на молекулу. Последовательности остатков легких ($C_L$) и тяжелых ($C_H$) цепей близки внутри одного и того же класса иммуноглобулинов.



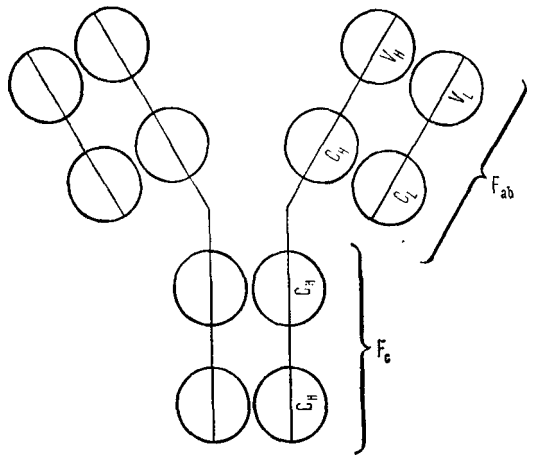


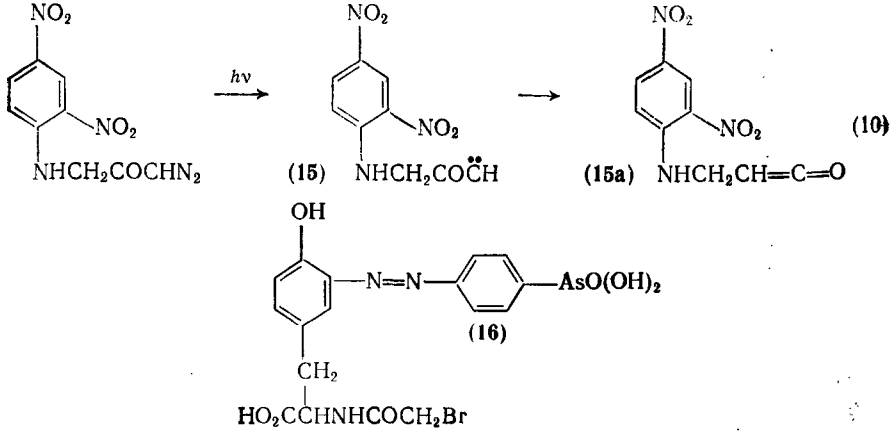

Рис. 24.2.2. Схематическое изображение молекулы IgG.

Исследованиям структуры IgG особенно способствовали два обстоятельства. Во-первых, в результате деградации папаином возможно получить фрагменты $F_{ab}$ и $F_c$ (см. рис. 24.2.2) с интактными центрами связывания. Во-вторых, пациенты со множественными миеломами секретируют с мочой большое количество легких цепей (белки Бенса-Джонса). Последовательности белков Бенса-Джонса в $V_L$-участках варьируют от пациента к пациенту. Все три типа фрагментов были закристаллизованы и методом рентгеноструктурного анализа определена их трехмерная структура [18].

Значительная информация об аминокислотных остатках, ответственных за связывание антигена, была получена методом афинной модификации [19]. Этот метод опирается на те же принципы, что и в случае ферментов (см. разд. 23.3.10). Соединение, близкое по структуре антигену и несущее реакционноспособную функциональную группу, может в принципе образовывать ковалентную связь с боковым радикалом аминокислоты, принадлежащей центру связывания. До сих пор этот метод не применялся в случае, если антиген представляет собой полисахарид или белок. При этом необходимо знание связывающейся на антителе части антигена, а также специфическое введение в этот участок реакционноспособной группировки. Вследствие этих затруднений современные исследования сконцентрировались на идентификации

аминокислот, участвующих в связывании малых гаптенов. В качестве гаптенов используются производные нитробензола, *м*-динитробензола, фосфорилхолина и лактозы. В качестве реакционноспособных группировок, образующих ковалентные связи с центром связывания гаптена, применяются арендиазониевые, бромацетильные группы, а также фотохимически генерируемые карбены и нитрены. Так же, как и в случае афинно-меченых ферментов, количество и ценность информации, получаемой из подобных экспериментов, решающим образом зависит от размера и реакционной способности реагирующей группы. Если последняя слишком велика, может иметь место реакция с аминокислотами, непосредственно не вовлеченными в процесс связывания. Если эта группа обладает слишком узкой специфичностью, она может не реагировать вовсе. Диазониевая группа реагирует с боковыми радикалами тирозина, гистидина и лизина. Бромацетильная группа может алкилировать все эти остатки, а также боковые радикалы цистеина, метионина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Фотохимическое превращение диазокетона в карбен {схема (10)} способно в принципе модифицировать любую аминокислоту, поскольку карбен может присоединяться по связям C—H. Однако этот метод полностью не оправдал возлагавшихся на него надежд вследствие того, что перегруппировка карбена **(15)** в менее реакционноспособный кетен **(15a)** сильно конкурирует со свободнорадикальными реакциями внедрения. Нитрены не претерпевают внутримолекулярной перегруппировки и в силу этого реакционноспособнее карбенов [20].

Метод афинной модификации центров связывания IgG можно проиллюстрировать несколькими примерами. Ион *м*-нитробензодиазония, близкий по размерам к *м*-динитробензолу, реагировал с антителами свиньи, выработанными против 2,4 динитрофенильного гаптена, присоединяясь к боковым радикалам Tyr-33 H-цепи и Tyr-33 и Tyr-313 L-цепи антитела. *N*-Бромацетил-(*м*-арсанилазо)-L-тирозин **(16)** реагировал с боковым радикалом Lys-59 H-цепи






антител к арсаниловым соединениям, выработанных морской свинкой. При связывании антител из кролика против бычьего ДНФ-γ-глобулина с *N*-динитрофенилглициновым диазокетоном и последующем фотолизе продукты реакции **(15)**, **(15a)** реагировали преимущественно с H-цепями, однако точная локализация участков присоединения проведена не была. Арилнитрены образуются в результате фотолиза арилазидов. В соответствии с этим бычий γ-глобулин обрабатывали 4-азидо-2-нитрофторбензолом, а затем получали и выделяли из кролика антитела на этот антиген. Смешивание антител с *N*-ε-(4-азидо-2-нитрофенил)-*L*-лизином с последующим облучением при 400 нм вызывало введение метки в H- и в меньшей степени в L-цепи. В результате протеолитической деградации меченого антитела были получены два пептида, X-Ala-Arg и Phe-Cys-Y-Arg. Последовательность 91—94 H-цепи — Phe-Cys-Ala-Arg, и это означает, что нитрен прореагировал с остатками Cys-92 и Ala-93. Эта последовательность располагается вблизи одного из гипервариабельных участков H-цепи (95—102).

### 24.2.4. БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Хорошим примером дискретной системы, которую можно выделить и которая содержит тесно ассоциированные друг с другом белки и нуклеиновые кислоты, является вирус. Вирус простейшего типа состоит из РНК или ДНК, одно- либо двухцепочечной, окруженной белковой оболочкой, состоящей из идентичных или различных субъединиц, организованных в симметричную структуру. В более сложных типах вирусов имеется также внешний слой, состоящий из липидов и гликопротеинов. Между нуклеиновой кислотой и белком (белками) оболочки существует тесная взаимосвязь, генетическая информация для биосинтеза этого белка закодирована в нуклеиновой кислоте, и в то же время белок предохраняет нуклеиновую кислоту от действия нуклеаз клетки-хозяина. Еще более тесная физическая связь имеет место между белковыми субъединицами. Такая связь была продемонстрирована в результате разрушения вируса табачной мозаики, за которым следовала спонтанная самосборка белка в отсутствие нуклеиновой кислоты. Пустая оболочка, или капсида, была, однако, менее стабильна, чем содержавшие нуклеиновую кислоту реконструированные вирусные частицы. Этот результат указывает, что взаимодействия белок-нуклеиновая кислота играют важную, хотя, вероятно, не столь значительную роль, по сравнению с белок-белковыми взаимодействиями. Вирусы, таким образом, как бы образуют смысловой мостик между предыдущим разделом и рассматриваемым ниже взаимодействием гистонов с нуклеиновыми кислотами.

Нуклеиновая кислота, содержащаяся в вирусе, влияет на форму последнего [21]. Некоторые, содержащие одноцепочечную ДНК, вирусы имеют спиральную структуру. Белок вируса табачной

мозаики образует 2200 идентичных субъединиц, в каждой из которых содержится 158 аминокислотных остатков. Молекула РНК расположена в отверстии в центре состоящего из белка цилиндра. Другие РНК-содержащие вирусы и почти все вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК, образуют структуры с икосаэдрической симметрией. Молекула ДНК в таких структурах сильно скручена. Предполагается, что значение взаимодействий белок-нуклеиновая кислота в икосаэдрических вирусах меньше, чем в спиральных. Важное исключение представляет собой полиовирус [22]. Маленький белок (VPg) с молекулярной массой менее 7000 ковалентно присоединяется к 5′-концевому олигонуклеотиду полио-РНК, образуя VPg-pUUAAAACAGp, к образующимся тяжам репликативного интермедиата вируса и к последовательности минус-цепей РНК. Природа ковалентной связи остается неизвестной, но предполагается [22], что VPg принимает участие в инициации синтеза РНК, но должен, однако, отщепиться от РНК до ее трансляции, в результате которой образуется вирусный белок.

Вирусы, содержащие неидентичные субъединицы, вынуждают, по-видимому, клетку-хозяина синтезировать вначале первичный белок, содержащий в единственной цепи последовательности субъединиц. В процессе самосборки и созревания вируса этот первичный белок селективно расщепляется (возможно, протеиназами хозяина), образуя все необходимые субъединицы. Так, предполагается, [21], что пикорнавирусы, типа энтеровирусов, собираются и созревают в ступенчатом режиме. Первичный белок вначале расщепляется на три фрагмента (VP0, VP1, VP3). Эти фрагменты, как полагают, через промежуточные формы VP0-VP1-VP3 и $(VP0\text{-}VP1\text{-}VP\text{-}3)_5$ собираются в прокапсиду $(VP0\text{-}VP1\text{-}VP3)_{60}$. Были выделены пустые оболочки этого типа. Затем в капсиде располагается РНК и происходит созревание посредством протеолитического расщепления VP0. В результате расщепления образуются субъединицы VP2 и VP4 и в результате созревший вирус состоит из капсиды $(VP1\text{-}VP2\text{-}VP3\text{-}VP4)_{60}$, окружающей вирусную РНК. Неизвестно, играет ли РНК какую-либо роль в управлении созреванием белков капсиды.

Взаимодействия белок-нуклеиновая кислота в хромосомах клеток эукариот сильнее. В хромосомах ДНК образует комплексы с пятью классами гистонов [23, 24]. Все гистоны — сильно основные белки: H1 обогащен лизином по сравнению с аргинином, H3 и H4 богаты аргинином, а в H2A и H2B соотношение между лизином и аргинином промежуточное. Последовательности аргинин-богатых гистонов очень консервативны. Гистоны H4 из тимуса теленка и проростков гороха различаются всего на две из 102 аминокислот, а гистон H3 из тимуса теленка и карпа — одним из 135 остатков. *N*-концевые участки H2A, H2B, H3 и H4 намного основнее *C*-концевых. Последние содержат несколько аминокислотных остатков с неполярными боковыми радикалами. Эти четыре гистона сильно взаимодействуют друг с другом, возможно *C*-концевыми участками и, как полагают, образуют агрегаты типа $(H2A\text{-}H2B\text{-}H3\text{-}H_4)_2$. Эти агрегаты, вероятно, возникают за счет взаимодействия боковых радикалов лизина и аргинина с фосфатными группами ДНК, образуя кластеры с последней. Эти кластеры покрывают примерно 200 пар оснований каждый, образуя повторяющиеся структуры, называемые нуклеосомами. Такие структуры были обнаружены методом электронной микроскопии.

Гистон H1 сильно отличается от остальных гистонов. Он больше по размерам (М. м. примерно 23 000) и его последовательность сильно варьирует для разных организмов, хотя почти половина молекулы состоит из лизина и аланина. В рамках одного вида гистон H1 был разделен на несколько близких по структуре белков. Они связываются с ДНК отличным от других гистонов способом и, по-видимому, образуют сшивки между полинуклеотидными тяжами примерно через 50 пар оснований. Наряду с пост-трансляционным метилированием и ацетилированием (см. разд. 24.2.1.1) гистоны претерпевают фосфорилирование боковых радикалов определенных остатков серина. Эта модификация особенно интересна в случае гистона H1, так как фосфорилирование достигает максимума во время деления клетки и, следовательно, может служить пусковым механизмом митоза. Скорость фосфорилирования гистона H1 высока при регенерации печени после частичной гепатэктомии и позитивно коррелирует со скоростью опухолевого роста.

Другой пример сильного взаимодействия белка с ДНК — регуляция оперона белком-репрессором. Наиболее изученным примером является lac-оперон *E. coli* [25]. Ген-регулятор кодирует синтез белка lac-репрессора, который затем связывается с соседним оператором. Связывание с белком-репрессором малой молекулы — индуктора, например изопропилтио-β-*D*-галактопиранозида, вызывает диссоциацию репрессора с операторного участка. Последующая транскрипция трех соседних генов оперона приводит к биосинтезу трех ферментов — β-галактозидазы, галактозопермеазы и тиогалактозидтрансацетилазы. lac-Репрессор представляет собой тетрамерный белок, состоящий из идентичных субъединиц по 347 аминокислот каждая. Сродство репрессора к последовательности ДНК оператора зависит от ионной силы; константа диссоциации в клетке, вероятно, менее $10^{-11}$ моль/л$^{-1}$. Структура участка связывания ДНК в lac-репрессоре до сих пор не выяснена, однако удаление трипсином 59 остатков с *N*-конца и 20 остатков с *C*-конца предотвращает связывание. Несколько больше известно об участке связывания индуктора. Измерения флуоресценции показывают, что находящийся в участке связывания индуктора остаток триптофана при связывании перемещается в менее полярное окружение. Изучение изменения флуоресценции методом остановленного потока показывает, что процесс связывания проходит в две стадии. Быстрая начальная стадия подчиняется, как и ожидалось, кинетике второго порядка. Более медленная стадия мономолекулярна и, по-

видимому, представляет собой конформационный переход. Последний результат согласуется с гипотезой, согласно которой индуктор вызывает изменение конформации белка-репрессора, понижающее сродство последнего к ДНК оператора.

К другим примерам взаимодействия белок-нуклеиновая кислота можно отнести ферменты рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, ДНК-зависимую РНК-полимеразу, ДНК-метилазы, а также ферменты, реактивирующие ДНК после фотооблучения.

### 24.2.5. ТОКСИЧНЫЕ БЕЛКИ

Поскольку в живых организмах белки встречаются повсеместно, а также служат важным источником питания, может показаться удивительным, что некоторые из них чрезвычайно токсичны. Однако подобно тому, как ничтожно малые концентрации пептидных гормонов способны к модуляции клеточного метаболизма, полипептиды соответствующей структуры способны блокировать клеточную активность посредством, например, связывания с рецепторами на мембране.

Некоторые из наиболее известных токсичных белков [26] продуцируются анаэробной спорообразующей бациллой *Clostridium botulinum*, хорошо растущей на некоторых пищевых, в первую очередь мясных, продуктах. Продуцируемые ею токсины блокируют высвобождение ацетилхолина и тем самым передачу нервного импульса в холинэргических синапсах. Для человека летальная доза токсина составляет около 1 мкг. О структурах этих соединений известно мало.

Лучше изучены нейротоксины из некоторых змей, особенно кобр (семейство *Elapidae*) и морских змей (семейство *Hydrophiidae*). Выделены и исследованы последовательности токсинов ряда родов и видов обоих этих семейств. Большинство изученных к настоящему времени нейротоксинов змей относится к одному из двух типов. Токсины типа I содержат 61—62 аминокислотных остатка, м. м. 6700—7000; токсины типа II — 71—74 аминокислоты, м. м. 7800—8000. Для токсинов типа I показано наличие четырех дисульфидных связей, которые занимают гомологичные позиции в последовательностях токсинов обоих типов. В токсинах типа II содержится еще одна дополнительная дисульфидная связь (табл. 24.2.5). При сравнении последовательностей 13 токсинов [27] установлено, что положение 18 аминокислот в них постоянно, а еще для нескольких остатков наблюдаются консервативные замены. На основании такого сравнения предложено, что токсины типа II возникли в результате вставки содержащего дисульфидную связь сегмента примерно в середине последовательности, а также прибавления аминокислот на *C*-конце. Предпринимались многочисленные попытки идентификации важных для активности аминокислотных остатков. Кобротоксин из *Naja naja atra* (тайваньская кобра, см. табл. 24.2.5), например, содержит два остатка тирозина,

*Таблица 24.2.5. Аминокислотная последовательность ядов Naja naja atra, Naja melanoleuca b*

Дисульфидные связи соединяют остатки 3—24, 17—45, 49—60, 61—66; в структуре второго яда имеется дополнительная дисульфидная связь, связывающая остатки 30—34

| | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 |
|---|---|
| Naja naja atra | Leu-Glu-Cys-His-Asn-Gln-Gln-Ser-Ser-Gln-Thr-Pro-Thr-Thr-Thr-Gly-Cys-Ser-Gly-Gly- |
| Naja melanoleuca b | Ile-Arg-Cys-Phe- -Ile-Thr-Pro-Asp-Val-Thr-Ser-Gln-Ile-Cys-Ala-Asp-Gly- |
| | 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 |
| Naja naja atra | -Glu-Thr-Asn-Cys-Tyr-Lys-Lys-Arg-Trp-Arg-Asp-His- -Arg-Gly-Tyr-Arg- |
| Naja melanoleuca b | -His-Val-Cys-Tyr-Thr-Lys-Thr-Trp-Cys-Asp-Asn-Phe-Cys-Ala-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg- |
| | 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 |
| Naja naja atra | -Thr-Glu-Arg-Gly-Cys-Gly- -Cys-Pro-Ser-Bal-Lys-Asn-Gly-Ile-Glu-Ile-Asn-Cys- |
| Naja melanoleuca b | -Val-Asp-Leu-Gly-Cys-Ala-Ala-Thr-Cys-Pro-Thr-Bal-Lys-Pro-Gly-Bal-Asn-Ile-Lys-Cys- |
| | 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 |
| Naja naja atra | -Cys-Thr-Thr-Asp-Arg-Cys-Asn-Asn |
| Naja melanoleuca b | -Cys-Ser-Thr-Asp-Asn-Cys-Asn-Pro-Phe-Pro-Thr-Arg-Asn-Arg-Pro |

причем нитрование одного из них, Tyr-35, тетранитрометаном не влияет на токсичность. Второй остаток, Tyr-25, по-видимому, утоплен в белковой глобуле, но в присутствии гидрохлорида гуанидина может быть пронитрован, что приводит к потере активности. Поскольку этот остаток погружен в белок, он, вероятно, не взаимодействует с холинэргическим рецептором, но важен для поддерживания правильной конформации молекулы токсина. Вблизи рецептора располагаются или вступают во взаимодействие, по-видимому, боковые радикалы сразу нескольких аминокислотных остатков и модификация некоторых из них не может в достаточной степени пролить свет на механизм действия токсина. Проведен твердофазный синтез токсина кобры [28]; возможно, что синтез аналогов с природными или неприродными аминокислотами, замещающими остатки в определенных участках молекулы, позволит получить ценную информацию о взаимосвязи между структурой и токсичностью.

### 24.2.6. СТРУКТУРНЫЕ И СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Белки, не несущие структурных функций, имеют тенденцию к высокому содержанию третичной структуры. Эта структура легко разрушается в денатурирующих условиях, таких как сдвиг pH, добавление органических растворителей, детергентов или добавление некоторых солей при высокой ионной силе. Для структурных белков, напротив, характерно высокое содержание вторичной структуры, чему благоприятствует наличие повторяющихся участков в первичной структуре.

Среди структурных белков особое место занимают кератины, поскольку они были первыми белками, изученными Астбюри методом диффракции рентгеновских лучей. Их нерастворимость и биохимическая инертность не способствовали, однако, достаточному уровню активности исследований. Кератины образуют защищающие от внешней среды барьеры типа рогов, копыт, когтей, волос, шерсти и перьев. В перьях содержатся β-структуры, в то время как для волос и шерсти характерны α-спиральные структуры. Последние состоят из белков с низким содержанием серы; эти микрофибриллы окружены матрицей двух других типов, одной с высоким содержанием глицина и тирозина, а другой — с высоким процентом серы. Во время синтеза прокератина в эпителиальных клетках в богатых серой белках имеются большие количества тиольных групп, образующих впоследствии дисульфидные связи, делающие кератин более жестким. Потерю волосами механической прочности при их обработке отбеливающими или восстанавливающими агентами (завивка-перманент) можно частично объяснить за счет расщепления дисульфидных связей. Восстановление и карбоксиметилирование дисульфидных связей (см. разд. 23.3.3) сделали возможным солюбилизацию и фракционирование некоторых компонентов кератина для последующего секвенирования [29]. В одном



компоненте, содержащем 151 аминокислоту, последовательность (17) повторяется три раза. α-Аминогруппа ацетилирована.

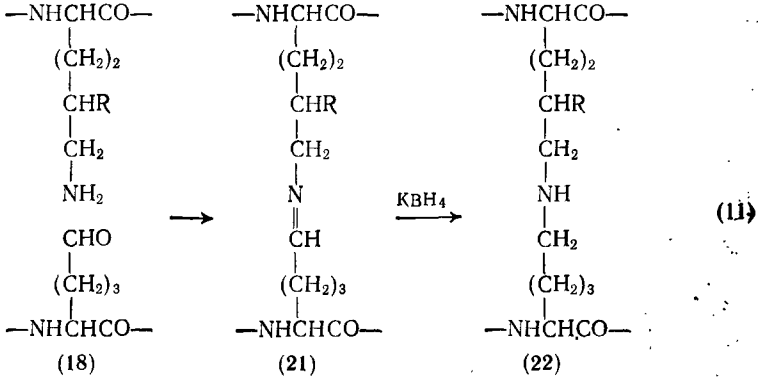
$$\begin{matrix}\text{Ser}\\ \text{Thr}\end{matrix}\text{-Ser-Cys-Cys-}\begin{matrix}\text{Arg}\\ \text{Gln}\end{matrix}\text{-}\begin{matrix}\text{Ser}\\ \text{Pro}\end{matrix}\text{-Thr-}\begin{matrix}\text{Cys}\\ \text{Ser}\end{matrix}\begin{matrix}\text{Ser}\\ \text{Ile-Gln}\\ \text{Leu}\end{matrix} \qquad (17)$$

Коллаген [30] — волокнистый белок, содержащийся в коже, сухожилиях, хрящах, костях и зубах. Коллаген внутриклеточно синтезируется в фибробластах в виде предшественника, проколлагена с м. м. цепи 125 000—130 000. Его отличие от коллагена заключается в продлении *N*-концевого сегмента, содержащего дисульфидные связи и триптофан. Превращение проколлагена в коллаген осуществляется вне клетки ферментом проколлагенпептидазой, удаляющей содержащий цистин и триптофан *N*-концевой сегмент посредством расщепления связи X-Glu или X-Gln, в результате чего на N-конце коллагена образуется остаток пирролидон-2-карбоновой-5 кислоты. Об этой протеазе известно мало, за исключением того, что она содержит важный для активности металл и не является ни «сериновой», ни «тиольной» протеиназой. Наследственное заболевание крупного рогатого скота, дерматоспараксис, объясняется отсутствием этой протеолитической стадии. Коллаген состоит из трех полипептидных цепей, в каждой из которых содержится около 1000 аминокислотных остатков. Цепи образуют тройную правую спираль, причем на каждый третий остаток приходится одна межмолекулярная водородная связь $>NH \ldots O=C<$. У *N*- и *C*-концов коллагена расположены неспиральные телопептидные участки. Зрелый коллаген содержит два типа цепей, α1 и α2, образуя в тройной спирали структуру состава $(\alpha 1)_2\alpha 2$. В эмбриональном коллагене, а также в коллагене, образующемся на ранних стадиях заживления раны, содержится только один тип цепей $(\alpha 1)_3$.

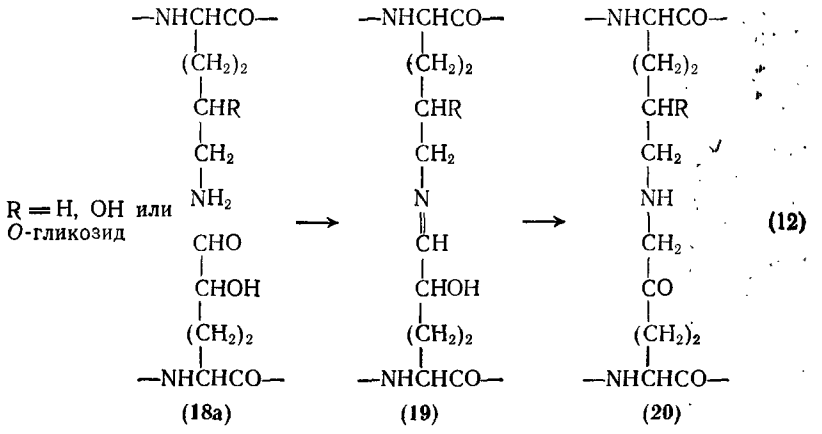
Как отмечалось выше (см. разд. 24.2.1), в фибробластах проходит посттрансляционная модификация определенных пролиновых и лизиновых остатков. Несколько менее половины остатков пролина превращается в гидроксипролин, около 20 % остатков лизина — в гидроксилизин, причем к одному или нескольким остаткам последнего присоединяются углеводы. За исключением телопептидных участков, α1- и α2-цепи состоят из регулярной последовательности, содержащей глицин в качестве каждого третьего остатка. Глицин обычно следует за гидроксипролином и предшествует пролину. Глицин, пролин и гидроксипролин вместе образуют около половины молекулы коллагена. Следующей по распространенности аминокислотой является аланин; гистидина и тирозина содержится очень мало.

В процессе созревания коллаген претерпевает другие ковалентные модификации. Последние включают образование новых ковалентных сшивок, делающих молекулу коллагена нерастворимой. Эти модификации, по-видимому, ограничиваются телопептидными

участками и начинаются с окислительного дезаминирования определенных остатков лизина и гидроксилизина, катализируемого медьзависимой лизилоксидазой. Образующиеся альдегиды аллизин (18) или гидроксиаллизин (18а) дают альдимины с остатками лизина и гидроксилизина соседней цепи. Образующиеся первоначально из гидроксилизина альдимины (19) стабилизируются посредством перегруппировки Амадори, давая (20) {схема (12)}.




(18) (21) (22) (11)




(18а) (19) (20) (12)

Напротив, альдимины, образовавшиеся из аллизина (21), остаются кислотолабильными и эти связи могут быть обнаружены только после восстановления альдимина борогидридом калия до (22) {схема (11)}. Имеются данные, что часть этих альдиминов восстанавливается и в нативном состоянии, так что (22) иногда могут быть обнаружены в кислотных гидролизатах коллагена без предварительного восстановления.

Предполагается, что коллаген образует нити, каждая из которых состоит из пяти перекрывающихся цепей тройных спиралей (рис. 24.2.3), что допускает образование межмолекулярных сшивок в перекрывающихся участках, включая телопептиды.



Эластин в отличие от коллагена обнаружен в основном в связках (лигаментах) и больших кровеносных сосудах, которые должны быть эластичными. Подобно коллагену, эластин богат глицином, аланином и пролином и не содержит цистеина, однако в от-

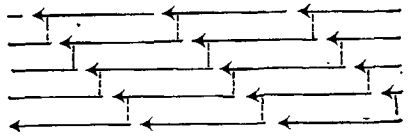
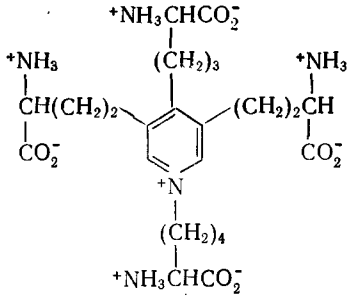
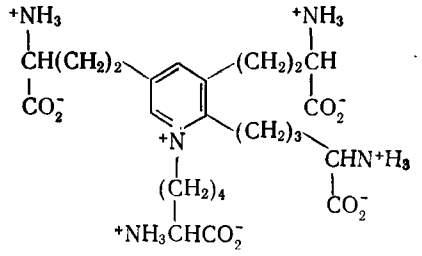


Рис. 24.2.3. Схематическое изображение зигзагообразной упаковки в нити пяти тройных спиралей коллагена.
Хотя изображение двумерно, пять тройных спиралей упаковываются по окружности цилиндра. Заметьте места сшивок в телопептидных участках.

личие от коллагена в нем нет гидроксилизина. В цепях эластина содержатся внутри- и межмолекулярные сшивки, но некоторые из них отличаются от таковых в коллагене, хотя и, как полагают, возникают вследствие окислительного дезаминирования лизина в аллизин. В кислотных гидролизатах зрелого эластина содержатся десмозин (23) и изодесмозин (23а).



(23) десмозин

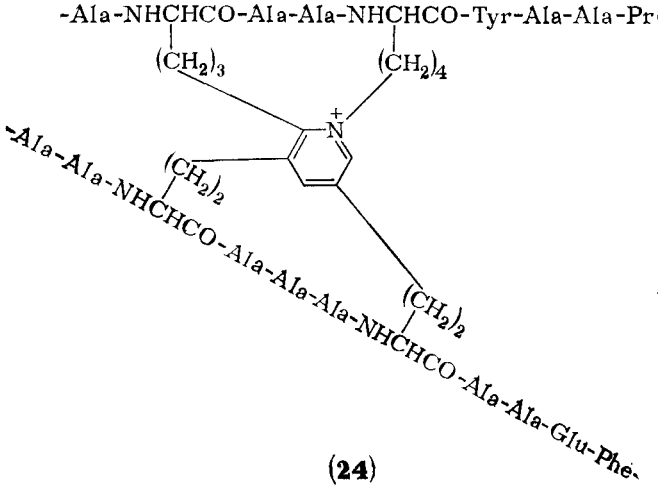


(23а) изодесмозин

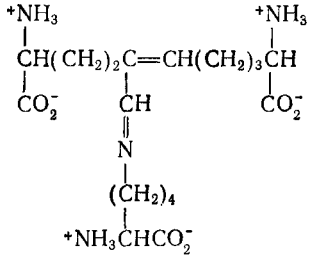
Эти соединения возникают, как полагают, в результате конденсации трех остатков аллизина и одного лизина, но точный механизм не установлен. Считают, что первоначальные продукты представляют собой производные дигидропиридина, что предполагает наличие стадий окисления. Образование десмозина и изодесмозина происходит, по-видимому, в последовательностях типа Lys-Ala-Ala-Lys или Lys-Ala-Ala-Ala-Lys. Одна из таких последовательностей, содержащая сшивку, изображена на структуре (24). Помимо десмозина и изодесмозина образуются также сшивки между боковым радикалом лизина и одним (21), (22) или двумя (25), (26) радикалами аллизина. Недостаток меди в пище понижает активность лизилоксидазы и, следовательно, количество сшивок. Являющаяся следствием этого недостаточная эластичность больших кровеносных сосудов приводит к сердечнососудистым поражениям, в частности к разрывному аневризму аорты. При этом затрагиваются также сшивки в коллагене; были обнаружены патологические дефекты скелета. Синдром Марфена — наследственный дефект, при котором нарушаются сшивки в коллагене и эластине. Генетиче-

ские дефекты могут заключаться в недостатке лизилоксидазы, дефекте в транспорте ионов меди или в ненормальной первичной структуре белков.

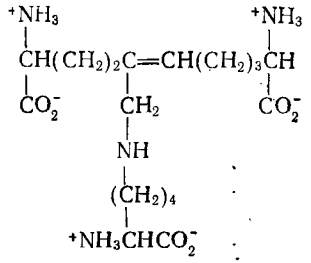
Дать удовлетворительное объяснение эластичности эластина на молекулярном уровне оказалось трудной задачей [31]. Согласно




**(24)**




**(25)** дегидромеродесмозии




**(26)** меродесмозин

одной из гипотез, в участках, образующих сшивки, часто встречаются последовательности типа -Pro-Gly-Gly-Val-Pro-. Эти последовательности образуют широкую левую спираль («смазанный виток»), гидрофобные остатки которой в момент расслабления эластичного волокна направлены внутрь. Предполагают, что растяжение эластичного волокна приводит к экспонированию этих остатков в воду, вследствие чего возникает энтропийная движущая сила к возвращению волокна в прежнее состояние. В эластичном волокне содержится по крайней мере еще один белок, совершенно, по-видимому, непохожий на эластин, так как он богат глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой и цистином (цистеином).

Химия мускульного сокращения — сложный процесс [32, 33], включающий взаимодействие нескольких белков, неорганических



ионов и АТР, возникающего в процессе метаболизма углеводов и окислительного фосфорилирования. Немускульные сократительные системы, действующие в ходе фагоцитоза, митоза и цитокинеза, включают белки с близкими структурами и свойствами [34]. Электронномикроскопические исследования показывают, что мускульные волокна состоят из пучков (миофибрилл) толстых нитей (миозин), перемежающихся тонкими нитями (актин) и окруженных жидкостью (саркоплазма) и напоминающей втулку системой частиц (саркоплазматический ретикулум). Промежутки (рис. 24.2.4,

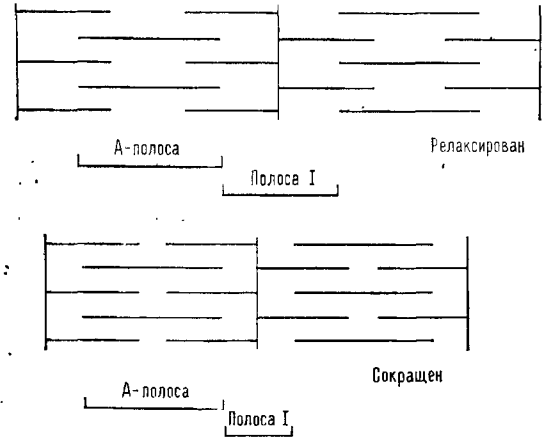



**Рис. 24.2.4. Схематическое изображение скелетной мышцы, показывающее взаиморасположение миозина и актина.**

полосы I) между миозиновыми филаментами (*А*-полосы) соединяются актиновыми нитями. Хаксли предположил, что в момент сокращения мышцы актиновые и миозиновые нити скользят относительно друг друга, так что промежутки между концами миозиновых нитей сокращаются. Далее предполагается, что относительное движение актина и миозина сопровождается быстрым образованием и распадом межмолекулярных ковалентных связей. Мышечное сокращение запускается выходом ионов $Ca^{2+}$ из саркоплазматического ретикулума в саркоплазму, в результате чего активируется аденозинтрифосфатаза миозина. АТР уменьшает взаимодействие миозина и актина и способствует релаксации. Действие аденозинтрифосфатазы понижает концентрацию АТР и усиливает взаимодействие между актином и миозином. Эта простая схема, однако, существенно усложнилась в результате открытия нескольких других белков, участвующих в сокращении и релаксации мышц; подробное обсуждение этих вопросов можно найти в [32, 33]. Ниже приводится краткое описание некоторых компонентов системы и их взаимодействий в процессе мускульного сокращения.

Молекулярная масса миозина — 460 000, длина нити достигает 160 нм. В состав молекулы входят две одинаковых α-спиральных цепи, скрученных друг с другом. В *N*-концевом участке каждой цепи, находящемся в глобулярной конформации, локализована аденозинтрифосфатаза. В миозине содержится ε-*N*-метиллизин, ε-*N*-триметиллизин и $N_\tau$-метилгистидин; последний входит в последовательность (**27**). Молекулярная масса каждой цепи составляет 190 000. Разница между полной молекулярной массой (460 000) и $2 \times 190\,000$ объясняется ассоциацией с глобулярной головкой молекулы трех небольших полипептидных цепей. Одну из этих цепей можно удалить без нарушения аденозинтрифосфатазной активности, однако две других цепи существенны для последней. Две существенно меньшие цепи высоко гомологичны, однако одна длиннее другой. Обращает на себя внимание последовательность, содержащаяся в *N*-концевом участке и включающая остатки аланина, пролина и лизина.

Уже упоминавшийся актин является другой сложной белковой системой. Сам актин имеет молекулярную массу 42 000 и состоит из 374 аминокислот с известной первичной структурой. Подобно миозину, в актине содержится $N_\tau$-метилгистидин, однако в другой, непохожей последовательности (28).

-Ile-Asp-Val-Asp-MeHis-Gln-Thr-Tyr-Lys- (**27**)

69 70 71 72 73 74 75 76 77

-Tyr-Pro-Ile-Glu-MeHis-Trp-Glu-Ile-Ile- (**28**)

-Ala-Ile-Thr-Ala-Arg- (**29**)

Из α-спиралей молекул актина образуется (по типу конец к концу) две скрученных цепи, причем в спиральном желобке между ними располагается другой белок, тропомиозин. Тропомиозин, как полагают, представляет собой агрегат нескольких полипептидных цепей, образующих скрученные витки. Каждая молекула взаимодействует с семью молекулами актина. Молекула тропомиозина связывается также с молекулой тропонина, состоящего из трех субъединиц. Субъединица T связывается с тропомиозином, субъединица I — с актинтропомиозиновым комплексом, а субъединица C — с субъединицами T и I. В отсутствие ионов $Ca^{2+}$ субъединицы T и I предотвращают сокращение, ингибируя взаимодействие между актином и миозином. При низких концентрациях иона $Ca^{2+}$ субъединица C лишь слабо связана с субъединицей I. При более высоких концентрациях $Ca^{2+}$ последний связывается субъединицей C, которая затем прочно связывается с субъединицей I, удаляя последнюю из актин-тропомиозинового комплекса. Ион $Ca^{2+}$, таким образом, действует в качестве депрессора релаксации. I-Субъединица тропонина интересна тем, что в ней содержится фосфорилированная последовательность (**29**), напоминающая последовательность вокруг центра фосфорилирования в фосфорилазе (*a*) (см. разд. 24.2.1.1). В тропонине C содержится 158 аминокислотных остатков, последовательность которых известна, и четыре центра связывания ионов $Ca^{2+}$.



### 24.2.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные выше белки расположены таким образом, чтобы продемонстрировать различные аспекты структуры и функции. Эта классификация в известной степени произвольна. Так, читатель может принять во внимание, что гемоглобин и мышечные белки могут рассматриваться в разделе белок-белковых взаимодействий, тропонин C — как белок, связывающий ион металла, а миозин — как белок, претерпевающий посттрансляционное метилирование. Белки можно изучать в нескольких аспектах, включая биосинтез, структуру, взаимодействия и биологическую роль. Любая попытка их классификации будет, по-видимому, лишь частично успешной, однако она дает возможность выдвинуть на передний край сходства и различия. Рассмотренные белки охватывают очень широкую область, вследствие чего описания являются вынужденно краткими. Рекомендуем читателю обратиться к цитированным обзорам.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *D. M. Zeigler and L. L. Poulsen*, Trends Biochem. Sci., 1977, **2**, 79.
2. *G. J. Cardinale, R. E. Rhoads, and S. Udenfriend*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, **43**, 537.
3. *G. L. Cantoni*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 435.
4. *H. R. Morris, M. R. Thompson, and A. Bell*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, **62**, 856.
5. *S. Magnusson, T. E., Petersen, L. Sottrup-Jensen, and H. Claeys*, in 'Proteases and Biological Control', ed. E. Reich, D. B. Rifkin, and E. Shaw, Cold Spring Harbor Laboratory, 1975, p. 123.
6. *C. T. Esmon, J. A. Sadowski and J. W. Suttie*, J. Biol. Chem., 1975, **250**, 4744.
7. *A. R. G. Wylie, J. D. Lonsdale-Eccles, N. L. Blumsom, and D. T. Elmore*, Biochem. Soc. Trans., 1977, **5**, 1449.
8. *R. Kornfeld and S. Kornfeld*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 217.
9. *C. J. Waechter and W. J. Lennarz*, Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 95.
10. *C. S. Rubin and O. M. Rosen*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 831.
11. *E. W. Davie and K. Fujikawa*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 799.
12. *H. J. Müller-Eberhard*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 697.
13. *R. F. Doolittle and B. Blombäck*, Nature, 1964, **202**, 147.
14. *M. F. Perutz and L. F. TenEyck*, Cold Harbor Symp. Quant. Biol., **1972**, **36**, 295.
15. *M. F. Perutz*, New Scientist., 1971, **50**, 676.
16. *N. M. Green*, Adv. Protein Chem., 1975, **29**, 85.
17. *G. M. Edelman, B. A. Cunningham, G. N. Reeke, J. W. Becker, M. J. Waxdal, and J. L. Wang*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1972, **69**, 2580.
18. *D. R. Davies, E. A. Padlan, and D. M. Segal*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 639.
19. *D. Givol*, Essays Biochem., 1974, **10**, 73
20. *J. R. Knowles*, Accounts Chem. Res., 1972, **5**, 155.
21. *S. J. Martin*, in 'The Biochemistry of Viruses', Cambridge University Press, Cambridge, 1978, chapter 5.
22. *A. Nomoto, B. Detjen, R. Pozzatti, and E. Wimmer*, Nature, 1977, **268**, 208.

23. *B. Lewin*, in 'Gene Expression', Wiley, New York, 1974, vol. 2, chapter 3.
24. *S. C. R. Elgin and H. Weintraub*, Ann. Rev. Biochem., 1975, **44**, 725.
25. *S. Bourgeois and M. Pfahl*, Adv. Protein Chem., 1976, **30**, 1.
26. *D. A. Boroff and B. R. DasGupta*, in 'Microbial Toxins', ed. S. Kadis, T. C. Montie, and S. J. Ajl, Academic, New York, vol. IIA, chapter 1.
27. *D. J. Strydom*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 4029.
28. *H. Aoyagi, H. Yonezawa, N. Takahashi, T. Kato, N. Izumiya, and C.-C. Yang*, Biochem. Biophys Acta, 1972, **263**, 823.
29. *J. H. Bradbury*, Adv. Protein Chem., 1973, **27**, 111.
30. *W. Traub and K. A. Piez*, Adv. Protein Chem., 1971, **25**, 243.
31. *R. B. Rucker and D. Tinker*, Internat. Rev. Exp. Pathol., 1977, **17**, 1.
32. *E. W. Taylor*, Ann. Rev. Biochem., 1972, **41**, 577.
33. *S. Ebashi*, Essays Biochem., 1974, **10**, 1.
34. *M. Clarke and J. A. Spudich*, Ann. Rev. Biochem., 1977, **46**, 797.

## 24.3. КОФЕРМЕНТЫ

*Г. К. С. Буд (University of Strathclyde)*

### 24.3.1. ВВЕДЕНИЕ

Для успешного протекания многих ферментативных реакций необходимо наличие, помимо фермента и субстрата, других веществ. Такие соединения называются коферментами, или кофакторами и составляют важную часть каталитического механизма. Таким образом, образуется интактная ферментная система, или холофермент. При этом белковую часть системы называют апоферментом, а упомянутую выше небелковую часть — простетической группой, кофактором или, наиболее часто, коферментом.

Во многих случаях кофермент можно отделить от белка-фермента. Таким образом, коферменты можно иногда рассматривать в качестве особой формы косубстрата ферментативной реакции. Коферменты обычно функционируют в качестве акцепторов или доноров функциональных групп или атомов и часто связывают два фермента друг с другом с образованием ферментной системы [1]. В этом случае один фермент переносит группу или атом с субстрата на кофермент, а второй — с кофермента на второй субстрат. В настоящее время в большинстве случаев возможно объяснение процесса переноса в терминах механизмов органических реакций.

Некоторые из витаминов (особенно группы В) чрезвычайно тесно связаны с коферментами. Прежде чем перейти к дальнейшему изложению, следует обсудить этот факт. Во многих случаях полезно рассматривать определенный кофермент в качестве метаболически активной формы соответствующего витамина. Превращение в эту форму может происходить различными путями: посредством сопряжения с аденозинтрифосфатом (АТР), фосфорилирования, окисления и т. д.

Термин витамин применяется к органическому веществу, необходимому, помимо углеводов, жиров и белков, для нормального здоровья и роста организма. Витамины не могут синтезироваться хозяином и должны поэтому поступать исключительно с пищей, в которой они обычно содержатся в малых концентрациях. Вследствие отсутствия витаминов в пище или в результате их неправильного усвоения возникает особая недостаточность, в конечном счете приводящая к смерти организма. На практике термин «витамин» ограничивается только потребностями млекопитающих, а иногда одного человека. Важно подчеркнуть этот пункт, поскольку потребности в витаминах варьируют у разных видов. Многие бактерии и другие паразитирующие организмы неспособны к поглощению витаминов из внешней среды и синтезируют все необходимые для роста коферменты из простых предшественников. Имеется, таким образом, фундаментальное различие между путями, по которым млекопитающие, с одной стороны, и паразитирующие организмы, с другой, получают необходимые для продолжения роста и нормального метаболического функционирования коферменты. Использование этого различия лежит в основе одного из подходов в химиотерапии. Этот подход интенсивно разрабатывался в последние годы и привел к созданию ряда чрезвычайно полезных антибактериальных лекарственных веществ [2]. В настоящее время можно детально объяснить механизм действия многих коферментов; были предприняты попытки [3] создания соединений, специфически влияющих на биологическую функцию кофермента. Представляется весьма вероятным, что такого рода исследования будут иметь далеко идущие последствия в лечении разного рода заболеваний и нарушений метаболизма.

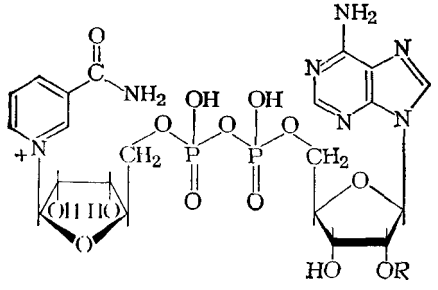
### 24.3.2. КОФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО В ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

Биологическое окисление [4] катализируется ферментами, каждый из которых функционирует в соединении с коферментом, действующим в качестве переносчика электронов. Имеется много ферментов окисления, но относительно немного коферментов. Именно последние определяют, будет ли процесс переноса электронов включать одиночные электроны, электронные пары и т. д. С переносом электронов связан процесс переноса водорода. Один из обсуждаемых ниже вопросов состоит в том, является ли описание окислительно-восстановительных реакций наилучшим в терминах переноса электронов или протонов, или, напротив, переноса частиц типа атома водорода или гидрид-иона.

#### 24.3.2.1. Пиридиннуклеотидные коферменты

Для протекания многих биологических окислительно-восстановительных реакций в качестве кофермента необходим никотинамидадениндинуклеотид NAD$^+$ (**1**) или его 2′-фосфат NADP$^+$ (**2**). В ранней литературе эти соединения часто называли соответст-

венно дифосфопиридиннуклеотидом (DPN) и трифосфопиридиннуклеотидом (TPN). Эти названия явно неправильны, поскольку DPN не является нуклеотидом «дифосфопиридина». В связи с этим эти названия более не рекомендуются к употреблению, равно как и еще более ранние названия «коэнзим I» и «коэнзим II».



(1) R=H

(2) R=P(=O)(OH)—OH

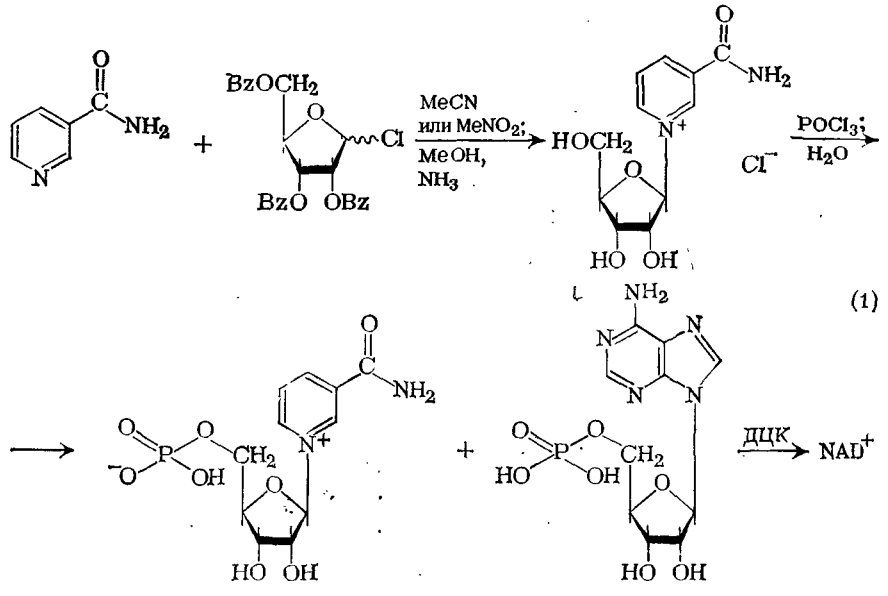
Эти соединения интересны и с исторической точки зрения, поскольку NAD+ был первым из открытых коферментов. Харден и Янг в 1906 г. продемонстрировали участие термостабильного кофермента в брожении, но NAD+ не был выделен в индивидуальном состоянии до 1936 г. Тем временем в качестве кофермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы был выделен NADP+ и было показано, что его свойства близки к свойствам NAD+. Эти ранние работы подробно обсуждаются в обзоре Синджера и Кирни [5].

Структура NAD+ установлена в результате комбинации методов деградации и синтеза. В результате гидролиза минеральными кислотами были получены аденин, никотинамид и 2 моль D-рибозо-5-фосфата. Щелочной гидролиз давал аденозиндифосфат, структура которого хорошо известна, а ферментативный гидролиз нуклеотидпирофосфатазой приводил к количественному образованию аденозин-5′-фосфата и 5′-фосфата *N*-рибозилникотинамида. Шленком, суммировавшим эти данные [6], была определена «грубая» структура NAD+ как $P^1$, $P^2$-диэфира пирофосфорной кислоты. Позднее [7], в результате изучения спектров $^1$H-ЯМР была установлена β-конфигурация гликозидной связи в рибозилникотинамидной части NAD+. Конфигурация другого гликозидного центра следовала из выделения производных аденозина, представляющих собой, как известно, β-рибозиды.

Синтез NAD+ был описан Тоддом и сотр. [8] и суммирован на схеме (1). В этом синтезе получался преимущественно β-аномер. Окончательный продукт был очищен в результате селективного ферментативного восстановления β-аномера до дигидроформы, деструкции α-аномера разбавленной щелочью и ферментативного реокисления очищенного дигидро-β-аномера.

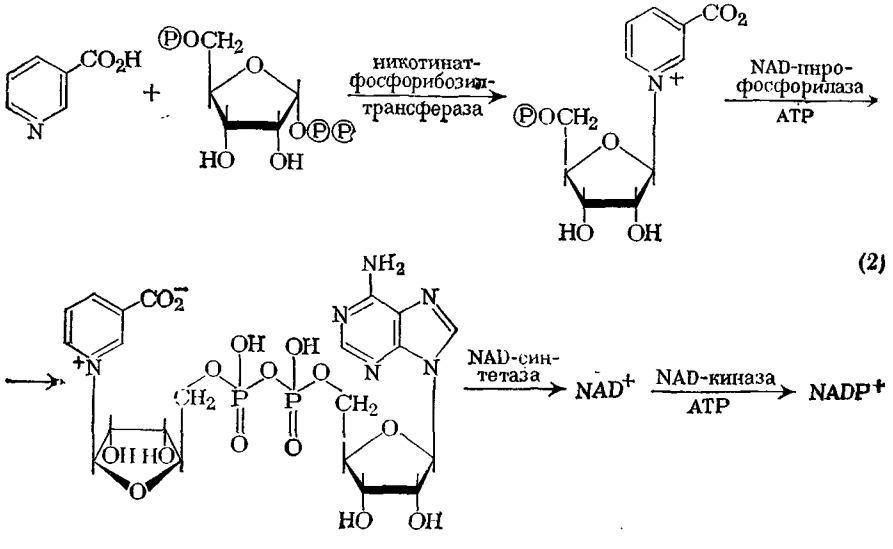
Структура NADP+ была установлена в результате применения аналогичных методов. Положение третьего фосфатного остатка было однозначно установлено после выделения аденозин-2′,5′-дифосфата [9] в результате ферментативного гидролиза NADP+ нуклеотидпирофосфатазой.






(1)

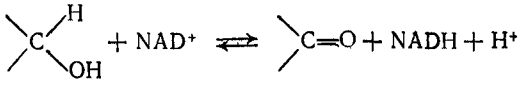
Исследования биосинтеза коферментов [10] привели к выяснению взаимосвязи между NAD+ и NADP+, с одной стороны, и витаминами — никотиновой кислотой и никотинамидом. Недостаток этих витаминов у человека приводит к заболеванию пищеварительного тракта — пеллагре. Последняя, вероятно, возникает вследствие отсутствия NAD+ и/или NADP+, образующихся ферментативно в клетках млекопитающих из никотиновой кислоты. Может показаться удивительным тот факт, что именно никотиновая




(2)

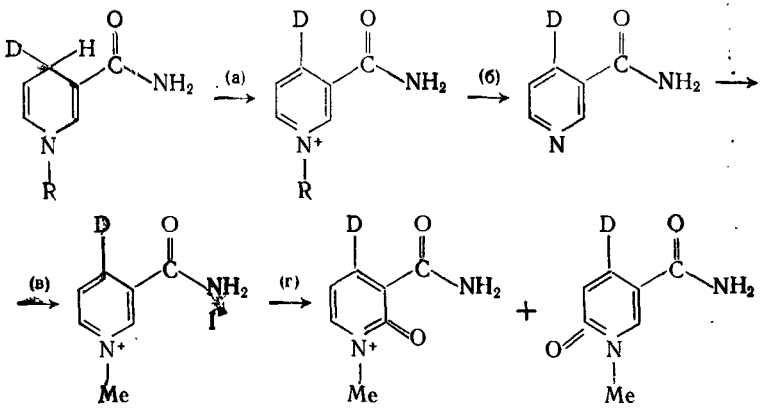
кислота, а не соответствующий амид, является наиболее предпочтительным предшественником для биосинтетической последовательности. Однако в печени существует фермент, осуществляющий необходимый гидролиз. Принятая в настоящее время биосинтетическая последовательность реакций представлена на схеме (2).

Оба кофермента принимают участие во многих биологических окислительно-восстановительных реакциях, и хотя ферменты часто специфичны только в отношении NAD+ или NADP+, механизм восстановления для обоих коферментов практически одинаков. В настоящее время твердо установлено, что в процессе ферментативной реакции NAD+ и NADP+ восстанавливаются по положению 4, образуя 1,4-дигидропиридиновые производные, NADH и NADPH. Таким образом, в процессе обратимой дегидрогенизации спиртов в карбонильные соединения {схема (3)} с субстрата на NAD+ непосредственно и, как мы увидим ниже, стереоспецифично, переносится атом водорода плюс пара электронов. В обратной реакции имеет место противоположный процесс.



(3)

Структура восстановленного пиридиннуклеотида установлена Коловиком и сотр. [11] в результате изящного эксперимента, включающего: а) химическое восстановление NAD+ дитионитом натрия в $D_2O$ с образованием NADH, меченного дейтерием и активного в ферментативной реакции, и б) окисление этого меченого NADH дрожжевой алкогольдегидрогеназой и ацетальдегидом, что привело к образованию дейтерийсодержащего окисленного кофермента NAD+. Положение дейтерия установлено в результате проведения последовательности реакций деградации, представленной на схеме (4).



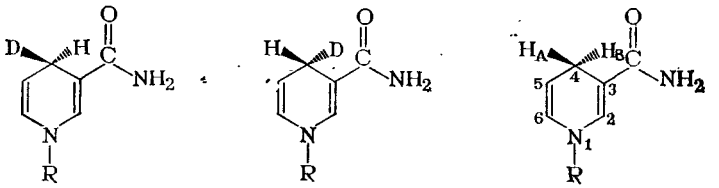
(4)

(а) Дрожжевая алкогольдегидрогеназа, MeCHO;
(б) NAD-аза; (в) MeI; (г) $K_3Fe(CN)_6$, KOH



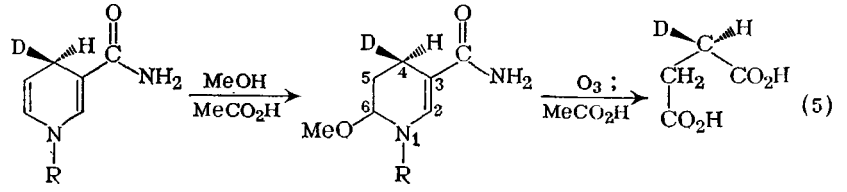
Окончательное окисление привело к образованию смеси приблизительно равных количеств 2- и 6-пиридонов *без потери дейтерия*. Восстановление дитионитом, таким образом, не приводило к образованию 1,2- или 1,6-дигидропиридиновых производных и, следовательно, ферментативно активный NADH должен быть производным 1,4-дигидропиридина. Другие наблюдения подтвердили этот вывод. Прямое доказательство присутствия дейтерия в положении 4 после восстановления NAD+ дитионитом в $D_2O$ было получено в результате исследования с применением $^1$H-ЯМР [12].

Ферментативное восстановление специфично не только в отношении положения группы, но и стереоспецифично. В зависимости от используемого фермента образуется тот или иной из изомеров (3) или (4). Химическое восстановление, естественно, приводит к смеси обоих изомеров.



(3) (4) (5)

Ферменты можно подразделить на классы А (например, дрожжевая алкогольдегидрогеназа) и В (например, β-гидроксистероиддегидрогеназа) в соответствии с их способностью переносить дейтерий на субстрат соответственно с (3) и (4) [13]. Изящные работы Корнфорта и сотр. [14] позволили установить, какой из двух атомов водорода у С-4 в NADH вовлечен в ферментативную реакцию одного из двух классов. Эти исследования включали окислительную деградацию {схема (5)}, примененную к двум изомерам 4-дейтерио-NADH, приготовленным в ферментативных реакциях класса А и В соответственно.



(5)

Этим путем были получены два изомера 2-монодейтериоянтарной кислоты, каждый из соответствующего изомера 4-дейтерио-NADH. Полученные образцы были сравнены с 2-монодейтериоянтарной кислотой известной абсолютной конфигурации (методом дисперсии оптического вращения). Спектр ДОВ образца, полученного с помощью фермента класса А, совпадал со спектром 2-*R*-монодейтериоянтарной кислоты. Другой образец имел спектр противоположного знака. Результаты этого эксперимента

можно суммировать следующим образом: когда фермент класса А переносит водород с субстрата на пиридиннуклеотид с образованием (5), этот атом водорода ($H_A$) присоединяется к той стороне кольца никотинамида, с которой нумерация атомов цикла с 1 по 6 идет против часовой стрелки.

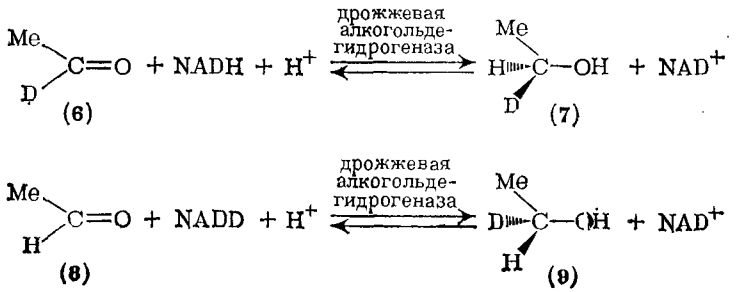
Классические работы Веннесланда, Вестхеймера и их сотр. показали, что водород переносится *непосредственно* с субстрата на кофермент, без обмена с протонами растворителя. Эти исследования подтвердили также стереоспецифичность переноса водорода (см. обзор Коловика и др. [15]). С дрожжевой алкогольдегидрогеназой было проведено два типа экспериментов {схемы (6) и (7)}.

$$MeCH_2OH + NAD^+ \overset{D_2O}{\rightleftharpoons} MeCHO + NADH + H^+ \quad (6)$$

$$MeCD_2OH + NAD^+ \overset{D_2O}{\rightleftharpoons} MeCDO + NADD + H^+ \quad (7)$$

NADH, образующийся в реакции (6), не содержит дейтерия, в то время как в результате реакции (7) в восстановленный NAD+ включается 1 моль дейтерия, что может служить доказательством непосредственного переноса атома водорода с α-углеродного атома этанола в кольцо никотинамида без обмена с протонами растворителя. Исследование обратной реакции свидетельствует в пользу того, что алкогольдегидрогеназа удаляет водород только с той стороны кольца никотинамида, к которой он был первоначально присоединен. Так, ферментативное повторное окисление ацетальдегидом ферментативно полученного NADD {схема (7)} приводит к образованию NAD+, не содержащего дейтерия.

Дрожжевая алкогольдегидрогеназа стереоспецифична не только в отношении NADH, но и субстратов — этанола и ацетальдегида [16], что продемонстрировано на схеме (8). В результате восстановления 1-дейтериоацетальдегида (6) NADH в присутствии фермента образуется 1*S*-дейтериоэтанол (7), в то время как немеченый ацетальдегид (8) в реакции с ферментативно синтезированным 4-дейтерио-NADH переходит в энантиомерный 1-R-дейтериоэтанол (9). Обратные реакции давали меченый и немеченый ацетальдегид соответственно.




(8)



Абсолютная стереоселективность восстановления наблюдалась только при использовании в качестве субстрата ацетальдегида, однако и для других карбонильных соединений и (в обратной реакции) спиртов эта селективность была высокой [15].

Вопрос о механизме переноса водорода с субстрата на кофермент пока не выяснен. По молчаливому соглашению считают [17], что реакция включает перенос гидрид-иона с субстрата на кофермент {схема (9)}. Среди других возможных механизмов — одновременный перенос двух электронов с последующим переносом протона {схема (10)}, последовательный перенос двух электронов и протона {схема (11)} и перенос по отдельности одного электрона и одного атома водорода {схема (12)}.

$$NAD^+ \xrightarrow{(H^-)} NADH \quad (9)$$

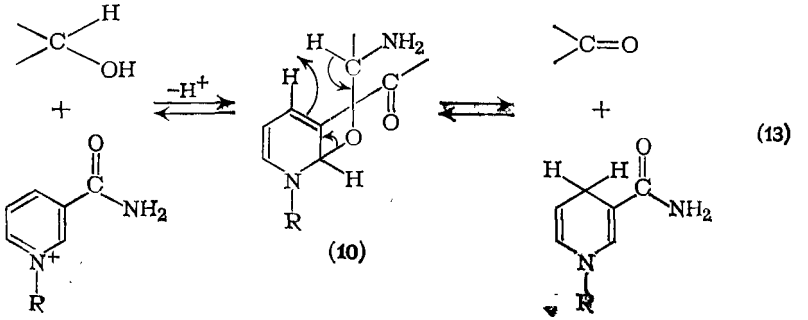
$$NAD^+ \xrightarrow{2e^-} NAD^- \xrightarrow{H^+} NADH \quad (10)$$

$$NAD^+ \xrightarrow{e^-} NAD\cdot \xrightarrow{e^-} NAD^- \xrightarrow{H^+} NADH \quad (11)$$

$$NAD^+ \xrightarrow{e^-} NAD\cdot \xrightarrow{H\cdot} NADH \quad (12)$$

В процессе действия алкогольдегидрогеназы не было зарегистрировано образования свободных радикалов, что, по-видимому, позволяет отбросить механизмы (11) и (12) [18]. Изучение модельных соединений не было слишком плодотворным, возможно в силу того, что были использованы высокореакционноспособные анормальные субстраты или нетипичные модели коферментов. Эти исследования [19], однако, привели к утверждениям, что механизм включает гидридный перенос {схема (9)} или последовательный перенос одного электрона {схемы (11), (12)}.

Гамилтон [20] убедительно показал, что между NAD+ и субстратом образуется ковалентное производное, что влияет на перенос двух электронов, и что водород переносится в виде протона {вариант схемы (10)}. Вариант Гамилтона представлен на схеме (13).

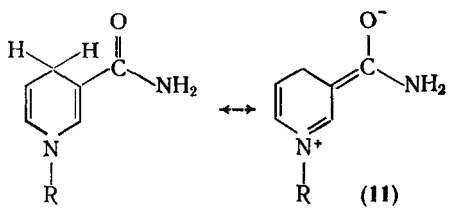



(13)

Ключевой стадией этой схемы является превращение (10) в NADH и карбонильное соединение *через* шестичленное пере-

ходное состояние, электроны в котором могут двигаться в соответствии со схемой, т. е. формально имеет место перенос протона. В обратном направлении водород переносится в виде гидрид-иона. Прямых доказательств в поддержку этой гипотезы не получено, однако, по мнению автора, она остается привлекательной.

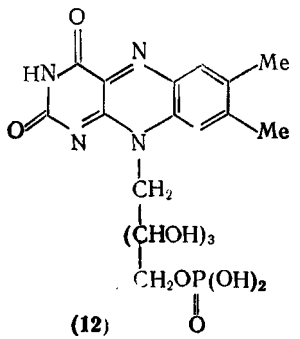
УФ-Спектры $NAD^+$, NADH и их аналогов весьма характерны и представляют удобный метод для регистрации ферментативных реакций с участием этих коферментов [21]. Метод настолько прост, что с его помощью часто можно исследовать ферменты, не использующие $NAD^+$ и NADH, если такие ферменты входят в сопряженную ферментную систему с другим ферментом, использующим коферменты. Спектр $NAD^+$ в отличие от пиридина не меняется при изменении pH от 2 до 10, $\lambda_{макс}$ 259 нм ($\varepsilon$ $17{,}3\cdot10^3$). Ферментативное (или химическое) восстановление до NADH приводит к появлению нового максимума при 340 нм ($\varepsilon$ $6{,}22\cdot10^3$), и оценку активности фермента проводят обычно при этой длине волны. Длинноволновое поглощение NADH обусловлено вкладом диполярной структуры (11)



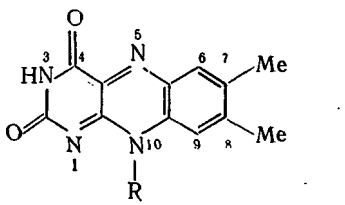
(11)

### 24.3.2.2. Флавиновые коферменты

Имеются два флавиновых кофермента, называемых обычно флавинмононуклеотидом FMN (12) и флавинадениндинуклеотидом FAD (13). Эта номенклатура неверна, поскольку FMN — не нуклеотид, а FAD — не динуклеотид. Более подходящими названиями были бы флавинмонофосфат и флавинадениндифосфат, и хотелось бы надеяться, что принятые сокращения FMN и FAD вскоре будут изменены. В этих названиях термин «флавин»



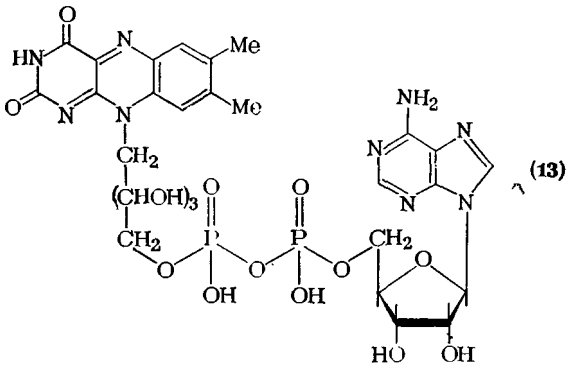
(12)



(14) R = H
(15) R = D-рибитил



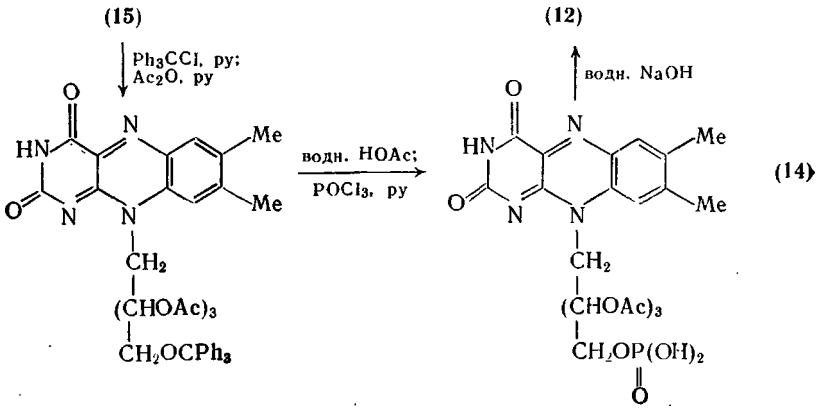
представляет собой синоним термина «рибофлавин», но даже здесь имеется неточность, поскольку название флавин обычно употребляется для группы соединений (14), в состав которых входит и рибофлавин.



(13)

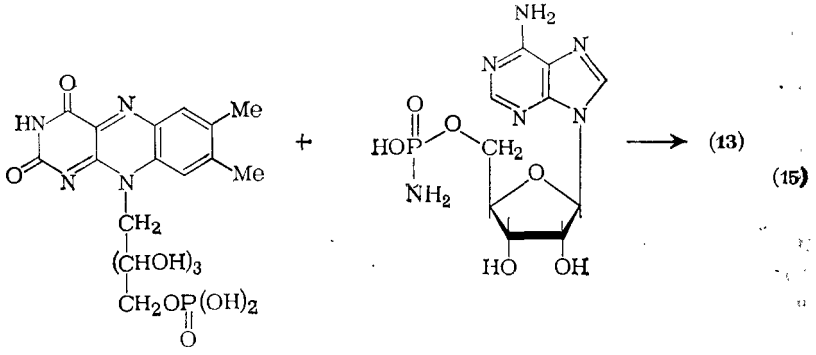
Следует также обратить внимание на приведенную нумерацию флавиновой циклической системы, поскольку многие биохимики до сих пор используют старую, вышедшую из употребления немецкую систему нумерации.

Информация о структурах FMN и FAD была получена в результате изучения продуктов химического и ферментативного гидролиза, при этом основным продуктом был рибофлавин (15). Химия рибофлавина и его производных, а также синтез этих соединений обсуждается в обзоре Вагнера-Яурегга [22]. Структуры коферментов были подтверждены встречным синтезом. На схеме (14) суммированы результаты синтеза FMN, разработанного Куном и сотр. [23], хотя имеется и более удобный метод получения небольших количеств рибофлавин-5′-фосфата посредством прямого фосфорилирования рибофлавина (с использованием ряда реагентов), в результате чего получается 4′,5′-циклофосфат, переходящий в FMN после кислотного гидролиза [22]



(14)

Аналогично, ранний метод синтеза FAD, описанный Тоддом и сотр. [24] и включающий конденсацию защищенного аденозинбензилхлорфосфата с таллиевой солью рибофлавин-5′-фосфата с последующим удалением защитных групп, был модифицирован и улучшен в работах нескольких групп исследователей. Наиболее известным является метод Моффата и Кораны [25], заключающийся в конденсации рибофлавин-5′-фосфата с аденозин-5′-амидофосфатом {схема (15)}. Этими авторами описана также удобная методика хроматографического разделения флавиновых коферментов на анионообменной целлюлозе.



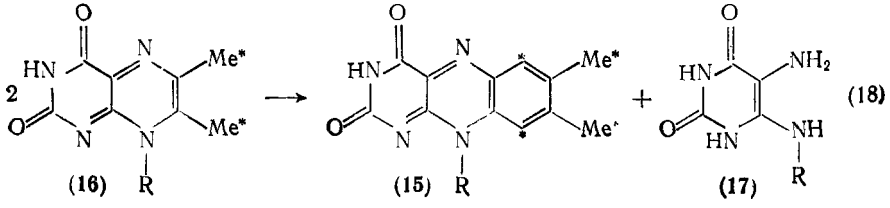

(15)

Связь между FMN, FAD и витамином рибофлавином совершенно очевидна. В животных клетках имеются ферменты, осуществляющие необходимые взаимопревращения [26]. Рибофлавинкиназа катализирует превращение рибофлавина в FMN {схема (16)}, а FAD-пирофосфорилаза (FMN-аденилтрансфераза) — последующие превращения в FAD {схема (17)}.

$$\text{Рибофлавин} + \text{ATP} \longrightarrow \text{FMN} + \text{ADP} \qquad (16)$$

$$\text{FMN} + \text{ATP} \longrightarrow \text{FAD} + \text{пирофосфат} \qquad (17)$$

Биосинтез самого рибофлавина, характерный для микроорганизмов, явился объектом интенсивного изучения. В результате сочетания биохимических [27] и химических [28] исследований установлен совершенно необычный метаболический путь. Непосредственный предшественник рибофлавина, производное птеридина, 6,7-диметил-8-*D*-рибитиллюмазин (**16**), образуется из пуриновых предшественников. В присутствии фермента рибофлавинсинтетазы две молекулы птеридинового предшественника об-

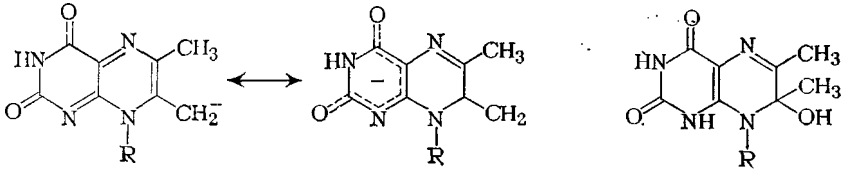



(18)



разуют одну молекулу рибофлавина и одну молекулу 5-амино-6-*D*-рибитиламиноурацила (**17**). Стехиометрия реакции была установлена в результате выделения обоих продуктов, а также экспериментов с $^{14}C$-меткой по схеме (18) {под действием рибофлавинсинтетазы или под действием воды, 100 °C; R = *D*-рибитил}.

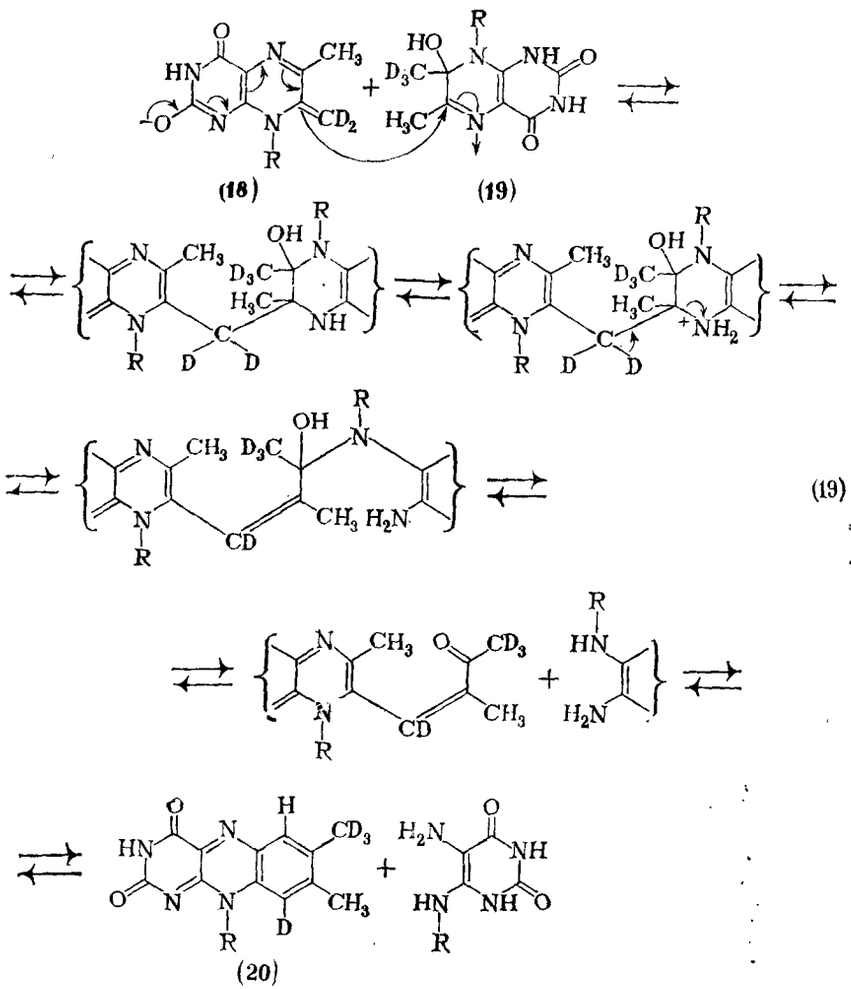
В этой реакции от молекулы птеридинового предшественника (донор) на вторую молекулу птеридина (акцептор) переносится четырехуглеродное звено, в результате чего образуется диметилбензольное кольцо рибофлавина. Механизм процесса переноса выяснен главным образом в результате химических исследований [28]: а) люмазин (**16**) может переходить в рибофлавин {схема (18)} и в отсутствие фермента, при нагревании в воде; б) протоны 7-метильной группы люмазина (**16**) легко обмениваются с растворителем ($D_2O$) при pH 7,0, что объясняется промежуточным образованием сильно делокализованных анионных частиц (**18**); в) исследования УФ-спектров водных растворов люмазина (**16**) показали наличие 7,8-дигидропроизводного (**19**), образующегося в результате нуклеофильной атаки по положению 7.



(18) (19)

В результате повторения *химического* эксперимента по схеме (**18**) с использованием $D_2O$ в качестве растворителя был получен меченный дейтерием рибофлавин (**20**), причем методом ЯМР было выяснено положение дейтерия. Четырехуглеродное звено, безусловно, переносится каким-то весьма специфическим образом. Для этой химической реакции был предложен механизм, приведенный на схеме (19). Ферментативная реакция, как было показано [27], проходит по весьма близкому механизму. Кинетический анализ показывает, что сродство к люмазину различно для донорных и акцепторных центров фермента.

Флавиновые коферменты принимают участие в большом числе окислительно-восстановительных реакций. Среди них: а) дегидрогеназы, такие как NADH-дегидрогеназа, являющаяся частью дыхательной цепи; б) флавиноксидазы, например оксидаза D-аминокислот; в) флавиноксигеназы, часто участвующие в реакциях гидроксилирования. Особенно важная роль принадлежит флавиновым коферментам в дыхательной цепи. Они, по-видимому, акцептируют электроны с молекул типа NADH, которые считаются непременными участниками двухэлектронных переносов, и передают их на молекулы типа убихинонов и цитохромов, биологическая активность которых по природе своей радикальна.



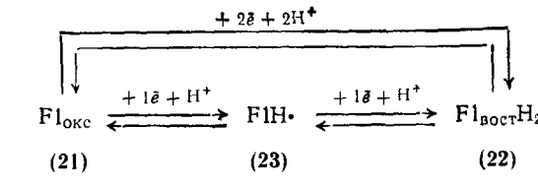
(18) (19)

(19)

(20)

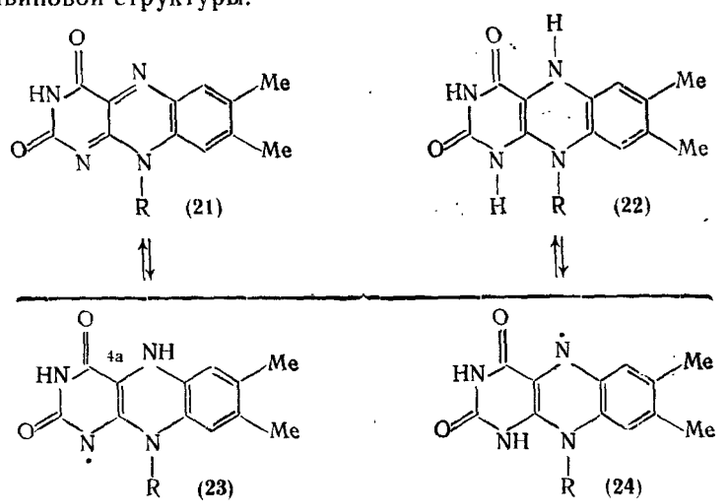
Исследования [29, 30] химии модельных систем позволили во многом объяснить механизм действия этих коферментов. Окислительно-восстановительные свойства флавинов можно суммировать схемой (20). Флавохинон $Fl_{окс}$ (21) принимает пару электронов субстрата вместе с двумя протонами, в результате чего образуется флавогидрохинон $Fl_{вост}H_2$ (22). Перенос одиночного электрона совместно с протоном с флавогидрохинона на молекулу акцептора приводит к образованию флавинового радикала FlH· (23). Только этот последний перенос электрона имеет биологическое значение, в то время как перенос между (23) и (21) биологического значения не имеет





(21) (23) (22) (20)

Хорошо установлено, что флавогидрохинон (22) представляет собой 1,5-дигидрофлавин. Обычно считают, что этот изомер является единственным биологически значимым дигидрофлавином. Последнее утверждение, возможно, неверно, поскольку ряд новых данных (см. ниже) о природе ковалентного интермедиата, по-видимому, образующегося в результате взаимодействия субстрата и флавина, свидетельствуют в пользу наличия 4a,5-дигидрофлавиновой структуры.



(21) (22)

(21)

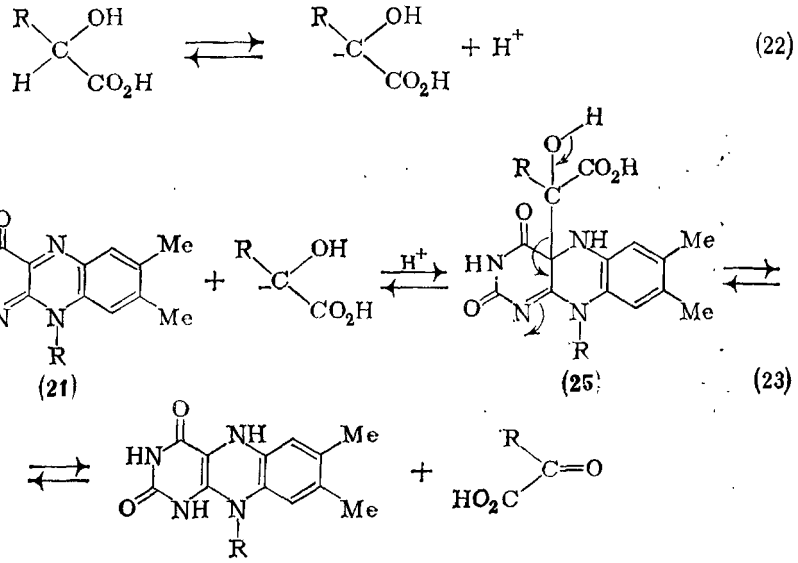
(23) (24)

Возможны две структуры флавинового радикала FlH· — (23) и (24), интермедиата между флавохиноном (21) и флавогидрохиноном (22), в зависимости от того, находится ли атом водорода при N-5 или N-1. Положение неспаренного электрона, указанное на формулах этих соединений, выбрано произвольно. Так, в случае (23) центр максимальной спиновой плотности, возможно, находится в положении 4a {схема (21)}.

Изучение алкилированных производных показало, что флавиновые радикалы типа (23) имеют синюю окраску ($\lambda_{макс} \approx$ $\approx$ 580 нм) и относительно стабильны, в то время как радикалы типа (24) — красного цвета ($\lambda_{макс} \sim$ 470 нм) и нестабильны. Предполагается, что одно- и двухэлектронные переносы могут «включаться и выключаться» в флавопротеинах посредством образования строго направленных водородных связей между ферментом и флавиновым коферментом. Если такая связь включает N-5, происходит стабилизация радикала и подавление двухэлектронного

переноса, в то время как связь с участием N-1 дестабилизует радикал и подавляет одноэлектронный перенос. В поддержку этой гипотезы говорят данные Мэсси и др. [31], показывающие, что все флавопротеины (дегидрогеназы), участвующие в одноэлектронных переносах и являющиеся донорами, акцепторами электронов или теми и другими попеременно, дают биологически активные синие радикалы. В то же время флавопротеины (оксидазы и оксигеназы), связанные исключительно с двухэлектронными переносами, дают красные радикалы, которые несущественны для биологической активности.

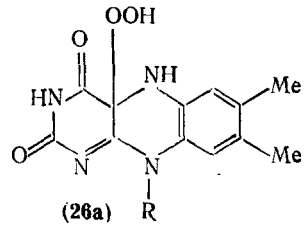
Объектом интенсивного изучения была природа взаимодействия между флавиновым коферментом и субстратом [20, 29, 30]. В настоящее время преобладает мнение об образовании ковалентного интермедиата. Вопрос о точной структуре такого интермедиата все еще остается открытым, однако наиболее вероятной является атака образующимся из субстрата карбанионом [32] флавохинона (**21**), в результате которой возникает 4a,5-дигидрофлавиновое производное (**25**). Перенос пары электронов достигается, таким образом, посредством образования ковалентного интермедиата, который затем распадается на флавогидрохинон (**22**) и окисленный субстрат. На схемах (22), (23) представлена типичная реакция дегидрогенизации.

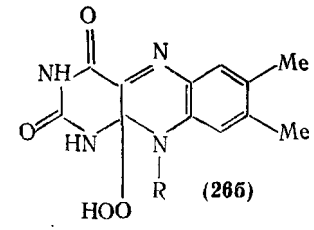



Вопрос о механизме переноса электронов с флавогидрохинона (**22**) на акцептор не вполне ясен. Предполагается [29], что при реализации одноэлектронного переноса на акцептор типа Fe(III) в цитохроме должна устанавливаться планарная конформация флавогидрохинона, обычно находящегося в конформации «бабочки». Такая планарная структура формально «антиароматична» и, следовательно, является потенциальным одноэлектронным донором.

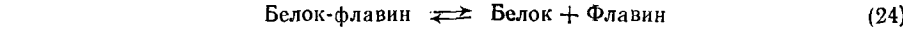


Взаимодействие флавогидрохинона (**22**) с молекулярным кислородом, обязательное для флавиноксидаз и флавиноксигеназ, должно включать образование какого-либо комплекса дигидрофлавин-кислород. Были предложены две гидропероксидные структуры (**26**) [31]. Имеются данные [33], что первая из них связана с проявлением флавин-зависимой бактериальной биолюминесценции. В этом случае в отсутствие субстрата флавогидрохинон-ферментный комплекс реагирует с кислородом, образуя соединение с $\lambda_{макс} \approx 372$ нм. Именно такой максимум ожидается для структуры 4a,5-дигидрофлавина. Более прямых доказательств в поддержку этой гипотезы нет. Вероятно, что обе структуры и, возможно, ряд других [29] принимают участие в различных реакциях. Существует также большое число теорий [20, 29, 30], объясняющих, как тот или иной из гидропероксидных аддуктов может функционировать в качестве донора эквивалента «оксена», требуемого для представления ароматического гидроксилирования, катализируемого флавиновыми оксигеназами (см. гл. 30.3).

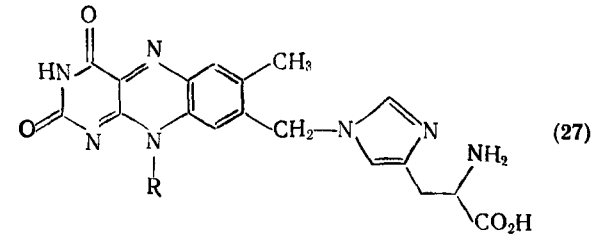



В большинстве случаев имеет место очень прочное связывание флавинового кофермента с апоферментом, равновесная константа диссоциации {схема (24)} составляет около $10^{-8}$ — $10^{-9}$ моль·л$^{-1}$, однако кофермент может быть удален при денатурации белка обычными методами.



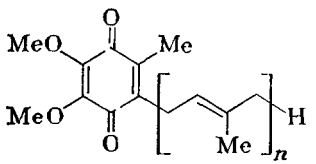

Известны также случаи, когда флавиновый кофермент соединен с белком ковалентной связью {сравни (27)}. Первым из таких коферментов был изучен флавин сукцинатдегидрогеназы.



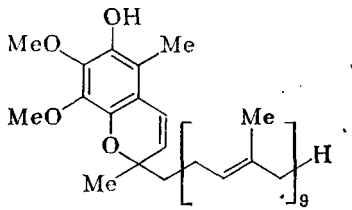
С помощью комбинации химических и ферментативных гидролизов [34] и химического синтеза [35] установлено наличие связи между 8а-метильной группой FAD и N-3 гистидинового остатка фермента (27). Выделены и другие флавиновые коферменты, несущие связи 8а-метильной группы с серусодержащими аминокислотными остатками. См. [29].

### 24.3.2.3. Убихиноны

Убихиноны, или коферменты Q — группа производных бензохинона общей формулы (28). В природных соединениях число изопреноидных звеньев варьируется от 6 до 10. Так, в убихинонах человека и большей части млекопитающих содержится 10 таких звеньев, в то время как у большинства микроорганизмов это число колеблется между 6 и 8. В ранних работах для убихинонов использовалась запутанная номенклатура и несколько систем нумерации. В настоящее время название «убихинон» предпочитают «коферменту Q», а число изопреноидных звеньев обозначают прибавлением цифр 6—10 в суффиксе. Так, убихинон-10 характерен для человека. Из природных источников выделены два других продукта, родственных убихинону-10. Один из них, убихроменол (29), легко образующийся в результате циклизации убихинона-10, возможно, является артефактом. Другой представляет собой частично восстановленное производное убихинона-10, в котором двойная связь концевого изопреноидного звена насыщена.

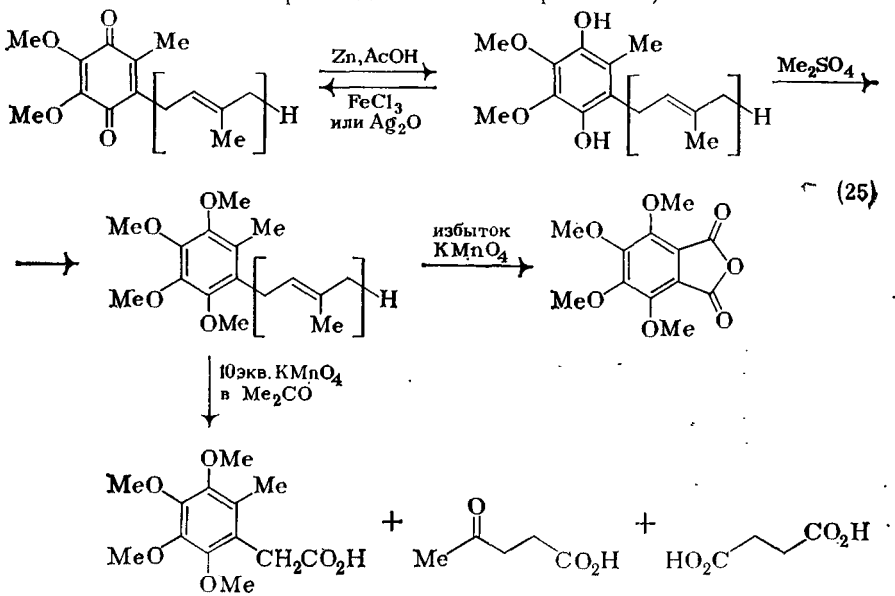


(28) $n$=6–10



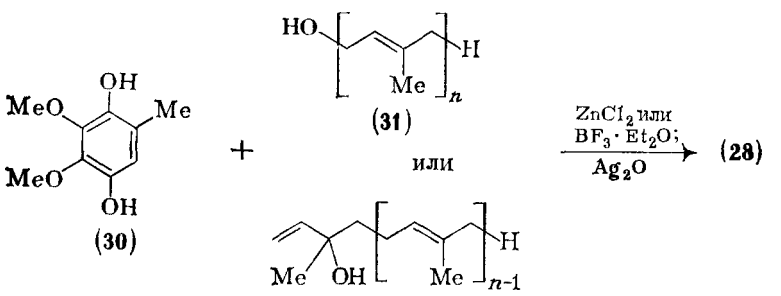
(29)

Структура убихинона-10 была установлена в результате сочетания деградационных, спектроскопических и синтетических методов. Эти данные суммированы в обзоре Хатефи [36]. Наиболее важными шагами явились элементный анализ и идентификация функциональных групп, в результате чего была установлена молекулярная формула $C_{59}H_{90}O_4$ и наличие двух метоксильных групп. Присутствие последних было подтверждено данными $^1$H-ЯМР, которые также показали наличие ароматической метильной группы и полиизопреноидной цепочки, а также отсутствие ароматических протонов. ИК-спектры [37] подтвердили, что полиизопреноидная цепочка находится полностью в *транс*-конфигурации. Наличие циклической бензохиноновой системы следовало из ее обратимого восстановления в мягких условиях до хинола и результирующего изменения в УФ-максимуме поглощения с 275 до 290 нм. Представленная на схеме (25) окислительная деградация завершила установление структуры (число выделенных на схеме изопреноидных звеньев равно 10).



(25)

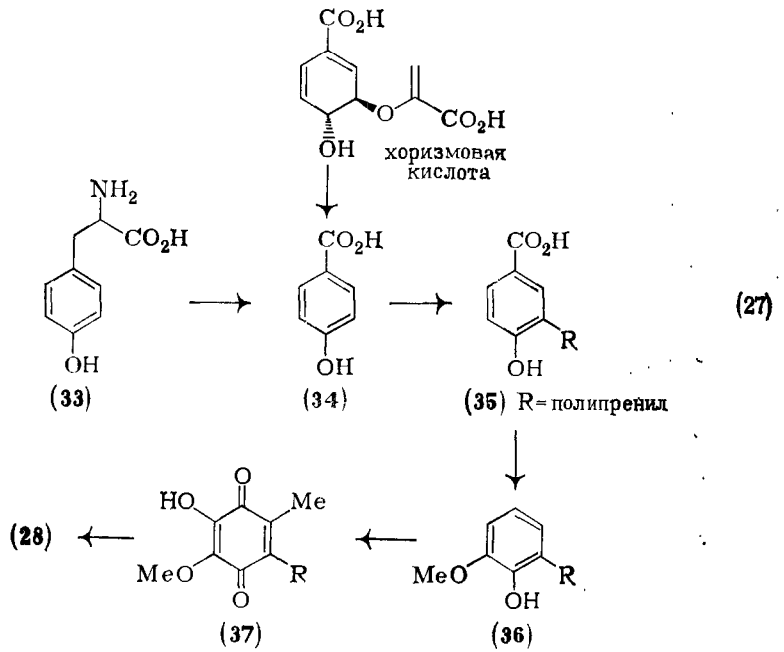
Синтез убихинона-10 и его аналогов включает конденсацию 2,3-диметокси-5-метилгидрохинона (30) с полностью *транс*-аллильным спиртом (31) или альтернативно с полностью *транс*-третичным спиртом (32) [38]. Продуктом реакции конденсации является производное гидрохинона, легко окисляемое до соответствующего хинона {схема (26)}.



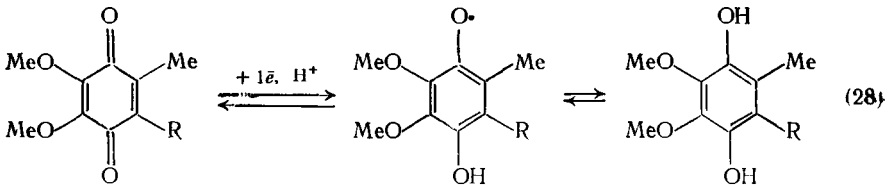
(26)

Выяснение деталей процесса биосинтеза убихинона оказалось более сложной задачей. Убихиноны в отличие от структурно родственных им соединений группы витамина К могут синтезироваться в тканях животных и поэтому не считаются витаминами. Полиизопреноидная цепочка, как показано [39], образуется в

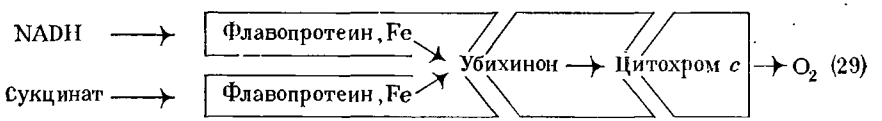
соответствии с обычными биосинтетическими путями синтеза терпенов, из мевалоната *через* аллильные пирофосфорные эфиры. Ароматическое кольцо образуется, по-видимому, из хоризмовой кислоты и незаменимых аминокислот, фенилаланина и тирозина (**33**). Принятый биосинтетический путь [40] подразумевает образование *n*-гидроксибензойной кислоты (**34**), которая в результате алкилирования соответствующим аллилпирофосфатом превращается в 4-гидрокси-3-полипренилбензойную кислоту (**35**). Последовательность реакций декарбоксилирования, гидроксилирования и метилирования дает 6-метокси-2-полипренилфенол (**36**), который после окисления и метилирования превращается в 5-деметоксиубихинон (**37**) и далее в убихинон. Наиболее значительная работа была выполнена с использованием гомогенатов или частей печени крыс, и конечным продуктом был убихинон-9 {схема (27)}. Дальнейшее рассмотрение биосинтетического пути дано в гл. 30.3.




Биологическая функция убихинонов в окислительно-восстановительных реакциях зависит от обратимого восстановления соответствующего гидрохинона. В случае, если восстанавливающий агент является одноэлектронным донором, реакция представляет собой двухстадийный процесс, включающий образование промежуточного радикала {схема (28)}. Именно таково участие убихинонов в процессе переноса электронов в дыхательной цепи. Убихиноны, согласно общепринятому мнению, являются промежуточным звеном между флавопротеинами, осуществляющими связывание двух и высвобождение одного электрона, и цитохромами, для которых характерно поглощение одного электрона, соответствующее переходу Fe(III)→Fe(II).

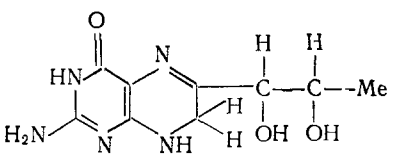



В поддержку такой роли убихинона в дыхательном переносе электронов говорит тот факт, что лиофилизованные митохондрии после экстракции пентаном и ресуспендирования в буфере не способны осуществлять транспорт электронов. Эта способность, однако, восстанавливается при добавлении убихинона-10 или его низшего гомолога [41]. Более того, разработаны методы фракционирования митохондрий, позволяющие разделить четыре типа комплексов, в совокупности способных осуществлять полный транспорт электронов [42]. Комплекс I восстанавливал убихиноны за счет NADH и содержал флавопротеин, негемное железо и убихинон. Комплекс II восстанавливал убихинон за счет сукцината и также содержал флавопротеин, негемное железо и убихинон. Комплекс III осуществлял восстановление цитохрома за счет восстановленного убихинона, а комплекс IV — кислорода за счет восстановленного цитохрома *c* {схема (29)}.




Согласно более поздним данным [43], эта картина может быть более сложной. Так, обнаружено, что при определенных условиях сукцинатдегидрогеназа может сочетаться с цитохромами в *отсутствие* убихинона. Это указывает на то, что убихинон, по крайней мере в данном случае, играет иную роль, чем в прямой схеме транспорта электронов.

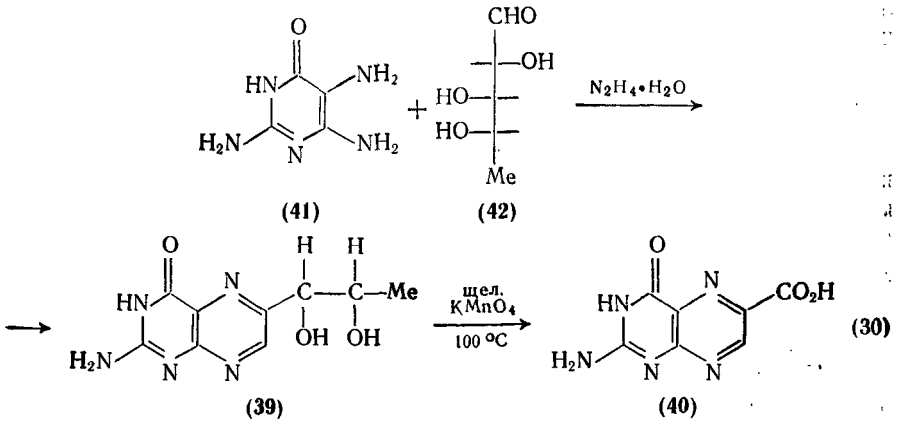
### 24.3.2.4. Дигидробиоптерин




Дигидробиоптерин (**38**) является коферментом ряда оксигеназ со смешанными функциями, из которых особого внимания замечу-

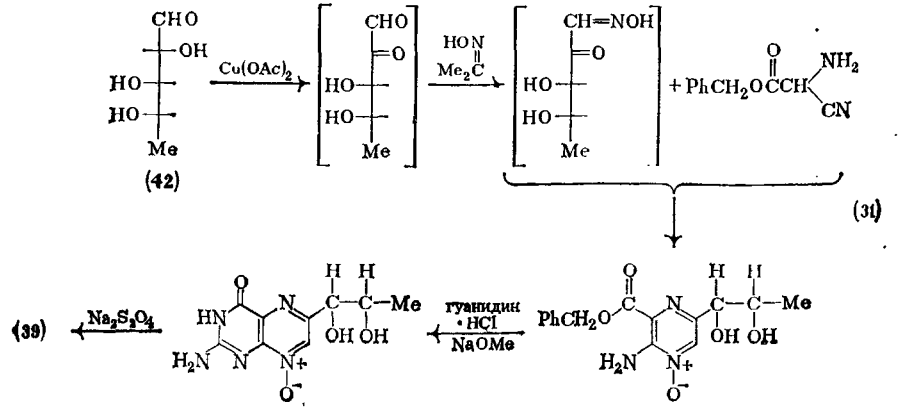
живает *L*-фенилаланилгидроксилаза, отсутствие которой приводит к одной из форм умственной отсталости — фенилкетонурии [44].

Кофермент представляет собой 7,8-дигидропроизводное биоптерина (39), птеридина, впервые выделенного из мочи человека [45], а также из *Drosophila melanogaster* [46]. Структура биоптерина установлена посредством комбинации спектральных исследований (УФ-спектр биоптерина очень близок спектрам 2-аминоптеридинонов-4) и окисления горячим щелочным перманганатом, в результате которого получали 2-амино-6-карбоксиптеридинон-4 (40). Природа бокового радикала определена в результате периодатного окисления. Структура, соответствующая 2-амино-6-(*L-эритро*-1,2-дигидроксипропил)птеридинону-4 (39), подтверждена синтезом [47] из 2,5,6-триаминопиримидинона-4 (41) и 5-дезокси-*L*-арабинозы (42) {схема (30)}.



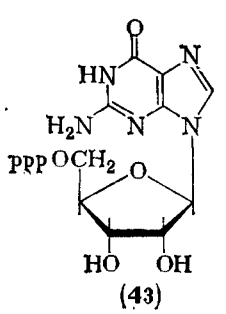

(30)

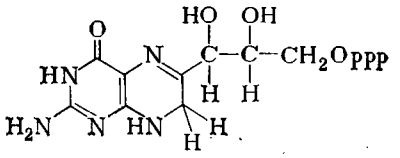
Более удобным методом синтеза, не приводящим к смеси изомеров, является метод Тэйлора и Якоби [48] {схема (31)}.






Значительный прогресс достигнут в исследованиях биосинтеза птеридинов у млекопитающих [49]. Как и в случае бактерий и подобных организмов (см. ниже в разделе о фолиевых коферментах), биосинтез начинается с гуанозинтрифосфата GTP (43) и включает раскрытие имидазольного цикла, в результате которого утрачивается атом С-8 пуриновой системы; последующее замыкание цикла приводит к *D-эритро*-дигидронеоптеринтрифосфату (44). Эта последовательность реакций катализируется GTP-циклогидролазой. Путь, по которому боковой радикал *D-эритро*-дигидронеоптеринтрифосфата превращается в соответствующий радикал биоптерина или 7,8-дигидробиоптерина, не установлен.


(43)


(44)

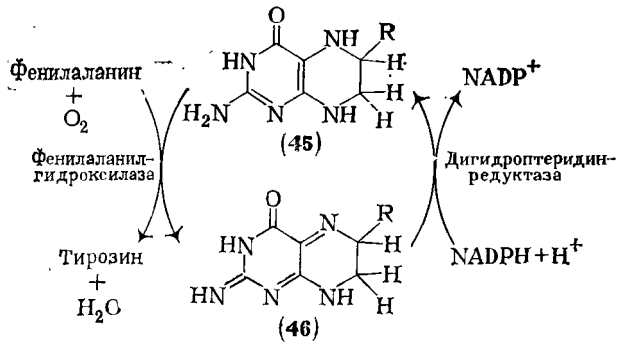
p = фосфат

Роль дигидробиоптерина в ферментативном гидроксилировании фенилаланина стала более ясной в результате изящных работ Кауфмана [44], из которых следует, что в этом процессе принимают участие три фермента. Первый из них, дигидрофолатредуктаза, катализирует NADPH-зависимое восстановление 7,8-дигидробиоптерина до 5,6,7,8-тетрагидропроизводного (45), которое и является активным коферментом {схема (32)}. В связи с этим предполагается, что тетрагидропроизводное (45) и является природным коферментом, в то время как 7,8-дигидропроизводное представляет собой артефакт, образующийся в процессе выделения, а ферментативное восстановление по схеме (32) — «спасательный» механизм.

7,8-Дигидробиоптерин + NADPH + H⁺ ⟶ Тетрагидробиоптерин + $NADP^+$ (32)

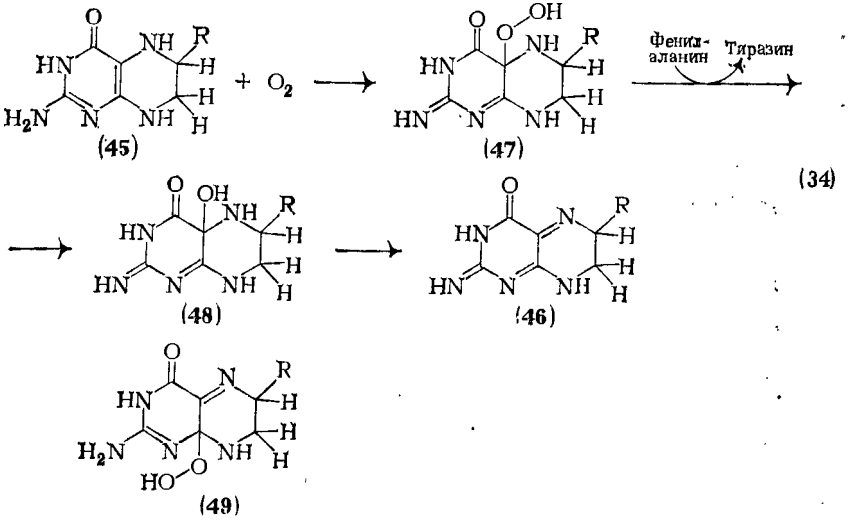
Два других фермента, *L*-фенилаланингидроксилаза и дигидроптеридинредуктаза, катализируют реакцию гидроксилирования фенилаланина и рециклизации окисленного кофермента соответственно. Природа окисленного кофермента изучалась Кауфманом с применением модельных соединений и идентифицирована как хиноидный изомер (46) дигидробиоптерина. Полный процесс можно изобразить схемой (33).

Более поздние работы направлены на выяснение механизма, посредством которого тетрагидробиоптерин (45) реагирует с молекулярным кислородом, образуя способные к осуществлению




(33)

гидроксилирования частицы. Получены данные о природе этих промежуточных частиц [50]. Механизм реакции, катализируемой фенилаланилгидроксидазой, в настоящее время сформулирован более подробно и включает образование промежуточного птеридингидропероксида (47) и гидратированного производного птеридина (48) {схема (34)}. Высказано также альтернативное предположение [51], основанное главным образом на исследованиях модельных систем, согласно которому вместо 4а-гидропероксида в реакции принимает участие 8а-гидропероксид (49).



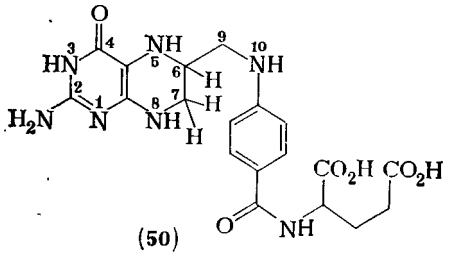

(34)

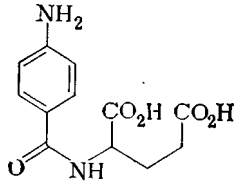
### 24.3.3. КОФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО В ТРАНСФЕРАЗНЫХ РЕАКЦИЯХ

Ферменты часто катализируют перенос групп атомов с субстрата на продукт. Функция кофермента при этом заключается в приеме группы с субстрата, обычно путем образования ковалентного соединения, и передаче этой группы молекуле акцептора, в результате чего образуется ожидаемый продукт. Природа ковалентного производного, возникающего между коферментом и переносимой группой такова, что а) группа приобретает необходимую для присоединения к молекуле акцептора реакционную способность и б) в ряде случаев природа переносимой группы, например ее степень окисления, изменяется при присоединении к коферменту.



#### 24.3.3.1. Фолиевые коферменты


(50)

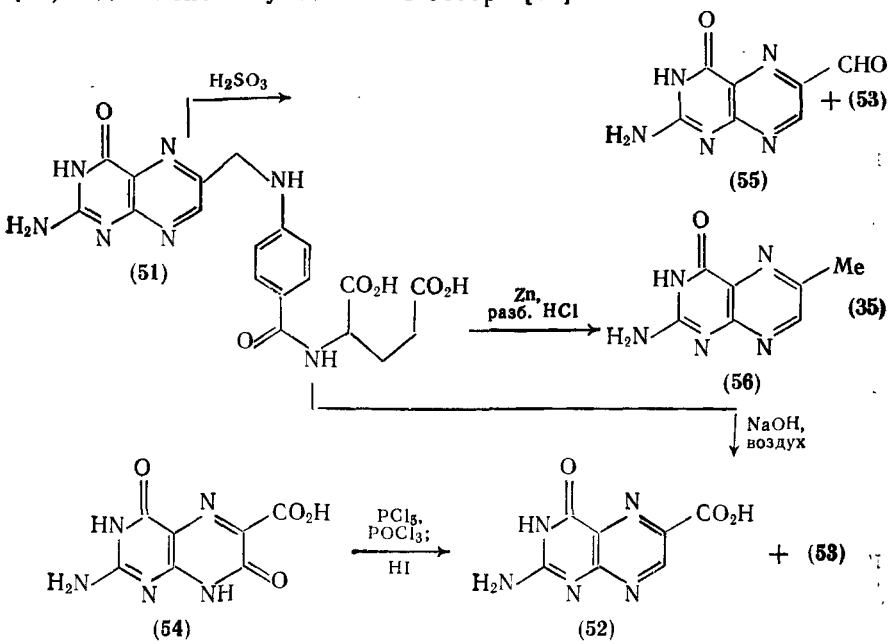

(53)

Все фолиевые коферменты, участвующие в переносе и взаимопревращении одноуглеродных групп атомов со степенью окисления уровня муравьиной кислоты, формальдегида и метанола, являются производными 5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты (50).

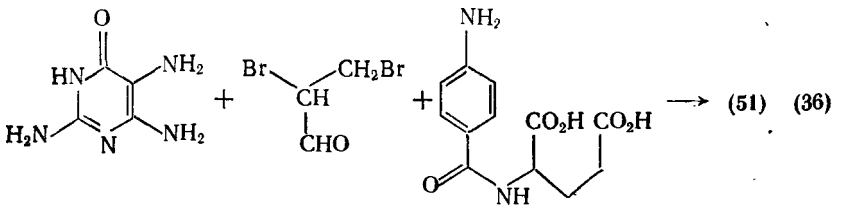
Химическим методом тетрагидрофолиевая кислота получается при каталитическом гидрировании фолиевой кислоты (51) [52]. Так как практически все тетрагидроптеридины этого типа очень легко окисляются на воздухе, почти все структурные исследования проводились на самой фолиевой кислоте. Следует отметить, что химическое восстановление фолиевой кислоты (51) приводит к образованию нового хирального центра у С-6. Эта реакция не стереоспецифична, и поэтому синтетическая тетрагидрофолиевая кислота и ее производные в ферментативных системах обладают только 50 % реакционной способностью.

Структура фолиевой кислоты установлена в результате щелочного гидролиза в аэробных условиях, давшего 2-амино-6-карбоксиптеридинон-4 (52) и диазотируемый ароматический амин, *n*-аминобензоил-*L*-глутаминовую кислоту (53). Тот факт, что фолиевая кислота представляет собой производное птеридина, подтверждается характеристическим УФ-спектром, близким к спектру ксантоптерина и других птеридиновых пигментов. Структура птеридинкарбоновой кислоты (52) была установлена прямым синтезом из изоксантоптеринкарбоновой-6 кислоты (54). Природа связи между птеридином и ароматическим амином стала ясной после обнаружения образования птеридинкарбоновой-6 кислоты в результате аэробного гидролиза, в то время как восстановительное расщепление сернистой кислотой или цинком в разбавленной кислоте приводит к производным 6-формил- и 6-метилптеридина (55)

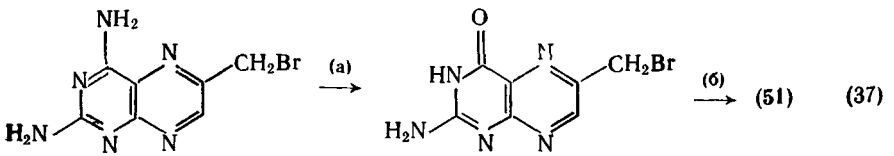
и (56) соответственно. Все эти реакции суммированы на схеме (35) и детально обсуждаются в обзоре [53].




Многочисленные синтезы фолиевой кислоты можно разделить на два основных типа. Первый из них {схема (36)} включает конденсацию 2,5,6-триаминопиримидинона-4 с трехуглеродным соединением типа 2,3-дибромпропаналя в присутствии *n*-аминобензоилглутаминовой кислоты. Реакционная смесь содержит около 25 % желаемого продукта, и необходима интенсивная очистка [53].




В другом, более эффективном типе синтеза {схема (37)} в качестве исходного соединения используют производное птеридина,



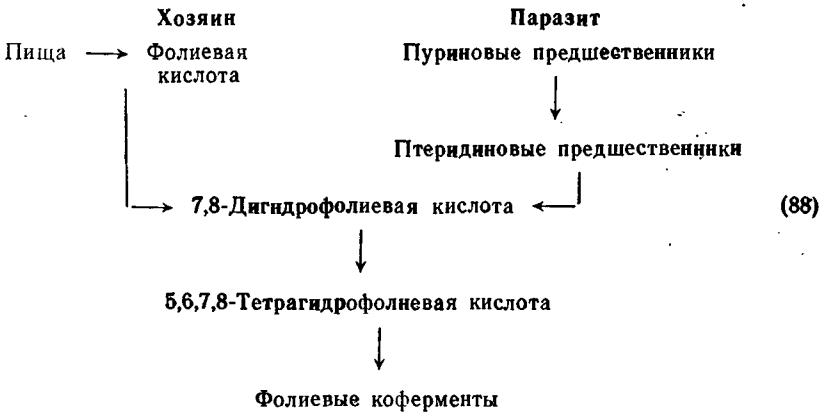

(а) 48% HBr, 100 °C; (б) *n*-аминобензоил-*L*-глутаминовая кислота



которое при конденсации с *n*-аминобензоилглутаминовой кислотой дает фолиевую кислоту в чистой кристаллической форме с выходом 60 % [54].

Биосинтез тетрагидрофолиевой кислоты (50) лучше всего рассматривать в два этапа. Первый этап, образование 7,8-дигидрофолиевой кислоты (57) из предшественников пуриновых нуклеотидов, характерен исключительно для микроорганизмов и других паразитических видов, большая часть которых располагает системами ферментов, необходимых для проведения синтеза *de novo*. Второй этап, восстановление 7,8-дигидрофолиевой кислоты до 5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты, катализируемое ферментом дигидрофолатредуктазой, является общим для клеток млекопитающих и бактерий. Специфическое ингибирование одного или нескольких ферментов, участвующих в биосинтезе этих соединений, оказалось наиболее эффективным подходом к созданию ряда антибактериальных агентов. В связи с этим представляется целесообразным рассмотреть как этот подход [2], так и процессы биосинтеза в деталях.

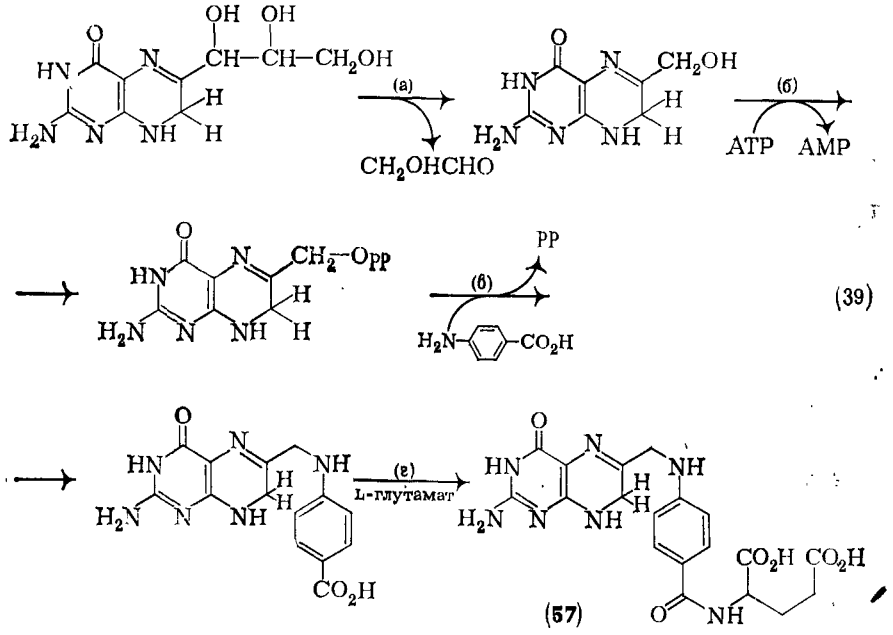
Различия между хозяином и паразитом в отношении биосинтеза тетрагидрофолиевой кислоты суммированы на схеме (38). Большая часть паразитических организмов неспособна к поглощению фолиевой кислоты из окружающей среды и зависит от синтеза последней *de novo*.




Ясно, что специфическое ингибирование одного или более ферментов, расположенных на биосинтетическом пути, ведущем к 7,8-дигидрофолиевой кислоте, должно производиться селективно токсичным агентом. Не столь очевидно то, что специфическое ингибирование дигидрофолатредуктазы, фермента, *общего* и хозяину, и паразиту, также привело бы к созданию очень эффективных хемотерапевтических агентов.

Биосинтез 7,8-дигидрофолиевой кислоты всесторонне исследован [55]. Наиболее эффективный предшественник, гуанозинтрифосфат GTP (43), под действием фермента GTP-циклогидролазы

(как это описано выше для биосинтеза биоптерина) превращается в *D-эритро*-дигидронеоптеринтрифосфат (**44**). Последующие стадии, начиная с дигидронеоптерина, образующегося в результате потери трех фосфатных остатков, изображены на схеме (39). Дигидроптероатсинтетаза специфически ингибируется сульфамидными препаратами и является единственным известным участком действия этих антибактериальных агентов. В связи с этим фермент оказался наиболее важным с точки зрения хемотерапии. Исследование [56] пролило свет на механизм действия этого фермента. Вуд и сотр. синтезировали ряд ингибиторов гидроксиметилдегидроптеринпирофосфокиназы. Последние также обладают интересной антибактериальной активностью [2].



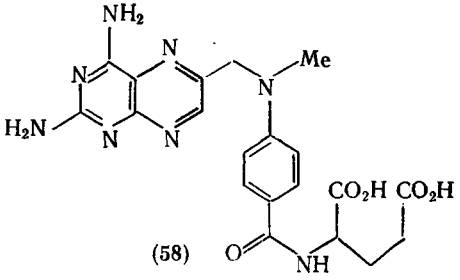

(39)

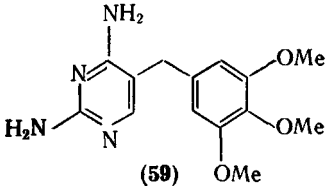
(а) дигидронеоптеринальдолаза; (б) гидроксиметилдигидроптеринпирофосфокиназа
(в) дигидроптероатсинтетаза; (г) дигидрофолатсинтетаза

Интенсивно изучался фермент дигидрофолатредуктаза, катализирующий восстановление дигидрофолиевой кислоты по схеме (40). Известны два типа ингибиторов этого фермента. Первый тип представлен изостерическим аналогом метатрексатом (**58**). Подобные соединения являются мощными ингибиторами фермента ($K < < 10^{-9}$ моль·л$^{-1}$) и широко используются в химиотерапии рака. Их действие на ферменты из различных источников различаются мало; эти соединения не используются в качестве антибактериальных агентов, поскольку, так же как и в случае фолиевой кислоты, у бактерий отсутствует механизм активного транспорта, позволяющий таким соединениям проникать сквозь клеточную стенку. Триметоприм (**59**) представляет собой хороший пример ингибитора

$$\underset{\text{кислота}}{\text{7,8-Дигидрофолиевая}} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{редуктаза}]{\text{дигидрофолат-}} \underset{\text{кислота}}{\text{5,6,7,8-Тетрагидрофолиевая}} + \text{NAD(P)}^+ \qquad (40)$$

второго типа. Эти соединения способны проникать сквозь клеточную стенку по механизму пассивной диффузии. Более того, возможен синтез производных 2,4-диаминопиримидина, *селективно* связывающихся с дигидрофолатредуктазой из патогенных источников. Так, триметоприм вызывает 50 % ингибирование бактериального фермента в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ моль·л$^{-1}$, в то время как для достижения той же степени ингибирования фермента из млекопитающих необходимо увеличение концентрации в 10 000 раз. Ясно, что такие соединения являются эффективными антибактериальными агентами [2].



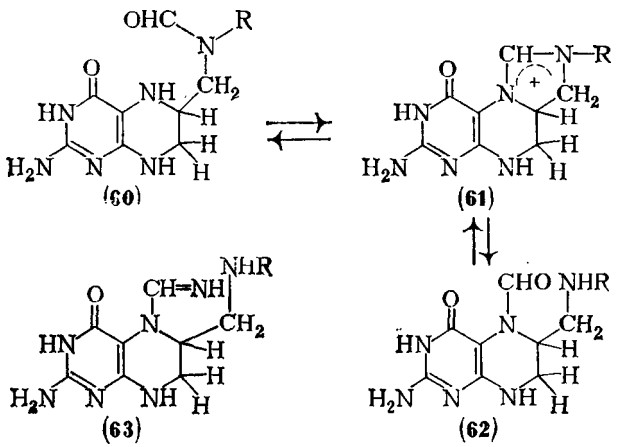




Механизмы, посредством которых в биологических системах происходит активация и взаимопревращение одноуглеродных группировок с различной степенью окисления, были предметом интенсивного изучения с применением как природного кофермента, тетрагидрофолата, так и модельных соединений. Результаты этих исследований подробно рассмотрены Брюсом и Бенковичем [57] и позднее Бенковичем и Боллардом [58]. Ферментативные аспекты этой проблемы обсуждаются в обзоре Мадда и Кантони [59].

Ферментативная активация формиата может быть представлена схемой (41). Неизвестно, однако, включает ли механизм реакции образование тройного комплекса или имеет место начальная реакция, в результате которой образуется интермедиат, такой как смешанный ангидрид муравьиной и фосфорной кислот (формилфосфат) или фосфорилированное производное тетрагидрофолиевой кислоты. В любом случае продуктом реакции является $N^{10}$-формилтетрагидрофолат (**60**). Последний легко и обратимо превращается (как ферментативно, так и химически) в 5,10-метенилтетрагидрофолат (**61**) или в $N^5$-формилтетрагидрофолат (**62**) {схема (42)}.

$$\text{Тетрагидрофолат} + \text{HCO}_2\text{H} + \text{ATP} \rightleftharpoons N^{10}\text{-формилтетрагидрофолат} + \text{ADP} + \text{P}_i \qquad (41)$$

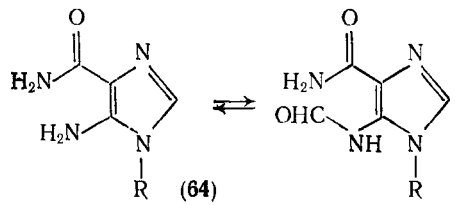
Оба этих производных тетрагидрофолата, а также близкий к ним $N^5$-формиминотетрагидрофолат (**63**), весьма специфично уча-




(42)

R = остаток бензоилглутаминовой кислоты

ствуют в биологических реакциях переноса формильного остатка. Так, одним из примеров является использование $N^{10}$-формильного производного (**60**) в качестве донора формила в ферментативном формилировании аминоимидазолкарбоксамида (**64**), интермедиата в биосинтезе пуриновых нуклеотидов *de novo* {схема (43)}




(43)

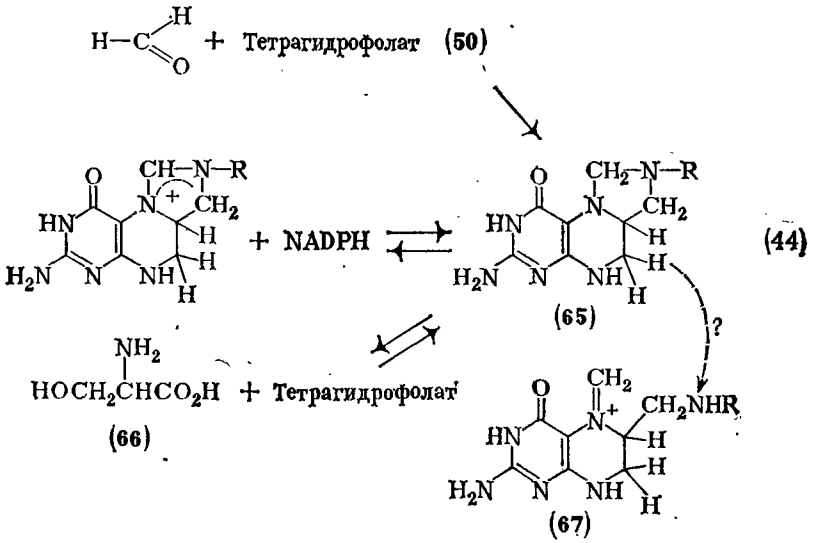
+ $N^{10}$-Формилтетрагидрофолат + Тетрагидрофолат

R = *рибозил-5′-фосфат*

В отсутствие фермента легко идет реакция формальдегида с тетрагидрофолиевой кислотой, приводящая к 5,10-метилентетрагидрофолату (**65**). Это соединение может образовываться также при а) ферментативном восстановлении 5,10-метенилтетрагидрофолата (**61**) с использованием NADPH в качестве донора водорода и б) ферментативной реакции серина (**66**) с тетрагидрофолатом в присутствии пиридоксальфосфата. Эти взаимопревращения приведены на схеме (44). Образующийся 5,10-метилентетрагидрофолат (**65**) представляет собой основной донор гидроксиметильных групп в биологических системах. Особенно следует отметить участие

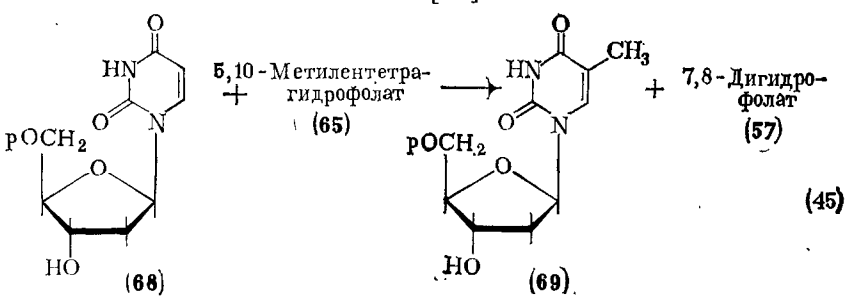


(**65**) в превращении дезоксиуридиловой кислоты в тимидиловую (см. ниже). Предполагается, что реакционноспособной частицей, действующей в качестве гидроксиметильного донора, является соединение типа основания Манниха (**67**)




(44)

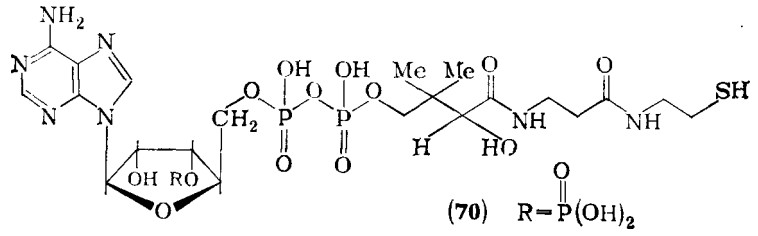
Участие фолиевых коферментов в переносе метильной группы лучше всего проиллюстрировать на примере превращения дезоксиуридиловой кислоты (**68**) в тимидиловую (**69**). 5,10-Метилентетрагидрофолат (**65**) в этой реакции выступает одновременно в роли донора углерода и восстановителя {схема (45)}. Предложены различные механизмы этой реакции, однако не получено решающих доказательств в пользу какого-либо одного из них. Более важным является тот факт, что кофермент при этом превращается в 7,8-дигидрофолат, который затем может вновь перейти в тетрагидрофолат. Это восстановление катализируется дигидрофолатредуктазой и, возможно, именно на этом этапе ингибиторы фермента типа триметоприма оказывают наибольший эффект. Установлена стереохимия синтеза тимидиловой кислоты [60].




(45)

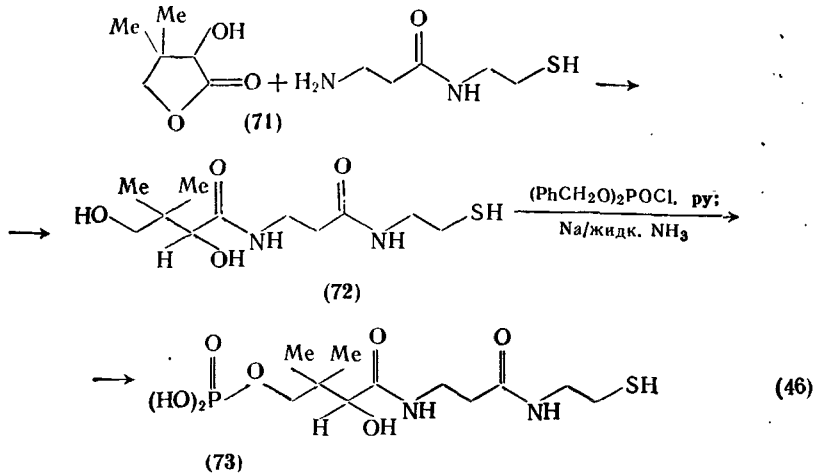
### 24.3.3.2. Кофермент А

Кофермент А принимает участие в биологической активации и переносе ацетильных групп. Структура кофермента (**70**) была установлена Липманом и сотр. [61] в результате проведения серии специфических ферментативных гидролизов. Так, обработка фосфатазой кишечника приводила к образованию аденозина, пантетеина и 3 моль фосфата. Положение фосфатных групп определяли после проведения более специфичных деградаций. Так, после обработки нуклеотидазой, специфически расщепляющей нуклеотид 3′-фосфаты, был получен «дефосфокофермент А» и 1 моль ортофосфата. Пирофосфатаза, с другой стороны, вызывала образование аденозин-3′,5′-дифосфата (известное соединение) и пантетеин-4′-фосфата. Положение фосфатной группы в последнем соединении было установлено путем его сравнения с синтетическим образцом известной структуры.



(**70**) R = $P(O)(OH)_2$

Синтез кофермента А сводится к двум составляющим: во-первых, к синтезу пантетеин-4′-фосфата (**73**) и, во-вторых, к присоединению последнего (**73**) к соответствующим образом активированному аденозинфосфату. Типичный пример первого синтеза представлен на схеме (46) [62], где исходным был *D*-(—)-пантолактон (**71**). Этот, хотя и удобный, синтез не приводит, однако, к однозначным результатам, и однозначное введение фосфатной группы осуществлено теми же авторами в результате более сложного синтеза. Интересно отметить, что фосфорилированию подвергается преимущественно первичная гидроксильная группа пантетеина (**72**).



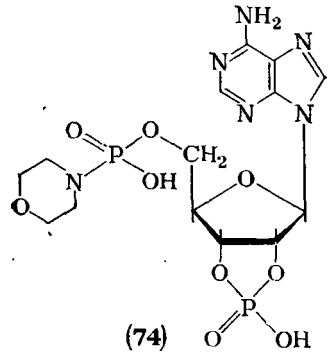
(**71**)

(**72**)

(**73**)

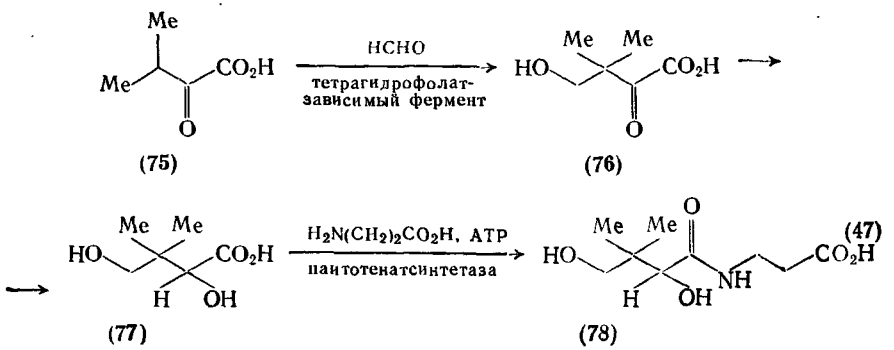
(**46**)

При конденсации пантетеин-4′-фосфата (**73**) с 5′-фосфоморфолидатом аденозин-2′,3′-циклофосфата (**74**) получен продукт, который после обработки разбавленной кислотой давал смесь кофермента А и изокофермента А (производное аденозин-2′-фосфата), которую разделяли хроматографией на ионообменной целлюлозе. Использование 5′-фосфоморфолидата аденозин-3′-фосфата в более специфичном синтезе невозможно, поскольку имеет место конкуренция за последнее соединение между фосфатными остатками в 3′-положении аденозина и 4′-положении пантетеина. Успех метода, использующего циклофосфат, определяется преимущественной атакой фосфоморфолидата фосфомоноэфиром по сравнению с фосфодиэфиром [63].



(**74**)

Исследования биосинтеза кофермента А установили связь между витамином *L*-пантотеновой кислотой (**78**) и коферментом. Пантотеновая кислота, один из витаминов группы В, не может синте-



(**75**)

(**76**)

(**77**)

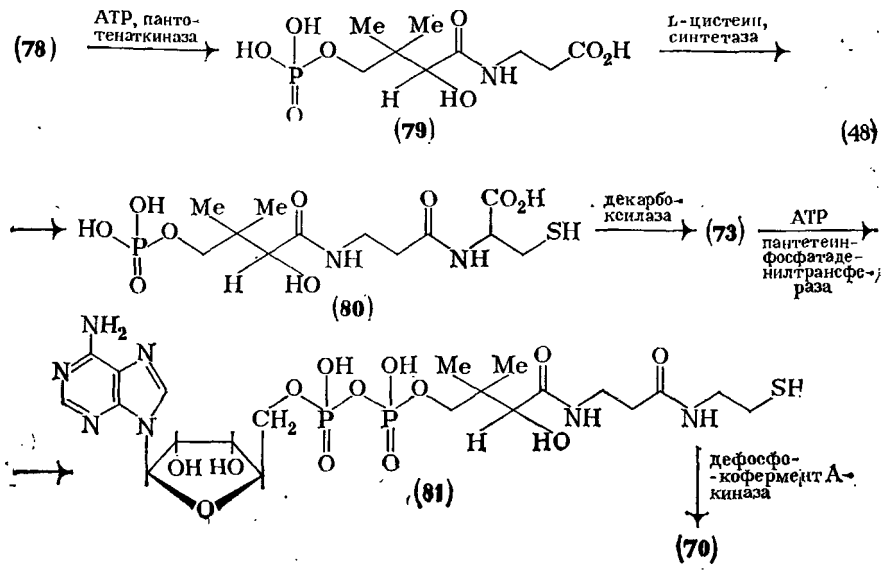
(**78**)

(**47**)

зироваться в организме животных. С другой стороны, большая часть микроорганизмов способна производить витамин из предшественников — пантоевой кислоты и β-аланина. Как животные, так и микроорганизмы способны к превращению пантотеновой кислоты в кофермент А. Оба процесса биосинтеза суммированы в превосходном обзоре Брауна [64].

Ферментативный синтез пантотеновой кислоты приведен на схеме (47). Ее предшественник, α-кетоизовалериановая кислота (**75**), превращается в кетопантоевую кислоту (**76**) в результате тетрагидрофолат-зависимой ферментативной реакции с формальдегидом. Последующее восстановление дает пантоевую кислоту (**77**), однако природа восстанавливающего агента все еще не установлена. Фермент пантотенатсинтетаза катализирует конденсацию пантоевой кислоты с β-аланином, в результате чего образуется *L*-пантотеновая кислота (**78**).

Превращение пантотеновой кислоты в кофермент А проводили с использованием препаратов ферментов из бактериальных источников и из печени крыс [65]. Вначале в результате фосфорилирования образуется 4′-фосфопантотеновая кислота (**79**), которая в результате конденсации с цистеином дает 4′-фосфопантотеноил-*L*-цистеин (**80**). Последующее декарбоксилирование до пантетеин-4′-фосфата (**73**), реакция с аденозинтрифосфатом с образованием дефосфокофермента А (**81**) и, наконец, селективное фосфорилирование приводит к коферменту А (**70**) {схема (48)}. Маловероятно, что альтернативный механизм [66], включающий начальную конденсацию пантотеновой кислоты с цистеином, имеет какое-либо биологическое значение.





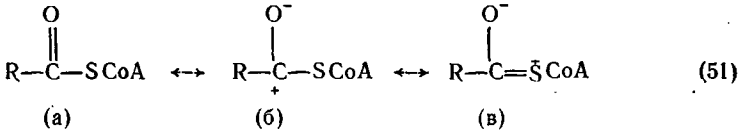

Кофермент А легко ацилируется как *in vitro*, так и *in vivo* с образованием производных 5-ацилкофермента А. Последние удобно обозначать как RCOSCoA; реакцию *in vivo* можно представить схемой (49).

$$RCO_2H + HSCoA + ATP \underset{}{\overset{Mg^{2+},\ K^+}{\rightleftharpoons}} RCOSCoA + AMP + PP_i \qquad (49)$$

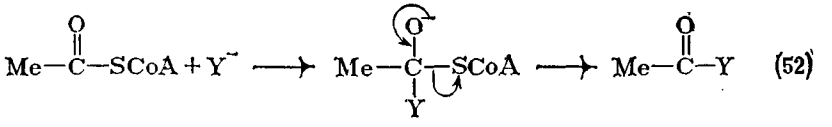
Таким путем может образовываться и ацетилкофермент А (**82**), наиболее важное из ацильных производных кофермента. Однако основным путем его биосинтеза является синтез из пировиноградной кислоты, основного продукта гликолиза. Превращение пировиноградной кислоты в ацетилкофермент А в общем виде можно представить схемой (50), однако в действительности процесс более сложен. В нем принимает участие тесно связанный комплекс ферментов и коферментов, включая тиаминпирофосфат (см. ниже), флавопротеин, $NAD^+$ и липоевую кислоту [67].

$$MeCOCO_2H + CoASH + NAD^+ \longrightarrow \underset{(82)}{MeCOSCoA} + CO_2 + NADH + H^+ \qquad (50)$$

Кофермент А способен к двоякой активации ацетата, так что последний может действовать как в качестве электрофила, так и нуклеофила [68]. Это наилучшим образом объясняют с использованием свойств тиоловых сложных эфиров. Канонические формулы этих соединений представлены по схеме (51).

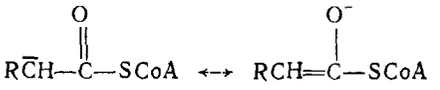



**Вклад** форм типа (в) в резонансный гибрид в этом случае намного меньше, чем в случае обычных сложных эфиров, вследствие чего электрофильность углеродного атома карбонильной группы существенно повышается. Тиоловые сложные эфиры типа кофермента А являются, следовательно, эффективными ацилирующими агентами, причем нуклеофильная атака проходит по обедненному электронами атому углерода {схема (52)}. Типичными нуклеофилами в биологических системах являются амины, карбоксильные ионы, фосфат-ионы и карбанионы, которые обсуждаются ниже.



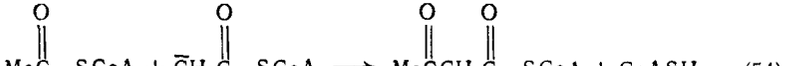

Карбанион, образующийся в результате потери протона от α-углеродного атома тиолового эфира также стабилизуется посредством эффективной делокализации отрицательного заряда, причем

эта делокализация более эффективна, чем в случае обычных сложных эфиров {схема (53)}. Ацетилкофермент А может, следовательно, выступать и в роли эффективного нуклеофила.



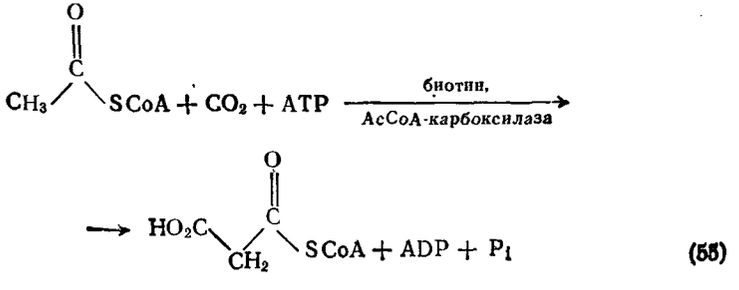
(53)

Вследствие этого ацетилкофермент А может вступать в биологический эквивалент конденсации Кляйзена, образуя ацетоацетилкофермент А {схема (54)}. Важность этой реакции состоит в том, что она, по-видимому, является первой стадией биосинтеза мевалоната и, следовательно, терпенов и стероидов [69]. Обратимая реакция, представленная на схеме (54), сдвинута влево и, вероятно, эффективна только в силу необратимой стадии далее в биосинтетической цепи.



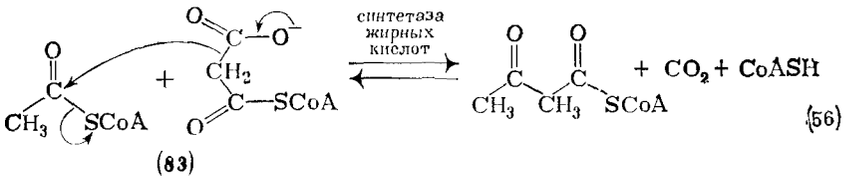
(54)

Аналогично можно сформулировать механизм биосинтеза жирных кислот посредством последовательного присоединения двууглеродных фрагментов к молекуле ацетилкофермента А («исходная частица»). Однако, по крайней мере в данном случае, необходим, по-видимому, более эффективный нуклеофил, и поэтому в качестве удлиняющего цепь агента используется малонилкофермент А (83) [70] (последний образуется из ацетилкофермента А в результате АТР-зависимого ферментативного карбоксилирования). Движущей силой реакции конденсации является декарбоксилирование, сдвигающее равновесие вправо, в результате чего образуется ацетоацетильное производное. Прежде чем вступить в конденсацию, ацетильные и малонильные группы переносятся, вероятно, на специальный белок-носитель, а затем на фермент (синтетазу жирных кислот). В каждом случае, однако, конденсация проходит с участием тиоловых сложных эфиров и формально аналогична показанной на схемах (55), (56). Биосинтез поликетидов протекает по близкому механизму.




(55)

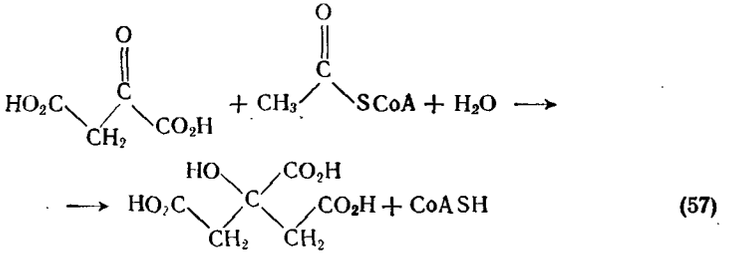





(83)

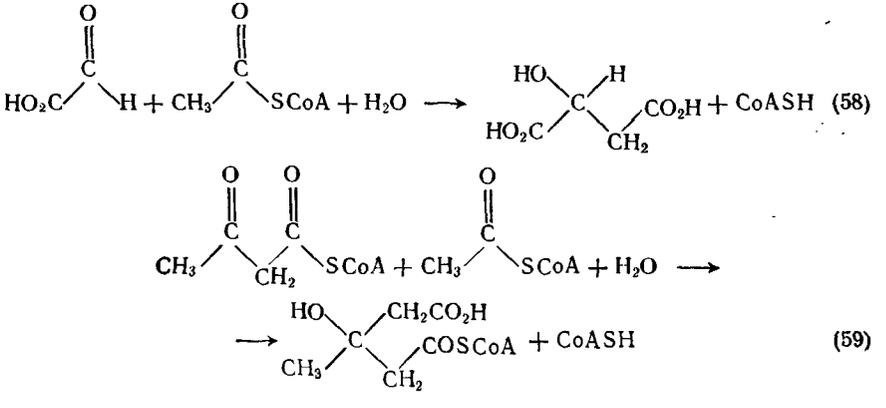
(56)

Ацетилкофермент А участвует также в конденсациях альдольного типа, важнейшей из которых является реакция со щавелевоуксусной кислотой, приводящая к образованию лимонной кислоты {схема (57)} — ключевая стадия в цикле лимонной кислоты. Эта реакция, катализируемая цитратсинтетазой, явилась предметом интенсивного изучения [71].



(57)

Близкими являются реакции, в которых ацетилкофермент А реагирует с глиоксилевой кислотой или ацетоацетилкоферментом А с образованием соответственно малата и β-гидрокси-β-метилглутарилкофермента А {схемы (58), (59)}. Последняя реакция является ключевой стадией в биосинтезе мевалоната.



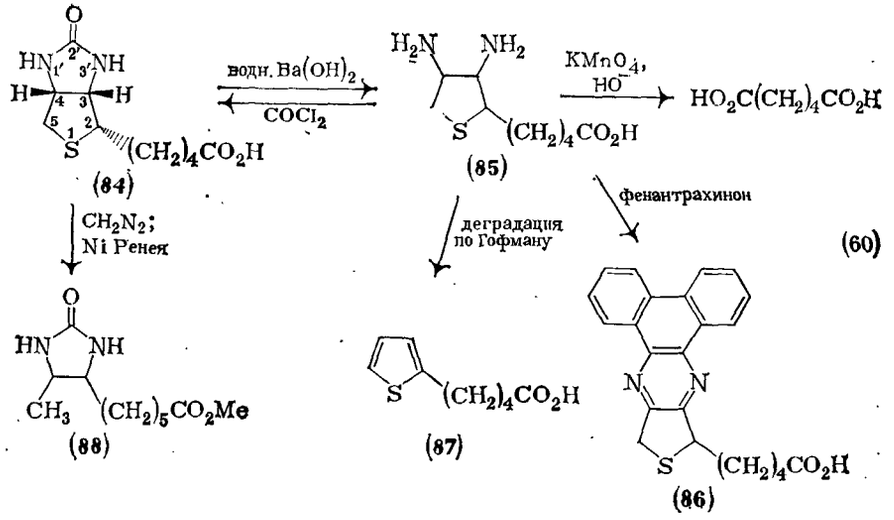
(58)

(59)

### 24.3.3.3. Биотин

В настоящее время роль биотина как кофермента, ответственного за перенос диоксида углерода в реакциях карбоксилирования, доказана несомненно [72]. Структура кофермента установ-

лена главным образом в результате работ дю Виньо и сотр. [73, 74]. Как строение, так и стереохимия этого соединения (84), подтверждены синтезом [75] и рентгеноструктурными исследованиями [76].

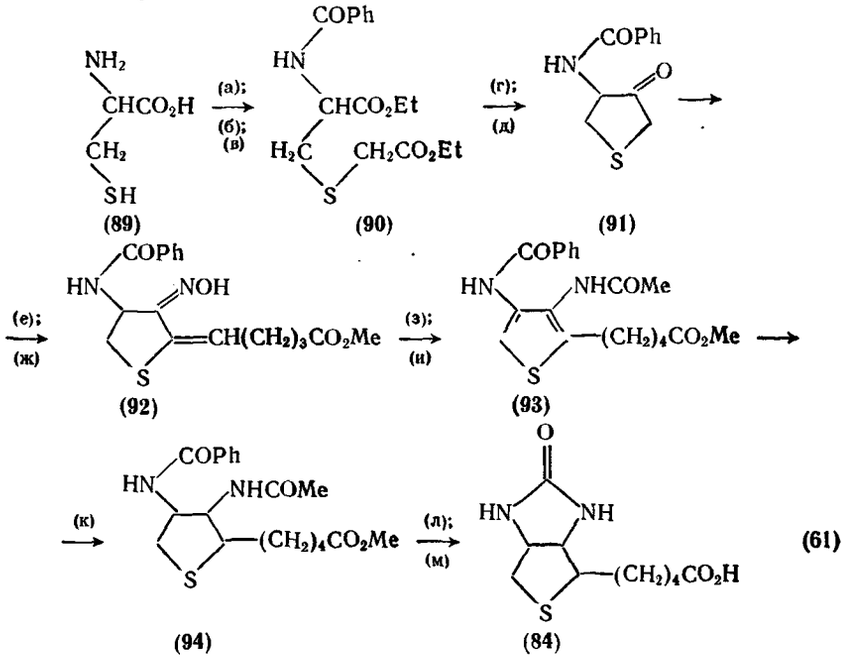



(60)

Важнейшие этапы в определении структуры биотина приведены на схеме (60). Биотин (84), $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, давал в реакции с диазометаном метиловый эфир и сульфон при окислении пероксидом водорода/уксусной кислотой, что доказывает наличие у него карбоксильной и тиоэфирной групп. В результате гидролиза выделена оптически активная диаминокарбоновая кислота (85), которая после обработки фосгеном вновь переходила в биотин, а при окислении давала адипиновую кислоту. Диамин (85) в реакции с фенантрахиноном образовывал хиназолиновое производное (86), что доказывало взаиморасположение аминогрупп 1,2 и наличие в биотине имидазолидонового кольца.

Природа серусодержащей части молекулы установлена Гофманом в результате исчерпывающего метилирования диаминокарбоновой кислоты (85) и далее образования производного тиофена (87), идентичного синтетическому стандарту. Другой интересной химической реакцией, внесшей вклад в установление структуры биотина, является образование метилового эфира детиобиотина (88) при обработке метилового эфира биотина никелем Ренея.

В биотине имеется три хиральных центра. Стереохимия молекулы установлена в результате синтеза [77, 78] и изучения свойств всех четырех возможных рацематов. Десульфуризация под действием никеля Ренея до соответствующего детиобиотина (88) разрушает асимметрию при С-2. Как (±)-биотин, так и (±)-эпибиотин дают один и тот же (88) и являются, таким образом, эпимерами по С-2. Изучение скорости гидролиза [78] различных рацематов, приводящего к образованию диаминокарбоновых кислот (85), показало, что одна пара рацематов гидролизуется медленнее другой. Было высказано заключение, что циклы в биотине и в эпибиотине имеют *цис*-сочленение. Стереохимия третьего асимметрического атома и абсолютная конфигурация (+)-биотина (единственного биологически активного стереоизомера) была установлена в результате рентгеноструктурного анализа [79] бис-*n*-броманилида $N^1$-карбоксибиотина.



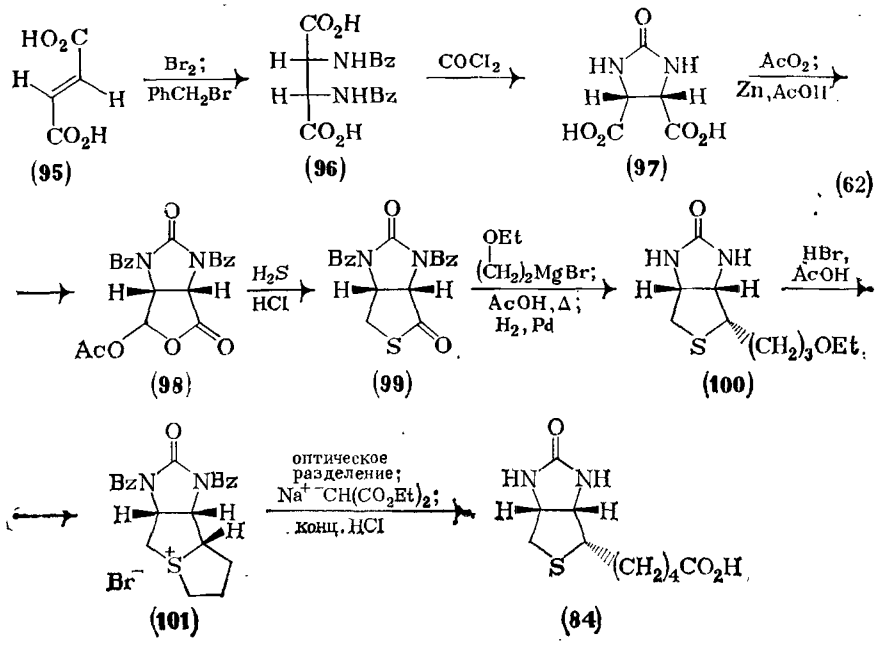

(61)

(а) $ClCH_2CO_2Na$; (б) PhCOCl; (в) EtOH, $H^+$;
(г) NaOMe; (д) AcOH, HCl; (е) $MeO_2C(CH_2)_3CHO$, пиперидин;
(ж) $H_2NOH$; (з) Zn, AcOH; (и) $Ac_2O$; (к) Pd, $H_2$;
(л) водн. $Ba(OH)_2$; (м) $COCl_2$, $Na_2CO_3$

Сообщалось о многочисленных синтезах биотина, но здесь обсуждаются только два из них. Первый синтез, изображенный на схеме (61), был проведен Гаррисом и сотр. [75]; в результате этой работы была подтверждена общая формула биотина. Последовательная обработка натриевого производного цистеина (89) хлоруксусной кислотой, бензоилхлоридом и этанолом в присутствии кислотного катализатора привела к образованию диэфира (90). Дикмановская циклизация с последующим гидролизом и декарбоксилированием дала циклический кетон (91). Конденсация с метил-γ-формилбутаноатом в присутствии основания и реакции с гидроксиламином дали оксим (92), восстановление которого привело к образованию ненасыщенного производного (93) и его

структурного изомера. Каталитическое восстановление (**93**) дало два рацемата соединения (**94**), каждый из которых гидролизовали отдельно до соответствующего диамина и затем обрабатывали фосгеном. Из одного из этих рацематов был получен (±)-биотин. Стереоспецифическое разделение последнего, наиболее эффективное при использовании *L*-(+)-аргинина [80], дало (+)-биотин (**84**).

Второй синтез [81] отличается от предыдущего тем, что он а) используется в промышленных масштабах; б) стереоспецифичен; в) в ходе синтеза происходит в первую очередь образование имидазолидонового кольца, а не тетрагидротиофенового. Этот синтез представлен на схеме (62). Фумаровую кислоту (**95**) через *мезо*-дибромянтарную кислоту превращали в *мезо*-2,3-бисбензиламиноянтарную кислоту (**96**). Обработка фосгеном привела к образованию производного имидазолидона (**97**) с *цис*-карбоксильными группами; восстановление соответствующего ангидрида в присутствии уксусного ангидрида дало циклическое производное (**98**). Введение серы достигали использованием сульфида водорода с последующим восстановлением, в результате получали тиолактон (**99**). Боковой радикал вводили посредством реакции Гриньяра, дегидрирования и каталитического восстановления (последнее стереоспецифично). В результате была установлена относительная конфигурация всех трех хиральных центров. Обработка полученного таким образом (**100**) бромидом водорода в уксусной кислоте привела к сульфониевой соли (**101**), стереоизомеры которой разделяли с использованием камфорсульфоновой кислоты. Ле-

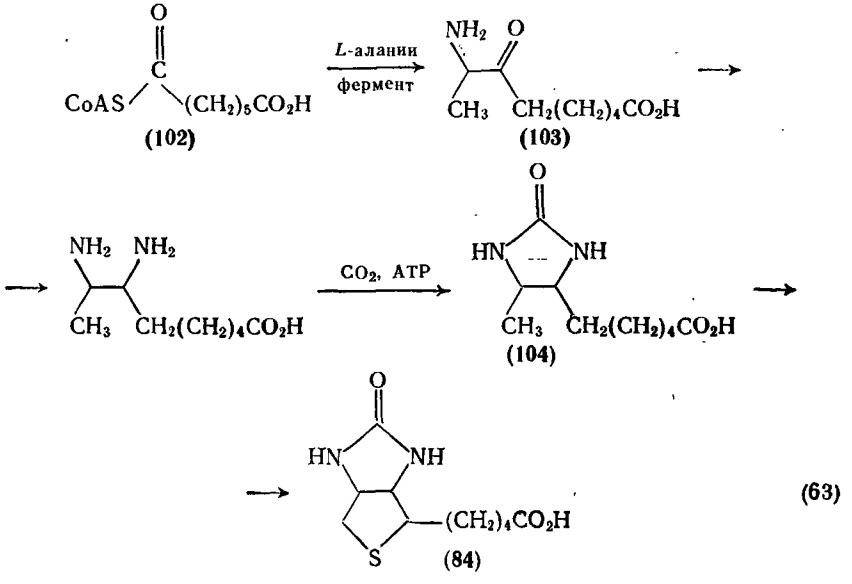





вовращающий изомер вводили в реакцию с натриевой солью диэтилмалоната и далее после кипячения с концентрированной хлороводородной кислотой, что вызывает гидролиз, декарбоксилирование и дебензилирование, получали (+)-биотин (**84**).

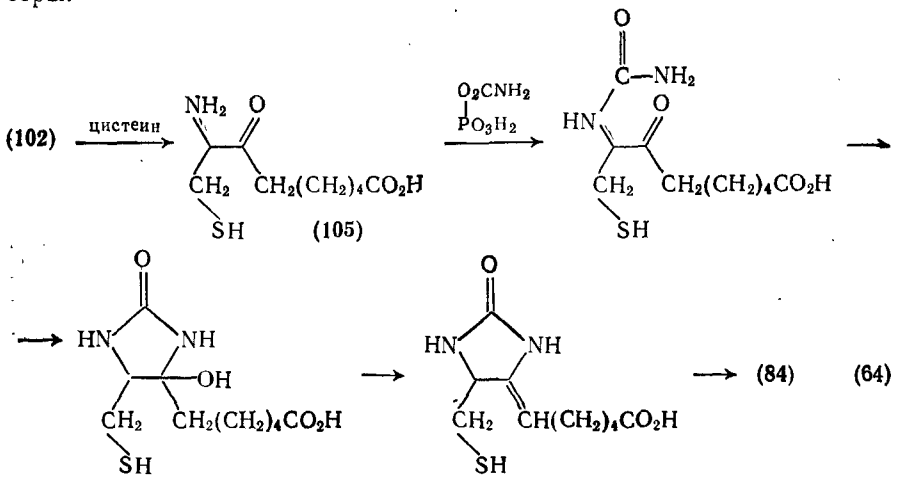
Значительный прогресс достигнут в изучении ферментативных ступеней биосинтеза биотина [82]. Для человека биотин является витамином, но поскольку к его синтезу способны кишечные бактерии, подлинная недостаточность биотина у человека фактически неизвестна.

Предложены два противоречивых механизма биосинтеза биотина, в основном различающихся тем, включается ли сера в молекулу в конце биосинтетической последовательности или, напротив, на ранней ее стадии. Первый механизм приведен на схеме (63). Хотя ферментативные стадии процесса охарактеризованы неполностью, распределение метки, обнаруженное в пимелилкоферменте А (**102**), согласуется с образованием последнего из ацетилкофермента А и малонилкофермента А. Последующее превращение в 8-амино-7-оксопеларгоновую кислоту (**103**) достигается с помощью пиридоксаль-зависимого фермента, использующего аланин в качестве второго субстрата. Последующая стадия — аминирование — полностью не охарактеризована, однако получен [83] гомогенный препарат детиобиотинсинтетазы, катализирующий предпоследнюю стадию — замыкание имидазолидонового кольца. Превращение детиобиотина (**104**) в биотин (**84**) продемонстрировано в гомогенатах клеток, однако механизм введения серы неизвестен.

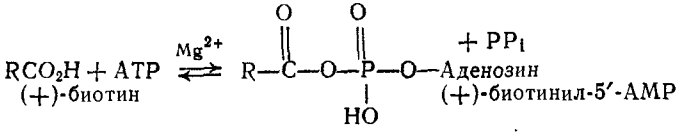


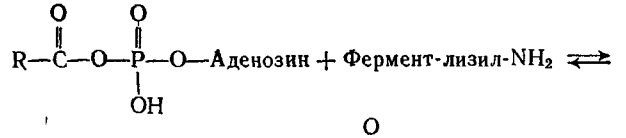

Второй механизм {схема (64)} предложен Линеном и сотр. [84]. В нем предполагается реакция между пимелилкоферментом

А (102) и цистеином (а не аланином), приводящая к 8-амино-9-меркапто-7-оксопеларгоновой кислоте (105), которая затем реагирует с карбамилфосфатом. В этом случае легче представить механизм замыкания тетрагидротиофенового кольца, однако сумма биохимических данных свидетельствует скорее в пользу механизма, представленного на схеме (63). Необходимы дополнительные исследования, в первую очередь касающиеся механизма введения серы.




Прежде чем биотин сможет функционировать в качестве переносчика диоксида углерода в реакциях карбоксилирования, он должен образовать ковалентную связь с апоферментом и составить каталитически активный холофермент [72]. Этот процесс включает две ферментативные реакции (65) и (66).

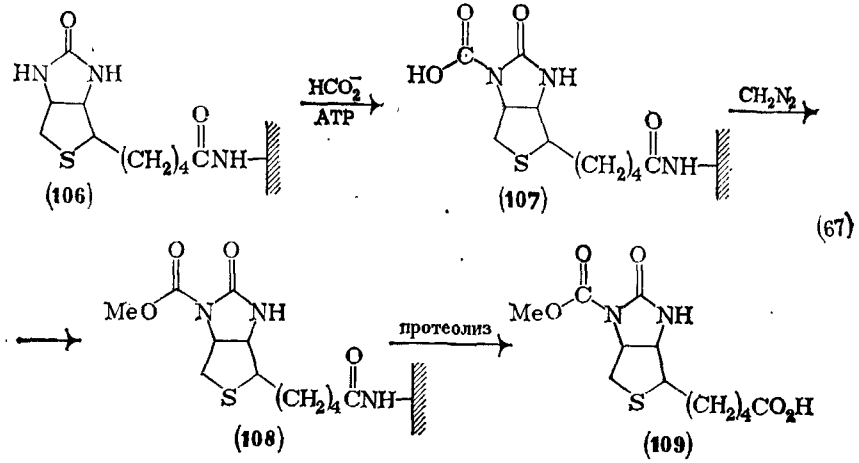


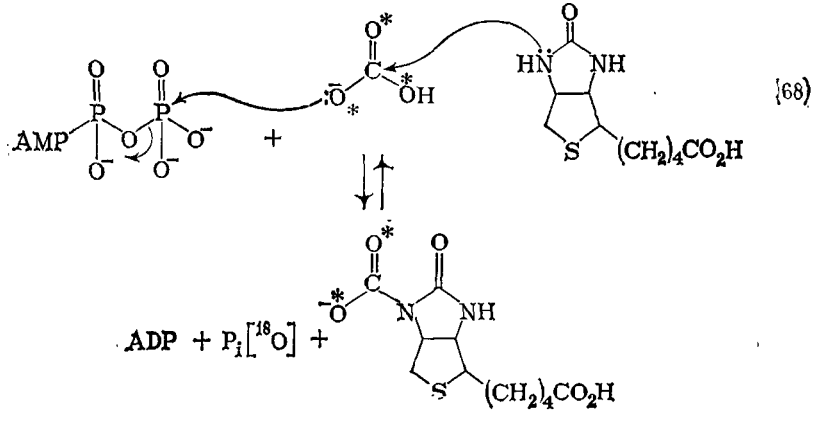

Результатом этих реакций является соединение биотина амидной связью с ε-аминогруппой лизинового остатка апофермента. В поддержку этого механизма говорит использование [85] синтетического (+)-биотинил-5′-AMP в реакции (66), где это соединение полностью замещает (+)-биотин, ATP и $Mg^{2+}$.



Установлена природа соединения, образующегося из диоксида углерода и связанного с ферментом биотина (106) [86]. Оказалось, что карбоксилированный продукт (107) относительно нестабилен, особенно при кислых pH. Поэтому его превращали в метиловый эфир (108) обработкой диазометаном. Протеолитическое расщепление дало $N^1$-метоксикарбонилбиотин (109), структура которого однозначно установлена рентгеноструктурным анализом [79] {схема (67)}.

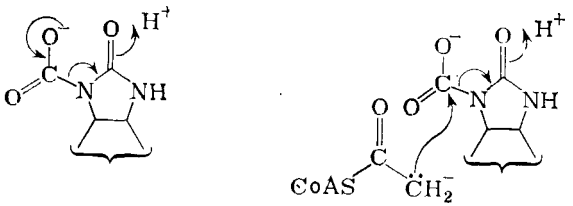



Общепризнано, что активной формой диоксида углерода, участвующей в реакции карбоксилирования, является бикарбонат-ион $HCO_3^-$. Выдвинуты различные механизмы (последовательный и согласованный) [72], объясняющие образование карбоксибиотина из биотина и ATP и $HCO_3^-$. На схеме (68) приведен согласованный механизм, находящийся в соответствии с экспериментами с использованием $^{18}O$. Этот механизм подразумевает нуклеофильную



атаку бикарбонат-иона амидным азотом. Бикарбонат согласованно нуклеофильно атакует γ-фосфорный атом ATP.

Для переноса диоксида углерода с карбоксибиотина на акцептор необходимо, чтобы карбоксильный атом углерода приобрел электрофильные свойства. Необходима также опосредованная ферментом активация молекулы акцептора как нуклеофильной частицы. Этот аспект уже обсуждался в связи с действием производных ацилкофермента А. Кажется вероятным, что общекислотный катализ [типа изображенного на схеме (69)], приводящий к протонированию карбонильного атома кислорода мочевины, может приводить к декарбоксилированию (в отсутствие нуклеофильной частицы) или к переносу карбоксила в присутствии подходящего нуклеофила.



(69)

Реакции карбоксилирования, проходящие с участием биотина, существенны при ферментативном синтезе щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной кислоты и диоксида углерода. Они имеют место также при ферментативном превращении ацетилкофермента А в более нуклеофильное соединение, малонилкофермент А, необходимый для синтеза жирных кислот, а также для близкого превращения пропионилкофермента А в метилмалонилкофермент А.

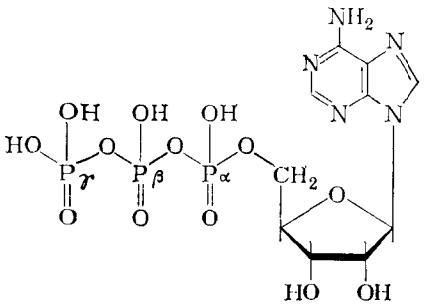
### 24.3.3.4. Аденозиндифосфат и -трифосфат

Аденозинтрифосфат участвует в большом числе метаболитических реакций и является ключевым интермедиатом в переносе энергии в живых организмах независимо от того, возникает ли эта энергия в процессе окисления, ферментации или фотосинтеза. В данном разделе будет рассмотрена роль аденозинтрифосфата (ATP) и аденозиндифосфата (ADP) в переносе фосфатных групп.

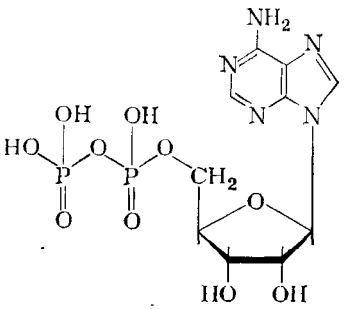
Структура ATP (и ADP) была установлена главным образом на основании данных гидролиза [87]. Так, гидролиз разбавленной щелочью давал аденозин-5′-фосфат и неорганический пирофосфат. Кислотный гидролиз, с другой стороны, приводил к быстрому высвобождению двух из трех фосфатных остатков в виде неорганического фосфата, а также аденина и рибозо-5-фосфата. Место присоединения трифосфатной группы к аденозину установлено посредством а) дезаминирования азотистой кислотой, в результате которого получен инозин-5′-фосфат, что доказывало отсутствие замещения по 6-аминогруппе и б) затраты 1 моль-экв периодата, что



доказывало отсутствие этерификации 2′- и 3′-гидроксильных групп. Титриметрические эксперименты подтвердили наличие трех первичных и одной вторичной фосфатных диссоциации. Ферментативное удаление одной из фосфатных групп приводило к образованию ADP. Для последнего были проведены аналогичные деградации и титрование кислотных групп. В результате были установлены структуры аденозинтрифосфата (**110**) и аденозиндифосфата (**111**).



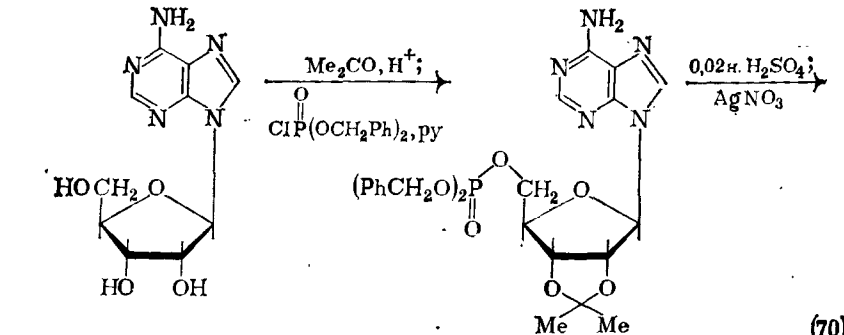
(**110**)



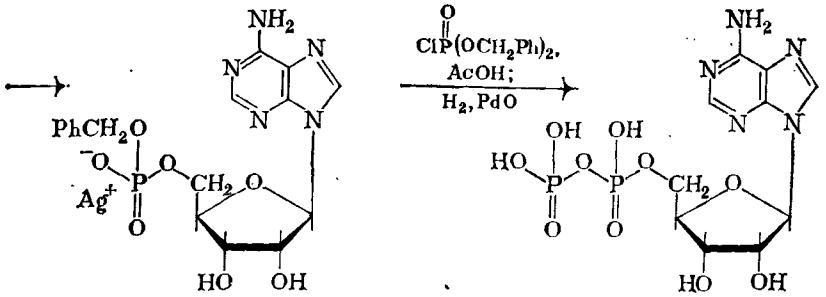
(**111**)

Сообщалось о многочисленных синтезах ATP и ADP [88]. В настоящее время они имеют лишь академический интерес, поскольку оба кофермента легко доступны в коммерческих масштабах и получаются экстракцией из биологических источников. С целью иллюстрации общих принципов, применявшихся в этих работах, ниже рассмотрены два таких синтеза. Пионерская работа Тодда и сотр. послужила для подтверждения структуры ATP и ADP. Описанный ими синтез [89] последнего соединения приведен на схеме (70). Синтез характерен применением защитных групп (как на углеводном остатке, так и на фосфате), для проведения реакции в нужном направлении и для применения классического метода получения смешанных ангидридов, а именно реакции соли кислоты с ацилхлоридом. Выходы в этом синтезе низки в силу нестабильности полностью этерифицированных фосфатных интермедиатов.

В противоположность этому синтез ATP из AMP, описанный Кораной [90] и модифицированный Смитом [91], представлял собой простую одностадийную реакцию без использования защитных групп. Для образования ангидридных связей использовался дициклогексилкарбодиимид {схема (71)}. Успех метода зависел от а) использования избытка ортофосфорной кислоты для обеспечения образования в качестве основных продуктов ди- и трифосфатов; б) применения растворимых триалкиламмониевых солей фосфомоноэфира и ортофосфорной кислоты и в) в первую очередь, от возможности разделения смеси продуктов, которая неизбежно образуется из-за отсутствия защитных групп, методами анионообменной хроматографии. Метод прост, сравнительно эффективен и

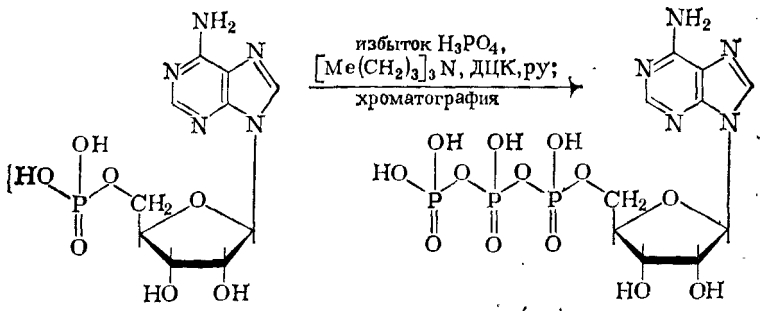


(70)



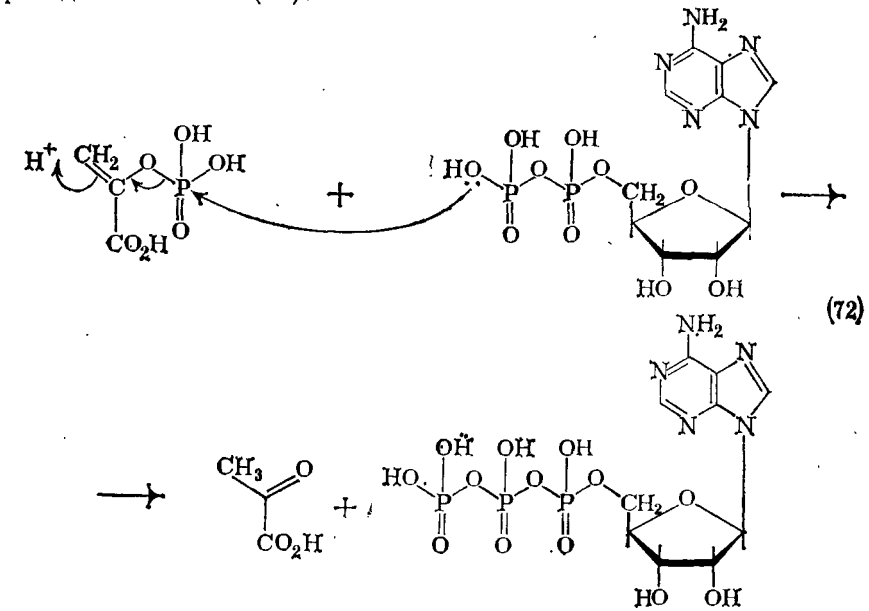
(111)

особенно удобен для приготовления ATP, изотопно меченного $^{32}P$ в β- и γ-фосфатных группах.



(110)

Биосинтетические процессы, приводящие к образованию ATP (превышающие скорость его деградации), многочисленны и включают окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи, окислительное фосфорилирование на уровне субстрата и фотосинтетическое фосфорилирование [92]. В каждом случае важнейшей стадией является фосфорилирование ADP и образование ATP, а не фосфорилирование аденозинмонофосфата. Типичная реакция между ADP и фосфорилирующим агентом, енолпируват-2-фосфатом, приведена на схеме (72).

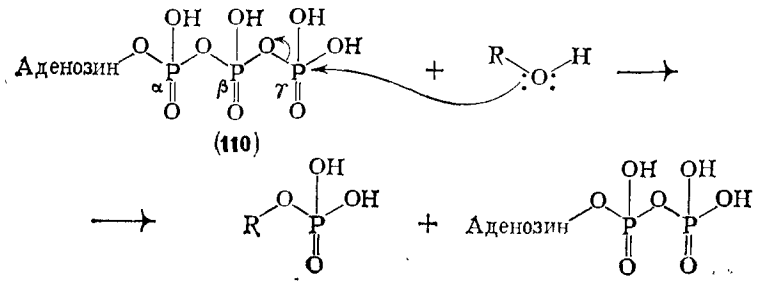


(72)

Аденозиндифосфат может образовываться в результате фосфорилирования аденозинмонофосфата (AMP) аденозинтрифосфатом в обратимой ферментативной реакции, катализируемой миокиназой {схема (73)}.

$$AMP + ATP \rightleftharpoons 2\,ADP \qquad (73)$$

Роль ATP в процессах переноса фосфатных групп лучше всего обсуждать (по крайней мере с химической точки зрения) с точки зрения решения вопроса, какой из атомов фосфора ATP атакуется нуклеофилом [93]. Наиболее часто встречающийся тип реакции катализируется киназами и включает атаку нуклеофильным субстратом γ-фосфорного атома ATP {схема (74)} с образованием фосфорилированного субстрата и ADP. Типичными нуклеофильными субстратами являются гидроксильные группы углеводов



(74)

(глюкоза, глицерин, нуклеозиды и т. д.), пантотеновая кислота, аминогруппа креатина и различные сложные эфиры фосфорной кислоты.

Другой пример представляет реакция, где нуклеофильный субстрат атакует α-фосфорный атом ATP. Реакции этого типа катализируются пирофосфорилазами и являются важной стадией биосинтеза нуклеотидных коферментов — диэфиров пирофосфорной кислоты. Некоторые из таких реакций обсуждались в связи с биосинтезом NAD+ {см. схему (2)}, FAD {схема (17)} и кофермента A {схема (48)}. В реакциях этого типа β- и γ-атомы фосфора ATP высвобождаются в виде пирофосфата, а α-атомы включаются во вновь образующийся диэфир пирофосфорной кислоты {схема (17)}.

$$\text{FMN} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{FAD} + \text{Пирофосфат} \qquad (17)$$

Третий тип реакций распространен в меньшей степени и заключается в нуклеофильной атаке β-фосфорного атома ATP. Участвующие в этой реакции ферменты называют пирофосфокиназами, а результатом реакции является перенос остатка дифосфата (β- и γ-атомы ATP) на нуклеофильный субстрат. Этот тип реакции обсуждался в связи с биосинтезом дигидрофолиевой кислоты {см. схему (39)} и имеет место также при биосинтезе тиаминдифосфата. Третий пример — синтез 5-фосфорибозил-1-пирофосфата из рибозо-5-фосфата и ATP {схема (75)}.

$$\text{Рибозо-5-фосфат} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{5-Фосфорибозил-1-пирофосфат} + \text{AMP} \qquad (75)$$

Для большей части приведенных выше реакций необходимы ионы $Mg^{2+}$. Полагают [94], что роль иона металла, образующего хелаты с трифосфатной группой ATP, состоит в облегчении нуклеофильной атаки ионизованных фосфатных групп и, возможно, в направлении нуклеофильной атаки на соответствующий атом фосфора.

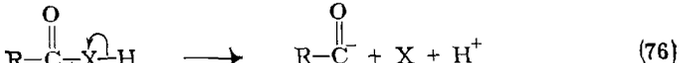
### 24.3.4. КОФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО В СТАБИЛИЗАЦИИ КАРБАНИОНОВ

Два кофермента, обсуждаемые в этом разделе, играют единственную в своем роде роль в определенных ферментативных реакциях. Химические структуры этих коферментов сильно различаются, однако анализ реакций, в которых они принимают участие, позволяет предположить, что их биологические функции близки по крайней мере в части, касающейся механизма их действия [95]. Роль этих коферментов можно свести к стабилизации карбанионов, в обычных условиях являющихся нестабильными или вовсе не образующимися частицами. Для выполнения этой функции коферменты должны образовывать ковалентные производные с соответствующими субстратами, причем природа производных должна быть такова, чтобы субстрат приобретал необходимый характер карбаниона. Пути достижения такого состояния рассматриваются в приведенных ниже разделах.

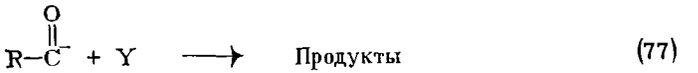


#### 24.3.4.1. Тиаминдифосфат

Тиаминдифосфат, иногда называемый кокарбоксилазой, участвует в качестве кофермента в ферментативном декарбоксилировании α-кетокислот, окислительном декарбоксилировании α-кетокислот и в образовании ацетоина. Брюсом и Бенковичем [95] суммированы аспекты механизмов, протекающих по общим схемам (76), (77), включающим маловероятный ацил-анион. Функция кофермента состоит в устранении необходимости этого ацил-аниона.

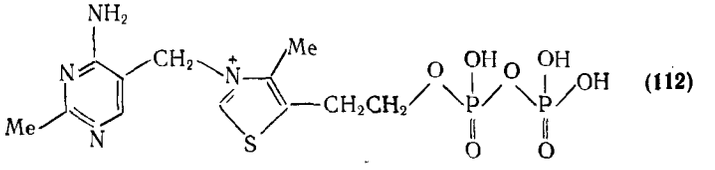


(76)



(77)

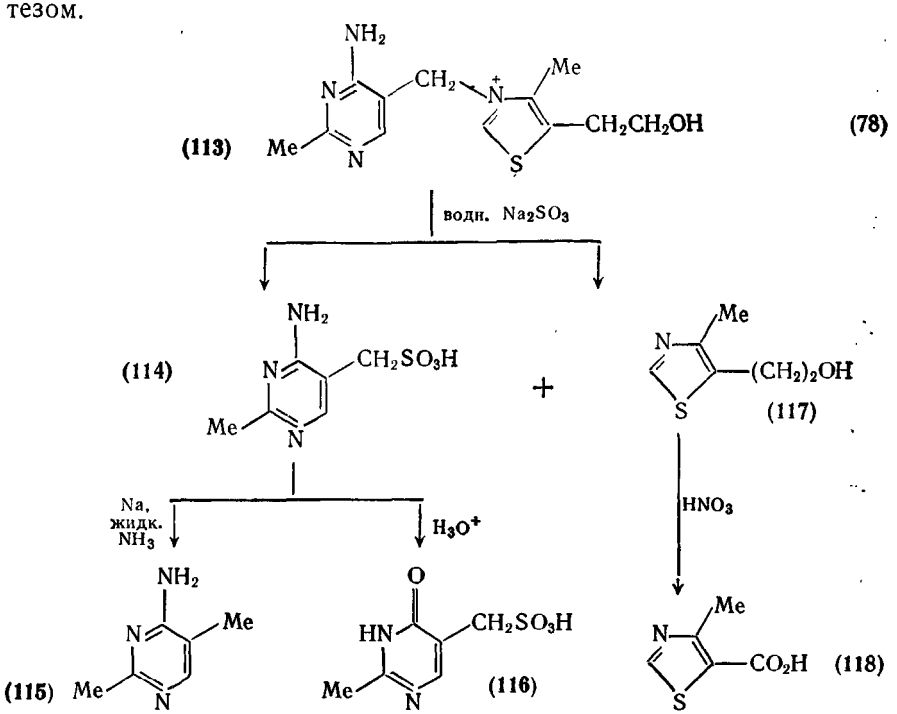
Впервые тиаминдифосфат был выделен в кристаллическом виде из дрожжей Ломанном и Шустером [96]. Этими же авторами установлена его структура (112) по данным гидролиза и титрования. Так, с помощью титрования было установлено, что в составе молекулы содержатся одна сильная и две более слабые кислотные группы. Рассмотрение величин $pK_a$, а также тот факт, что ферментативный гидролиз кофермента приводил к тиамину (113) и 2 экв. фосфорной кислоты, позволили сделать предположение, что кофермент представляет собой пирофосфорный эфир тиамина. Щелочной гидролиз и идентификация неорганического пирофосфата в продуктах гидролиза подтвердили это предположение. В результате расщепления кофермента сульфитом натрия было установлено, что дифосфатная группировка расположена в тиазольном фрагменте молекулы, поскольку продуктами такого расщепления были несодержащий фосфора пиримидин и тиазолдифосфат. Таким образом, было определено место присоединения дифосфатного остатка, позднее подтвержденное синтезом.



(112)

Структурная взаимосвязь между тиаминдифосфатом (112) и витамином тиамином (113) тем самым становится ясной. Целесообразно кратко рассмотреть данные, которые привели к установлению структуры последнего соединения {схема (78)} [97]. Наиболее значительной реакцией является расщепление витамина водным раствором сульфита натрия при комнатной температуре, приводящее к образованию двух компонентов. Первый из них был идентифицирован как производное пиримидина (114) в результате а) образования серной кислоты при обработке водой при

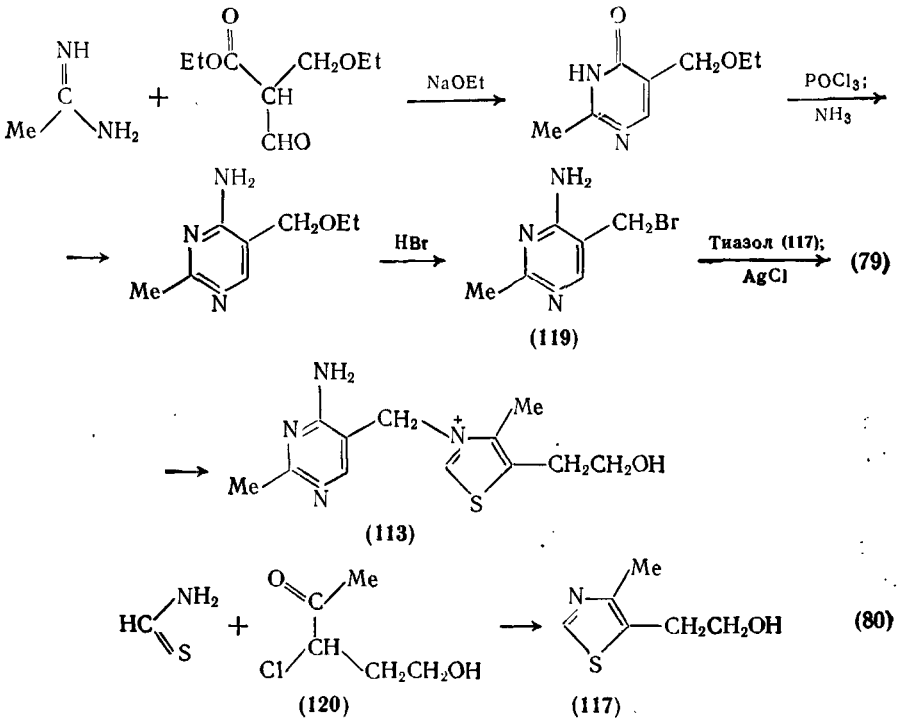
200 °C и сульфита натрия при сплавлении со щелочью; б) образования пиримидина (**115**) после обработки натрием в жидком аммиаке; структура (**115**) подтверждена синтезом; в) кислотного гидролиза, приводящего к третьему пиримидину (**116**), структура которого также была подтверждена синтезом. Второй компонент расщепления сульфитом натрия был идентифицирован как тиазол (**117**). Окисление этого соединения азотной кислотой приводило к потере одного атома углерода и образованию известной тиазолкарбоновой кислоты (**118**). Наличие в (**117**) гидроксильной группы было доказано ацилированием и замещением на хлор при обработке хлороводородной кислотой при 150 °C. Тиазол, следовательно, содержал α- или β-гидроксиэтильный заместитель в положении 5. Последний вариант более вероятен, поскольку а) витамин был оптически неактивен; б) тест (**117**) с иодоформом был отрицателен. Положение присоединения тиазольного цикла к пиримидиновому установлено после определения положения остатка сульфокислоты в пиримидине (**114**) и позднее было подтверждено синтезом.




Сообщалось о нескольких синтезах тиамина. Ниже суммированы два различных подхода к этой проблеме. В одном из них [98] {схема (79)} конденсация соответствующим образом замещенного функционализованного пиримидина (**119**) с тиазолом (**117**) непосредственно приводила к образованию витамина (**113**). Тиазол



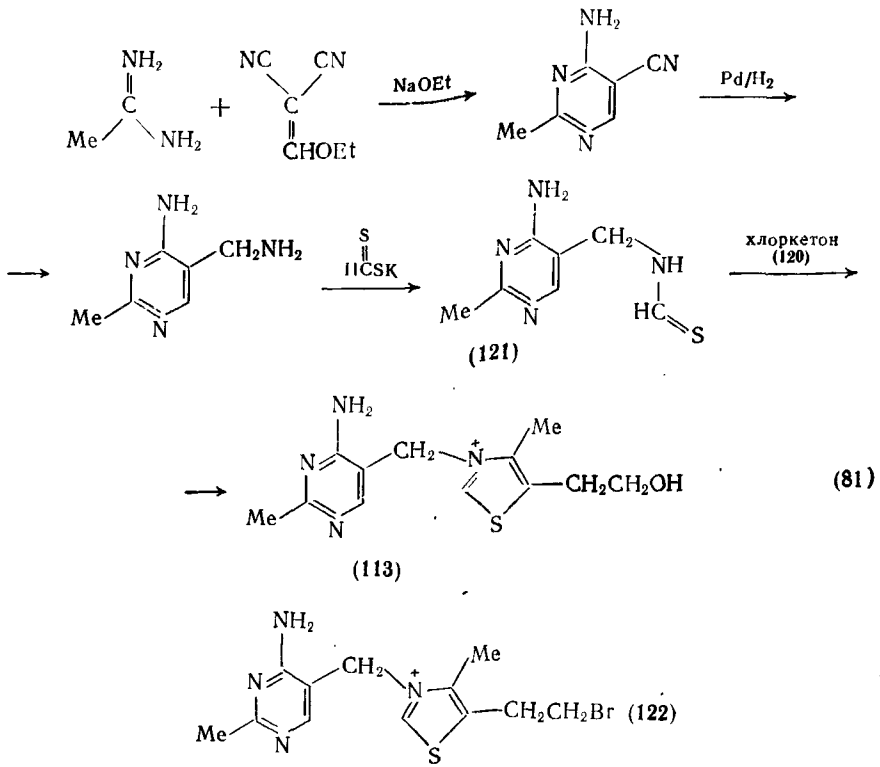
(**117**) для этой реакции готовили конденсацией хлоркетона (**120**) с тиоформамидом {схема (80)}.




Другой подход, впервые примененный Тоддом и др. [99], включал синтез 5-тиоформамидометилпиримидина (**121**), содержащего в качестве предшественника тиазольного цикла тиоформамидную группу. Конденсация (**121**) с хлоркетоном (**120**) непосредственно приводила к тиамину. Пиримидин (**121**) удобнее всего получать последовательностью реакций, начиная с ацетамидина и этоксиметиленмалононитрила {схема (81)} [100].

Синтезы кофермента тиаминдифосфата (**112**) [101] обычно заключались в фосфорилировании тиамина с использованием реагентов типа пирофосфата натрия в растворе ортофосфорной кислоты. Эти синтезы не очень эффективны. Сообщалось [102], что обработка 5-(β-бромэтильного) аналога тиамина (**122**) пирофосфатом серебра в растворе фосфорной кислоты при 100 °C приводила к образованию более чистого продукта с большим выходом.

Современным представлениям о биосинтезе тиаминдифосфата посвящен прекрасный обзор Брауна [103]. Принято рассматривать процесс биосинтеза в четыре стадии: а) превращение тиамина в тиаминдифосфат; б) ферментативный синтез тиамина из пиримидиновой и тиазольной составляющих; в) биосинтез пиримидиновой части молекулы и г) биосинтез тиазольной составляющей. Боль-



(81)

шая часть бактерий и близких к ним организмов способна осуществлять все четыре этапа биосинтеза. Клетки млекопитающих, напротив, лишены ферментов, необходимых для синтеза тиамина *de novo*. Тиамин, таким образом, является витамином; млекопитающие способны лишь к проведению превращения тиамина в метаболитически активный кофермент, тиаминдифосфат.

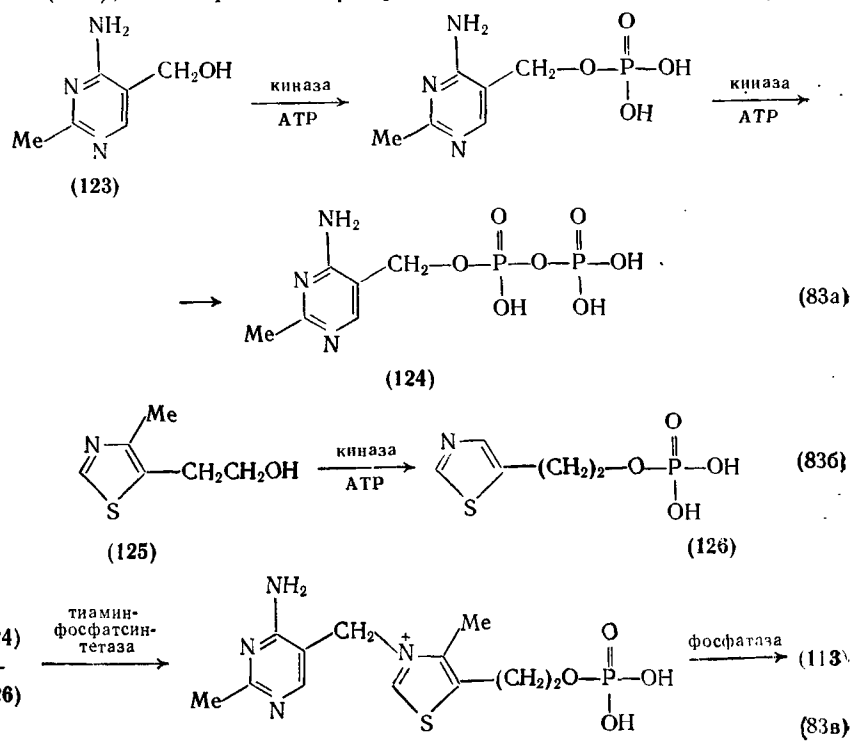
Образование тиаминдифосфата из тиамина происходит в результате переноса пирофосфатной группы с АТР на тиамин {схема (82)}. Использование АТР, меченного $^{32}P$ по терминальной фосфатной группе, что давало тиаминдифосфат, меченный только по терминальной фосфатной группе, а также тот факт, что частично очищенный препарат фермента может использовать для синтеза кофермента тиамин, но не тиаминмонофосфат, привели к выводу, что реакция (82) — действительно одностадийная реакция, катализируемая пирофосфокиназой, а не двустадийная, проходящая с участием двух простых киназ. Второй из указанных выше экспериментов особенно важен, поскольку, как показано ниже, первичный продукт синтеза тиамина из простых предшественников *de novo* — именно монофосфат. Поэтому перед завершающей стадией пирофосфорилирования должно проходить дефосфорилирование



тиаминмонофосфата, катализируемое, вероятно, внутриклеточными фосфатазами.

$$\text{Тиамин} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Тиаминдифосфат} + \text{AMP} \qquad (82)$$

Ферментативный синтез тиамина из пиримидинового и тиазольного предшественников приведен на схеме (83). Его общие принципы напоминают многие из принципов, лежащих в основе химических синтезов тиамина {ср. схему (79)}, тем, что тиазольный компонент (126), реагирующий как нуклеофил, конденсируется с пиримидиновым компонентом (124), несущим подходящую уходящую группу. Рядом исследователей было установлено, что такая уходящая группа представляет собой пирофосфат. Показано также, что пирофосфатный эфир (124) образуется из гидроксиметилпиримидина (123) в два отдельных этапа. Каждый из этих этапов заключается в переносе одного фосфатного остатка с АТР. Так, использование АТР, меченного $^{32}P$ по терминальной фосфатной группе, в этом случае привело к образованию пиримидинпирофосфата (124), в котором оба фосфатных остатка были мечеными.



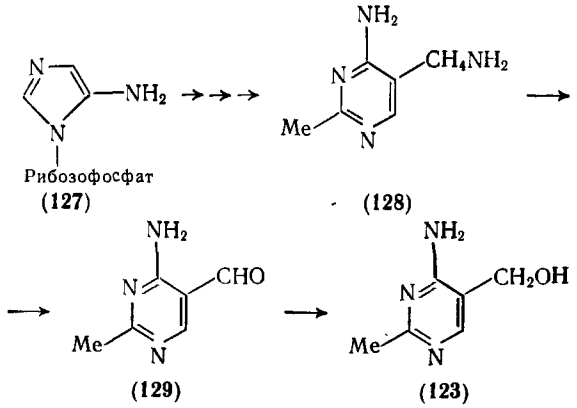
(83а)

(83б)

(83в)

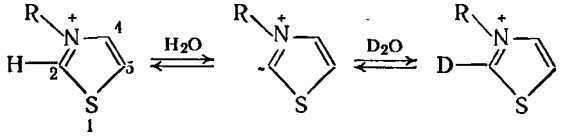
О подробностях стадий биосинтеза пиримидинового (123) и тиазольного (125) предшественников тиамина известно очень мало. В наиболее значительной работе по биосинтезу пиримидина [104]

предполагается, что в процессе биосинтеза пиримидинового компонента тиамина принимают также участие некоторые компоненты синтеза пуринов *de novo*. Имеются данные, что общим интермедиатом в этих процессах является 5-аминоимидазолрибонуклеотид (**127**). Далее было предложено [105], что интермедиатами являются 5-аминометил- и 5-формилпиримидиновые производные (**128**) и (**129**), хотя прямые данные об этом отсутствуют, и разумного механизма таких превращений не предложено. Частичная биосинтетическая последовательность, приведенная на схеме (84), может в связи с этим рассматриваться как спекулятивная. О биосинтезе тиазольного компонента известно еще меньше; исследования в этой области ограничены попытками идентификации возможных предшественников с использованием меченых соединений.



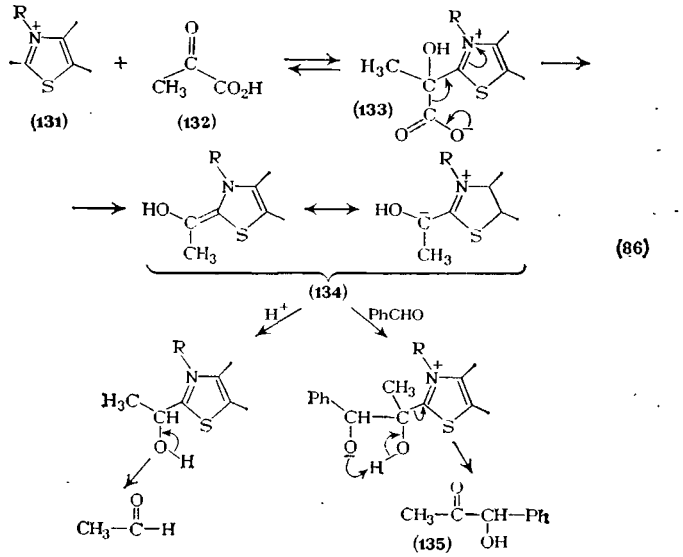

(84)

Ключ к пониманию механизма действия тиаминдифосфата как кофермента дали работы Бреслоу [106], показавшие, что протон, присоединенный к атому С-2 солей тиазолия, легко обменивается на дейтерий при растворении этой соли в $D_2O$. Поскольку интермедиат реакции, биполярный ион или илид (**130**), особенно легко образуется в случае *N*-бензилтиазолиевых солей, то разумно предположить, что пиримидиновое кольцо в коферменте играет близкую роль {схема (85)}.




(85)

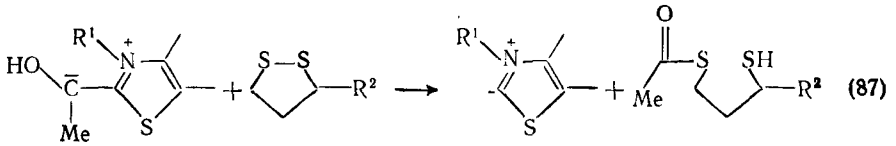
Илид (**131**), образовавшийся таким путем из тиаминдифосфата, — нуклеофильная частица, и поэтому может реагировать с карбонильными соединениями, такими как пировиноградная кислота (**132**), давая при этом α-гидроксикислоту (**133**). Декарбоксилирование последней должно проходить с образованием стабилизованного ацилкарбаниона (**134**) {схема (86)}. Имеются данные, полученные при изучении дейтериевого обмена, показывающие, что илид (**131**) является интермедиатом процесса декарбоксилирования пировиноградной кислоты *in vivo*. Карбанион (**134**) может легко претерпевать дальнейшие превращения, давая продукты, характерные для ферментативных реакций, проходящих с участием тиаминдифосфата в качестве кофермента. Так, протонирование должно приводить к образованию ацетальдегида и регенерации илида (**131**), как это и обнаруживается при ферментативном декарбоксилировании α-кетокислот. Реакция с альдегидом типа бензальдегида приводит к «перекрестной» ацилоиновой конденсации и образованию ацилоина (**135**). Последний был выделен из продуктов дрожжевого брожения, к которым добавлен бензальдегид. Роль илида (**131**) в ацилоиновой реакции сходна с ролью цианида в известной бензоиновой конденсации. В этом случае цианид действует по отношению к карбонильной группе как эффективный нуклеофил и стабилизует в возникающем аддукте отрицательный заряд на атоме углерода [107]. Тот факт, что карбанион (**134**) действительно является интермедиатом ферментативной ацилоиновой реакции, доказан синтезом протонированной формы 2-(1′-гидроксиэтил)тиаминдифосфата [108] и способностью последнего вступать в ацилоиновую реакцию с альдегидами в присутствии неочищенных ферментных препаратов {схема (86)}.




(86)

Более сложной представляется роль тиаминдифосфата в окислительном декарбоксилировании α-кетокислот. В этом случае в состав полиферментной системы помимо тиаминдифосфата входят также липоевая кислота, кофермент А и NAD+. В результате происходит перенос с пировиноградной кислоты «ацетальдегидного

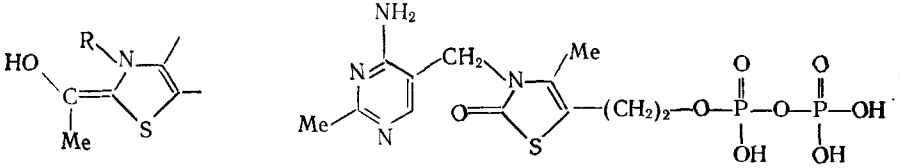
эквивалента», превращающегося в ацетильную группу кофермента А. В окислении участвуют карбанион (**134**), образующийся в соответствии со схемой (86), и липоевая кислота, сокращенно обозначенная (**136**). В результате образуются ацетилдигидролипоевая кислота (**137**) и илид (**131**) {схема (87)}. Ацетильная группа переносится далее на кофермент А, а роль $NAD^+$ состоит в окислении дигидролипоевой кислоты в липоевую [109].



(87)

(**134**) (**136**) (**131**) (**137**)

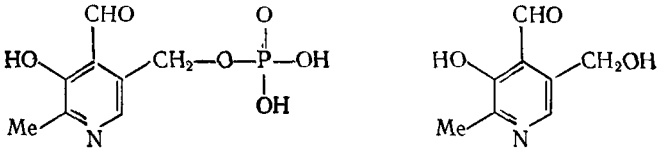
Интересная работа [110] также свидетельствует в пользу участия карбанионов типа (**134**) в тиаминдифосфат-зависимых ферментативных реакциях. Авторы показали, что тиазолон (**138**), который можно рассматривать в качестве аналога переходного состояния карбаниона (**134**) [111], очень прочно связывается с пируватоксидазным ферментным комплексом. При этом константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса по крайней мере в $10^4$ раз меньше соответствующей константы фермент-субстратного комплекса в тех же условиях. Это наблюдение свидетельствует в пользу того, что енаминная форма карбаниона (**134**) действительно участвует в ферментативной реакции.



(**134**) (**138**)

### 24.3.4.2. Пиридоксальфосфат

Пиридоксальфосфат (**139**) — кофермент, участвующий в большом числе реакций α-аминокислот, включая рацемизацию, декарбоксилирование, трансаминирование и элиминацию или замещение у β- и γ-атомов углерода [112]. С точки зрения механизма все эти реакции могут быть классифицированы как требующие

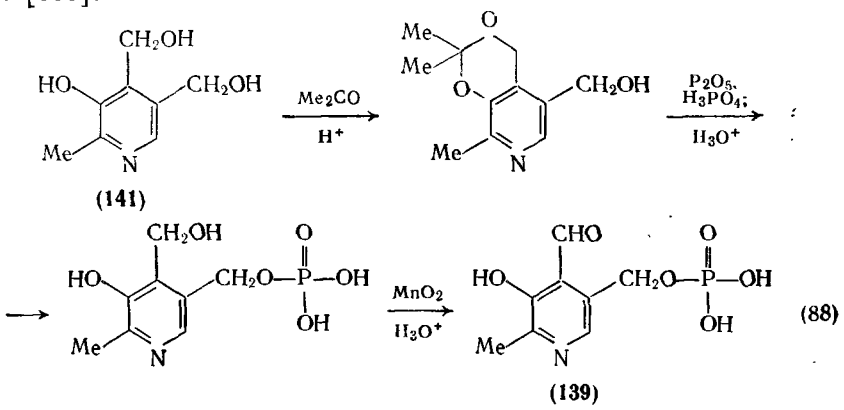


(**139**) (**140**)



стабилизации карбаниона в α- и β-положениях α-аминокислоты. Пиридоксальфосфат выполняет это требование посредством образования имина между α-аминогруппой аминокислоты и альдегидной группой кофермента. В этом случае, как показано ниже, становится возможной эффективная делокализация отрицательного заряда карбаниона.

Пиридоксальфосфат, который иногда называют кодекарбоксилазой, был впервые выделен из дрожжей [113] и оказался идентичным синтетическому образцу, полученному с низким выходом в результате фосфорилирования пиридоксаля (**140**) фосфорилхлоридом в присутствии воды [114]. Точное положение фосфатного остатка установлено методом элиминирования; структура была окончательно подтверждена прямым синтезом [115], приведенным на схеме (88). Другие синтетические работы суммированы в обзоре [116].



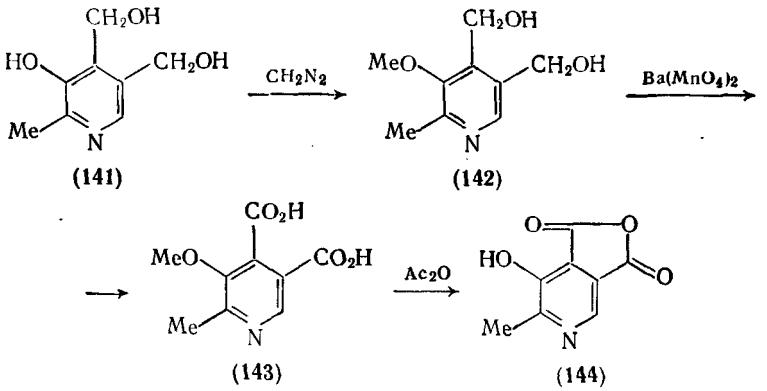
(**141**)

(**139**)

(88)

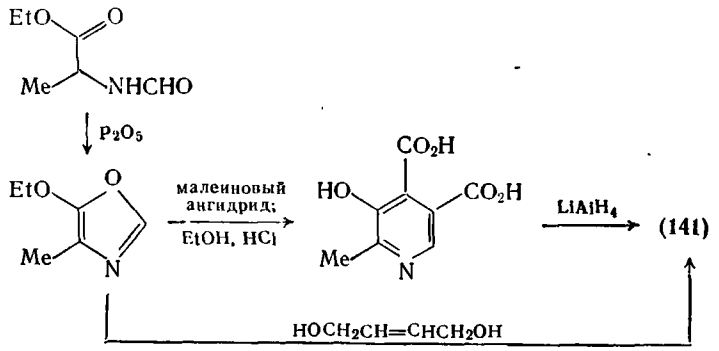
Исходным веществом во всех этих синтезах обычно является витамин пиридоксол (**141**) или близкий к нему пиридоксамин (**145**). В связи с этим представляется целесообразным кратко рассмотреть химические свойства этих соединений, которые вместе с пиридоксалем (**140**) часто называют пиридоксином, или витамином $B_6$. Структура пиридоксола (**141**) была независимо установлена двумя группами исследователей [117]. На схеме (89) приведены важнейшие реакции этого определения. Наличие 3-гидроксипиридинового ядра установлено из характеристичного УФ-спектра, присутствие трех гидроксильных групп — из образования триацетата и трибензоата. Из этих групп только одна может метилироваться диазометаном с образованием метилового эфира (**142**). Осторожное окисление перманганатом бария дает дикарбоновую кислоту (**143**), содержащую все атомы углерода исходного соединения, включая *C*-метильную группу. Дикарбоновая кислота легко переходит в ангидрид (**144**). Характер замещений в пиридиновом кольце определен на основании наблюдения, что пиридоксол (**141**), но не его метиловый эфир (**142**) давал положительный тест на

фенол по Гиббсу, показывая тем самым, что *пара*-положение относительно фенольной гидроксильной группы не замещено.




(89)

Сообщалось о многочисленных синтезах пиридоксола; эти данные приведены в обзоре Осбонда [116]. В качестве примера на схеме (90) приведен один из таких синтезов.

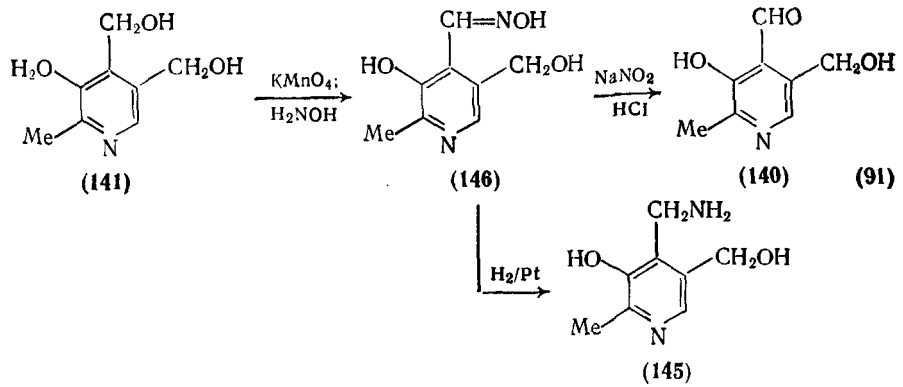



(90)

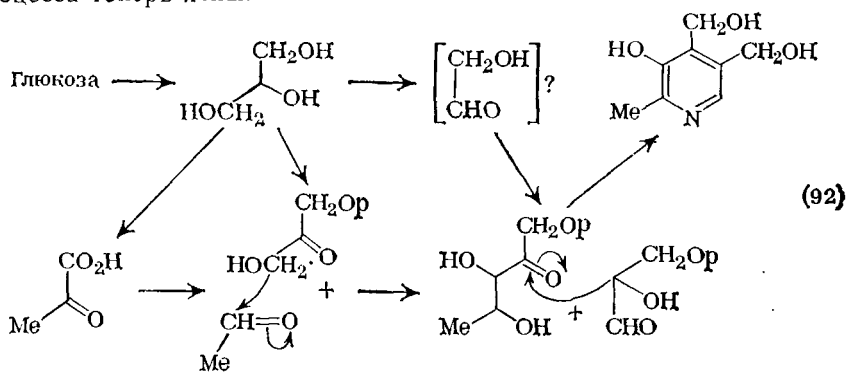
Взаимосвязь между пиридоксолом (**141**), пиридоксалем (**140**) и пиридоксамином (**145**) установлена [118] в результате превращений, представленных на схеме (91). Осторожное окисление пиридоксола перманганатом калия дало пиридоксаль, выделенный в виде оксима (**146**). Обработка последнего азотистой кислотой привело к пиридоксалю, а каталитическое восстановление — к пиридоксамину. Сообщалось и о других методах синтеза этих соединений [116].

До недавнего времени о биосинтезе пиридоксальфосфата, по крайней мере в части, касающейся образования гетероциклического кольца, было известно мало [119]. Биосинтез пиридоксина (витамина $B_6$) *de novo* — процесс, свойственный исключительно микроорганизмам. Попытки установления предшественников, интермедиатов и путей его биосинтеза были безуспешными ввиду того, что большинство организмов производит лишь очень малые





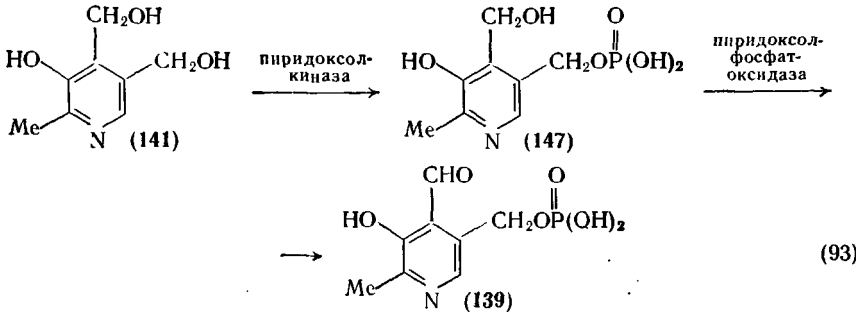

количества витамина. Биосинтез пиридоксола, приведенный на схеме (92), выяснен лишь недавно [120] с использованием мутантных штаммов *E. coli*. Хотя некоторые детали превращения глицерина в пиридоксол все еще требуют выяснения, основные черты этого процесса теперь ясны.




(92)

Предприняты значительные усилия по изучению взаимопревращений различных форм витамина $B_6$ и их фосфорилированных производных [121]. Большая часть данных относится к тканям млекопитающих, но на основании этих результатов можно предположить наличие сходных механизмов и для других организмов. Основной путь от пиридоксола (**141**) до пиридоксальфосфата (**139**) включает, по всей вероятности, превращение пиридоксола в соответствующий фосфат (**147**) специфической внутриклеточной киназой, за чем следует окисление этого соединения с образованием пиридоксальфосфата {схема (93)}.

Роль пиридоксальфосфата (**139**) в ферментативных реакциях α-аминокислот была выяснена в результате элегантных работ групп А. Е. Браунштейна [112] и Снелла [122]. Две эти группы исследователей независимо предложили общий механизм пиридоксальфосфат-зависимых ферментативных реакций, в основном на основании изучения неферментативных реакций между амино-

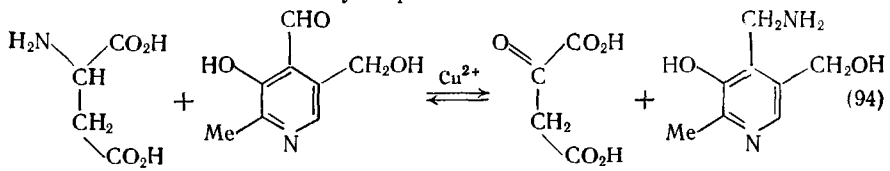



(93)

кислотами и пиридоксалем (**140**). Прежде чем перейти к детальному рассмотрению этого механизма, следует кратко отметить функциональные группы кофермента, необходимые для связывания апоферментом.

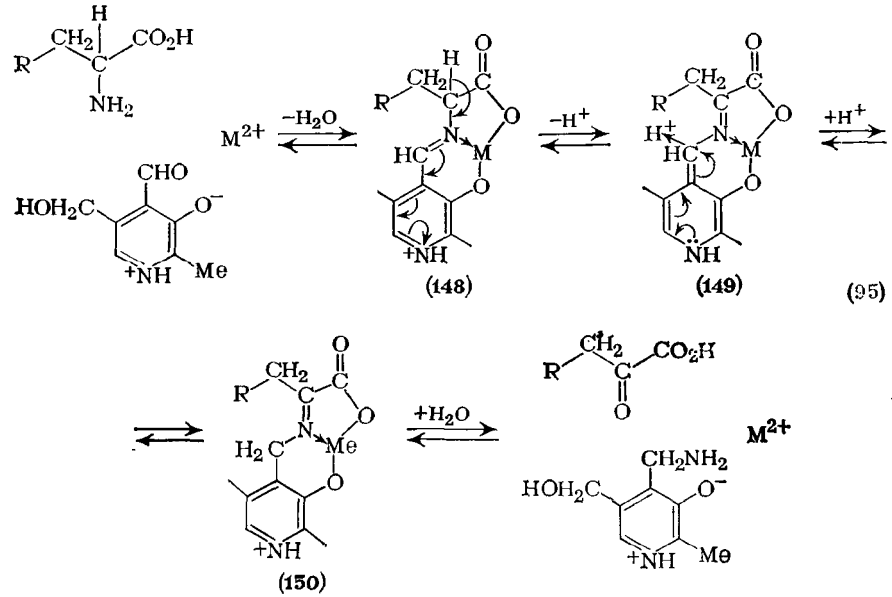
Нефосфорилированные аналоги кофермента не связываются апоферментом, в то время как сильно связывающиеся фосфонатные аналоги каталитически неактивны. Особо важной является альдегидная группа. Первоначально она участвует в образовании имина с ε-аминогруппой остатка лизина. УФ-спектр комплекса типичен для основания Шиффа; восстановление комплекса борогидридом натрия приводит к необратимой модификации лизинового остатка. Фенольная гидроксильная группа, по-видимому, не принимает участия в связывании, так как соответствующий метиловый эфир связывается хорошо, хотя образующийся в результате холофермент и неактивен. И, наконец, метильная группа не участвует в связывании: комплекс апофермента с 2-норпиридоксальфосфатом активнее комплекса с обычным коферментом.

Упомянутые выше модельные эксперименты привели Браунштейна и Снелла к предположению, что важнейшей чертой пиридоксальфосфат-зависимых реакций является образование имина (основания Шиффа) между α-аминогруппой аминокислоты и альдегидной группой пиридоксальфосфата. Это предположение получило широкое признание. В модельных экспериментах обычно использовался пиридоксаль, поливалентный ион металла ($Ca^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Al^{3+}$) и подходящий субстрат — аминокислота. Типичная реакция трансаминирования, которая может быть проведена таким путем, изображена на схеме (94). Для достижения полноты реакции необходим большой избыток субстрата.




(94)

Механизм, предложенный для объяснения неферментативных реакций этого типа, приведен на схеме (95) [123]. Движущей силой реакции является стабилизация переходного состояния образования карбаниона посредством делокализации заряда в сопряженной системе. Функция иона металла в модельных системах заключается, по-видимому, в стабилизации промежуточного имина (**148**), обеспечении планарности сопряженной системы и облегчении высвобождения протона за счет увеличения индуктивного эффекта α-углеродного атома.



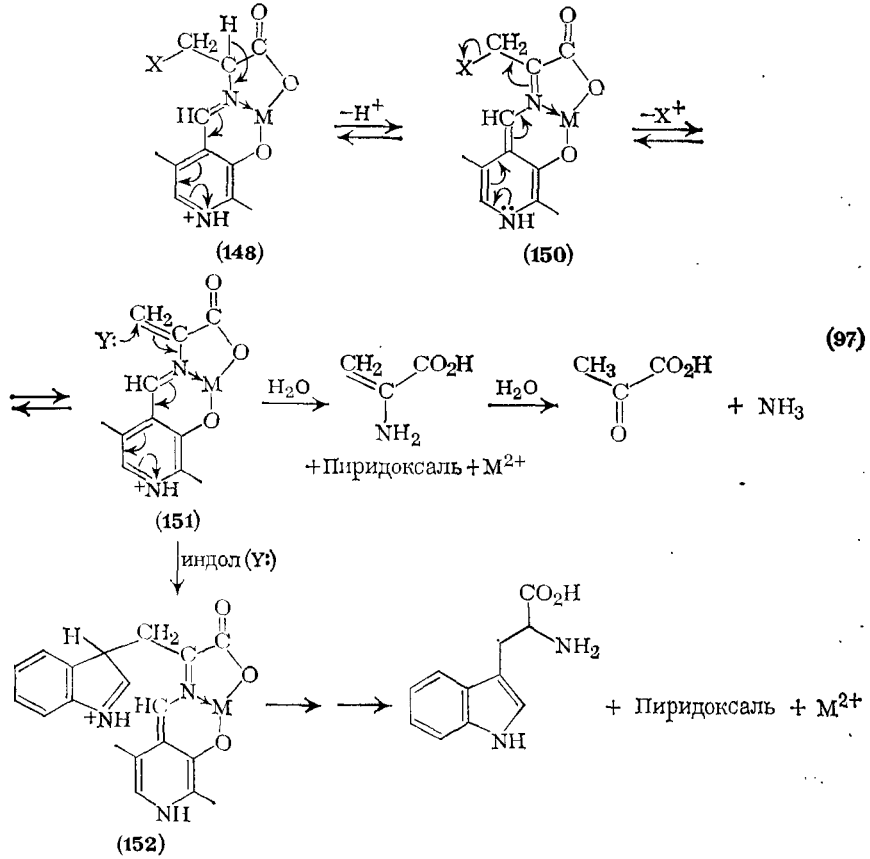

(95)

Для демонстрации реакций рацемизации, элиминирования и конденсации были проведены аналогичные модельные эксперименты. Тип реакции, протекающей в модельной системе, определяется экспериментальными условиями и природой субстратов. Так, реакции трансаминирования, приведенной на схеме (94), благоприятствуют пониженные значения pH (pH ≈ 5), а рацемизации — повышенные (pH ≈ 10). Использование в качестве аминокислоты серина, содержащего в β-положении уходящую группу, в присутствии соответствующего нуклеофила, такого как индол, приводит к неферментативному превращению серина в триптофан {схема (96)}.

$$\text{Серин} + \text{Пиридоксаль} + \text{Индол} \overset{Al^{3+}}{\rightleftharpoons} \text{Триптофан} + \text{Пиридоксаль} \qquad (96)$$

К этим реакциям приложимы механизмы, близкие к изображенному на схеме (95). Так, рацемизация является следствием реакции, обратной той, которая приводит к (**148**) и (**149**). Возвращение протона в α-положение (рацемизация) или на альдегидный атом углерода (трансаминирование) определяется, по-видимому, значением pH раствора. Для реакций элиминирования и конденса-

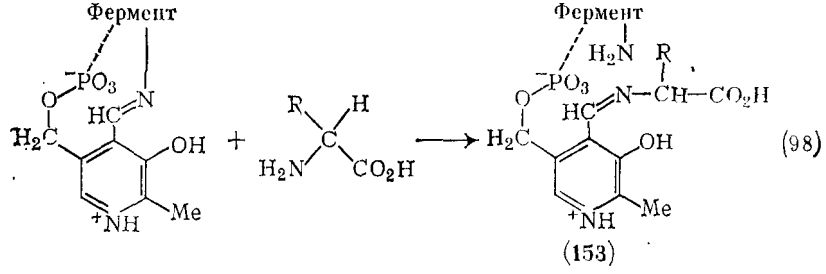
ции справедлив расширенный механизм, приведенный на схеме (97). В этом случае промежуточный имин (150) может претерпевать элиминирование, приводящее к интермедиату (151); гидролиз последнего дает пировиноградную кислоту и аммиак. Реакция (151) с индолом, с другой стороны, приводит к интермедиату (152), а затем к триптофану.



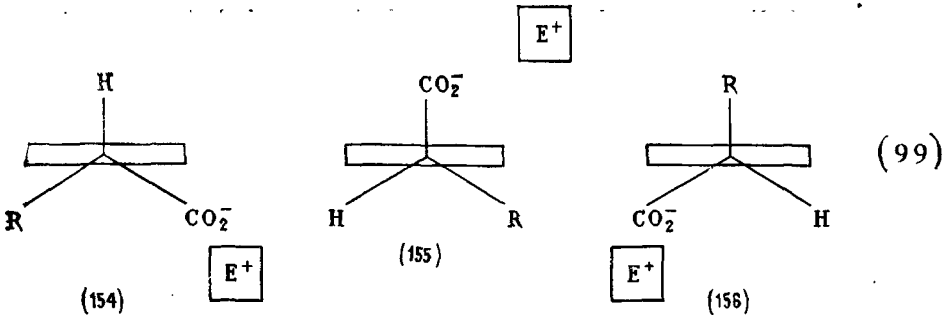

Декарбоксилирования α-аминокислот в модельных системах не происходит. Показано, что ионы металлов ингибируют эту реакцию. Последнее не является неожиданным, поскольку карбоксильная группа образует часть хелатной структуры, а карбоксилат-ион делит свою пару электронов с ионом металла. Можно ожидать, что эти факторы будут понижать тенденцию к элиминированию диоксида углерода. Хелаты металлов не способны принять предпочтительную для декарбоксилирования конформацию (см. ниже) и это, вероятно, вносит основной вклад в их сопротивление протеканию декарбоксилирования.



Успех модельных экспериментов с участием пиридоксаля и ионов металлов в дублировании многих ферментативных реакций α-аминокислот позволил предположить, что ионы металлов могут играть важную роль и в соответствующих ферментативных реакциях. Однако в действительности это, по-видимому, не так; получены высокоочищенные препараты ферментов, требующие пиридоксальфосфат, но не нуждающиеся для проявления полной активности в ионах металла [124]. Функция иона металла в модельной системе состоит, вероятно, в поддержании правильной геометрии промежуточного имина и тем самым в облегчении делокализации заряда. В ферментативной реакции эту функцию выполняет сам фермент. За исключением этой особенности, складывается впечатление, что роль пиридоксальфосфата очень близка к роли пиридоксаля в модельной системе. Поскольку реакция образования холофермента из кофермента и апофермента заключается в образовании имина пиридоксальфосфата с ε-аминогруппой лизина, образование имина (153), участвующего в ферментативной реакции, должно происходить в результате переаминирования, имеющего место в присутствии аминокислотного субстрата {схема (98)}.

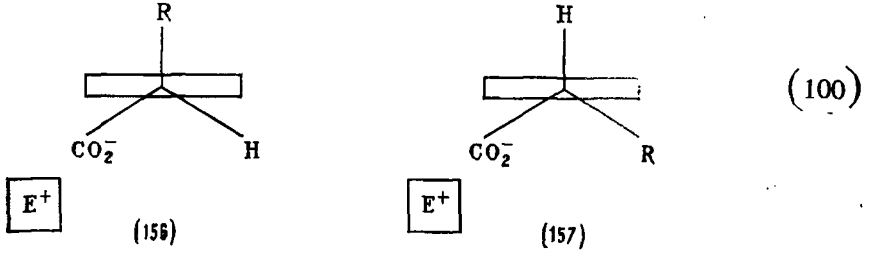



Было показано наличие строгого стереохимического контроля реакций, катализируемых пиридоксальфосфатом [125]. Важным фактором «активации» σ-связей π-системой является стереохимическое расположение σ-связи относительно близрасположенных π-орбиталей. В соответствии с этим Донатаном предложено [126], что разрывающаяся σ-связь должна лежать в плоскости, перпендикулярной плоскости π-системы кофермента. Именно такая конформация позволяет достичь максимального σ — π-перекрывания и максимально уменьшить энергию переходного состояния разрыва связи. Донатан предположил далее, что конформация может контролироваться апоферментом, возможно посредством связывания карбоксилат-иона, что имин (153) может принимать одну из трех возможных конформаций. Последние схематически представлены на схеме (99). Здесь прямоугольником обозначена плоскость пиридинового кольца; глаз наблюдателя направлен вдоль связи $C^{\alpha}$ — N. В каждом случае вертикальной линией изображена лабильная σ-связь. Таким образом, конформация (154) благоприятствует трансаминированию, (155) — декарбоксилированию, а (156) — удалению R (как в серингидроксиметилазе).




(99)

Интересным подтверждением этих идей явилось наблюдение, что смена конфигурации аминокислоты (*L*- на *D*-) приводит к тому, что конформация (**156**), благоприятствующая уходу R, заменяется конформацией (**157**), способствующей потере H и трансаминированию {схема (100)}. Перекрестную реакционную способность можно продемонстрировать на примере *L*-серингидроксиметилазы: последняя катализирует реакцию переаминирования *D*-аланина [125].




(100)

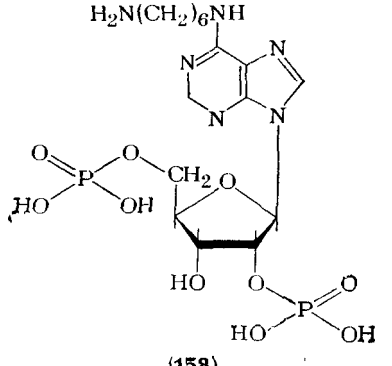
### 24.3.5. КОФЕРМЕНТЫ КАК СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛИГАНДЫ В АФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод афинной хроматографии основан на единственной в своем роде биологической специфичности взаимодействия между биологическими макромолекулами, такими как ферменты, и лигандами — субстратами, специфическими ингибиторами и коферментами. Этот мощный метод приобретает все возрастающее значение для очистки ферментов. Обычным экспериментальным приемом в связи с этим является образование ковалентной связи между специфическим лигандом и нерастворимой матрицей-носителем. Результирующий материал пакуют в колонку, на которой, в принципе, будет сорбироваться только фермент (ферменты), обладающий значительным сродством к лиганду, в то время как все другие белки будут беспрепятственно проходить через нее. Элюция специфически адсорбированного белка достигается изменением состава растворителя, благоприятствующим диссоциации комплекса фермент-лиганд [127].



Возрастает применение афинной хроматографии на группоспецифических адсорбентах. Так, путем использования лиганда, специфичного в отношении группы ферментов, можно избежать ряда трудностей, присущих созданию более специфичного лиганда. При использовании такого, менее специфичного, адсорбента в афинной хроматографии несколько уменьшается селективность адсорбции, что, однако, можно компенсировать правильным подбором условий элюции [128]. Коферменты представляют собой почти идеальные группо-специфические лиганды, поскольку они обычно взаимодействуют с данной группой ферментов. У каждого из таких ферментов имеется по крайней мере два специфических центра связывания — один для кофермента (общий для всех членов группы) и один (или более) — для данного специфического субстрата.

Почти все из обсуждавшихся выше коферментов были использованы в афинной хроматографии (см. обзор Лове и Дина [127]). Проделана большая работа по выделению дегидрогеназ с использованием пиридиннуклеотидных коферментов NAD+ или NADP+. В ранних экспериментах использовался относительно малоспецифичный способ присоединения лиганда к матрице. Типичные условия представляли собой карбодиимид-промотируемую конденсацию кофермента (NAD+ или NADP+) с ω-карбоксиалкилпроизводными Сефарозы. Полагают, что реакция заключается в образовании амидной связи между 6-аминогруппой пуринового компонента кофермента {см. структуры (**1**) и (**2**)} и карбоксильной группой «ножки», присоединенной к матрице носителя [129]. Позднее [130] были использованы простые аналоги NAD+ или NADP+, эффективно связывающиеся с соответствующими ферментами. Так, производное аденозин-2′,5′-дифосфата (**158**) присоединялось к Сефарозе через терминальную аминогруппу бокового радикала. Полученный таким образом носитель специфично адсорбировал NADP+-зависимые ферменты, например глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу или 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, в то время как связывания NAD+-зависимых ферментов, в частности




(158)

лактатдегидрогеназы, не происходило. Элюция адсорбированных ферментов производилась путем добавления в растворитель NADP+.

Другой подход заключается в использовании специфических ингибиторов ферментов, структурно родственных коферменту. Так, метотрексат (58) является мощным ингибитором дигидрофолатредуктазы, причем это его свойство мало меняется в случае ферментов, выделенных из различных источников. Это соединение было ковалентно присоединено к 6-аминоэтилСефарозе путем конденсации с карбодиимидом, затрагивающей карбоксильную группу метотрексата. Полученный сорбент был использован для крупномасштабного выделения дигидрофолатредуктазы из *E. coli*. Промывка колонки 1 мольным раствором хлорида натрия вызвала удаление менее чем 1 % связанного фермента, а последующая элюция тем же раствором, содержавшим дигидрофолиевую кислоту, позволила достичь количественного выхода фермента [131].

## ЛИТЕРАТУРА


1. *M. Dixon and E. C. Webb*, 'Enzymes', Longmans, London, 1958, chapter IX. (*М. Диксон, Э. Уебб.* Ферменты. М., Мир, 1966; см. также перевод нового издания. М., Мир, 1982. Т. 1—3).
2. *G. H. Hitchings and J. I. Burchall*, Adv. Enzymol., 1965, **27**, 417; *H. C. S. Wood*, in 'Chemistry and Biology of Pteridines', ed. W. Pfleiderer, de Gruyter, Berlin, 1976, p. 27.
3. *R. H. Abeles and A. L. Maycock*, Accounts Chem. Res., 1976, **9**, 313.
4. *A. White, P. Handler, and E. L. Smith*, 'Principles of Biochemistry', 5th edn., McGraw-Hill, New York, 1973, chapters 14—16. (*А. Уайт, П. Хэндлер, Э. Л. Смит.* Основы биохимии. М., Мир, 1982).
5. *T. P. Singer and E. B. Kearney*, Adv. Enzymol., 1954, **15**, 79.
6. *F. Schlenk*, J. Biol. Chem., 1942, **146**, 619.
7. *R. U. Lemieux and J. W. Loun*, Canad. J. Chem., 1963, **41**, 889.
8. *L. J. Haynes, N. A. Hughes, G. W. Kenner, and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1957, 3727; *N. A. Hughes, G. W. Kenner and A. R. Todd*, ibid., 1957, 3733.
9. *A. Kornberg and W. E. Pricer*, J. Biol. Chem., 1950, **186**, 557.
10. *J. Preiss and P. Handler*, J. Biol. Chem., 1958, **233**, 488 and 493.
11. *M. E. Pullman, A. San Pietro, and S. P. Colowick*, J. Biol. Chem., 1954, **206**, 129.
12. *H. E. Dubb, M. Saunders, and J. H. Wang*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 1767; *R. F. Hutton and F. H. Westheimer*, Tetrahedron, 1958, **3**, 73.
13. *H. R. Levy, P. Talalay, and B. Vennesland*, in 'Progress in Stereochemistry', ed. P. B. D. de la Mare and W. Klyne, Butterworths, London, 1962, vol. III, chapter 8.
14. *J. W. Cornforth, G. Ryback, G. Popjak, C. Donninger, and G. Schroepfer*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1962, **9**, 371.
15. *S. P. Colowick, J. van Eys, and J. H. Park*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1966, vol. 14, chapter 1.
16. *H. R. Levy, F. A. Loewus, and B. Vennesland*, J. Amer. Chem. Soc., 1957, **79**, 2949.
17. *H. Sund*, in 'Biological Oxidations', ed. T. P. Singer, Interscience, New York, 1968, p. 603.
18. *H. R. Mahler*, in 'Symposium on Free Radicals in Biological Systems', Stanford Biophysics Lab., California, 1960.





19. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, 'Bioorganic Mechanisms', Benjamin, New York, 1966, vol. II, p. 343. (*Т. Брюс, С. Бенкович.* Механизмы биорганических реакций. М., Мир, 1970).
20. *G. A. Hamilton*, in 'Progress in Bioorganic Chemistry', ed. E. T. Kaiser and F. J. Kézdy, Wiley-Interscience, New York, 1971, vol. 1, p. 83.
21. *M. Klingenberg*, in 'Methods of Enzymatic Analysis', ed. H. U. Bergmeyer and K. Gawehn, Academic Press, 1974, vol. 4, p. 2045.
22. *T. Wagner-Jauregg*, in 'The Vitamins', ed. W. H. Sebrell and R. S. Harris, Academic Press, New York, 1972, vol. V, p. 3.
23. *R. Kuhn, H. Rudy, and F. Weygand*, Ber., 1936, **69**, 1543.
24. *S. M. H. Christie, G. W. Kenner and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1954, **46**.
25. *J. G. Moffatt and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 3756.
26. *M. K. Horwitt and L. A. Witting*, in 'The Vitamins', ed. W. H. Sebrell and R. S. Harris, Academic Press, New York, 1972, vol. V, p. 53.
27. *G. W. E. Plaut*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 11.
28. *T. Paterson and H. C. S. Wood*, J. C. S. Perkin I, 1972, 1051.
29. *P. Hemmerich*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1976, **33**, 451.
30. *T. C. Bruice*, in 'Progress in Bioorganic Chemistry', ed. E. T. Kaiser and F. J. Kézdy, Wiley-Interscience, New York, 1976, vol. 4, p. 1.
31. *V. Massey, F. Müller, R. Feldberg, M. Schuman, P. A. Sullivan, L. G. Howell, S. G. Mayhew, R. G. Matthews, and G. P. Foust*, J. Biol. Chem., 1969, **244**, 3999.
32. *C. T. Walsh, A. Schonbrunn, and R. H. Abeles*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 6855.
33. *J. W. Hastings, C. Balny, C. Le Peuch, and P. Douzou*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, **70**, 3468.
34. *W. C. Kenney, W. H. Walker, and T. P. Singer*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 4510.
35. *W. H. Walker, T. P. Singer, S. Ghisla, and P. Hemmerich*, European J. Biochem., 1972, **26**, 279.
36. *Y. Hatefi*, Adv. Enzymol., 1963, **25**, 275.
37. *R. A. Morton, U. Gloor, O. Schindler, G. M. Wilson, L. H. Chopard-dit-Jean, F. W. Hemming, O. Isler, W. M. F. Leat, J. F. Pennock, R. Rüegg, U. Schwieter, and O. Wiss*, Helv. Chem Acta, 1958, **41**, 2343.
38. *A. F. Wagner and K. Folkers*, 'Vitamins and Coenzymes', Intercience, New York, 1964, p. 443.
39. *U. Gloor, O. Schindler, and O. Wiss*, Helv. Chim. Acta, 1960, **43**, 2089.
40. *R. Bentley and I. M. Campbell*, in 'The Chemistry of the Quinonoid Compounds', Interscience, Lindon, 1974, pt. 2, p. 692.
41. *L. Szarkowska*, Arch. Biochem. Biophys., 1966, **113**, 519.
42. *Y. Hatefi, A. G. Haavik, L. R. Fowler, and D. E. Griffiths*, J. Biol. Chem., 1962, **237**, 2661.
43. *E. C. Slater*, Quart. Rev. Biophys., 1971, **4**, 35; B. Chance, FEBS Letters, 1972, **23**, 3.
44. *S. Kaufman and D. B. Fisher*, in 'Molecular Mechanisms of Oxygen Activation', ed. O. Hayaishi, Academic Press, New York, 1974, p. 285.
45. *E. L. Patterson, M. H. von Saltza, and E. L. R. Stokstad*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 5871.
46. *H. S. Forrest and H. K. Mitchell*, J. Amer. Chem. Soc., 1955, **77**, 4865.
47. *E. L. Patterson, R. Milstrey, and E. L. R. Stokstad*, J. Amer. Chem. Soc., 1956, **78**, 5868.
48. *E. C. Taylor and P. A. Jacobi*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 6781.
49. *K. Fukushima, I. Eto, T. Mayumi, W. Richter, S. Goodson, and T. Shiota*, in 'Chemistry and Biology of Pteridines', ed. W. Pfleiderer, de Gruyter, Berlin, 1975, p. 247.
50. *S. Kaufman*, in 'Chemistry and Biology of Pteridines', ed. W. Pfleiderer, de Gruyter, Berlin, 1975, p. 291.
51. *H. I. X. Mager*, in 'Chemistry and Biology of Pteridines', ed. W. Pfleiderer, ed Gruyter, Berlin, 1975, p. 753.

52. *Y. Hatefi, P. T. Talbert, M. J. Osborn, and F. M. Huennekins*, Biochem. Preps. 1960, **7**, 89.
53. *W. Shive*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1963, vol. 11, p. 82.
54. *J. A. Montgomery, J. D. Rose, C. Tempie, and J. R. Piper*, in 'Chemistry and Biology of Pteridines', ed. W. Pfleiderer, de Gruyter, Berlin, 1975, 485; *J. R. Piper and J. A. Montgomery*, J. Org. Chem., 1977, **42**, 208.
55. *T. Shiota*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 111.
56. *C. J. Sucking, J. R. Sweeney, and H. C. S. Wood*, J. C. S. Perkin I, 1977, 439.
57. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, 'Bioorganic Mechanisms', Benjamin, New York, 1966, vol. II, p. 350. См. сс. 19.
58. *S. J. Benkovic and W. P. Bullard*, in 'Progress in Bioorganic Chemistry', ed. E. T. Kaiser and F. J. Kézdy, Wiley-Interscience, New York, 1973, vol. 2, p. 133.
59. *S. H. Mudd and G. L. Cantoni*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1964, vol. 15, p. 1.
60. *C. Tatum, J. Vederas, E. Schleicher, S. J. Benkovic, and H. Floss*, J. C. S. Chem. Comm., 1977, 218.
61. *L. Jaenicke and F. Lynen*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960, vol. 3B. p. 3.
62. *J. Baddiley and E. M. Thain*, J. Chem. Soc., 1952, 800; ibid., 1953, 1610.
63. *J. G. Moffatt and H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1961, **83**, 663.
64. *G. M. Brown*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 73.
65. *G. M. Brown*, J. Biol. Chem., 1959, **234**, 370; *Y. Abiko*, J. Biochem. (Japan), 1967, **61**, 290; ibid., p. 300.
66. *M. B. Hoagland and G. D. Novelli*, J. Biol. Chem., 1954, **207**, 767.
67. *A. White, P. Handler, and E. L. Smith*, 'Principles of Biochemistry', 5th edn., McGraw-Hill, New York, 1973, pp. 339—342. (См. сс. 4).
68. *P. Goldman and P. R. Vagelos*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1964, vol. 15, p. 71.
69. *R. B. Clayton*, Quart. Rev., 1965, **19**, 168.
70. *H. R. Mahler and E. H. Cordes*, 'Biological Chemistry', 2nd edn., Harper and Row, New York, 1971, p. 714 (*Г. Малер, Ю. Кордес.* Основы биологической химии. М., Мир. 1970).
71. *A. White, P. Handler, and E. L. Smith*, 'Principles of Biochemistry', 5th edn., McGraw-Hill, New York, 1973, p. 343.
72. *J. Moss and M. D. Lane*, Adv. Enzymol., 1971, **35**, 321.
73. *V. du Vigneaud, D. B. Melville, K. Folkers, D. E. Wolf, R. Mozingo, J. C. Keresztesy, and S. A. Harris*, J. Biol. Chem., 1942, **146**, 475.
74. *D. B. Melville, A. W. Moyer, K. Hofmann, and V. du Vigneaud*, J. Biol. Chem., 1942, **146**, 487.
75. *S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mozingo, R. C. Anderson, G. E. Arth, N. R. Easton, D. Heyl, A. N. Wilson, and K. Folkers*, J. Amer. Chem. Soc., 1944, **66**, 1756.
76. *W. Traub*, Nature, 1956, **178**, 649.
77. *A. Grüssner, J. P. Bourquin, and O. Schnider*, Helv. Chim. Acta, 1945, **28**, 517.
78. *B. R. Baker. W. L. McEwen, and W. N. Kinley*, J. Org. Chem., 1947, **12**, 322.
79. *C. Bonnemere, J. A. Hamilton, L. K. Steinrauf, and J. Knappe*, Biochemistry, 1965, **4**, 240; *J. Trotter and J. A. Hamilton*, ibid., 1966, **5**, 713.
80. *D. E. Wolf, R. Mozingo, S. A. Harris, R. C. Anderson, and K. Folkers*, J. Amer. Chem. Soc., 1945, **67**, 2100.
81. *M. W. Goldberg and L. H. Sternback*, U. S. Pat. 2489232, 2489235, and 2489238 (1949).
82. *D. B. McCormick and L. D. Wright*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 81.
83. *K. Krell and M. A. Eisenberg*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 6558.
84. *A. Lezius, E. Ringelmann, and F. Lynen*, Biochem. Z., 1963, **336**, 510.
85. *M. D. Lane, K. L. Rominger, D. L. Young, and F. Lynen*, J. Biol. Chem. 1964, **239**, 2865.
86. *M. D. Lane and F. Lynen*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1963, **49**, 379.
87. *J. Baddiley*, in 'Chemistry of Carbon Compouds' ed. E. H. Rodd, Elsevier, 1960, vol. IVC, p. 1732.
88. *H. G. Khorana*, 'Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest' Wiley, New York, 1961, chapter 4; *A. M. Michelson*, 'The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides', Academic Press, New York, 1963, chapter 4 (*Г. Корана.* Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты. М., Мир, 1964; *А. Михелсон.* Химия нуклеозидов и нуклеотидов, М., Мир, 1966).
89. *J. Baddiley and A. R. Todd*, J. Chem. Soc., 1947, 648.
90. *H. G. Khorana*, J. Amer. Chem. Soc., 1954, **76**, 3517; *M. Smith and H. G. Khorana*, ibid., 1958, **80**, 1141.
91. *M. Smith*, Biochem. Prep 1961, **8**, 1.
92. *E. Racker*, Adv. Enzymol., 1961, **23**, 323.
93. *S. Kit*, in 'Metabolic Pathways', ed. D. M. Greenberg, Academic Press, New York, 1970, vol. IV, pp. 237—251.
94. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, 'Bioorganic Mechanisms', Benjamin, New York, 1966, vol. II, pp. 167—176.
95. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, 'Bioorganic Mechanisms', Benjamin, New York, 1966, vol. II, chapter 8.
96. *K. Lohmann und P. Schuster*, Biochem. Z., 1937, **294**, 188.
97. *E. P. Steyn-Parvé and C. H. Monfoort*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1963, vol. 11, p. 3.
98. *R. R. Williams and J. K.* Cline, J. Amer. Chem. Soc., 1936, **58**, 1504.
99. *A. R. Todd and F. Bergel*, J. Chem. Soc., 1937, 364.
100. *A. Windaus, R. Tschesche, and R. Grewe*, Z. physiol. Chem., 1935, **237**, 98; *R. Grewe*, ibid., 1936, **242**, 89.
101. *J. Weijlard and H. Tauber*, J. Amer. Chem. Soc, 1938, **60**, 2263; *P. Karrer and M. Viscontini*, Helv. Chim. Acta, 1946, **29**, 711.
102. *H. Weil-Malherbe*, Biochem. J. 1940, **34**, 980.
103. *G. M. Brown*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 1.
104. *P. C. Newell and R. G. Tucker*, Biochem. J., 1968, **106**, 271, 279.
105. *A. F. Diorio and L. M. Lewin*, J. Biol. Chem., 1968, **243**, 3999, 4006.
106. *R. Breslow*, J. Amer. Chem. Soc., 1957. **79**, 1762; ibid., 1958, **80**, 3719.
107. *N. L. Allinger, M. P. Cava, D. C. de Jongh, C. R. Johnson, N. A. Lebel, and C. L. Stevens*, 'Organic Chemistry', 2nd edn., Worth, New York, 1976, p. 464.
108. *L. O. Krampitz, I. Suzuki, and G. Greull*, Fed. Proc., 1961, **20**, 971; *L. O. Krampitz, G. Greull, C. S. Miller, J. B. Bicking, H. R. Skeggs, and J. M. Sprague*, J. Amer. Chem. Soc., 1958, **80**, 5893.
109. *F. G. White and L. L. Ingraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1962, **84**, 3109.
110. *J. A. Gutowski and G. E. Lienhard*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 2863.
111. *R. Wolfenden*, Nature, 1969, **223**, 704; *G. E. Lienhard*, Science, 1973, 180, 149.
112. *A. E. Braustein*, in 'The Enzymes', ed. P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960, vol. 2, chapter 6.
113. *E. F. Gale and H. M. R. Epps*, Biochem. J., 1944, **38**, 250.
114. *I. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, W. D. Bellamy, and C. E. Foust*, J. Biol. Chem., 1945, **161**, 743.
115. *J. Baddiley and A. P. Mathias*, J. Chem. Soc., 1952, 2583.
116. *J. M. Osbond, Vitamins and Hormones*, 1964, **22**, 367.
117. *A. F. Wagner and K. Folkers*, 'Vitamins and Coenzymes', Interscience, New York, 1964, p. 162.
118. *S. A. Harris, D. Heyl, and K. Folkers*, J. Amer. Chem Soc., 1944, **66**, 2088.
119. *V. M. Rodwell*, in 'Metabolic Pathways', ed. D. M. Greenberg, Academic Press, 1970, vol. IV, p. 4.
120. *R. E. Hill, F. J. Rowell, R. N. Gupta, and I. D. Spenser*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 1869; *R. E. Hill, P. Horsewood, I. D. Spenser, and Y. Tani*, J. C. S.

Perkin I, 1975, 1622; *R. E. Hill, I. Miura, and I. D. Spenser*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 4179.
121. *E. E. Snell and B. E. Haskell*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1971, vol. 21, p. 47.
122. *D. E. Metzler, M. Ikawa, and E. E. Snell*, J. Amer. Chem. Soc., 1954, **76**, 648.
123. *T. C. Bruice and S. J. Benkovic*, 'Bioorganic Mechanisms', Benjamin, New York, 1966, vol. II, pp. 226—300
124. *B. M. Guirard and E. E. Snell*, in 'Comprehensive Biochemistry', ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, 1964, vol. 15, chapter V.
125. *H. C. Dunathan*, Adv. Enzymol., 1971, **35**, 79.
126. *H. C. Dunathan*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S A., 1966, **55**, 712.
127. *C. R. Lowe and P. D. G. Dean*, 'Affinity Chromatography', Wiley, London, 1974, chapter I.
128. *C. R. Lowe and P. D. G. Dean*, 'Affinity Chromatography', Wiley, London, 1974, chapter III.
129. *H. Guilford*, Chem. Soc. Rev., 1975, **2**, 249.
130. *P. Brodelius, P. O. Larsson, and K. Mosbach*, European J. Biochem., 1974, **47**, 81.
131. *M. Poe, N. J. Greenfield, J. M. Hirshfield, M. N. Williams, and K. Hoogsteen*, Biochemistry, 1972, **11**, 1023.

## 24.4. ВИТАМИН $B_{12}$

*Б. Т. Голдинг (University of Warwick)*

### 24.4.1. ВВЕДЕНИЕ

#### 24.4.1.1. Номенклатура

Витамин $B_{12}$ [или цианокобаламин (**1а**)] принадлежит к семейству соединений, называемых корриноидами. Последние являются производными коррина (**2**), «ядра» структуры цианокобаламина. Нумерация атомов углерода и азота в (**2**) соответствует принятой для порфиринового ядра за исключением того, что в коррине отсутствует атом С-20. Подобно порфиринам четыре пятичленных цикла в корриноидах имеют обозначения A, B, C и D, как показано в (**1**) и (**2**). Карбоксильные боковые радикалы (или образованные ими амиды) обозначаются буквами a, b, c ... g, как в (**1**). Названия основных корриноидов (табл. 24.4.1) образуются с участием приставки коб-, показывающей присутствие иона кобальта. Верхние и нижние координационные места иона кобальта обозначаются соответственно α и β (ср. стероиды). При наименовании корриноида с известной стереохимией вначале в скобках пишут его α-заместитель, затем без скобок β-заместитель, за которым следует название корриноида. Поскольку кобаламины по определению содержат в α-положении 5,6-диметилбензимидазол, отражать это в их названии нет необходимости. Названия, таким образом, сокращаются до X-кобаламина (X = Cbl), где X — лиганд в β-положении. Примеры корриноидов приведены в табл. 24.4.2.

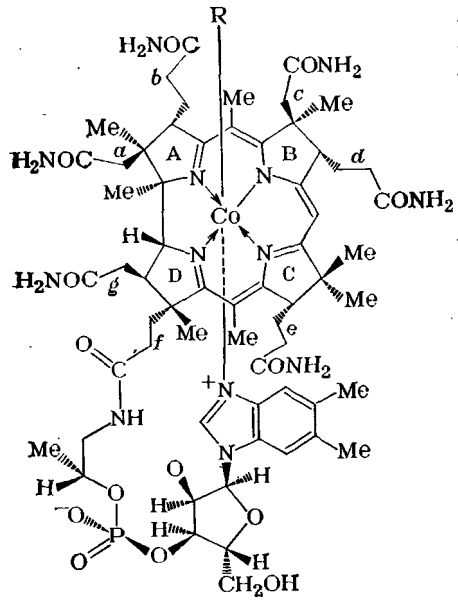
Наряду с указанными выше сокращениями, иногда употребляются следующие термины для обозначения форм кобаламинов:

*Таблица 24.4.1. Основные корриноиды*

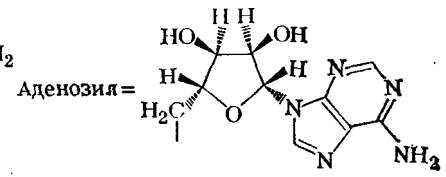
| Корриноид | Сокращение | Боковые * радикалы a—e, g | Боковой ** радикал f |
|---|---|---|---|
| Кобириновая кислота | — | $CO_2H$ | $CO_2H$ |
| Кобиновая кислота | — | $CO_2H$ | $CONHCH_2CH(OH)Me$ |
| Кобамовая кислота | — | $CO_2H$ | $CONHCH_2CH(OR^1)Me$ |
| Кобировая кислота | Cby | $CONH_2$ | $CO_2H$ |
| Кобинамид | Cbi | $CONH_2$ | $CONHCH_2CH(OH)Me$ |
| Кобамид | Cba | $CONH_2$ | $CONHCH_2CH(OR^2)Me$ |
| Кобаламин | Cbl | $CONH_2$ | $CONHCH_2CH(OR^3)Me$ |

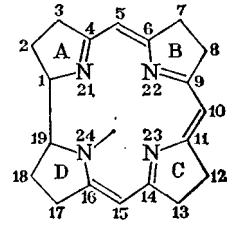
* См. формулу (**1**).

** $R^1$ = α-*D*-рибофуранозо-3-фосфорил; $R^2 = R^1$ + основание, присоединенное к α-гликозидной связи; $R^3 = R^1$ + 5,6-диметилбензимидазол, присоединенный к α-гликозидной связи.



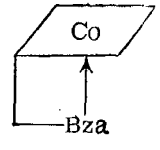
(**1а**) R = CN
(**1б**) R = OH
(**1в**) R = аденозил
(**1г**) R = Me



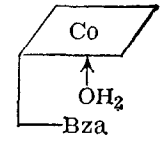



(**2**)

«содержащий основание» (**3а**) [эквивалентен (**1**)] и «лишенный основания» (**3б**).




(**3а**)




(**3б**)

*Таблица 24.4.2. Примеры корриноидов *–*****

| Название | Сокращенное обозначение |
|---|---|
| Цианокобаламин (витамин $B_{12}$) | CN-Cbl (Ia) |
| Аквакобаламин (витамин $B_{12a}$) | |
| Гидроксокобаламин (витамин $B_{12b}$) | HO-Cbl (Iб) |
| Аденозилкобаламин | Ado-Cbl (Iв) |
| Метилкобаламин | MeCbl (Iг) |
| (Циано)метилкобинамид | (CN)MeCbi |
| $Co^{\alpha}$-(5-метоксибензимидазолил)-$Co^{\beta}$-цианокобамид | (5-MeOBza)CN-Cba |

* Иногда необходимо указывать степень окисления иона кобальта как (I), (II) или (III), например коб(I)аламин ($Cbl^{I}$) (раньше называли $B_{12s}$); этот кобаламин получают восстановлением HO-Cbl($\rightarrow Cbl^{II} \rightarrow Cbl^{I}$) (см. разд. 24.4.4), и коб(II)аламин ($Cbl^{II}$) (ранее называли $B_{12r}$).

** Не следует употреблять для обозначения аденозилкобаламина термины кофермент $B_{12}$, DBC и т. д. Следует также избегать обозначения «фактор» [например, фактор $III_m$ для (5-MeOBza)CN-Cba].

*** Модификацию амидной функции обозначают добавлением вида изменения и его положения к основному наименованию корриноида, например: гидролиз е-амидной группы CN-Cbl дает цианокобаламин a, b, c, d, g-пентаамид-е-карбоновую кислоту [сокращенно CN-Cbl-(e-OH)].

**** Для a, b, c, d, g, f-гептаметилового эфира дицианокобирниновой кислоты принято наименование кобэстер.

## 24.4.1.2. Выделение и определение структуры природных корриноидов

Злокачественная анемия [2, 3], впервые ясно описанная в начале XIX столетия, характеризуется уменьшением эритроцитов, многие из которых при этом теряют обычную дисковидную форму. Некоторые из них имеют еще и гораздо большие размеры («мегалобласты»). К другим симптомам этого заболевания относятся лимонно-желтый цвет лица, краснота и повышенная чувствительность языка, отсутствие в желудке соляной кислоты и на более поздней стадии дегенерация нервной системы, связанная с постепенным параличем конечностей. Частота заболевания злокачественной анемией в Великобритании составляет примерно один случай на 1000 человек; большая часть пациентов старше 40 лет. До 1922 г. заболевание приводило без исключения к смертельному исходу, наступавшему после постепенно ухудшавшегося состояния больного в течение примерно трех лет. Отталкиваясь от первых наблюдений Уиппла, врачи Майнот и Мэрфи в 1926 г. обнаружили, что прием больными злокачественной анемией диеты, содержавшей большие количества сырой печени, оказывал благоприятное действие. В этот момент химики столкнулись с исключительно сложной проблемой выделения активного начала этого явления, так называемого антианемийного фактора (АРА), присутствующего в печени в концентрации всего лишь около одной части на миллион (млн$^{-1}$).

Между 1926 и 1939 гг. Коном и сотр. Генслленом, Дэкином, Уэстом, ЛаЛэндом и Клемом были разработаны принципиальные методы выделения фактора АРА. Благодаря их усилиям лечение злокачественной анемии стало более приятным занятием. Поедание печени было заменено периодическими инъекциями водного раствора частично очищенного активного начала. Парадоксально, но этот успех задержал дальнейшую очистку этого начала, поскольку число больных злокачественной анемией, на которых должны были испытываться высокоочищенные препараты, значительно уменьшилось.

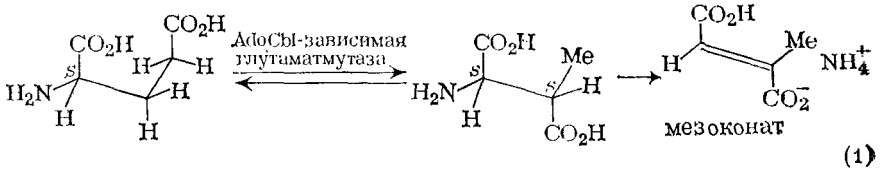
Очистка фактора АРА была ускорена подключением к исследованиям фирм Glaxo в Англии (Смит, Паркер и сотр. [4]) и Merck в США (Фолкерс и сотр. [5]). Этими группами были переработаны тонны печени, и в апреле 1948 г. Фолкерс объявил о выделении красного кристаллического соединения, названного им витамином $B_{12}$ (цианокобаламин, CN-Cbl), исключительно активного в отношении злокачественной анемии. Последующие работы Фолкерса были посвящены развитию методов микробиологического определения содержания кобаламинов, что дало возможность их обнаружения в мясных экстрактах, сухом молоке, а также в ферментационных средах некоторых микроорганизмов. В настоящее время кобаламины получают в промышленных масштабах с помощью процессов ферментации.

Определение структуры CN-Cbl началось в классическом стиле. Опыты по деградации и синтезу, проведенные Фолкерсом, Тоддом, Петровым и их сотрудниками (см. обзоры Фолкерса [5] и Смита [4]), легли в основу идентификации нуклеотидной части молекулы и дали некоторые данные о природе корринового ядра. Поскольку как гем, так и кобаламин, принимают участие в биохимических процессах в крови, было предположено, что эти соединения структурно родственны. Действительно, при сплавлении CN-Cbl со щелочью образуется пирролсодержащий дистиллат; при сжигании CN-Cbl в его золе был обнаружен кобальт. Цианидный лиганд был идентифицирован по запаху цианида водорода при обработке CN-Cbl $KMnO_4$ в разбавленной $H_2SO_4$ при 0 °C. Позднее эти данные были подтверждены ИК-спектроскопией CN-Cbl ($\nu_{C\equiv N}$ 2130 см$^{-1}$).

Группа Тодда в сотрудничестве со Смитом исследовала продукты кислотной и щелочной деградаций CN-Cbl. Кристаллы CN-Cbl и двух продуктов его деградации были переданы Ходжкин для рентгеноструктурного анализа. Правильная структура (Ia) предложена в 1957 г. [6]. Молекула содержит гексакоординированный диамагнитный ион кобальта, Co(III). Донорными атомами для кобальта являются N-3 диметилбензимидазола и четыре атома азота коррина (номенклатуру см. выше), шестое координационное место занято цианидом. Корриновое ядро содержит четыре частично восстановленных пиррольных кольца (A—D), два из которых непосредственно связаны (A/D-связь,

C-1, C-19), в то время как A/B, B/C и C/D соединены так, как в других порфиринах.

В то время как в определение структуры CN-Cbl вносились последние штрихи, Баркер [7] исследовал двухстадийное превращение глутаминовой кислоты в ион аммония и мезаконовую кислоту (через 3-метиласпарагиновую кислоту), катализируемое бесклеточным экстрактом *Clostridium tetanomorphum* {схема (1)}. Было обнаружено, что первая стадия может быть блокирована обработкой экстракта активированным углем. Такая обработка удаляла оранжевый кофактор превращения глутаминовой кислоты в 3-метиласпарагиновую. После установления факта нестабильности этого кофактора на свету был достигнут существенный прогресс в его выделении. Его близость к CN-Cbl была доказана превращением кофактора в CN-Cbl под действием цианид-ионов. Дальнейшие химические исследования достигли почти правильного установления структуры кофактора, однако в них была упущена важнейшая уникальная черта. Кристаллы были еще раз направлены Ходжкин, и она совместно со своим сотрудником Ленхертом окончательно установила эту удивительную структуру (**Iв**, см. также рис. 24.4.1). Неожиданная черта (**Iв**), σ-связь Co—C, позволила идентифицировать аденозилкобаламин AdoCbl (как теперь называют кофактор) как первое природное металлорганическое соединение. Впоследствии к этому «избранному кругу» присоединился метилкобаламин MeCbl (**Iг**).




(1)

В настоящее время стало ясно, что первоначально выделенный CN-Cbl являлся артефактом процедуры очистки, в процессе которой проходило превращение AdoCbl в CN-Cbl. Если не принять особых предосторожностей от экспозиции светом, AdoCbl и MeCbl превращаются в гидроксокобаламин (HO-Cbl, **Iб**), реагирующий с цианид-ионами (присутствовавшими в колонках с активированным углем, на которых первоначально проводилась очистка «витамина $B_{12}$»), с образованием CN-Cbl.

Были разработаны количественные методы определения кобаламинов в биологических системах [9]. В плазме крови здоровых некурящих взрослых людей содержится MeCbl ($\approx$250 пкг/см$^3$), AdoCbl и HO-Cbl (AdoCbl + HO-Cbl $\approx$ $\approx$ 125 пкг/см$^3$, AdoCbl > HO-Cbl); CN-Cbl присутствует ($\approx$2 % общего кобаламина) в крови курильщиков (табачный дым содержит HCN!), а также в крови лиц, употребляющих в пищу продукты, высвобождающие цианид-ионы (например, маниок). В эритроцитах основным кобаламином является Ado-Cbl (>50 % от общего), за которым следует HO-Cbl ($\approx$25 %), MeCbl ($\approx$10—15 %) и небольшое количество CN-Cbl. В кобаламин-зависимых ферментативных реакциях у животных и микроорганизмов в качестве кофакторов принимают участие AdoCbl, HO-Cbl или MeCbl (см. разд. 24.4.5). Роль CN-Cbl в этих процессах не установлена.

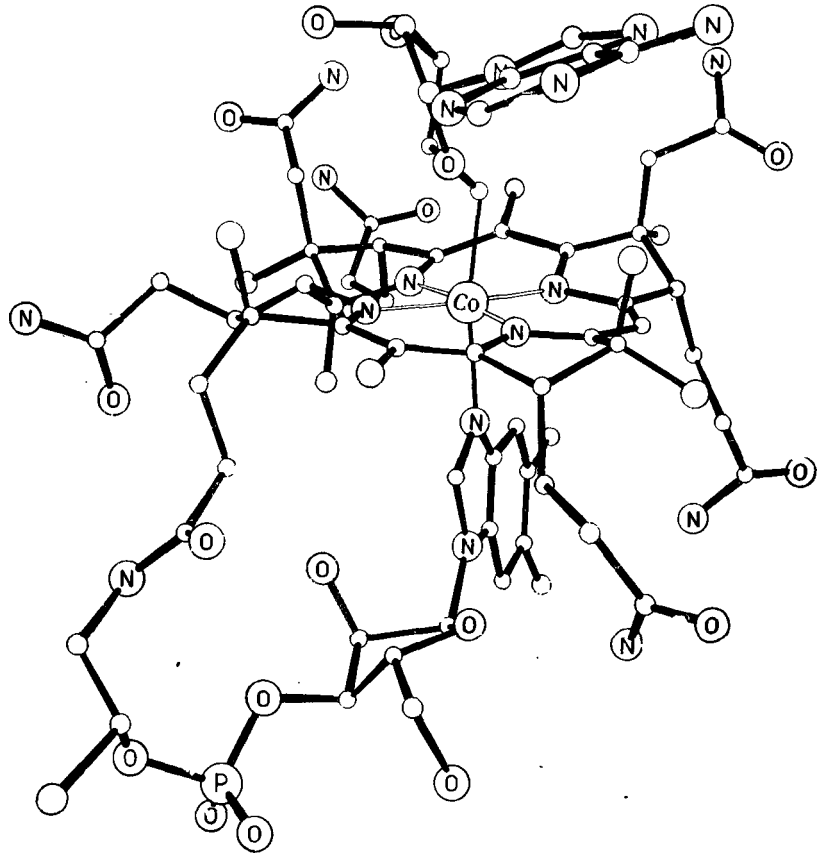



Рис. 24.4.1. Стереоскопическое изображение кристаллической структуры AdoCbl [8].

В сточных водах обнаружены производимые некоторыми микроорганизмами аналоги AdoCbl, диметилбензимидазол в которых замещен другим основанием. Так, *Clostridium thermoaceticum* производит аналог, содержащий 5-метоксибензимидазол; аспекты биосинтеза последнего рассматриваются ниже. Многообразие природных корриноидов было еще расширено после выделения корриноидов, лишенных металла, из клеток некоторых фотосинтезирующих бактерий, например *Chromatium* штамма D [10].

### 24.4.1.3. Спектроскопия корриноидов

Наиболее употребляемыми спектроскопическими методами изучения корриноидов являются электронная и ЯМР-спектроскопия, а также для кобальт(II)содержащих корриноидов дополнительно ЭПР-спектроскопия. Среди других спектроскопических методов, приложимых к корриноидам для их характеристики и изучения связывания с белками [12], применяется круговой дихроизм [11].

#### *(1) Электронные спектры*

На УФ/видимых спектрах корриноидов имеется несколько полос, наиболее значительные из которых (выше 300 нм) обозначаются как $\alpha$, $\beta$ и $\gamma$. Например, $\lambda_{макс}$ ($\varepsilon \cdot 10^{-5}$) для $(CN)_2$-Cbl в воде следующие: $\alpha$ 584 нм (0,98 $м^2 \cdot моль^{-1}$), $\beta$ 543 нм (0,86); $\gamma$ 369 нм (3,04). Эти полосы поглощения, судя по их интенсивности, а также по их наличию в спектрах корриноидов, не содержащих металла, относятся скорее всего к переходам корринового хромофора, а не к *d—d*-переходам или переходам с переносом заряда иона металла. Значения $\lambda_{макс}$ и $\varepsilon$ для различных корриноидов приводятся в [13]. Следующие ниже положения опираются главным образом на работу [14]. Полоса $\alpha$ (слабо выраженная в алкилкобаламинах) приписывается 0 — 0)-колебательному компоненту $\psi_7 \rightarrow \psi_8$-перехода, т. е. электронного перехода с наивысшей занятой молекулярной орбитали 14 электронного корринового хромофора на низшую свободную орбиталь. $\beta$-Полоса соответствует 0—1-колебательному переходу. Ее положение определяется зарядом на ионе металла. Полоса сдвигается в сторону больших длин волн по мере уменьшения положительного заряда. $\gamma$-Полоса (или $\gamma_1$- и $\gamma_2$-полосы) является следствием переходов $\psi_6 \rightarrow \psi_8$ и $\psi_7 \rightarrow \psi_9$. Форма $\gamma$-полосы (полос) зависит от того, положителен, отрицателен или равен нулю матричный элемент Q, объединяющий эти переходы. Знак этого элемента, в свою очередь, зависит от природы коррина.

УФ-видимая спектроскопия использовалась при исследовании связывания HO-, $N_3$- и CN-Cbl с белками, в частности с «внутренним фактором» человека.

Исследованы спектры люминесценции синтетических корринов, содержавших различные ионы металлов [15]. В некоторых случаях [Ni(II), Cu(II)] имеет место тушение люминесценции за счет того, что *d*-уровни иона металла лежат ниже самого нижнего триплетного состояния корринового хромофора. С наличием или отсутствием люминесценции коррелирует успех или неудача фотохимических замыканий цикла в металлических комплексах секокорринов (см. разд. 24.4.2).

#### *(2) $^1H$- и $^{13}C$-ЯМР-спектры*

ЯМР-Спектроскопия — ценный метод для характеристики Co(III)-корриноидов в растворе [16—18], она может быть, в принципе, использована для определения их конформации. Можно отметить следующие особенности $^1H$-ЯМР-спектров корриноидов.

а) В спектрах, содержащих основание кобаламинов (**3а**), имеется синглет ($\delta$ 0,5) за счет метильной группы C-1, лежащей над диметилбензимидазолом (см. рис. 24.4.1) и, следовательно, экранированной последним. В спектрах кобинамидов и лишенных основания кобаламинов (**3б**) сигнал метильной группы C-1 появляется при $\delta$ 1,2.

б) Протоны при C-5 (Co-$CH_2$) аденозилкорриноидов диастереотопны и поэтому имеют разные химические сдвиги (для AdoCbi в $^2H_2O$ $\sigma$ 0,38 и 0,63).

в) Протоны в положении 2 $\sigma$-алкильной группы алкилкорриноидов экранированы корриновым хромофором и резонируют в более высоком поле, например у $Me_2CH$-Cbi метилы изопропильной группы дают два сигнала, при $\delta$ —0,70 и —0,94.

г) В $^1H$-ЯМР-спектре AdoCbi в $^2H_2O$ сигнал H-1′ (аномерный протон аденозильной группы) резонирует при $\delta$ 4,37, что сдвинуто примерно на 1 $млн^{-1}$ в сторону сильных полей по сравнению со свободным аденозином. Для объяснения этого явления предложено, что при растворении аденозилкорриноидов в воде имеет место конформационный переход, в результате которого аденинове кольцо меняет ориентацию с параллельной коррину на перпендикулярную последнему [18] (см. рис. 24.4.1). Однако доказательства в пользу этого далеко идущего предположения представляются довольно слабыми.

$^{13}C$-ЯМР-спектры и их отнесения приведены в [19]. Этот метод оказался чрезвычайно полезным при изучении биосинтеза, а также для обнаружения изомеризации аксиальных лигандов иона кобальта. Эти изомеры можно легко различить по спектрам избирательно обогащенных корриноидов, например водного метилкобинамида, содержащего 90 % $^{13}C$ в метильной группе, дающей сигналы при $\delta$ 128,4 и 130,3 $млн^{-1}$ (относительно внешнего стандарта — бензола) примерно равной интенсивности, соответствующие (OH)MeCbi и (Me)HO-Cbi [20]. Изучение температурных зависимостей химических сдвигов спектров $^{13}CH_3$-Cbl, [1,2-$^{13}C_2$]EtCbl и [5′-$^{13}C$]AdoCbl (все обогащены в соответствующих положениях на 90 %) показало, что эти кобаламины при изменении температуры претерпевают конформационный переход, связанный с корриновой системой [21]. Ранее, на основе изменений в электронных и $^1H$-ЯМР-спектрах, наблюдаемых при нагревании растворов аквокобинаминов и алкилкобаламинов, было сделано ошибочное предположение о равновесии многих корриноидов в водном растворе с пятикоординированными формами (лишенными $\alpha$-лиганда).

### (3) Спектры ЭПР

Этот метод применим к парамагнитным Co(II)-содержащим корриноидам и был недавно использован также для характеризации образцов, содержащих Co(IV), полученных из модельных

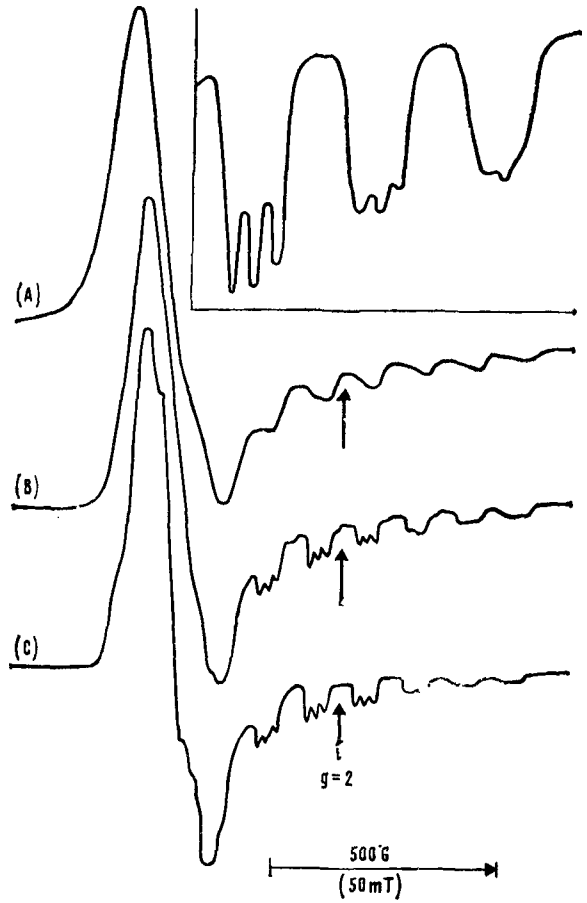



Рис. 24.4.2. ЭПР-спектры $Cbl^{II}$.

(*A*) — кристаллы при 298 К; (*B*) — после фотолиза AdoCbl при 77 К и pH 7,3 в водном диметилглутарат-содержащем фосфатном буфере; (*C*) — в этаноле. Врезка — высокопольная область кривой (*C*), записанная при большем усилении и малой скорости развертки для демонстрации разрешения триплетов последних трех линий сверхтонкой структуры [22].

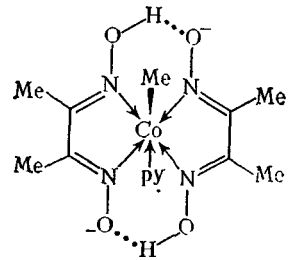
соединений (см. ниже). Co(II)-корриноиды — пятикоординированные, низкоспиновые $d^7$-комплексы с неспаренным электроном, занимающим $d_{z^2}$-орбиталь. Типичные спектры ЭПР приведены на рис. 24.4.2 [16, 22]. Расщепления в спектре являются результатом спин-спинового взаимодействия неспаренного электрона с $^{59}Co(I = 7/2)$ и $^{14}N(I = 1)$ диметилбензимидазола. Для $Cbl^{II}$ в водном растворе с pH 7,3 и 77 К $a(Co) = 110$ Гс, $a(N) = 18$ Гс и $g = 2{,}006 \pm 0{,}007$. ЭПР-спектроскопия оказалась незаменимой при обнаружении $Cbl^{II}$ в ферментативных реакциях (см. разд. 24.4.5).



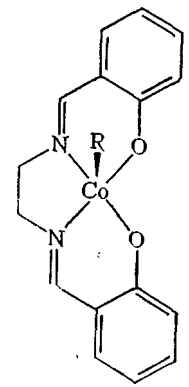
В результате окисления алкил(акво)кобалоксимов (см. разд. 24.4.4) с помощью Ce(IV) в кислом водном метаноле образуются соединения Co(IV) {$RCo^{IV}(dmgH)_2OH_2$, R = Me, $PhCH_2$ и т. д.}, стабильные при 195 К в течение многих часов [23]. На ЭПР-спектрах этих соединений обнаруживается восемь относительно широких полос с величинами g 2,012—2,033 и $a(Co)$ 24,5—31,3 Гс.

### 24.4.1.4. Модельные соединения

Подробное исследование корриноидов трудно осуществимо. Даже их элементный анализ неточен в силу неопределенной гидратации. В этих соединениях затруднено также изучение свойств σ-связи Co—C, так как последняя «погружена» вглубь сложной молекулы. В связи с этим были разработаны методы получения некоторых модельных соединений, позволивших выяснить свойства этой связи в корриноидоподобном окружении. Примерами удобных модельных систем являются комплексы алкилбис(диметилглиоксимато)кобальта («кобалоксимы», [24] {например, метил(пиридин)кобалоксим (**4а**) $MeCo(dmgH)_2py$, где dmgH — моноанион диметилглиоксима, py — пиридин} и алкил-*N*,*N*′-этиленбис(салицилидениминато)кобальта {RCo(salen); (**4б**)} [25]. С кобалоксимами было проведено исследований больше, чем с какой-либо другой модельной системой. В этом разделе большая часть ссылок на модели корриноидов касается именно кобалоксимов (обо всех типах соединений алкилкобальта см. обзор [26]).




(**4а**)




(**4б**)

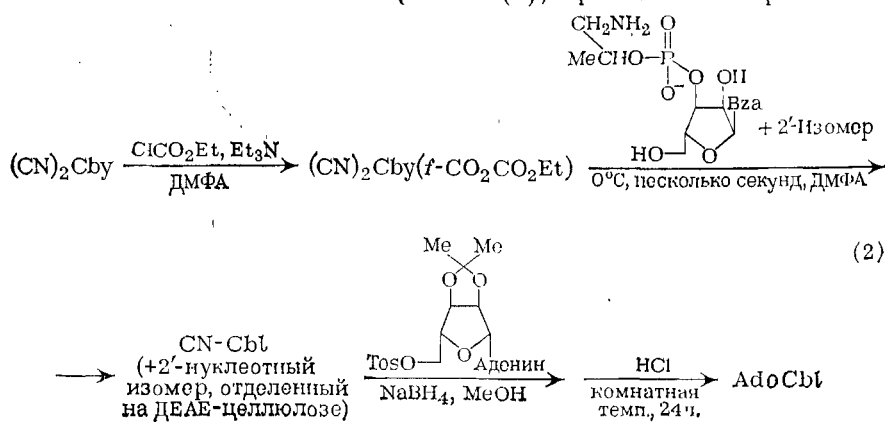
Алкилкобалоксимы открыты Шраузером [24], установившим их близость алкилкорриноидам. Вычисления методом молекулярных

орбиталей [24] и кристаллографические исследования [27] показали, что ближайшее окружение ионов кобальта в кобалоксимах и корриноидах сходно. Так, для $MeCo(dmyH)_2py$ величины связей составляют: Co—C = 0,1998 нм, Co—N(py) = = 0,2068 нм, средняя Co—N(dmgH) = 0,1897 нм. Соответствующие величины в AdoCbl равны 0,205; 0,223 и 0,194 нм [8]. Ионы кобальта в $MeCo(dmgH)_2py$ и AdoCbl не выступают заметным образом из плоскости окружающих атомов азота [$(dmgH)_2$ или коррина]. Однако в кобалоксимах, аксиальные группы которых значительно различаются по размерам, ион кобальта смещается в направлении большей группы [так, в $ClCo(dmgH)_2PPh_3$ он смещен на 0,005 нм]. Полагают, что в *S*-алкилкобинамидах ион кобальта смещен в сторону алкильной группы [28] и что это направленное вверх смещение может сделать возможным лучшее взаимодействие с интермедиатами в кобаламин-зависимых ферментативных реакциях [29].

Ввиду простоты ЯМР-спектров алкилкобалоксимов [группа dmgH дает сигналы при δ 2,1 (синглет 12H, Me × 4) и около 18 (широкий синглет, 2H, 2 × dmgH, связанный внутримолекулярно)] при условии, что алкильная группа и основание ахиральны, можно удобно контролировать реакции σ-алкильной группы. Химические свойства алкилкобалоксимов, гидридкобалоксимов, а также кобалоксима(II) и кобалоксима(I) имеют много общего со свойствами соответствующих корриноидов, как это указано в разд. 24.4.4. Механизм реакции корриноида часто наиболее глубоко можно изучать на соответствующем кобалоксиме (см. реакции соединений алкилкобальта с Hg(II), разд. 24.4.4).

### 24.4.2. СИНТЕЗ КОРРИНОИДОВ

В 1964 г. Бернхаузер и сотр. [30] сообщили о превращении природной кобировой кислоты в CN-Cbl {схема (2); первые две стадии}. Вскоре были описаны эффективные методы превращения CN-Cbl в MeCbl и AdoCbl {схема (2), третья и четвертая стадии}. Варьируя схему (2), удалось получить многие аналоги природных корриноидов, представляющие интерес для структурно-функциональных исследований.




(2)

Для полного синтеза «витамина $B_{12}$» требуется получение кобировой кислоты, молекулы с девятью хиральными центрами из простых исходных соединений. Синтез корринового хромофора или модельного коррина — относительно более легкая задача. В Кембридже (Англия) исследование структуры CN-Cbl привело к трем попыткам его синтеза: Кларк и Тодд выбрали нитроны в качестве предшественников корриновой системы и синтезировали модельные соединения, соответствовавшие AB- и AD-частям CN-Cbl [31]. «Посматривая одним глазом на проблему биосинтеза витамина $B_{12}$» [32], Джонсон разработал простой метод получения корринов из пирролов [33]. Легко получить катионные комплексы 1,19-диметил-2,3,7,8,12,13,17,18-октадегидрокоррина с никелем(II), кобальтом(II) и кобальтом(III), которые затем можно гидрогенизировать до соответствующих комплексов 1,19-диметилкоррина. Корнфорт пренебрег более простым путем синтеза модельных корринов и столкнулся с необходимостью синтеза кобировой кислоты «с нуля». В 1962 г. он задумал синтез кобировой кислоты с использованием изоксазолов. На ранних стадиях были синтезированы предшественники пятичленных циклов кобировой кислоты. Предложенный Корнфортом остроумный синтез предшественника цикла C из *D*-(+)-камфоры позднее использовали Эшенмозер и Вудвард в их синтезе кобировой кислоты (см. ниже). После неудачи попыток соединения A/D-звеньев с помощью радикалов синтетическая работа Корнфорта застопорилась [34]. Использование изоксазолов в качестве предшественников коррина было также независимо предложено Стивенсом [35], синтезировавшим комплекс цинка(II) с 1,2,2,7,7,12,12,17,17-нонаметилкоррином и двигавшимся в направлении синтеза кобировой кислоты.

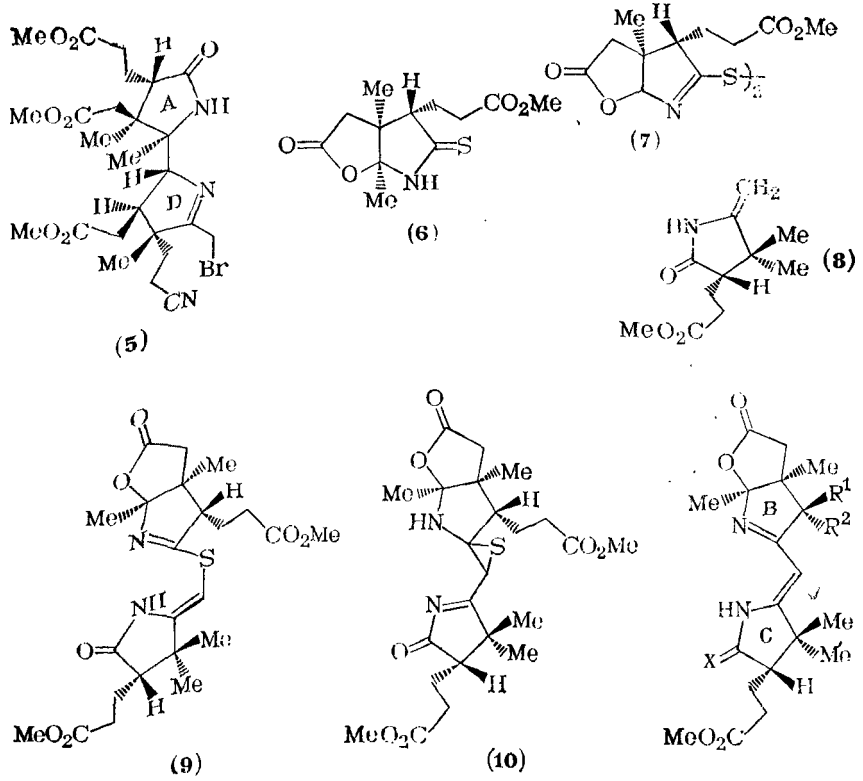
Эшенмозер (Цюрих) и Вудворд (Гарвард) начали свой штурм «цитадели» $B_{12}$ в 1960 г. Проявив присущее ему чутье к соединению главным образом тривиальных реакций в замечательные, остроумные последовательности, Вудворд [36] предложил 37-стадийный синтез «β-корринорстерона», предшественника соединения (5), соответствовавшего AD-части кобировой кислоты. Рационализация перициклических реакций, проведенная Вудвордом и Хоффманом, была стимулирована прежними безуспешными попытками синтеза (5).

Эшенмозер предложил совершенно другой подход к синтезу корриновой системы, включавший конденсации енамидов и иминоэфиров. Этот метод был использован при синтезе модельных корринов [37] [например, дицианокобальт(III)-1,8,8,13,13-пентаметилкоррина], но в случае природного соединения успеха не имел. Группы, которые впоследствии должны были стать заместителями в корриноидной системе кобировой кислоты, блокировали

конденсацию иминоэфира. Решение этой проблемы зависело от создания метода «серного мостика» для синтеза звеньев N=C—C=C—N корринового хромофора [38]. В начале 1966 г. было обнаружено, что тиоамид (**6**) количественно окисляется бензоилпероксидом до бис(имидоил)дисульфида (**7**). В дихлорметане, содержавшем следы HCl, (**7**) реагировал с енамидом (**8**), давая продукты (**9**) и (**6**). Для эффективного получения предшественника фрагмента BC, 1 моль-экв. тиоамида (**6**) окисляли с помощью 0,5 моль-экв. бензоилпероксида в присутствии енамида (**8**) в дихлорметане, содержавшем каталитические количества HCl. При этом немедленно получался бис(имидоил)дисульфид (**7**), который далее реагировал с (**8**), давая (**9**) и тиамид (**6**). Последний вновь циклизовался под действием еще 0,5 моль-экв. бензоилпероксида. Ожидалось, что под действием соединений фосфора(III) сера будет удаляться из (**9**), возможно, через таутомер (**10**) и, действительно, нагревание (**9**) с триэтилфосфитом приводило к образованию BC-предшественника (**11**). На этом этапе имело место нетривиальное дополнительное превращение, соблазнявшее исследователей возможным использованием в оставшейся части синтеза кобировой кислоты («экспериментальной битвы с диастереоизомерией») [38]. Была получена равновесная смесь эпимеров [примерно 2 части (**11**) +1 часть (**12**)], из которой удалось закристаллизовать (**11**). Соединения (**11**) и (**12**) можно «уравновесить» в $CHCl_3$, содержащем каталитические количества HCl. Хотя стереохимия лабильного хирального центра в (**11**) соответствует неприродной конфигурации у C-8 в корриноидах, легкость выделения (**11**) и обнаружение эпимеризации на последующих стадиях синтеза сделали ненужным выделение «правильного» изомера (**12**).

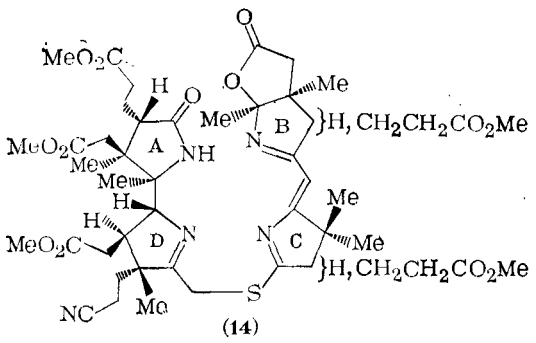
BC-Тиоамид (**13**), полученный из (**11**), был соединен с полученным Вудвардом AD-компонентом (**5**), модифицированным методом «серного мостика». Было получено соединение (**14**), которое затем превращали в четыре стадии в дицианокобальтовый(III) комплекс и циклизовали в коррин. В течение этой последовательности реакций имели место эпимеризации у C-3, C-8 и C-13, и только благодаря применению жидкостной хроматографии высокого давления удалось анализировать и, когда нужно, разделять смеси диастереоизомеров. Конечным продуктом этой последовательности реакций был так называемый 5,15-бис-норкобэстер-c-диметиламид-f-нитрил, который метилировали по C-5 и C-15 (см. разд. 24.4.4) с целью получения «кобэстер-f-нитрила». Избирательный гидролиз нитрила до карбоновой кислоты и превращение сложноэфирных групп в амидные ($CONH_2$) привели к получению идентичной с природной кобировой кислоты. Детали этой работы можно найти в [36, 38, 39].

В процессе сотрудничества между Гарвардом и Цюрихом Эшенмозером был предложен новый метод синтеза корринов, в том числе кобировой кислоты. В этом методе была воплощена

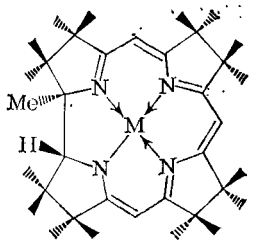



(**11**) $R^1=CH_2CH_2CO_2Me$, $R^2=H$, X=O
(**12**) $R^1=H$, $R^2=CH_2CH_2CO_2Me$, X=O
(**13**) $R^1$, $R^2$ как в (**11**), (**12**), X=S

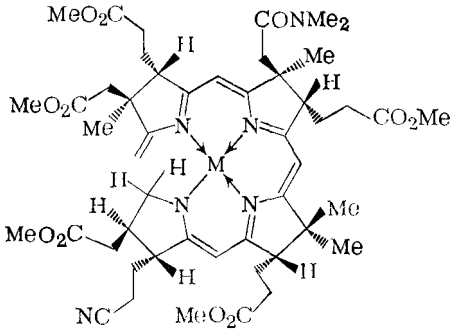
давно вынашиваемая автором идея использования одного предшественника для создания каждого пятичленного кольца кобировой кислоты. Осуществление этой идеи также требовало использования метода «серного мостика», но в первую очередь зависело от достижения превращения секокоррина (**15**) в коррин (**16**) на последней стадии. На основании проведенного Вудвардом и Хоффманом анализа перициклических реакций было предсказано, что такое превращение должно происходить фотохимически и должно приводить к *транс*-соединению циклов AD (т. е. к природной конфигурации корриноидов). Так и происходит (это «самая чистая и наиболее восхитительная стадия из всех, с которыми мы столкнулись в нашей работе» [32]) под действием видимого света с M = Li(I), Mg(II), Zn(II), Cd(II), Pd(II) и Pt(II), но не с M = H, Cu(II), Ni(II), Co(II) и Mn(II) [40, 41]. Cd(II)Cl-комплекс (**15**) фотоциклизовался в (**16**), который был затем превращен в «c-диметиламид-f-нитрил-abdeg- — пентаметиловый



(14)



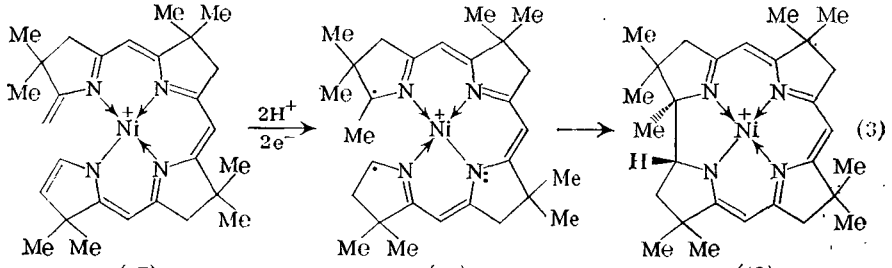
(16)
[внешние заместители как в (15)]



(15) M=ион металла

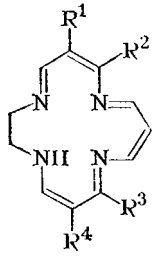
эфир бисноркобировой кислоты» и далее в кобировую кислоту (см. выше).

Позднее Эшенмозером была описана восстановительная циклизация $\Delta^{18}$-дегидро-1,19-секокорринового комплекса (**17**) в коррин (**19**), катализируемая кислотами {схема (3), электролиз в смеси MeCN—$CF_3CO_2H$, содержащей $LiClO_4$} [32]. Превращение предполагаемого интермедиата (**18**) в (**19**) может служить моделью одной из стадий биосинтеза корриноидов.



(17) (18) (19) (3)

В природных корриноидах корриновый хромофор окружен пятичленными циклами и блокирован метильными группами в положениях 5 и 15. Представляет интерес сравнение такого экранированного хромофора с «голым» коррином («корромин» [42], другая система номенклатуры, см. [43]) соединения (**20**). В результате коротких синтезов были получены металлокомплексы двух производных (**20**)—5,6,14,15-дибензокорромина (**21**) [42] и 5,15-дифенилкорромина (**22**) [43]. До сих пор, однако, не сообщалось о детальных химических исследованиях этих комплексов.



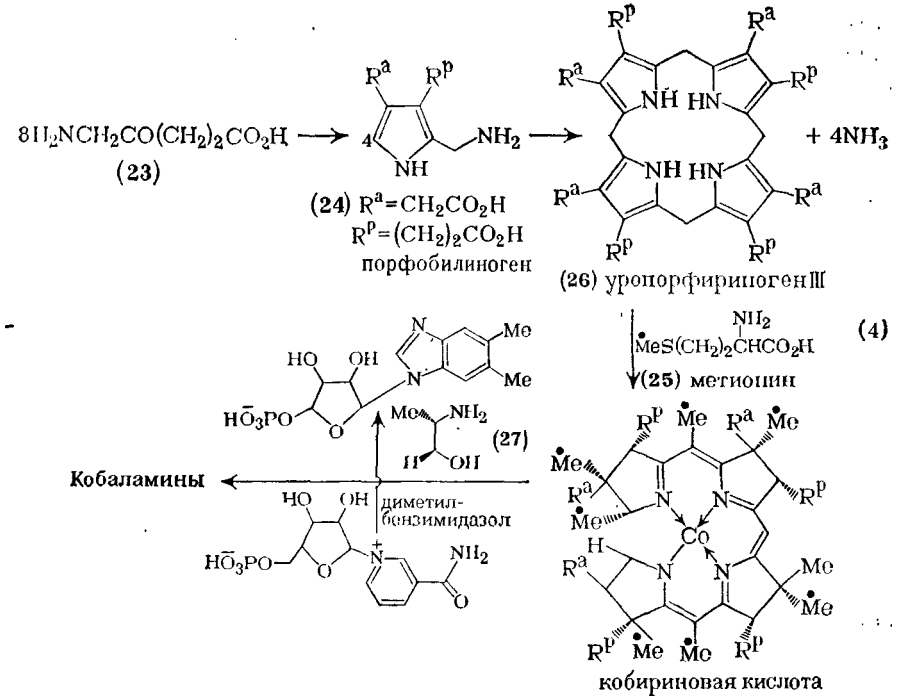
(20) $R^1=R^2=R^3=R^4=H$
(21) $R^1R^2=R^3R^4=$ бензо
(22) $R^1=R^4=Ph$, $R^2=R^3=H$

### 24.4.3. БИОСИНТЕЗ КОРРИНОИДОВ

Кобаламины образуются из нескольких «строительных блоков», изображенных на схеме (**4**). Отметим, что при биосинтезе аденозилкорриноидов аденозилирование может иметь место ранее образования HO-Cbl (частично амидированные корриноиды из *P. shermanii* содержат σ-аденозильную группу). Это, по-видимому, не единственно возможная последовательность событий в превращении кобириновой кислоты в кобинамид, хотя амидирование всегда начинается с c-OH [44]. На примерах *P. shermanii*, *C. tetanomorphum*, *Lactobacillus leichmannii* изучалось превращение CN-Cbl (или HO-Cbl) в AdoCbl. Полиферментная система *L. leichmannii* ассоциирована с рибосомами и может быть разделена на два компонента [45]. Один из них («витамин $B_{12}$-редуктаза»), восстанавливающий CN-Cbl (или HO-Cbl) в $Cbl^I$ (через $Cbl^{II}$), чрезвычайно нестабилен. Второй компонент («аденозилирующий фермент») катализирует реакцию между $Cbl^I$ и ATP, приводящую к образованию AdoCbl. Успех лечения злокачественной анемии путем периодических инъекций HO-Cbl зависит от метаболитического превращения этого кобаламина в AdoCbl и MeCbl эндогенными ферментативными системами.

#### 24.4.3.1. Корриноидная система (кобириновая кислота)

Пионерские работы [46, 47] с $^{14}C$-меченными δ-аминолевулиновой кислотой (**23**), порфобилиногеном (**24**) и метионином (**25**) доказали, что эти соединения являются предшественниками корриноидов. Однако ввиду экспериментальных ошибок и малого числа специфических деградаций, известных для CN-Cbl, информация, полученная из этих опытов, была ограниченной.




В результате более поздних исследований с использованием $^{13}C$-меченных предшественников [48—53] (в сочетании с ЯМР-спектроскопией) и выделения промежуточных продуктов последовательности реакций между уропорфириногеном-III (**26**) и кобириновой кислотой была составлена подробная схема биосинтеза корриноидов (см. гл. 30.2) [54, 55].

Момент и механизм включения иона кобальта в корриноиды неизвестен. Как только ион кобальта вошел в корриновое кольцо, он уже не удаляется оттуда (химического метода избирательного удаления иона кобальта из корриноидов не существует). Открытие не содержащих металл корриноидов [10] предполагает в связи с этим, что ион кобальта не играет важной роли в биосинтезе корриноидов.

### 24.4.3.2. (*R*)-1-Аминопропанол-2

Исследования с применением $^{14}C$ и $^{15}N$ показали, что это звено (**27**) имеет предшественником *L*-треонин. Работы с *P. shermanii* указывают, что треонин непосредственно декарбоксилируется в ферментативной реакции, зависимой от тиолов и корринонда [56].

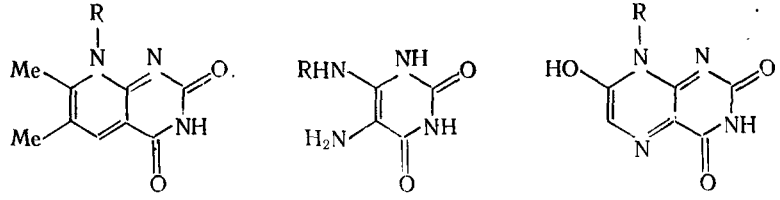


### 24.4.3.3. 5,6-Диметилбензимидазол

Обнаружение *о*-диметилбензеноидного звена в составе 5,6-диметилбензимидазола и рибофлавина привело Вулли (1950 г.) к предположению об общем происхождении этих молекул. Последовавшие за этим исследования показали, что диметилбензимидазол образуется из рибофлавина, а последний, в свою очередь, — из гуанозинтрифосфата посредством многоступенчатой последовательности реакций [57, 58]. Ключевым интермедиатом в этой последовательности является 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин (**28**), из двух молекул которого образуется рибофлавин и (**29**). Источник четырехуглеродного звена, включающего метильные группы при С-6 и С-7 соединения (**28**), не вполне ясен. Исследования с применением изотопов показали [59], что в том случае, если оно образуется из наиболее вероятного кандидата, 2,3-бутандиона, то последний должен возникать в результате процесса, использующего С-1 молекулы пентозы, а не реакции, например, характерной для *Aerobacter aerogenes*, в которой участвуют две молекулы пировиноградной кислоты. Из [1′-$^{14}$C]рибофлавина образуется 5,6-диметилбензимидазол, меченый только по С-2, что предполагает образование в качестве интермедиата между рибофлавином и бензимидазолом 1,2-диамино-4,5-диметил-*N*-метилен- (или *N*-формил) бензола.

Происхождение корриноидов, содержащих основания, отличные от 5,6-диметилбензимидазола, неясно. Эксперименты с *Clostridium thermoaceticum* показывают, что $^{14}C$ из С-1′-рибофлавина включается в С-2 5-метоксибензимидазола, аналога 5,6-диметилбензимидазола, производимого этим микроорганизмом [60]. Предполагается, что 5-гидроксибензимидазол, метилирование которого дает 5-метоксибензимидазол, возникает в результате сочетания (**28**) с аналогом (**30**).

О других аспектах биосинтеза корриноидов см. [44] и [61], а также часть 30.



(**28**) R = рибитил (**29**) (**30**)

## 24.4.4. РЕАКЦИИ КОРРИНОИДОВ И МОДЕЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

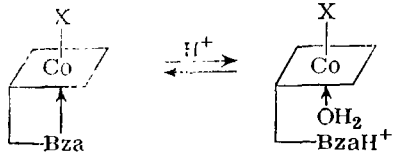
### 24.4.4.1. Термическая стабильность

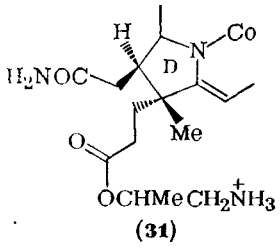
Корриноиды — относительно стабильные соединения как в кристаллическом состоянии, так и в растворе. Так, в оптимуме pH (4,5—5,0) и при комнатной температуре водный раствор CN-Cbl

полностью сохраняет биологическую активность в течение более чем двух лет [5]. Алкилкобаламины MeCbl и AdoCbl остаются неизменными после нагревания в анаэробном водном растворе при 94 °C в течение 5 ч. Однако EtCbl при 80 °C быстро теряет этилен [21]. Температурная стабильность уменьшается в ряду: первичные > вторичные > третичные алкилкобаламины (последние не получены).

### 24.4.4.2. Протонирование и обмен лигандов

p$K_a$ протонирования HO-Cbl до аквакобаламина равно 7,62 (0,1 М водный раствор $KNO_3$, 298 К) [62]. При низких значениях pH протонирование диметилбензимидазола вызывает удаление последнего из координационной сферы иона кобальта, например по схеме (5) (для X = OH p$K_a$ = −2,4, для X = Me p$K_a$ = 2,7). HO-группа HO-Cbl легко замещается на другие лиганды, например по схеме (6). Цианид-ион вытесняет диметилбензимидазол из ко-




(5)

(31)

баламинов. В случае AdoCbl удаляется также аденозильная группа {схема (7)}

$$\text{HO-Cbl} \xrightarrow{\text{водн. } NaN_3} \text{N}_3\text{-Cbl} \qquad (6)$$

$$\text{AdoCbl} \xrightarrow{\text{избыток } CN^-} (CN)_2\text{Cbl} + CH_2{=}CH(CHOH)_2CH(OH)CN + \text{Аденин} \qquad (7)$$

Обмен лигандов в корриноидах рассмотрен в [63] (о сходных процессах в кобалоксимах см. также [64]).

CN-группу в CN-Cbl нелегко заместить другими лигандами (константа устойчивости $10^{12}$ л·моль$^{-1}$). Однако такое замещение идет при фотоактивации (приводит к HO-Cbl, $\Phi \approx 10^{-4}$, не зависит от длины волны облучения выше 300 нм) [65].

### 24.4.4.3. Гидролиз амидных функций

В корриноидах имеются различные функциональные группы, подверженные кислотному или основному гидролизу. Разработаны методы преимущественного расщепления одной определенной амидной связи, использующие возможное соучастие соседних групп. Продукты такого гидролиза являются ценными промежуточными



соединениями для получения аналогов для биологического тестирования [66], интермедиатов биосинтеза корриноидов [67] и нерастворимых адсорбентов для хроматографии корриноид-связывающих белков или ферментов [68].

Так, обработка CN-Cbl, например 0,8 *М* $H_3PO_4$ (75 °C, 4 ч) или 0,5 *М* HCl (37 °C, 3 ч) в атмосфере инертного газа, приводит к хроматографически разделимой смеси моно-, ди- и трикарбоновых кислот, возникающих вследствие расщепления b-, d- и/или e-пропионамидных групп (относительные скорости расщепления: e > b ≈ d). Методами дифракции рентгеновских лучей и нейтронов показано, что основной монокарбоновой кислотой является CN-Cbl (e-OH) [69]. Полагают, что гидролизу e-пропионамида способствует близрасположенная фосфатная группировка. Эта группировка гидролизуется при стоянии водного раствора CN-Cbl(e-OH). В этих условиях CN-Cbl и CN-Cbl(b-OH) стабильны.

Концентрированная соляная кислота (65 °C, 18,5 мин) избирательно гидролизует f-амидную группу CN-Cbl, давая после колоночной (ДЭАЭ-целлюлоза) и препаративной бумажной хроматографии кобировую кислоту с 10 %-ным выходом [70]. Преимущественное образование кобировой кислоты зависит от изомеризации f-амида в f-сложный эфир (**31**), который затем подвергается кислотному гидролизу (ср. преимущественное расщепление полипептидов, катализируемое сильными кислотами, по остаткам серина и треонина). Другой способ получения кобировой кислоты [71] основан на индуцировании образования f-сложного эфира (**31**) под действием безводного HF или $ZnCl_2$ в метаноле. После ацилирования аминогруппы (**31**) сложноэфирную группировку можно расщепить в водном пиперидине с образованием кобировой кислоты (выход до 20 %).

### 24.4.4.4. Гидролиз фосфатной группировки

Изящный метод превращения кобаламинов в кобинамиды, разработанный Бернхауэром и сотр. [71], зависит от сродства лантанид-ионов к фосфатным группировкам {схема (8)}.

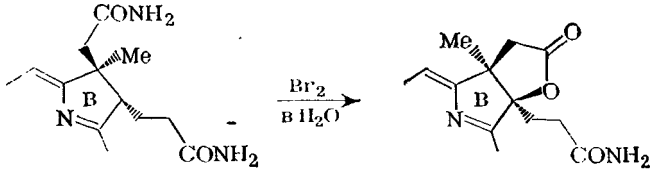
$$\text{CN-Cbl} \xrightarrow[\text{pH 8–9, 100 °C, 50 мин}]{Ce(OH)_3,\ \text{водн. HCN}} \sim 100\,\%\ \text{Cbl} + \alpha\text{-Рибазол} + \text{Нерастворимый фосфат} \qquad (8)$$

### 24.4.4.5. Электрофильное замещение в корриновом хромофоре

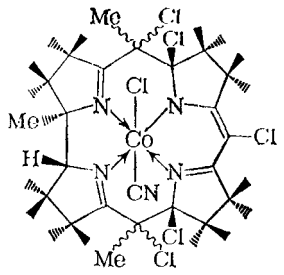
В ранних работах корриноиды подвергались действию обычных электрофильных реагентов (например, $^2H^+$, $Cl^+$, $Br^+$, $NO_2^+$), в результате чего были получены 10-замещенные производные. В случае галогенирующих агентов альтернативным процессом, как показано, является образование c-лактона, зависящее от условий и

типа коррина {схема (9), эквимольное количество брома в воде} (отметим, что с-лактоны возникают также в процессе щелочного или кислотного гидролиза корриноидов на воздухе [69]).

Инхоффеном и сотр. [72] обнаружено еще одно осложнение при действии галогенирующих агентов. При хлорировании кобэстера (15—20 кратный избыток $Cl_2$ в $CCl_4$ при комнатной температуре) в течение нескольких секунд получен бесцветный аддукт (**32**). Восстановление (**32**), например $[Rh(CO)_2Cl]_2$ в метаноле при комнатной температуре, и последующая обработка водным KCN приводили к 10-хлордицианокобэстеру.




(9)



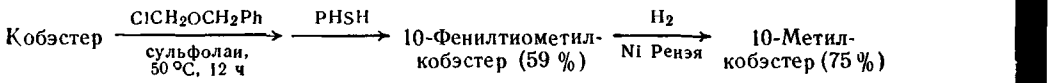

(**32**) внешние заместители,как в (**1а**)

Сотрудники Эшенмозера исследовали электрофильное замещение в корриновом хромофоре, используя простые синтетические норкоррины (т. е. коррины, лишенные заместителей при С-5, С-10 и/или С-15). Поскольку биосинтез корриноидов может проходить через образование промежуточного 5,15-бисноркоррина, представляло интерес выяснение вопроса, обладают ли точки ферментативного метилирования (т. е. переноса метильных групп с *S*-аденозилметионина) корринового хромофора врожденной большей реакционной способностью. Для превращения синтетического 5,15-бисноркобэстера в синтетический кобэстер было необходимо осуществить региоселективное замещение в корриновом хромофоре. Вычисления методом молекулярных орбиталей показали, что реакционная способность С-5 и С-15 в отношении электрофила должна быть выше, чем у С-10 [73]. Найдено [74], что рацемический дициано(7,7,12,12-тетраметилкоррин)кобальт(III) и рацемический (7,7,12,12,19-пентаметилкоррин)никель(II)хлорид претерпевают замещение у С-15 под действием $^2H^+$ или хлорсульфонилизоцианата/ДМФА, что приводит к образованию 15-цианопроизводных. Это можно объяснить стерическим экранированием положений С-5 и



С-10 геминальными диметильными группами (соответственно у С-7 и С-12).

Прямое метилирование корринового хромофора невозможно, в силу чего необходимо было создание реагентов, вводящих заместители при С-5 и С-15, которые далее могли быть превращены в метильные группы. Успех сопутствовал работе только с двумя такими реагентами [39]: $(SCN)_2$ или $ClCH_2OCH_2Ph$, например по схеме (10).




(10)

Реакция, аналогичная (10), была использована при синтезе кобировой кислоты. Смесь С-13-эпимеров 5,15-бисноркобэстер-с-лактон-f-нитрила в реакции с $PhCH_2OCH_2Cl$ (в MeCN-NiCl, 88 °C, 15 ч) дала с 47 % выходом 5,15-бисфенилтиометилкобэстер-с-лактон-f-нитрил (смесь С-13-эпимеров), который затем превращали в синтетическую кобировую кислоту (см. разд. 24.4.2). Использование 5,15-бисноркобэстер-с-лактон-f-нитрила (а не 5,15-бисноркобэстера или 5,15-бисноркобэстер-f-нитрила) уменьшило замещение при С-10 (получено менее 0,5 % замещенного при С-10 продукта). В условиях реакции (10) с-лактон кобэстера оставался неизменным.

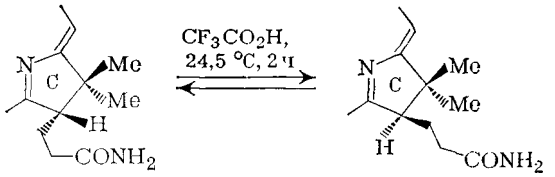
### 24.4.4.6. Окисление метильных групп при С-5 и С-15

Метильные группы при С-5 и С-15 корриноидов, активированные вследствие их присоединения к корриновому хромофору, избирательно окисляются перманганатом калия в безводном пиридине до карбоксильных групп [75]. Образующиеся карбоновые кислоты — аномально сильные ($pK_a$ 15-нор-Cbl-15-$CO_2H$ равна 2,1). Нагревание каждой из кислот в $Ac_2O$/AcOH вызывает их декарбоксилирование с образованием норкорриноидов. Интересно, что карбоксильные группы при С-5 и С-15 стимулируют гидролиз близрасположенных пропионамидных групп гидроксидом Ce(III). Cbl(e-OH) превращали в соответствующий е-пентиламид и окисляли до 15-норкарбоновой кислоты. Обработка этой кислоты безводным фторидом водорода (для удаления нуклеотида), а затем гидроксидом Ce(III) (100 °C, 3 ч) приводила к образованию 2-аминопропанола-1 и пентиламина. При аналогичной обработке Cbl(b-OH) получен только 2-аминопропанол-1.

### 24.4.4.7. Эпимеризации у С-13 и С-8

Обработка корриноидов сильными кислотами катализирует обратимую реакцию образования более глубоко окрашенных в красный цвет 13-эпикорриноидов {схема (11)}. Эти соединения отличаются от корриноидов по своим хироптическим свойствам,

по-видимому, за счет несколько отличной асимметрии связи $C_{12}$—$C_{13}$, передающейся на корриновый хромофор. Микробиологическая активность CN-Cbl (13-эпи) в системе *E. coli* составляет 14 % от активности CN-Cbl.




(11)

В результате восстановления с-лактона CN-Cbl образуется Cbl-abdeg-пентамид (50 %) с примесью его 8-эпимера (8 %). Амидирование последнего дает CN-Cbl (8-эпи). Скорость роста *E. coli* в среде, содержащей этот эпимер, как и в случае CN-Cbl (13-эпи), низка. Однако в растущих культурах *P. shermanii* он трансформируется в CN-Cbl [76, 77].

### 24.4.4.8. $Cbl^{II}$, $Cbl^{I}$, H-Cbl (гидридокобаламин) и близкие модельные соединения

*Корриноиды, содержащие Co(I) или Co(II), получены путем* восстановления. Например, HO-Cbl в анаэробных условиях реагирует по схемам (12)—(14) [78, 79].

$$\text{HO-Cbl} \xrightarrow[\text{0,2 } M \text{ фосфат, pH 7,0}]{\text{электрохимическое восстановление}} Cbl^{II} \qquad (12)$$

$$\text{HO-Cbl} \xrightarrow{\text{водн. } NaBH_4} Cbl^{I} \qquad (13)$$

$$\text{HO-Cbl} \xrightarrow{Zn,\ HOAc} \text{Зеленый раствор, содержащий H-Cbl} \qquad (14)$$

О количественных исследованиях электрохимии кобаламинов см. [80]. Восстановленные модельные соединения получают аналогичными методами. Особенно удобной является препаративная реакция (15) [81], протекающая через образование *in situ* комплекса кобалоксима(II). При восстановлении $ClCo(dmgH)_2PBu_3$ действием $NaBH_4$ в забуференном до pH 7,0 водном метаноле получены черные, разрушающиеся на воздухе кристаллы $HCo(dmgH)_2PBu_3$ [79]. В отличие от $Co^{I}(dmgH)_2L$ это соединение растворимо в неполярных растворителях. H-Cbl и гидридокобалоксимы представляют собой сопряженные кислоты $Cbl^{I}$ и кобалоксимных(I) нуклеофилов соответственно, каждый из которых формально несет отрицательный заряд [для $HCo(dmgH)_2PBu_3$ $pK_a \approx 10{,}5$].

$$CoCl_2 \cdot 6H_2O \xrightarrow[\text{py в MeOH}]{\text{2 dmg H, 2NaOH}} Co^{II}(dmg\,H)_2\,py \xrightarrow{NaBH_4} :Co^{I}(dmg\,H)_2\,py \qquad (15)$$

Все эти соединения весьма чувствительны к окислению. Так, под действием кислорода $Cbl^{I}$ и $Cbl^{II}$ со временем переходят в

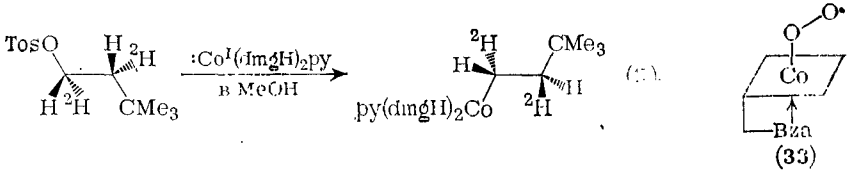


HO-Cbl [82], в то время как $N_2O$ избирательно переводит $Cbl^{I}$ в $Cbl^{II}$ [83]. При 174 K $Cbl^{II}$ быстро и обратимо реагирует с кислородом, образуя комплекс со стехиометрией $CblO_2$ и возможной структурой (33) [84]. ЭПР-спектры этого соединения показывают, что плотность неспаренного электрона локализуется преимущественно на атомах кислорода. Атаке (33) другой молекулой $Cbl^{II}$ и образованию пероксокомплекса (Cbl-OO-Cbl) препятствуют стерические факторы. В водном растворе при низких pH $Cbl^{I}$ и H-Cbl быстро разлагаются (до $Cbl^{II}$ и $H_2$) (время полупревращения $Cbl^{I}$ при pH 8,01 составляет 67 мин, при pH 6,98 оно равно 22 мин) [78].

$Cbl^{I}$ быстро реагирует с алкилирующими агентами (алкилгалиды, *O*-толуолсульфонаты, эпоксиды). Реакции этого типа представляют собой прекрасный общий метод синтеза алкилкобаламинов, например по схеме (16) [78].

$$Cbl^{I} + MeI \longrightarrow MeCbl + I^{-} \qquad (16)$$

Биосинтез AdoCbl включает реакцию между $Cbl^{I}$ и ATP (см. разд. 24.4.3). Производные Co(I) модельных соединений в реакциях с алкилирующими агентами ведут себя аналогично $Cbl^{I}$. Показано [85], что реакция между различными алкилирующими агентами и $Cbl^{I}$ или (трибутилфосфин)кобалоксимом(I) подчиняются кинетике второго порядка. Реакционная способность алкилгалидов убывает в ряду: $RI > RBr \gg RCl$ и $MeX > EtX > Me_2CHX > Me_3CX$. Характеристики этих реакций соответствуют механизму замещения $S_N2$, и для некоторых из них, проходящих с участием кобалоксима(I), показано, что с точки зрения стереохимии они протекают с инверсией [86, 87], например по схеме (17).




(17)

(33)

Нуклеофильности по шкале Пирсона при этом следующие: 14,4 для $Cbl^{I}$; 14,3; 13,8; 13,6; 13,3 и 13,1 [85] для L-кобалоксимов(I) с $L = H_2O$, py, $Me_2S$, $Bu_3P$ и $C_6H_{11}NC$ соответственно. Такие значения характерны лишь для немногих нуклеофилов (например, для $CN^-$ эта величина равна 6,7), поэтому $Cbl^{I}$ и производные кобалоксима(I) получили название «супернуклеофилов».

Интересное исключение из механизма $S_N2$ обнаружено Бреслоу и Ханна [88], нашедшими, что [1-$^2$H]циклодецил-*O*-толуол-*n*-сульфонат не реагирует с $Cbl^{I}$ (15 ч, 50 %-ный водный MeOH), в то время как с соответствующим иодидом в течение 15 мин образуется циклодецилкобаламин. Однако продукт содержал дейтерий как в положении C-1 циклодецильной группы, так и в *других* положениях кольца. Замещение $Cbl^{I}$ по механизму $S_N2$ в случае обоих

циклодецильных субстратов, по-видимому, затруднено. В то же время с иодциклодеканом возможен другой тип переноса электронов, через циклодецильный радикал {схема (18)}.

$$Cbl^{I} + RI \rightleftarrows Cbl^{II} + (RI)^{-} \longrightarrow I^{-} + R\cdot \xrightarrow{Cbl^{II}} R\text{-}Cbl \quad R = \text{циклодецил} \tag{18}$$

Комплексы кобалоксима(II) реагируют с алкилирующими агентами, являющимися хорошими акцепторами электронов, например по схеме (19). Для таких реакций установлен механизм переноса электронов, аналогичный реакциям (18) [89].

$$2Co^{II}(dmgH)_2py + PhCH_2Br \xrightarrow{\text{бензол}} BrCo(dmgH)_2py + PhCH_2Co(dmgH)_2py \tag{19}$$

$$[\kappa\,(\text{при } 298\text{ K}) = 3{,}2 \pm 0{,}2 \cdot 10^{-1}\ \text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}]$$

Потенциально полезным свойством H-Cbl и гидридокобалоксимов является их способность к присоединению к неактивированным алкенам, например по схеме (20) [79]. Отметим, что $Cbl^{I}$ с этиленом не реагирует. Как гидридосоединения, так и Co(I)-нуклеофилы реагируют с алкенами, активированными электронноотгягивающей группировкой, однако механизм присоединения здесь иной {схемы (21), (22)} [79].

$$H\text{-}Cbl + C_2H_4 \xrightarrow{MeCO_2H} EtCbl \tag{20}$$

$$HCo(dmgH)_2PBu_3 \xrightarrow[\text{водн. MeOH}]{\text{избыток } CH_2{=}CHCN} CH_3CHCNCo(dmgH)_2PBu_3 \tag{21}$$

$$:Co^{I}(dmgH)_2py \xrightarrow[pH \gg 7]{CH_2{=}CHCN} NCCH_2CH_2Co(dmgH)_2py \tag{22}$$

### 24.4.4.9. Электрофильная атака связей Co—C

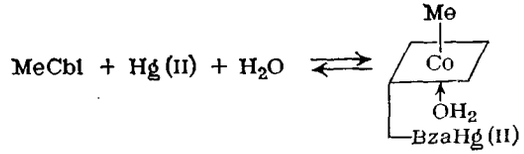
Связь Co—C алкилкорриноидов и их модельных соединений может расщепляться галогенирующими агентами {схема (23)}. Попытки интерпретации механизма этих реакций противоречивы [90].

$$AdoCbl + I_2 \longrightarrow I\text{-}Cbl + Ado\,I \tag{23}$$

Под действием Hg(II) MeCbl претерпевает бимолекулярное электрофильное замещение ($S_E2$), образуя ион метилртути, MeHg(II) [91]. У рыб и млекопитающих генерация токсичного MeHg(II) из Hg(II) и эндогенного MeCbl может происходить в водной среде. События, происшедшие в Минамата (Япония), могут служить иллюстрацией ужасных последствий воздействия избыточных количеств MeHg(II) и Hg(II) на экологическую систему.

При взаимодействии MeCbl с Hg(II) (водный ацетатный буфер, pH 5,0, комнатная температура) можно наблюдать (спектрофотометрически) две конкурирующие реакции [91] {схемы (24), (25)}.





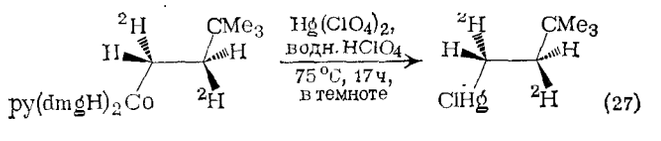

(24)

$$MeCbl + Hg(II) + H_2O \longrightarrow HO\text{-}Cbl + MeHg(II) + H^{+} \tag{25}$$

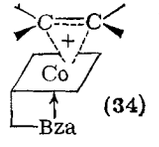
MeHg(II) реагирует с MeCbl, образуя $Me_2Hg$ и HO-Cbl, однако эта реакция протекает много медленнее, чем реакция (25). Лишенный основания корриноид из реакции (24) реагирует с Hg(II), но константа скорости этой реакции составляет лишь примерно $10^{-3}$ от константы реакции (25). Вклад реакции (24) заключается, таким образом, в уменьшении концентрации реакционноспособного соединения MeCbl. EtCbl аналогично реагирует с Hg(II), однако в этом случае связь Co—C не расщепляется. Исследования реакций между алкил(акво)кобалоксимами (первичные алкилы; вторичные алкилы не реагируют) и Hg(II) показывают, что механизм дезалкилирования близок таковому для реакции RCbl за исключением того, что в первом случае нет аналогичной предравновесной стадии [92] {ср. реакцию (22)}. Показано, что кинетика реакции алкилкобалоксимов с Hg(II) в водной $HClO_4$ подчиняется выражению (26) [87]; для $R = Me_3CCH_2CH_2$ $\kappa_{298K} = 1{,}9\cdot10^{-3}$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$. В одном случае четко показана инверсия дезалкилирования {схема (27)} [87].

$$\frac{d\,[RHg(II)]}{dt} = \kappa\,[RCo(dmgH)_2H_2O]\,[Hg(II)] \tag{26}$$

Этот результат контрастирует с данными, полученными при изучении остальных электрофильных замещений металл-углеродных связей под действием Hg(II), где имеет место сохранение конфигурации.




(27)




(34)

Ионы многих других металлов, например Cr(II), Ir(IV)$Cl_6$, Pd(II)$Cl_4$, реагируют с соединениями алкилкобальта с разрывом связи Co—C. Механизмы некоторых из этих реакций, например MeCbl с Pd(II)$Cl_4$ [93], аналогичны механизмам с участием Hg(II) (см. выше). Cr(II) вызывает восстановительное расщепление связи Co—C в RCbl {схема (28)}. Механизм этого расщепления либо $S_N2$ (прямое замещение), либо окислительно-восстановительное замещение $S_E2$ {т. е. перенос карбаниона $R^-$ с $RCbl^{III}$ на Cr(III)}. В случае Ir(IV)$Cl_6$ металл окисляет кобальтовый комплекс до RCo(IV), в котором R далее замещается хлорид-ионом [95]. Такие

частицы Co(VI) генерировали электрохимически [96] и характеризовали спектрофотометрическими методами [23] (см. разд. 24.4.1). Алкильные группы можно также удалить из алкилкобальтовых соединений реакциями с комплексами Co(I), Co(II) и Co(III). Перенос алкильной группы с алкилкобалоксима на кобалоксим (I) или кобалоксим(II) в метаноле подчиняется механизму бимолекулярного замещения с инверсией конфигурации у алкильной группы [97].

$$RCbl + Cr(II)aq \longrightarrow Cbl^{II} + (H_2O)_5Cr(II)R \xrightarrow{H^+} RH + Cr(III)aq \quad (28)$$
$$R = Me \text{ или } Et$$

### 24.4.4.10. π-Комплексы кобаламинов и кобалоксимов

Имеются данные, что простые алкены (например, этилен) и алкены, содержащие электронодонорные группировки (например, виниловые эфиры), образуют комплексы с Co(III) (в кобаламинах и кобалоксимах) [98—101], в то время как алкены, несущие электроноакцепторные группы (например, тетрацианоэтилен), образуют комплексы с производными Co(I) [102]. Такие комплексы соответствуют π-комплексам, например (34). {Об их структуре и функции см. [98, 99, 102].} π-комплексы Co(III) являются, вероятно, интермедиатами в сольволизе 2-ацетоалкилкобалоксимов {схема (29)} [98], в катализируемом кислотой распаде 2-гидрокси- и 2-алкоксиалкилкобаламинов и кобалоксимов [103] {схема (30)} и в синтезе алкилкобаламинов по схеме (31) [99]. Они были также предложены в качестве интермедиатов некоторых кобаламин-зависимых ферментативных реакций [104] (см. разд. 24.4.5).

$$AcOCH_2CH_2Co(dmg\,H)_2py \xrightarrow{EtOH} EtOCH_2CH_2Co(dmg\,H)_2\,py + HOAc \quad (29)$$
$$[k\ (\text{при } 298\ K) = 4{,}37 \cdot 10^{-6} c^{-1}]$$

$$HOCH_2CH_2\text{-}Cbl \xrightarrow[100\ ^\circ C,\ 2\ мин]{0{,}01\ M\ HCl} H_2O + CH_2{=}CH_2 + HO\text{-}Cbl \quad (30)$$

$$HO\text{-}Cbl + H_2C{=}CHOCH_2CH_2OH \longrightarrow \text{(1,3-диоксолан-2-ил)-}CH_2Cbl + H_2O \quad (31)$$

### 24.4.4.11. Фотохимия алкилкорриноидов и модельных соединений

AdoCbl и другие алкилкорриноиды разлагаются под действием УФ- и видимого света. Природа продуктов зависит от алкильной группы и от наличия молекулярного кислорода. Аэробный фотолиз RCbl дает HO-Cbl и альдегид, происходящий из R·, вероятно через $RO_2$·. В присутствии молекулярного кислорода при облучении (в некоторых случаях термолизе) алкилкобаламинов образуются



пероксидные соединения {схемы (32), (33)} [105, 106].

$$MeCH_2CHMeCo(dmg\,H)_2py \xrightarrow[\text{избыток } O_2 \text{ в } H_2O]{h\nu} MeCH_2CHMeOOCo(dmg\,H)_2py \quad (32)$$

$$MeCbl \xrightarrow[\text{избыток } O_2 \text{ в } H_2O]{h\nu} HO\text{-}Cbl + CH_2O \quad (33)$$

Подробные исследования [107] аэробного фотораспада нескольких алкилкобаламинов показали, что квантовый выход (Ф) зависит от длины волны падающего света (250—570 нм) и pH раствора (1 или 7). Для MeCbl получены $\Phi_{570} = 0{,}12$, $\Phi_{250} = 0{,}35$ (pH 7); аналогичная зависимость от длин волн была найдена и при pH 1 (для форм алкилкобаламинов, лишенных основания). Однако для EtCbl при pH 1 квантовый выход понижался с 0,38 (550 нм) до 0,28 (250 нм). MeCbl, по-видимому, устойчив к аэробному фотолизу. Его связь Co—C легко расщепляется на Me· и $Cbl^{II}$ (импульсный фотолиз MeCbl имеет $k \approx 1{,}5 \cdot 10^9$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$) [108], однако эти частицы быстро рекомбинируют, если не присутствуют акцепторы Me· (типа молекулярного кислорода или пропанола-2). EtCbl и AdoCbl быстро распадаются при анаэробном фотолизе [21], поскольку образующиеся вначале органические радикалы (их появление можно зафиксировать с помощью ЭПР) [109] способны участвовать в превращениях, недоступных для Me· {схемы (34), (35)}.

$$EtCbl \xrightarrow{h\nu} Cbl^{II} + 1/2H_2 + C_2H_4 \quad (34)$$

$$AdoCbl \xrightarrow{h\nu} 8{,}5'\text{-Циклоаденозин } (+1/2H_2?) \quad (35)$$

Анаэробное облучение водного раствора MeCbl лампой мощностью 150 Вт постепенно приводило к образованию $CH_4$ и $C_2H_6$ в соотношениях, изменяющихся в зависимости от pH раствора (29/71 при pH 4; 57/43 при pH 12,5) [110]. Добавление KCN (до 0,1 *M*) или 2-меркаптоэтанола (до 1 *M*) вызывало изменения соотношения метан/этан до 100/0. Эти добавки, как полагают, образуют комплексы с ионом кобальта (вытесняя диметилбензимидазол) и затем замещают $Me^-$ в MeCbl. Утверждалось [110], что облучение $C^2H_3Cbl$ дает 89 % $C_2H_6$ и 11 % $C_2H_3{}^2H_3$, причем последнее соединение образуется при удалении Me из корриновой системы. Этот интересный результат требует подтверждения. О анаэробном фотораспаде алкилкобалоксимов в водном растворе см. [111].

## 24.4.5. КОРРИНОИД-ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

Эти реакции приведены в табл. 24.4.3. Две из них (катализируемые метилмалонил-CoA-мутазой и $N^5$-метилтетрагидрофолат-гомоцистеинилметилтрансферазой) важны в физиологии человека. Хотя у человека и имеется рибонуклеотидредуктаза, она относится к

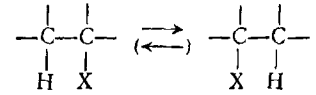
*Таблица 24.4.3 Корриноид-зависимые ферментативные реакции*

| *(А)* MeCbl-зависимый фермент | |
|---|---|
| *Реакции* | |
| 1. Синтез метионина ($N^5$-метилтетрагидрофолат : гомоцистеинметилтрансфераза) | {См. текст и схему (37)} |
| 2. Синтез метана | |
| 3. Синтез ацетата | |

| *(Б)* AdoCbl-зависимый фермент | *Реакции* |
|---|---|
| 4. Диолдегидраза | См. текст |
| 5. Этаноламиноаммониалиаза | Напр.: $HO(CH_2)_2NH_2 \longrightarrow CH_3CHO + NH_3$ |
| 6. Аминомутаза, использующая либо | |
| (а) (*S*)-3,6-диаминогексановую кислоту | Напр.: $H_2N(CH_2)_3\overset{S}{C}HNH_2CH_2CO_2H \rightleftarrows$ |
| (б) (*R*)-2,6-диаминогексановую кислоту | $\rightleftarrows CH_3\overset{S}{C}HNH_2CH_2\overset{S}{C}HNH_2CH_2CO_2H$ |
| (в) (*R*)-2,5-диаминопентановую кислоту | |
| (г) α- или β-лейцин | |
| 7. Метилмалонил-CoA-мутаза | См. схемы (39), (41) и текст |
| 8. Глутаматмутаза | См. схему (1) |
| 9. α-Метиленглутаратмутаза | $HO_2C(CH_2)_2C(CO_2H)=CH_2 \rightleftarrows$ $\rightleftarrows HO_2CCHMeC(CO_2H)=CH_2$ |
| 10. Рибонуклеотидредуктаза | См. схему (48) и текст |

классу ферментов, независимых от AdoCbl. До недавнего времени полагали, что в растениях корриноидов не содержится. Однако для фермента лейцин-2,3-аминомутазы, выделенного из проростков бобовых, была продемонстрирована зависимость от AdoCbl *in vitro* [113]. Остальные реакции, приведенные в табл. 24.4.3, осуществляются микроорганизмами. Почти наверняка имеются также другие корриноид-зависимые ферментативные реакции, еще ожидающие своего открытия.

Реакции из табл. 24.4.3 можно разделить на две группы. К группе (А) относятся синтетические реакции, проходящие *через* MeCbl; они обсуждаются ниже на примере $N^5$-метилтетрагидрофолат : гомоцистеинметилтрансферазы. Реакции группы (Б) требуют наличия AdoCbl и имеют ряд общих черт. Так, реакции 4—9 и, возможно, 5 представляют собой молекулярные перегруппировки, в которых группа X меняется местами с атомом водорода {схема (36)}.



(36)



Ключевой стадией во всех этих реакциях является, по-видимому, разрыв связи Co—C, протекающей, вероятно, по гомолитическому механизму, в результате чего образуется $Cbl^{II}$ и аденозил-радикал (см. [112б], авторы [112в] придерживаются противоположного мнения). Последний отнимает атом водорода у субстрата, в результате чего образуется 5′-дезоксиаденозин и радикал, производимый из субстрата (S·) (распад связи Co—C и перенос H-атома с субстрата может быть согласованным процессом). Далее S· перегруппировывается, образуя радикальное производное продукта (P·), который затем отнимает атом водорода у 5′-дезоксиаденозина, давая продукт PH и аденозил-радикал. Последний может рекомбинировать с $Cbl^{II}$ или атаковать следующую молекулу субстрата. Доказательства этого механизма, а также механизма превращения S· в P·, наряду с другими возможными механизмами, приводятся ниже в разделе, касающемся метилмалонил-CoA-мутазы и диолдегидразы. Рибонуклеотидредуктаза, хотя и не катализирует молекулярной перегруппировки, включена в ферменты группы B, так как по своему механизму сближается с ферментами этого класса. Этот фермент также подробно обсуждается ниже. Корриноид-зависимое превращение треонина в (*R*)-1-аминопропанол-2 [56], по-видимому, представляет собой реакцию, отличную от приведенных в таблице. В отсутствие дополнительной информации трудно делать какие-либо заключения о механизме этого процесса.

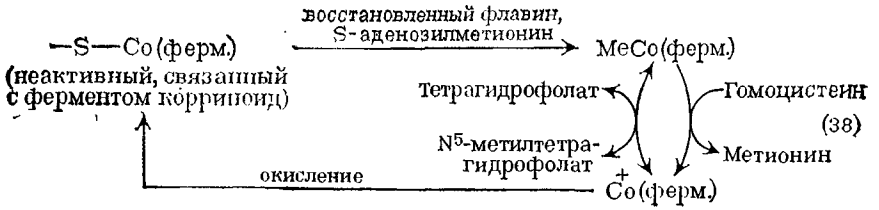
### 24.4.5.1. $N^5$-метилтетрагидрофолат : гомоцистеинметилтрансфераза

Как в животных тканях, так и в *E. coli* синтез метионина из гомоцистеина протекает с участием кобаламин-зависимых ферментов по общей схеме (37).

*N*-Метилтетрагидрофолат + Гомоцистеин ⟶ Тетрагидрофолат + Метионин (37)

После выделения фермент из *E. coli* за счет прочно связанного кобаламина(III) имеет цвет мякоти лосося. Для синтеза метионина по схеме (37) необходимо также наличие восстановленного флавина и *S*-аденозилметионина, генерирующего связанный с ферментом MeCbl из нефункционального кобаламина. MeCbl, связанный с ферментом, отличается высокой стабильностью в отношении света по сравнению со свободным MeCbl. Образование связанного с ферментом MeCbl можно блокировать иодпропаном, который превращает $Cbl^I$ в PrCbl. Фотолиз пропилированного фермента приводит к восстановлению его активности. Предложен механизм реакции кобаламин-зависимого синтеза метионина {схема (38)} [114]. Метильная группа связанного с ферментом MeCbl переносится на гомоцистеин, в результате чего образуются метионин и $Cbl^I$. Модельные исследования убедительно свидетельствуют в

пользу такого механизма [115]. Реакция между $Cbl^{I}$ и *N*-метилтетрагидрофолатом представляет собой наименее понятую часть схемы (38).




Хорошо известно, что *N*-метиламины в реакциях $S_N2$-типа инертны даже в тех случаях, когда в качестве нуклеофила участвует $Cbl^{I}$ (производные тетраалкиламмония быстро реагируют с кобальтовыми(I) нуклеофилами, давая соединения алкилкобальта [116]). Фермент может активировать *N*-метилтетрагидрофолат протонированием N-5 и, действительно, сообщалось [117], что $Cbl^{I}$ при pH 4 реагирует с *N*-метилтетрагидрофолатом с образованием MeCbl (2,5 %). Однако поскольку MeCbl был идентифицирован только на основе дифференциального УФ/видимого спектра, это сообщение требует подтверждения.

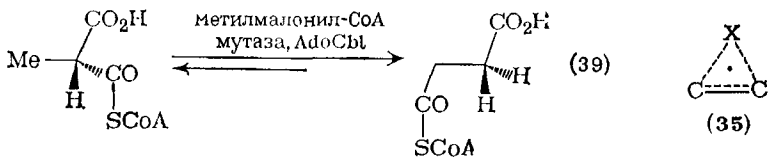
Значение *N*-метилтетрагидрофолат : гомоцистеинметилтрансферазы для животных представляет собой спорный вопрос. Поскольку метионин является компонентом питания человека, полагают, что роль ферментативного пути в производстве метионина незначительна. Метилтрансфераза, однако, может осуществлять единственно возможный путь регенерации тетрагидрофолата из $N^5$-метилтетрагидрофолата. Предложено (гипотеза «метилфолатной ловушки» [118]), что клинические проявления злокачественной анемии, отличные от нейрологических поражений (их причины еще не выяснены), могут объясняться за счет «обусловленного недостатка фолата», возникающего вследствие недостатка кобаламина. Нарушение превращения $N^5$-метилтетрагидрофолата в тетрагидрофолат вызывает накапливание фолата в форме, неспособной к выполнению всех биологических функций. Одним из последствий этого нарушения является замедление синтеза ДНК (для производства тимидинтрифосфата тимидилатсинтетазой необходим 5,10-метилентетрагидрофолат).

Клетки некоторых опухолей обладают пониженной активностью $N^5$-метилтетрагидрофолат : гомоцистеинметилтрансферазы и не способны синтезировать метионин из гомоцистеина в достаточных количествах. В противоположность нормальным клеткам в среде, содержащей гомоцистеин, но не метионин, такие клетки погибают. Это обстоятельство используется в новых подходах к химиотерапии рака [119].



### 24.4.5.2. Метилмалонил-CoA-мутаза

Этот фермент осуществляет одну из стадий удивительной последовательности реакций, необходимых для поддерживания нормального состояния организма человека. Пропионил-CoA ферментативно карбоксилируется до (*S*)-метилмалонил-CoA, который затем эпимеризуется до (*R*)-метилмалонил-CoA. Только (*R*)-изомер метилмалонил-CoA является субстратом AdoCbl-зависимой метилмалонил-CoA-мутазы, переводящей его в сукцинил-CoA {схема (39)}. Таким путем пропионил-CoA, возникающий, в частности, в результате деградации жиров, связывается посредством сукцинил-CoA с циклом Кребса, а накапливание токсичной метилмалоновой кислоты предотвращается. В случае редкого наследственного заболевания у детей, метилмалонилкацидурии [120], нормальное функционирование метилмалонил-CoA-мутазы нарушается. В случае одной из форм болезни («чувствительной к $B_{12}$») имеет место недостаток кофактора фермента в силу повреждения биосинтеза AdoCbl. Это можно контролировать введением HO-Cbl ($\approx$1 мг в день). Имеется также другая разновидность заболевания, нечувствительная к лечению кобаламином, возникающая из-за дефекта в структуре фермента.




Исследования с метилмалонил-CoA, специфически меченным $^{13}C$ и $^{14}C$, показали [121, 122], что перегруппировка в сукцинил-CoA включает внутримолекулярный 1,2-переход тиоэфирной группировки. Проведено [121] сопоставление реакции метилмалонил-CoA-мутазы с «перегруппировкой Урри-Хараша» (например: $Me_2CPhC^{\bullet}H_2 \rightarrow Me_2C^{\bullet}CH_2Ph$) и высказано предположение, что в ферментативной реакции также принимают участие радикалы. Однако хорошо известные перегруппировки β-арилалкильных радикалов коренным образом отличаются от радикальных механизмов, возможных для метилмалонил-CoA-мутазы и любых других AdoCbl-зависимых перегруппировок. В случае β-арилалкильных радикалов возможно образование мостикового интермедиата, у которого потеря резонансной энергии ароматического кольца частично компенсируется повышенной стабилизацией радикального центра. В случае же AdoCbl-зависимых перегруппировок необходимо учитывать стабильность интермедиатов типа (35), где X=OH, $NH_2$ или углеродсодержащая группа (например, COSCoA). Поскольку надежные доказательства 1,2-переходов в радикалах с *насыщенной* мигрирующей группой, составленной из элементов первого ряда (C, N или O), отсутствуют, можно полагать, что сое-

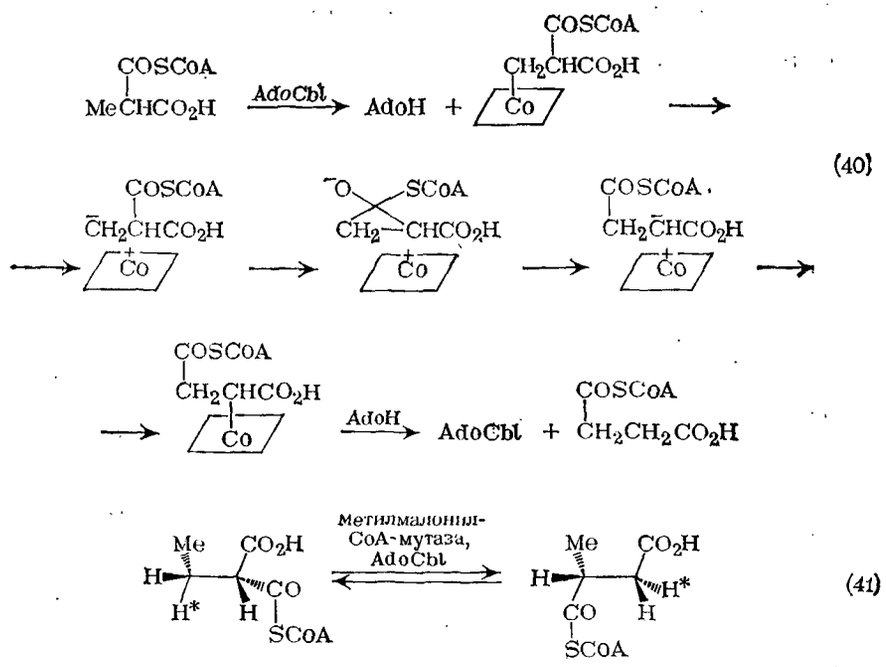
динения типа (35) энергетически невыгодны, как это следует и из теоретических соображений [123].

В 1964 г. Ингрэм [124] назвал превращения природных алкилкобаламинов «биологическими перегруппировками Гриньяра» и предложил механизм для реакции метилмалонил-CoA-мутазы {схема (40)}. Предполагалось, что связь Co—C промежуточного органокобаламина, образованного из субстрата и AdoCbl, поляризована ($Co^{\delta+}-C^{\delta-}$) и это обстоятельство инициирует перегруппировку. Позднее в поддержку этого механизма исследована модельная реакция [125]. Однако в силу чрезвычайно низкого выхода продукта перегруппировки (0,3 %) эта модель кажется неубедительной.

Тем временем исследования с метками ($^2H$ и $^3H$) показали, что реакция, катализируемая метилмалонил-CoA-мутазой, обладает, как теперь принято считать, основными чертами AdoCbl-зависимых реакций. Так, смесь немеченого метилмалонил-CoA и [$Me^2H_3$]-метилмалонил-CoA частично изомеризовались в сукцинил-CoA. Анализ содержания дейтерия в продукте и в исходном соединении, извлеченном из реакционной смеси, привел к предположению, что атом водорода, удаляемый с субстрата, соединяется с 5′-$CH_2$-водородными атомами AdoCbl в интермедиате, содержащем метильную группу, а затем водород удаляется, становясь частью продукта [126]. Исследование стереохимии метилмалонил-CoA-мутазной реакции продолжено изучением действия фермента на этилмалонил-CoA. С использованием в качестве метки дейтерия установлена стереохимия реакции по схеме (41). В этом случае, а также с метилмалонил-CoA замещение COSCoA на H проходит с сохранением конфигурации {ср. реакции, катализируемые диолдегидразой (см. ниже) и глутаматмутазой {см. схему (1)}, где аналогичные процессы сопровождаются инверсией}.

Впечатляющие данные, касающиеся механизма метилмалонил-CoA-мутазной реакции, получены в модельных исследованиях. Изучена [128] реакция $Cbl^I$ с 3,1 моль-экв. диметилбромметилмалоната в водном растворе (pH 8—9). Через 6 мин электронный спектр аликвоты раствора соответствовал образованию кобальт-углеродной связи [как в (36)]. Однако (36) слишком нестабилен, чтобы его можно было выделить. Реакционную смесь, содержавшую (36), выдерживали 48 ч при комнатной температуре, после чего экстрагировали эфиром, обрабатывали щелочью и хроматографировали; в результате получены малоновая кислота, метилмалоновая кислота (18 %) и янтарная кислота (3,7 %) (выходы рассчитаны по HO-Cbl, из которого восстановлением избытком $NaBH_4$ был приготовлен $Cbl^I$). Малоновая кислота возникает, вероятно, в результате щелочной дегидратации диметилбромметилмалоната. В контрольном эксперименте, в котором вместо HO-Cbl использован нитрат Co(II), образования янтарной кислоты не зарегистрировано.

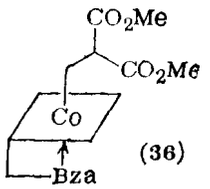





В другом исследовании [121] кобалоксим (37) облучали в этаноле и получали различные выходы диэтилдиметилмалоната и продукта перегруппировки, диэтил-2-метилсукцината. Колебания выходов в этом эксперименте и низкий выход в [128] были объяснены тем, что «вскоре после гомолитического распада связи кобальт-углерод субстрат (сложный эфир малоновой кислоты) теряет контакт с центральным атомом кобальта и лишенный таким образом каталитического действия последнего не может более перегруппировываться» [130]. Поэтому было синтезировано более сложное модельное соединение «мостиковый кобалоксим» (38) (структура доказана рентгеноструктурным анализом) [130]. В этом случае после гомолитического распада связи Co—C возникающий органический радикал не может удаляться от атома кобальта(II). Анаэробное облучение метанольного раствора (38) в течение 12 ч вызывало полный гомолиз связи Co—C. После обработки неочищенного препарата этанольным KOH, что вызывает расщепление сложноэфирных связей, получена 2-метилянтарная кислота с 83 % выходом. Этот блестящий эксперимент говорит о важной роли Co(II) в образовании продукта перегруппировки. Предложен механизм этого процесса {схема (42)} [130] с участием интермедиата, стабилизованного кобальтом (39) и, возможно, (38) и (40).

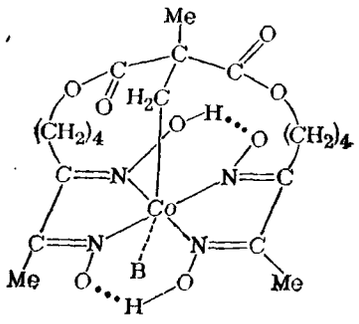
Модельная система [128] была развита введением в нее тиоэфирной группировки [131], которая также может претерпевать

1,2-переход, конкурируя со сложноэфирной группой. Проведена реакция $Cbl^{I}$, полученного восстановлением HO-Cbl избытком $NaBH_4$, с бромидом (41) в водном растворе (pH 8—9). Через

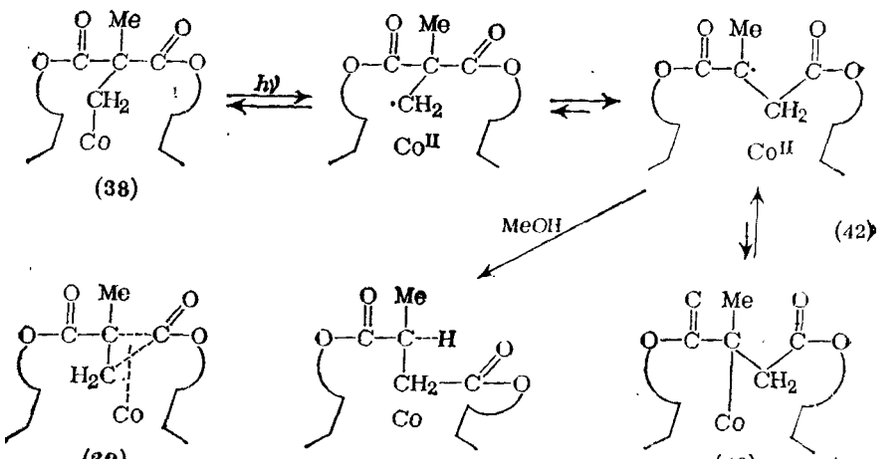


(36)

$(EtO_2C)_2CMeCH_2Co(dmgH)_2py$ (37)

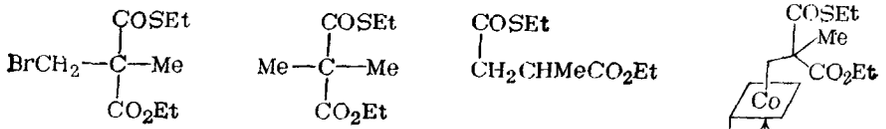


(38) В-метанол



(38) (42) (39) (40)

30 мин получен электронный спектр реакционной смеси, сходный со спектром AdoCbl. После стояния при комнатной температуре в течение одного дня смесь экстрагировали эфиром и получали (42) и до 70 % (43) (выход рассчитан по HO-Cbl). Предложено, что из (43) образуется промежуточный алкилкобаламин (44), возникающий в результате 1,2-перехода этилтиокарбонильной группы. Контрольные опыты показали, что в отсутствие HO-Cbl



(41) (42) (43) (44)



(или при замене последнего на $CoCl_2$) продукт перегруппировки (43) не образуется.

Аксиома, что механизм действия фермента не может быть полностью выяснен без знания его структуры. Ни для одного из кобаламин-зависимых ферментов не определена первичная структура, а определение трехмерной структуры кажется делом далекого будущего. Метилмалонил-CoA-мутаза в силу доступности, стабильности и относительно низкой молекулярной массы была выбрана в качестве объекта исследования [132]. Авторами был получен препарат фермента, гомогенный согласно данным ультрацентрифугирования и другим критериям. Средняя молекулярная масса 124 000; под действием гуанидинхлорида фермент диссоциирует на две субъединицы одинакового размера. Получен также кристаллический комплекс фермента с HO-Cbl, однако кристаллы не удовлетворяли требованиям кристаллографического анализа.

### 24.4.5.3. Диолдегидраза

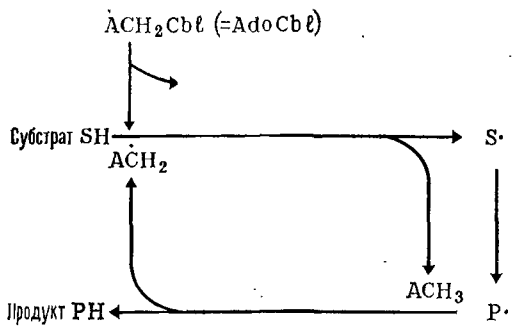
Этот фермент катализирует превращение 1,2-диолов ($C_2$—$C_4$, например пропандиола-1,2, глицерина, 3,3,3-трифторпропандиола-1,2) в альдегиды (например, из этандиола-1,2 образуется ацетальдегид) [133, 134]. Фермент может также превращать бутандиол-2,3 в бутанон, но не способен использовать в качестве субстратов диолы с пятью или более углеродными атомами. Глицериндегидраза представляет собой близкий, если не идентичный, фермент. Большинство субстратов постепенно инактивируют диолдегидразу. Пропандиол-1,2 может защищать фермент от инактивации, например глицерином. В отсутствие субстратов холофермент инактивируется кислородом. Диолдегидраза инактивируется также реагентами, атакующими тиольную группу.

Необычной чертой диолдегидразы является отсутствие у нее биологической стереоспецифичности в отношении энантиомеров субстратов. В конкурирующих условиях (*S*)-пропандиол-1,2 превращается в пропаналь быстрее (*R*)-пропандиола-1,2, но в реакции каждого диола в отдельности (*R*)-изомер реагирует быстрее [135]. По-видимому, (*S*)-изомер прочнее связывается с ферментом, но реагирует медленнее {для (*R*)-изомера $V_{макс}$ (нмоль·мин$^{-1}$) $= 13{,}9 \pm 0{,}60$, $K_м$ (моль·л$^{-1}$) $= 0{,}381 \pm 0{,}028 \cdot 10^{-4}$; для (*S*)-изомера эти величины равны $6{,}82 \pm 0{,}17$ и $0{,}123 \pm 0{,}07 \cdot 10^{-4}$ соответственно} [134].

Изотопные исследования [112б, 133, 136] превращения пропандиола-1,2 в пропаналь, катализируемого диолдегидразой, показывают, что а) включения H растворителя в пропаналь не происходит; б) метка $^2H$ (или $^3H$) при C-1 пропандиола обнаруживается у C-2 пропаналя и в 5′-$CH_2$ AdoCbl; в) $^3H$ из 5′-$CH_2$-группы AdoCbl переносится к C-2 пропаналя; г) в случае (*R*)-пропандиола-1,2 от C-1 удаляется $H_R$, в случае (*S*)-изомера удаляется

$H_S$; д) имеет место инверсия у С-2, т. е. Н присоединяется к С-2 со стороны, противоположной уходящей НО-группе; е) около 1 % метки $^3H$ при С-1 пропандиола-1,2 обнаруживается у С-2 соответствующей молекулы пропаналя; ж) метка $^{18}O$ из С-2-гидроксильной группы рацемического пропандиола-1,2 переходит в пропаналь, поэтому интермедиатом реакции является пропандиол-1,1, претерпевающий стереоспецифичную ферментативную дегидратацию (потерю *про-R*-гидроксильной группы) с образованием пропаналя.

В 1972 г. предложена схема AdoCbl-зависимых перегруппировок {схема (43)} [137]. Эта схема составлена на основе обширных исследований диолдегидразы с привлечением, где это возможно, других реакций. Во введении к этому разделу упоминалось о гомолизе связи Co—C AdoCbl и удалении атома водорода из молекулы субстрата. Когда субстратом SH является пропандиол-1,2, S· соответствует $CH_3CH(OH)C^{\cdot}HOH$; P· соответствует $CH_3C^{\cdot}HCH(OH)_2$, а продукт PH соответствует $CH_3CH_2CH(OH)_2(\rightarrow CH_3CH_2CHO + H_2O)$. Доказательства, что в реакции, катализируемой диолдегидразой, участвуют $Cbl^{II}$ и органические радикалы, получены методом ЭПР-спектроскопии. Так, для реакционной смеси, содержащей фермент, AdoCbl и пропандиол-1,2, замороженной до 77 K, отмечался широкий сигнал, с $g \approx 2{,}3$, соответствовавший $Cbl^{II}$, и дублет (расщепление 154 Гс, центр с $g = 2{,}0$), приписанный органическому радикалу [138]. Наблюдаемые спектры можно наиболее точно интерпретировать моделью, согласно которой органический радикал располагается на расстоянии $\geqslant 0{,}5$ нм от иона кобальта $Cbl^{II}$ [138]. Появление сигнала, приписанного органическому радикалу, кинетически компетентно, т. е. скорость образования радикала, соответствующего сигналу, выше общей скорости ферментативной реакции. Тот факт, что сигнал имеет вид дублета, объясняется взаимодействием типа электростатического обмена с Co(II).



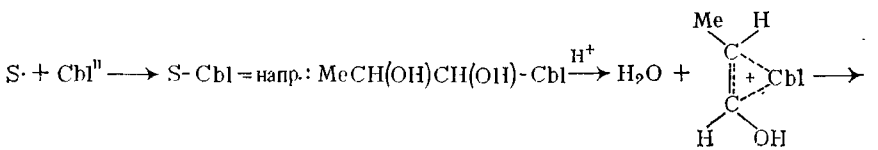

(43)

**Механизм (43) предусматривает образование в качестве интермедиата 5′-дезоксиаденозина. Это соединение было выделено**



в результате экспериментов, в которых диолдегидразу инкубировали с аналогами субстрата (в частности, с 2-гидроксиацетальдегидом), а затем денатурировали. Наиболее убедительным доказательством его роли как интермедиата являются опыты с этаноламинаммониалиазой [139]. Этот фермент осуществляет превращение этаноламина в ацетальдегид и аммиак, а также 2-аминопропанола-1 в пропаналь и аммиак. При инкубации фермента (15 с) с [1-$^3$H]-2-аминопропанолом-1 и последующей денатурации трихлоруксусной кислотой получен меченный тритием 5′-дезоксиаденозин (выход $>80$ %, считая на AdoCbl). Однако если перед обработкой трихлоруксусной кислотой комплекс фермента с аминопропанолом инкубировали (90 с) с этаноламином, то вновь происходило образование AdoCbl (80 %), а большая часть трития обнаруживалась в ацетальдегиде. И, наконец, инкубация [1,1-$^2H_2$]-2-аминопропанола-1 и [5′,5′-$^2H_2$]-AdoCbl с этаноламинаммониалиазой с последующей денатурацией дала 5′-дезоксиаденозин, который затем был подвергнут деградации до *n*-нитрофенилгидразона ацетальдегида. Продукт в основном содержал три атома дейтерия в метильной группе (по данным масс-спектрометрии).

Предложены три механизма превращения S· в P· {см. схему (43)}. Долфин и др. [104], воодушевленные свидетельствами образования π-комплексов в качестве интермедиатов некоторых реакций кобаламинов и кобалоксимов (см. разд. 24.4.4), предложили для диолдегидразы механизм (44). Заметим, что молекула воды, теряемая на первой стадии, должна вернуться на второй стадии процесса. Именно этим объясняются данные [136], полученные с использованием $^{18}O$. Другой возможностью является перенос электронов между $Cbl^{II}$ и S·, в результате чего образуются $Cbl^{I}$ и $S^+$. В диолдегидразной реакции таким интермедиатом ($S^+$) должен быть $CH_3CH(OH)C^+HOH$, способный перегруппировываться в $CH_3C^+HCH(OH)_2$ ($P^+$) через промежуточный протонированный гидроксиэпоксид. Окончательно, $Cbl^{I}$ и $P^+$ должны переходить в $Cbl^{II}$ и P·. Третий механизм [123] был предложен на основании данных, согласно которым 2-гидроксиалкильные радикалы (возникающие при атаке HO· диолов-1,2) быстро распадаются (в интервале pH 2,5—4) до 1-формилалкильных радикалов, например по схеме (45).



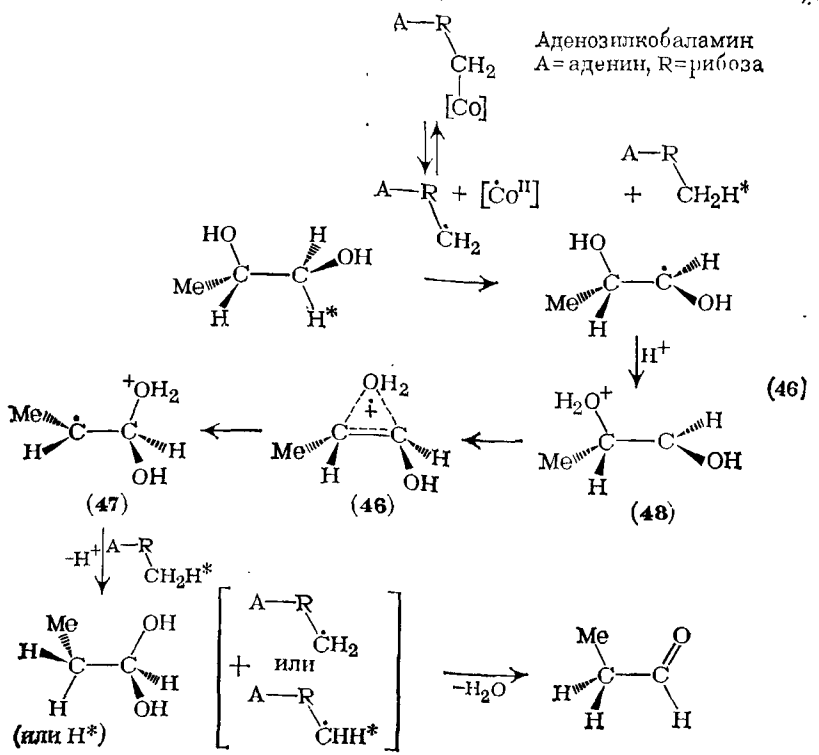

(44)

$$HOCH_2CH_2OH \xrightarrow{\cdot OH} H_2O + HOCH_2\dot{C}HOH \xrightarrow{H^+} H_2O + \dot{C}H_2CHO \quad (45)$$

$HOCH_2CHOH(CH_2)_nCo(dmgH)_2py$

(45)

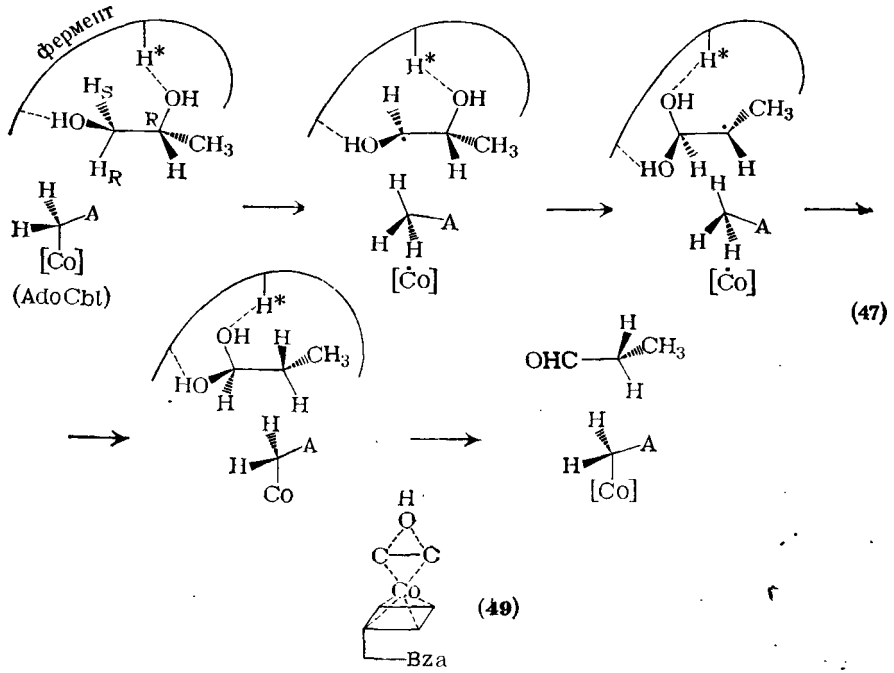
Эти реакции напоминают реакции диолдегидразы и, кроме того, проходят без участия иона металла. Проведены модельные исследования [149], имевшие целью показать, что реакции типа (45) могут инициироваться радикалами первичных алкилов. Обнаружено, что в результате анаэробного фотолиза дигидроксиалкилкобалоксимов (**45**, $n = 2$, 3, 4 или 9) при $n = 3$ образуется исключительно пентаналь, при $n = 4$ — смесь гексаналя и гексанона-2 (в соотношении примерно 1 : 4). При $n = 2$ или 9 карбонилсодержащие продукты не образуются. Возможен следующий механизм образования пентаналя из (**45**; $n = 3$): в результате фотолиза образуются гидратированный Co(II), диметилглиоксим, 4,5-дигидроксипентильный радикал, который затем претерпевает 1,5-H-переход (что подтверждается избирательным дейтерированием) с образованием 1,2-дигидроксипентильного радикала. Последний распадается на пентаналь и воду (через $PrC\cdot HCHO$ или $PrC\cdot HCH(OH)_2$, которые нейтрализуются диметилглиоксимом).




(46)



Была учтена [123] возможность того, что взаимопревращение S· и P· {схема (43)} может проходить через протонированное мостиковое соединение (**46**) {схема (46)}. Этот механизм учитывает все данные экспериментов с мечеными H и O, полученными в работе с диолдегидразой {меченые атомы обозначены на схеме (46) звездочками}. Расчеты методом *ab initio* показывают, что протонированное мостиковое соединение энергетически сравнимо с «открытыми» формами (**47**) и (**48**), и поэтому барьер активации кислородного перехода должен быть относительно низок. Возможная последовательность событий, происходящих в активном центре фермента, показана на схеме (46) (необходимый кислотный катализатор может представлять собой карбоксильную группу фермента).

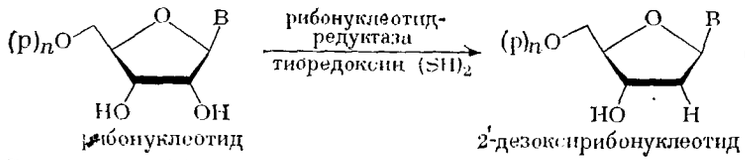



Предложены три механизма действия диолдегидразы, не требующие участия промежуточных радикалов. Приняв неверное утверждение о том, что кобальторганические соединения являются интермедиатами AdoCbl-зависимых ферментативных реакций (еще нет экспериментальных доказательств в пользу таких интермедиатов), Кори и др. [141] предложили многостадийный механизм диолдегидразной реакции, отличительной чертой которого является наличие большого числа алкил- и гидридокобальтовых интермедиатов. Салем и др. [29] на основании расчетов методом молекулярных орбиталей сформулировали механизм,

включающий интересное переходное состояние типа «двухголового тетраэдра» (49). Шраутцер [112c] предложил механизмы для диолдегидразы и этаноламинаммониалиазы, которые начинаются с гетеролитического распада связи Co—C AdoCbl с образованием $Cbl^{I}$ и 4′,5′-ангидроаденозина. $Cbl^{I}$ затем атакует молекулу субстрата с образованием (в случае пропандиола-1,2) 2-гидроксипропилкобаламина. Предполагается, что этот интермедиат посредством внутримолекулярного 1,2-гидридного перехода распадается на пропаналь и $Cbl^{I}$. Для объяснения переноса иона трития с 5′-$CH_2$-аденозина AdoCbl на пропаналь, отмеченного в [137] (см. выше), Шраутцер предположил, что этот перенос осуществляется *после* образования пропаналя в результате обменной реакции с участием 4′,5′-ангидроаденозина. Однако данные, предложенные Шраутцером в поддержку этой гипотезы, включая модельные опыты [142], недостаточно убедительны.

### 24.4.5.4. Рибонуклеотидредуктазы

Эти ферменты катализируют одну из стадий {схема (48)} биосинтеза ДНК и поэтому чрезвычайно важны для роста клеток [143]. AdoCbl-зависимые рибонуклеотидредуктазы характерны только для микроорганизмов, в частности *L. leichmannii*. Фермент из этого источника получен в гомогенном состоянии и представляет мономерную единицу с молекулярной массой 76 000. В рибонуклеотидредуктазах имеется аллостерический центр (или центры), благодаря которому продукт восстановления или другие дезоксирибонуклеотиды влияют на скорость восстановления рибонуклеотида (например, восстановление ATP этим ферментом стимулируется dGTP). Последнее свойство использовано для препаративного выделения фермента из *L. leichmannii* с применением афинной колонки, содержавшей иммобилизованный на Сефарозе dGTP [144].




(48)

рибонуклеотид — 2′-дезоксирибонуклеотид

B—основание, $(p)_n$—ди- или трифосфат

Рибонуклеотидредуктазы катализируют перенос атома водорода с дитиола $(SH)_2$ на C-2′ рибозного кольца. Реакция ATP с ферментом из *L. leichmannii* в $^2H_2O$ привело к образованию (2′*R*)-[2′-$^2$H]-dATP (т. е. сохранению конфигурации при C-2′). В этих условиях происходит быстрое дейтерирование дитиольного восстановителя ($SH \rightarrow S^2H$). Другие исследования с мечеными атомами показали, что в процессе реакции протоны воды/дитиола смешиваются с протонами 5′-$CH_2$ AdoCbl и что кислород при



C-2 удаляется, а при C-3 — сохраняется. Участие 5′-$CH_2$-группы AdoCbl предполагает, что в процессе реакции происходит обратимое расщепление связи Co—C подобно тому, как это происходит в AdoCbl-зависимых перегруппировках. Спектроскопическими методами показано, что имеет место гомолитический разрыв связи с образованием $Cbl^{II}$ и аденозил-радикала [145]. Смесь, состоявшую из фермента из *L. leichmannii*, AdoCbl, дигидролипоата (дитиол) и dGTP в буфере, инкубировали в течение 6—1000 мсек при 310 K, а затем замораживали до 130 K. ЭПР-спектр, снятый при 78—85 K, показал наличие сложного сигнала с $g \approx 2{,}119$, приписанного атому Co(II), взаимодействующему с аденозильным радикалом. При использовании GTP вместо dGTP после короткой инкубации при 310 K (10—40 мсек) сигнал появляется, но по прошествии большего времени его интенсивность существенно снижается. GTP, подобно dGTP, связывается в аллостерическом центре и производит необходимые конформационные изменения и, кроме того, реагирует с промежуточной радикальной парой.

Механизм рибонуклеотидредуктазной реакции предложен Шраутцером [112в], согласно которому промежуточный фермент-рибозильный катион атакуется $Cbl^{I}$. Однако этот механизм не в состоянии объяснить следующие факты: а) как осуществляется удаление гидроксила ($^-$OH — очень плохая уходящая группа; имеются данные, свидетельствующие против ее активации посредством, например, фосфорилирования, хотя возможность протонирования, как всегда, трудно доказать или опровергнуть); б) спектроскопические данные, полученные Блэкли и др. [145]. Очевидно, что вопрос о механизме этой реакции все еще остается открытым и необходима разработка неферментативных химических моделей этого процесса.

В заключение интересно отметить, что восстановление, катализируемое рибонуклеотидредуктазой из *E. coli*, включает, как показано, участие органического радикала, локализованного в β-положении тирозина белка. Данный фермент не зависит от AdoCbl, но содержит два атома не-гемного железа в «антиферромагнитно-сопряженном двухъядерном высокоспиновом Fe(III)-комплексе» [146].

### 24.4.5.5. Внутренний фактор и транскобаламины

Вскоре после успешного применения печени в лечении злокачественной анемии (см. разд. 24.4.1.2) Кастлом было показано, что в желудочном соке лиц, страдающих этим заболеванием, отсутствует вещество («внутренний фактор»), ответственное за связывание кобаламинов, поступающих с пищей, и их транспорт через стенку кишечника в кровоток [147]. В связи с этим для успешного лечения злокачественной анемии были признаны необходимыми внутримышечные инъекции (обычно 1 мг HO-Cbl,

пять раз с интервалом в 2—3 дня, а затем еще по 1 мг каждые два месяца), а не пероральный прием витамина, так как в последнем случае он не будет достаточно эффективно транспортироваться к месту действия. Внутренний фактор человека, недавно очищенный до гомогенного состояния, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 44 000, прочно связывающий кобаламин (для CN-Cbl, $K = 1{,}5 \cdot 10^{10}$ л·моль$^{-1}$). Белки плазмы крови, связывающие кобаламины и ответственные за их транспорт в ткани, получили название транскобаламинов (0; I и II) [148].

### 24.4.5.6. Кобаламины в питании

Источником кобаламинов у жвачных является бактериальная флора их кишечника. Их рацион должен включать Co(II); отмечались случаи кобаламиновой недостаточности, например у овец, пасшихся на бедных кобальтом почвах. Люди полностью зависят от получения кобаламинов с пищей [3]. Их ежедневная норма составляет 3—7 мкг (для поддержания пула кобаламинов на уровне примерно 5 мг). Бо́льшая часть смешанных (но, вероятно, не вегетарианских!) диет содержит такое необходимое количество кобаламинов. Последние присутствуют в молочных продуктах, рыбе и мясе, но не обнаруживаются в злаковых, орехах, фруктах и овощах. Содержание кобаламинов составляет (мкг/100 г): 0,36 в молоке, 4,69 в лососине, 104 в печени ягненка.

## ЛИТЕРАТУРА


1a. 'Cobalamin, Biochemistry and Pathophysiology', ed. B. M. Babior, Wiley, New York, 1975, appendix 1 (p. 453).
1б. Biochemistry, 1974, **13**, 1555.
2. Об истории исследования злокачественной анемии и выделения цианокобаламина см.: *W. B. Castle*, 'Introduction' (p) в сс. 1а.
3. Химический аспект см.: *I. Chanarin*, 'The Megaloblastic Anaemias', Blackwell, Oxford, 1969.
4. *E. Lester Smith*, 'Vitamin $B_{12}$', Methuen, London, 1965, chapters 3 and 4.
5. *K. Folkers and D. E. Wolf*, Vitamins and Hormones, 1954, **12**, 1.
6. *R. Bonnett, J. R. Cannon, V. M. Clark, A. W. Johnson, L. F. J. Parker, E. Lester Smith, and Sir Alexander Todd*, J. Chem. Soc., 1957, 1158.
7. *H. A. Barker*, in 'Vitamin $B_{12}$ und intrinsic Factor', (2nd European Symposium, Hamburg, 1961), ed. H C. Heinrich, Ferdinand Enke Veriag, Stuttgart, 1962, p. 82.
8. *P. G. Lenhert*, Proc. Roy. Soc., 1968, **A303**, 45.
9. *J. C. Linnell*, chapter 6 (p. 287), см. сс. 1а. *E. V. Quadros, D. M. Mathews, I. J. Wise, and J. C. Linnell*, Biochim. Biophys. Acta, 1976, **421**, 141.
10а. *J. I. Toohey*, in 'Methods in Enzymology', ed. D. B. McCormick and L. D. Wright, Academic Press, London, 1971, vol. XVIII, part C, p. 71.
10б. *V. B. Koppenhagen and J. J. Pfiffner*, J. Biol. Chem., 1971, **246**, 3075.
11. *R. D. Fugate, C.-A. Chin and P.-S. Song*, Biochim. Acta, 1976, **421**, 1.
12. *E. Nexø and H. Olesen*, Biochim. Biophys. Acta, 1976, **446**, 143.
13. *W. Friedrich*, 'Vitamin $B_{12}$ und verwandte Corrinoide', Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.





14. *P. O'D. Offenhartz, B. H. Offenhartz, and M. M. Fung*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 2966.
15. *M. Gardiner and A. J. Thomson*, J. C. S. Dalton, 1974, 820.
16. *H. A. Hill, J. M. Pratt, and R. J. P. Williams*, in Ref. 10a, p. 5.
17. *J. D. Brodie and M. Poe*, Biochemistry, 1971, **10**, 914; ibid., 1972, **11**, 2534.
18. *P. V. Law, D. G. Brown, E. L. Lien, B. M. Babior, and J. M. Wood*, Biochemistry, 1971, **10**, 3428.
19. *D. Doddrell and A. Allerhand*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, **68**, 1083.
20. *T. E. Needham, N. A. Matwiyoff, T. E. Walker, and H. P. C. Hogenkamp*, J. Amer. Chem. Soc., 1973, **95**, 5019.
21. *H. P. C. Hogenkamp, P. J. Vergamini, and N. A. Matwiyoff*, J. C. S. Dalton, 1975, 2628.
22. *J. H. Bayston, F. D. Looney, J. R. Pilbrow, and M. E. Winfield*, Biochemistry, 1970, **9**, 2164.
23. *J. Halpern, M. S. Chan, J. Hanson, T. S. Roche, and J. A. Topich*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 106.
24. *G. N. Schrauzer*, Accounts Chem. Res., 1968, **1**, 97; Angew. Chem. Internat. Edn., 1976, **15**, 417.
25. *G. Costa*, Pure Appl. Chem., 1972, **30**, 335.
26. *D. Dodd and M. D. Johnson*, J. Organometallic Chem., 1973, **52**, 1.
27. *A. Bigotto, E. Zangrando, and L. Randaccio*, J. C. S. Dalton, 1976, 96.
28. *J. D. Brodie*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1969, **62**, 461.
29. *L. Salem, O. Eisenstein, N. T. Anh, H. B. Burgi, A. Devaquet, A. Veillard and G. Segal*, Nouveau J. Chim., 1977, **1**, 335.
30. *K. Bernhauer, O. Müller, and F. Wagner*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1964, **3**, 200.
31. *D. St. C. Black, V. M. Clark*, B. G. Odell, and Lord Todd, J. C. S. Perkin I, 1976, 1944.
32. *A. Eschenmoser*, Chem. Soc. Rev., 1976, **5**, 377.
33. *A. W. Johnson*, Chem. Soc. Rev., 1975, **4**, 1; *A. W. Johnson and W. R. Overend*, J. C. S. Perkin I, 1972, 2681.
34. *A. L Begbie, W. R. Bowman, V. M. Clark, J. W. Cornforth, B. T. Golding, and W. P. Watson* (неопубликованные данные; ср.: *W. P. Watson*, Ph. D. Thesis, University of Warwick, 1974).
35. *R. V. Stevens*, Tetrahedron, 1976, **32**, 1599.
36. *R. B. Woodward*, Pure Appl. Chem., 1973, **33**, 145.
37. *A. Eschenmoser, R. Scheffold, E. Bertele, M. Pesaro, and H. Gschwend*, Proc. Roy. Soc., 1965, **288**, 306.
38. *A. Eschenmoser*, Quart. Rev., 1970, **24**, 366; Pure Appl. Chem. Suppl., 1971, **2**, 69; Naturwiss., 1974, **61**, 513.
39. *H. Maag*, Diss. Nr. 5173, E. T. H. Zürich, 1973.
40. *Y. Yamada, D. Miljkovic, P. Wehrli, B. T. Golding, P. Löliger, R. Keese, K. Müller, and A. Eschenmoser*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1969, **8**, 343.
41. *W. Führer*, Diss. Nr. 5158, E. T. H. Zürich, 1973.
42. *D. St. C. Black and A. J. Hartshorn*, Austral. J. Chem., 1976, **29**, 2271.
43. *S. C. Tang and R. H. Holm*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 3359.
44. *H. C. Friedmann and L. M. Cagen*, Ann. Rev. Microbiol., 1970, **24**, 159.
45. *H. Ohta and W. S. Beck*, Arch. Biochem. Biophys., 1976, **174**, 713.
46. *R. C. Bray and D. Shemin*, J. Biol. Chem., 1963, **238**, 1501.
47. *S. Schwartz, K Ikeda, I. M. Miller, and C. J. Watson*, Science, 1959, **129**, 40.
48. *A. I. Scott*, Tetrahedron, 1975, **31**, 2639.
49. *C. E. Brown, D. Shemin, and J. J. Katz*, J. Biol. Chem., 1973, **248**, 8015.
50. *A. R. Battersby, M. Ihara, E. McDonald, J. R. Redfern, and B. T. Golding*, J. C. S. Perkin I, 1977, 158.
51. *A. R. Battersby, E. McDonald, R. Hollenstein, M. Ihara, F. Satoh, and D. C. Williams*, J. C. S. Perkin I, 1977, 166.
52. *A. I. Scott, N. Georgopapadakou, K. S. Ho, S. Klioze, E. Lee, S. L. Lee, G. H. Temme, C. A. Townsend, and I. A. Armitage*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 2548.

53. *M. Imfeld, C. A. Townsend, and D. Arigoni*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 541; *A. I. Scott* et al., ibid., p. 544.
54. *R. Deeg, H.-P. Kriemler, K.-H. Bergmann, and G. Müller*, Z. physiol. Chem., 1977, **358**, 339.
55. *A. R. Battersby, E. McDonald, H. R. Morris, M. Thompson, D. C. Williams, V. Ya. Byhovsky, N. I. Zaitseva, and V. N. Bukin*, Tetrahedron Letters, 1977, 2217.
56. *S. H. Ford and H. C. Friedmann*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, **72**, 1077.
57. *G. W. E. Plaut, C. M. Smith, and W. L. Alworth*, Ann. Rev. Biochem., 1974, **43**, 899.
58. *B. Mailänder and A. Bacher*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 3623.
59. *W. L. Alworth, M. F. Dove, and H. N. Baker*, Biochemistry, 1977, **16**, 526.
60. *R. Wurm, R. Weyhenmeyer, and P. Renz*, European J. Biochem., 1975, **56**, 427.
61. *H. C. Friedmann*, см. сс. 1a, chapter 2 (p. 75).
62. *W. J. Eilbeck, M. S. West, and Y. E. Owen*, J. C. S. Dalton, 1974, 2205.
63. *J. M. Pratt*, 'Inorganic Chemistry of Vitamin $B_{12}$', Academic Press, London, 1972.
64. *K. L. Brown, D. Lyles, M. Pencovici, and R. G. Kallen*, J. Amer. Chem. Soc., 1975, **97**, 7338.
65. *A. Volger, R. Hirschmann, H. Otto, and H. Kunkely*, Ber. Bunsengesellschaft phys. Chem., 1976, **80**, 420.
66. *H. C. Heinrich, W. Friedrich, and P. Riedel* in Ref. 7, p. 244.
67. *K. Bernhauer, F. Wagner, H. Michna, P. Rapp, and H. Vogelmann*, Z. phys. Chem., 1968, **349**, 1297.
68. *R.-H. Yamada and H. P. C. Hogenkamp*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 6266; *R. H. Allen and P. W. Majerus*, ibid., p. 7695.
69. *K. Bernhauer, H. Vogelmann, and F. Wagner*, Z. phys. Chem., 1968, **349**, 1281.
70. *R. Bonnett, J. M. Godfrey, and D. G. Redman*, J. Chem. Soc. (*C*), 1969, 1163.
71. *P. Renz*, см. сс. 10a, p. 82.
72. *A. Gossauer, K.-P. Heise, H. Laas, and H. H. Inhoffen*, Annalen, 1976, 1150.
73. *R. Keese*, Tetrahedron Letters, 1969, 149.
74. *D. Bormann, A. Fischli, R. Keese, and A. Eschenmoser*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1967, **6**, 868.
75. *D. Jauernig, P. Rapp, and G. Ruoff*, Z. phys. Chem., 1973, **354**, 957; *P. Rapp, G. Bozler, and E. Fridrich*, ibid., p. 970.
76. *R. Bonnett J. M. Godfrey, V. B. Math, B. Edmond, H. Evans, and O. J. R. Hodder*, Nature, 1971, **229**, 473.
77. *P. Rapp and U. Oltersdorf*, Z. phys. Chem., 1973, **354**, 32.
78. *D. Dolphin*, см. сс. 10a, p. 34.
79. *G. N. Schrauzer and R. J. Holland*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 1505; ibid., p. 4060.
80. *T. M. Kenyhercz, T. P. DeAngelis, B. J. Norris, W. R. Heineman, and H. B. Mark*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 2469; *D. Lexa, J. M. Saveant, and J. Zickler*, ibid., 1977, **99**, 2786.
81. *G. N. Schrauzer*, Inorg. Synth., 1968, **11**, 61.
82. *T. M. Kenyhercz, A. M. Yacynych, and H. B. Mark*, Analyt. Letters, 1976, **9**, 203.
83. *R. Blackburn, M. Kyaw, and A. J. Swallow*, J. C. S. Faraday I, 1977, 73, 250.
84. *J. H. Bayston, N. K. King, F. D. Looney, and M. E. Winfield*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 2775.
85. *G. N. Schrauzer and E. Deutsch*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 3341.
86. *F. R. Jensen, V. Madan, and D. H. Buchanan*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 1414.
87. *H. L. Fritz, J. H. Espenson, D. A. Williams, and G. A. Molander*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 2378.
88. *R. Breslow and P. L. Khanna*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 1297, 6765.
89. *P. W. Schneider, P. F. Phelan, and J. Halpern*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 77.





90. *R. Dreos, G. Tauzher, N. Marsich, and G. Costa*, J. Organometallic Chem., 1975, **92**, 227.
91. *J. M. Wood*, Naturwiss., 1975, **62**, 357; *R. E. DeSimone, M. W. Penley, L. Charbonneau, S. G. Smith, J. M. Wood, H. A. O. Hill, J. M. Pratt, S. Ridsdale, and R. J. P. Williams*, Biochim. Biophys. Acta, 1973, **304**, 851.
92. *J. H. Espenson, W. R. Bushey, and M. E. Chmielewski*, Inorg. Chem., 1975, **14**, 1302
93. *W. M. Scovell*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 3451.
94. *J. H. Espenson and T. D. Sellers*, J. Amer. Chem. Soc., 1974, **96**, 94.
95. *S. N. Anderson, D. H. Ballard, J. Z. Chrzastowski, D. Dodd, and M. D. Johnson*, J. C. S. Chem. Comm., 1972, 685; *P. Abley, E. R. Dockal, and J. Halpern*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 659.
96. *I. Levitin, A. L. Sigan, and M. E. Vol'pin*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 469.
97. *D. Dodd, M. D. Johnson, and B. L. Lockman*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 3664.
98. *B. T. Golding, H. L. Holland, U. Horn, and S. Sakrikar*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1970, **9**, 959.
99. *R. B. Silverman and D. Dolphin*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 4626.
100. *K. L. Brown, M. M. L. Chu, and L. L. Ingraham*, Biochemistry, 1976, **15**, 1402.
101. *Е. А. Парфенов, Т. Г. Черняков, М. Г. Эгелев*. ЖОХ. 1974, **44**, 2319.
102. *G. N. Schrauzer, J. H. Weber, and T. M. Beckham*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 7078.
103. *H. P. C. Hogenkamp, J. E. Rush, and C. A. Swenson*, J. Biol. Chem., 1965, **240**, 3641.
104. *B. M. Babior*, J. Biol. Chem., 1970, **245**, 6125; *R. B. Silverman, D. Dolphin, and B. M. Babior*, J. Amer. Chem. Soc., 1972, **94**, 4028.
105. *C. Bied-Charreton and A. Gaudemer*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3997.
106. *H. P. C. Hogenkamp, J. N. Ladd, and H. A. Barker*, J. Biol. Chem., 1962, **237**, 1950; *H. P. C. Hogenkamp*, ibid., 1963, **238**, 477; *H. P. C. Hogenkamp*, Biochemistry, 1966, **5**, 417.
107. *R. T. Taylor, L. Smucker, M. L. Hanna, and J. Gill*, Arch. Biochem. Biophys., 1973, **156**, 521.
108. *J. F. Endicott and G. J. Ferraudi*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 243.
109. *K. N. Joblin, A. W. Johnson, M. F. Lappert, and B. K. Nicholson*, J. C. S. Chem. Comm., 1975, 441.
110. *G. N. Schrauzer, J. W. Sibert, and R. J. Windgassen*, J. Amer. Chem. Soc., 1968, **90**, 6681; *G. N. Schrauzer, L. P. Lee, and J. W. Sibert*, ibid., 1970, **92**, 2997.
111. *B. T. Golding, T. J. Kemp, P. J. Sellars, and E. Nocchi*, J. C. S. Dalton, 1977, 1266.
112a. *B. M. Babior*, Accounts Chem. Res., 1975, **8**, 376.
112б. *R. H. Abeles and D. Dolphin*, ibid., 1976, **9**, 114.
112в. *G. N. Schrauzer*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1977, **16**, 233.
112г. *J. M. Poston and T. C. Stadtman*, см. сс. 1a, chapter 3, p. 111.
112д. *B. M. Babior*, см. сс. 1a, p. 141.
113. *J. M. Poston*, Science, 1977, **195**, 301.
114. *R. T. Taylor and H. Weissbach*, Arch. Biochem. Biophys., 1969, **129**, 745; *R. T. Taylor*, ibid., 1971, **144**, 352.
115. *G. N. Schrauzer and R. J. Windgassen*, J. Amer. Chem. Soc., 1967, **89**, 3607.
116. *G. Costa, A. Puxeddu, and E. Reisenhofer*, J. C.S. Dalton, 1973, 2034.
117. *H. Rüdiger*, European J. Biochem., 1971, **21**, 264.
118. *V. Herbert and K. C. Das*, Vitamins and Hormones, 1976, **34**, 1.
119. *R. M. Halpern, B. C. Halpern, B. R. Clark, H. Ashe, D. N. Hardy, P. Y. Jenkinson, S.-C. Chou, and R. A. Smith*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, **72**, 4018.
120. *M. J. Mahoney and L. E. Rosenberg*, chapter 8 (p. 369) of Ref. 1a; D. Gompertz in 'The Treatment of Inherited Metabolic Disease', ed. D. N. Raine, MTP, Lancaster, 1975, chapter 8.
121. *H. Eggerer e. a.*, Biochem. Z., 1960, **333**, 1.

122. *R. W. Kellermeyer and H. G. Wood*, Biochemistry, **1962**, **1**, 1124; *E. F. Phares, M. V. Long, and S. F. Carson*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **1962**, **8**, 142.
123. *B. T. Golding and L. Radom*, J. Amer. Chem. Soc., **1976**, **98**, 6331.
124. *L. L. Ingraham*, Ann. New York Acad. Sci., 1964, **112**, 713.
125. *J. N. Lowe and L. L. Ingraham*, J. Amer. Chem. Soc., 1971, **93**, 3801.
126. *W. W. Miller and J. H. Richards*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, **91**, 1498.
127. *J. Retey and B. Zagalak*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1973, **12**, 671.
128. *P. Dowd and M. Shapiro*, J. Amer. Chem. Soc., 1976, **98**, 3724.
129. *G. Bidlingmaier, U. Kempe, T. Krebs, J. Retey, and H. Flohr*, Angew. Chem. Internat Edn., 1975, **14**, 822.
130. *H. Flohr, W. Pannhorst, and J. Retey*, Angew. Chem. Internat. Edn., 1976, **15**, 561.
131. *A. I. Scott and K. Kang*, J. Amer. Chem. Soc., 1977, **99**, 1997.
132. *B. Zagalak, J. Retey, and H. Sund*, European J. Biochem., 1974, **44**, 529.
133. *B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos, and R. H. Abeles*, J. Biol. Chem., 1966, **241**, 3028.
134. *W. W. Bachovchin, R. G. Eagar, K. W. Moore, and J. H. Richards*, Biochemistry, 1977, **16**, 1082.
135. *F. R. Jensen and R. A. Neese*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, **62**, 816.
136. *J. Retey, A. Umani-Ronchi, and D. Arigoni*, Experientia, 1966, **22**, 72; *J. Retey, A. Umani-Ronchi, J. Seibl, and D. Arigoni*, ibid., p. 502.
137. *T. H. Finlay, J. Valinsky, K. Sato, and R. H. Abeles*, J. Biol. Chem., 1972, **247**, 4197.
138. *K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sands, J. A. Fee, and R. H. Abeles*, Biochim. Biophys. Acta, 1975, **397**, 510.
139. *K. Sato, J. C. Orr, B. M. Babior, and R. H. Abeles*, J. Biol. Chem., 1976, **251**, 3734.
140. *B. T. Golding, P. J. Sellars, and C. S. Sell*, J. C. S. Chem. Comm., 1976, 773.
141. *E. J. Corey, N. J. Cooper, and M. L. H. Green*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, **74**, 811.
142 *G. N. Schrauzer and J. W. Sibert*, J. Amer. Chem. Soc., 1970, **92**, 1022.
143. *H. P. C. Hogenkamp and G. N. Sando*, Structure and Bonding, 1974, **20**, 23.
144. *P. J. Hoffmann and R. L. Blakley*, Biochemistry, 1975, **14**, 4804.
145. *W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, and R. L. Blakley*, J. Biol. Chem., 1974, **249**, 2338.
146. *B.-M. Sjöberg, P. Reichard, A. Gräslund, and E. Ehrenberg*, J. Biol. Chem., 1977, **252**, 536.
147. *L. Ellenbogen* см. сс. 1а, chapter 5, p. 215.
148. *J. M. England, M. C. Down, I. J. Wise, and J. C. Linnell*, Clinical Science and Molecular Medicine, 1976, **51**, 47.

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

**Автустомицин А** 106
**Авидин** 560
**Агматин, производное** 283
**Аденилатциклаза** 151, 152, 562
**5′-Аденилилметилендифосфонат** 169
**Аденин** 55
  получение 34
  реакции 44, 84, 88
**Аденин (производные)**
  арабинозиды 98
  ациклические нуклеозиды 109
  *N*-3-гликозиды 84
  ликсозиды 98, 106
  9-метил- 37
  *N*-7-нуклеозиды 92
  циклонуклеозиды 37, 98, 675
**Аденозилкобаламин см. Кобаламины, аденозил-**
**S-Аденозилметионин** 202, 545, 677
**Аденозин** 69
  получение 34, 84, 86, 88, 92, 97
  реакции 57, 95, 114
**Аденозин (производные)**
  ангидро- 688
  5′-*O*-ацетил- 57
  3′,5′-ди-*O*-ацетил- 57
  $N^6$-диметил- 72, 105
  2′,3′-*O*-изопропилиден- 87, 111
  2′,3′-*O*-изопропилиден-5′-*O*-тозил- 55
  2′,3′-*O*-метоксиэтилиден- 106
  1-*N*-оксид 112
  пентабензоил- 114
  тетрабензоил- 114
  2′,3′5′-*O*-трибензоил- 114
  эпоксипроизводные 108
  2′,3′-*O*-этоксиметилиден- 107
**Аденозин-5′-амидофосфат** 590
**Аденозин-5′-дифосфат** 131
  биосинтез 625
  в биосинтезе 134, 622, 624
  получение 148, 169, 629
  спектры 132
  структура 132, 134, 622, 623
  физ. свойства 132
**Аденозин-дифосфаты** 107, 582, 643
**Аденозиндифосфатглюкоза** 137
**Аденозин-5′-трифосфат** 131
  биосинтез 171, 624
  в биосинтезе 134, 147, 606, 620 сл., 625, 626, 630, 688
  конформации 139
  получение 169, 623, 624
  реакции 135
  спектры 132, 147
  структура 132, 134
  физ. свойства 132
**Аденозин-5′-трифосфатаза** 577, 578
**Аденозин-2′-фосфат** 57
**Аденозин-3′-фосфат** 57, 137
**Аденозин-5′-фосфат**
  биосинтез 171
  выделение 134
  конформации 139
  метаболизм 171
  получение 55, 166
  реакции 147
  структура 132
  физ. свойства 132
**Аденозин-5′-фосфоанизидин** 165
**Аденозин-5′-фосфопиперидин** 165
**Аденозинциклофосфаты** 57, 131, 132, 151, 152
**Адипиновая кислота, α-амино-** 338
**Адипиновый полуальдегид, α-амино-** 338
**Адренокортикотропный гормон** 221, 289, 440
**Азетидинкарбоновая-2 кислота** 325
**АИКА-рибозид** 92, 93, 95
**Активация в пептидном синтезе** 391 сл.
**Актин** 228, 577, 578
**Актиномицины** 324 сл., 439
**Аламетицин** 330
**Аланилкарбоксипептидаза** 340
**Аланин** 207, 226, 237, 241 сл.
  дегидро- 229, 231, 329
  α-метил- 330
**β-Аланин** 268, 611, 612
**Алкогольдегидрогеназа** 135, 282, 585 сл.
**Аллизин** 229, 574, 575
  гидрокси- 574
**Альбоноурсин** 306
**Альбумины** 220, 221, 548, 561
  предшественники 548
**Альтиомицин** 303
**Алюмихромы** 316
**Аманитины** 317, 318
**Аматоксины** 318
**Амидазы** 245, 343
**Амилаза** 549
**Аминокислоты** 207, 225 сл.
**Аминомутазы** 678
**Аминопептидазы** 233, 260, 271, 546
**1-Аминорибозофосфат** 171
**Аминотрансфераза** 282
**Амоксициллин** 344
**Ампициллин** 344, 346
**Амфибин А** 328
**Ангиотензины** 272, 293, 555, 556
**Антаманид** 317, 319, 438, 439
**Антипаин** 299
**«Антифриз»-белок** 549
**Апоферменты** 580
**Арабиноза** 88, 548
  нуклеозиды 72, 86, 88, 89, 98, 109
**Аранотин** 311
**Аргиназа** 535
**Аргинин**
  защита групп 385
  кодирование 207, 210 сл.
  реакции 260, 231, 232
  структура 226
  хроматография 261
**Аргинин (производные)**
  динитрофенилпроизводные 266
  метилпроизводные 228, 545
  *N*-нитро- 385
**Аскорбатоксидаза** 562
**Аскорбиновая кислота** 544
**Аспарагин** 207, 226, 231, 261
**Аспарагиновая кислота** 652
  в биосинтезе 171, 172
  защита групп 383, 384, 411
  кодирование 207
  структура 226
  хроматография 261
**Аспартатдекарбоксилаза** 243
**Аспирин** 467, 468, 473
**Аустамид** 308
**Афинная**
  метка 283, 566
  хроматография 642 сл.
**Ацетальдегид** 683, 685
  2-гидрокси- 685
***транс*-Ацетилаза** 204, 545
**Ацетилэстераза** 346
**Ацетоацетатдекарбоксилаза** 479 сл.
**Ацилазы почек** 245

**Баракол** 19
**Барбитуровая кислота, нуклеозид** 91
**Белки** 216 сл.
  биосинтез 208 сл., 286, 287, 296
  вторичная структура 222, 224

Белки
гидролиз 231 сл., 259 сл.
дисульфидные связи 279, 280
классификация 220 сл.
конформации 422 сл.
концевых групп определение 264 сл.
первичная структура 222 сл., 256 сл.
расщепление ферментами 271 сл.
расщепление химическое 264 сл.
сократительные 575 сл.
структурные 672 сл.
токсичные 570 сл.
третичная структура 222 сл.
ферменты см. Ферменты
четвертичная структура 222
эволюция 280 сл.
Бензизоксазолкарбоновая-3 кислота 520
Бензимидазол
5-гидрокси- 665
Бензойная кислота, амид 500
Бензол, 2,4-динитро-1-фтор- 265
Бензотриазол 1-гидрокси- 395, 411
Бернинамицин 330
Биогенетического типа синтезы 16 сл.
Биоптерины 599 сл.
Биотин 560, 615 сл.
детно- 616, 619
Бифункциональный катализ 471 сл.
Блеомицин 331, 366
Бовернцин 321, 324
Бомбезин 293
Брадикинины 293, 556
Бревианамиды 308, 309
*N*-Бромсукцинимид 273
Бромциан 269, 273
Бруцин 244
Бутандиол-2,3 683
Бутанон 683
Бутирии, производные 329, 598

Вагнера-Меервейна перегруппировка 14
Вазопресин 287 сл.
Вазотоцин 288
Валериановая кислота, α-амино- 227, 260
Валин
кодирование 207, 211
меченый 252
получение 238, 252
реакции 259
структура 226
хроматография 261
Валин, *N*-метил- 439
Валиномицин 321, 323, 324
Вертициллин А 311
Виомицин 314, 315
Вирусные
белки 231, 567, 568
РНК
структура 60 сл., 196, 211
функции 196, 198, 200, 201, 211
Витамины
$B_1$ 199, 627 сл.
$B_2$ 589, 590
$B_6$ 635—637
$B_{12}$ 12, 476, 649 сл.
Bc 603, 604, 677, 678
C 544
K 259
L 611, 612, 626
PP 583
Внутримолекулярный катализ 465 сл.

Галактоза 204, 548
Галактозамин, *N*-ацетил- 548
β-Галактозидаза 204, 209, 569
Галактозопермеаза 569
Галактозопермеаза 569
Галлихромы 316
Гаптен 564

Гастрин 221
получение 411 сл.
структура 283, 291, 563
функция 283, 289, 291, 563
Гексокиназа 222, 517 сл.
Гельферихa метод 83, 85
Гемоглобины 213
структура 221 сл., 281, 556
функция 223, 476, 556 сл.
эволюция 557
Ген 197
Генетический код 177, 206 сл.
Генная инженерия 213 сл.
Гераниол 11
Гидантоины 236
Гидразин, реакция с ДНК 191
Гидриндантин 262
Гидроксилизин 223
биосинтез 544, 573
реакции 233
структура 228
Гидроксиметилдигидроптериинпирофосфокиназа 606
Гидроксипролин 223
анализ 262
биосинтез 256, 544, 573
структура 228
Гидроксистероиддегидрогеназа 585
Гилберта-Джонса метод 80 сл.
Гипоксантин
нуклеозиды 33, 87, 93, 95, 97
нуклеотид 33, 134, 171, 622
Гиппуровая кислота 498
Гистидин
биосинтез 203
защита групп 387, 388
кодирование 207, 212, 280
разделение изомеров 244
реакции 265
структура 226
Гистидин, *N*-метил- 228, 578
Гистоны 221, 549, 568
Глиадин 221
Гликоген 152
Гликогенсинтетаза 153
Гликогенфосфорилаза 153, 550
Гликопротеины 221, 548 сл.
Глиоксиловая кислота 28, 615
Глиотоксин 310
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 515
Глицерин 626, 683
Глицериндегидраза 683
Глицил-аргинин 283
Глицил-глицил-глицин 217
Глицил-глицин 217
Глицил-тирозин 502, 515
Глицин
выделение 11
защита групп 237
кислотность 478
кодирование 207, 210
меченый 250
получение 250
структура 226, 227
Глицин (производные)
*N*,*N*-бис(триметилсилил)- 237
*п*-гидроксифенил- 303
β-Глобин 54
Глобулины 220, 222
Глумитоцин 288
Глутаматмутаза 676
γ-Глутамилпептиды 298 сл.
Глутамин
в биосинтезе 173, 261
кодирование 207, 212
реакции 171, 231
структура 226
хроматография 261
Глутаминовая кислота
в биосинтезе 652

Глутаминовая кислота
защита групп 383, 384, 411
кодирование 207
получение 253
разделение изомеров 244
структура 226
хроматография 261
Глутаминовая кислота (производные)
4-аминобензоил- 604, 605
γ-карбокси- 232, 259, 330, 547
Глутаминсинтетаза 231, 302, 303
Глутаровая кислота, 2-оксо- 26, 253, 544
Глутатион 298
Глутатионредуктаза 544
Глутелины 220
Глюкагон 151, 221, 442 сл., 563
Глюкоза 626
Глюкозамин, *N*-ацетил- 339, 528, 548, 549
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 582, 643
Глюкозофосфаты 152, 153, 517, 550, 551
Гомосерин 269, 273
Гомохроматография 194
Гомоцистеин 677, 678
Гонадолиберин 289, 292, 448
Гормоны 221
Грамицидины
A 443
C 296, 297, 319, 441
«Греческого огня» токсин 303
Гуаниловая кислота 33, 55, 171
Гуанин 34, 44, 55
*N*-2-ацетил- 84
9-метил- 37
*N*-7-нуклеозид 92
Гуанозин 69
получение 33, 34, 92, 93, 95
реакции 113, 116
Гуанозин (производные)
*N*,*N*-2-диметил- 95
нзо- 94
2′,3′-*O*-изопропилиден- 94
*N*-2-метил- 95
тетрабензоил- 114
трибензоил- 113, 114
Гуанозин-2′,5′-дифосфат 138
Гуанозин-3′,5′-дифосфат 138
Гуанозин-3′,5′-дифосфат 138
Гуанозиндифосфатглюкоза 137
Гуанозиндифосфатманноза 549
Гуанозин-5′-трифосфат
биосинтез 171
в биосинтезе 202, 601, 605, 689
Гуанозин-5′-трифосфатциклогидролаза 601, 605
Гуанозин-3′-фосфат 132
Гуанозин-2′,5′-циклофосфат 144
Гуанозин-3′,5′-циклофосфат 151

Дансильная группа 266
Дараиского метод 239
Дегидроаланин 229, 231, 329
Дегидроацетовая кислота 17
Дегидробиотинсинтетаза 619
Дезоксиадениловая кислота 36, 38
2′-Дезоксиаденозин 69, 88, 98
*O*-ацетил- 38
3′-*O*-ацетил-5′-*O*-тозил- 37
3,5-ди-*O*′-ацетил- 38
3′-Дезоксиаденозин 98
5′-Дезоксиаденозин 684, 685
Дезоксиаденозин-5′-трифосфат 688
Дезоксиаденозин-3′-фосфат 38
Дезоксиаденозин-5′-фосфат 36, 38
5-Дезокси-l-арабиноза 600
6-Дезоксиглюкозо-1-фосфат 518
Дезоксигуаниловая кислота 36, 38
Дезоксигуанозин 69, 113
Дезоксигуанозин-5′-трифосфат 688, 689
Дезоксигуанозин-3′-фосфат 38

Дезоксигуанозин-5′-фосфат 36, 38
2′-Дезоксиинозин 111
2-Дезокси-*D*-ксилаза 38
2-Дезокси-*D*-рибоза 34, 36, 69, 88
3-*O*-ацетил- 38
Дезоксирибонуклеиновые кислоты см. ДНК
Дезокситимидиловая кислота 36, 38, 132, 174, 609
Дезокситимидин 36, 69
получение 90
реакции 97, 113, 115
5′-Дезокситимидин, 5-амино- 125
Дезокситимидин-3′,5′-дифосфат 39, 145
Дезокситимидин-5′-трифосфат 174, 678
Дезокситимидин-3′-фосфат 38, 145
Дезокситимидин-5′-фосфат
биосинтез 174, 609
получение 38
реакции 132
структура 36
2′-Дезоксиуридин
получение 90, 97, 98
реакции 121, 122
2′-Дезоксиуридин (замещенные) 119 сл.
Дезоксиуридин-5′-трифосфат 174
Дезоксиуридин-5′-фосфат 174, 609
Дезоксицитидиловая кислота 36, 38
Дезоксицитидин 69
замещенные 70, 97, 120
Дезоксицитидин-3′,5′-дифосфат 39
Дезоксицитидин-3′-фосфат 38
Дезоксицитидин-5′-фосфат 36, 38
Декановая кислота, α-амино- 313
Декоинин 106
Денатурация полипептидов 432, 433
Депсипептиды 285, 321 сл.
Десмозин 229, 230, 575
изо- 229, 230, 575
Деструксин 326
Диазомицины 302
Дигалактозилцистеин 232
Дигидронеоптеринальдолаза 606
Дигидроптериднредуктаза 601, 606
Дигидроптероатсинтетаза 606
Дигидрофолатредуктаза 601, 605 сл., 644
2′,5′-Дидезоксиуридин, 5′-амино-5-иод- 125
Диизопропилфторфосфат 482, 483
*N*-(3-Диметиламино)-*N*′-(этоксипропил)карбодиимид 268
Диметилсульфат, реакция с ДНК 190
2,4-Динитрофенильная метка 264 сл.
Диолдегидраза 676, 677, 683 сл.
Дипептидиаминопептидаза 271, 272, 278
Дитирозин 229, 230
2,3-Дифосфоглицериновая кислота 558
Дифосфопиридиннуклеотид 582
Дициклогексилкарбодиимид 161 сл., 178
Дише реактив 73
ДНазы 549, 570
ДНК
биосинтез 688
вторичная структура 36, 42 сл.
выделение 35
гибриды с РНК 60
деградация 140 сл.
кольцевые 48
первичная структура 36 сл., 188 сл.
сверхспирализация 48, 49
синтез 177 сл.
сокращенные формулы 41
состав 42 сл.
третичная структура 36, 47 сл.
формы 43 сл.
функции 198 сл.
хромосом 51 сл.
ДНК-лигаза 150, 151, 200
ДНК-метилаза 570
ДНК-полимераза 150, 188, 189, 198, 199
Долихол, производные 549, 550
Додецилсульфат натрия 35

Желатин 228

Защитные группы 114 сл., 171, 371 сл., 410 сл.
адамантилоксикарбонильная 372, 385
*трет*-амилоксикарбонильная 372
аитрахиноновая 381
ацетальные 117
ацетамидометильная 388
ацетильная 114, 235
бензизоксазолилметоксикарбонильная 372
бензилоксикарбонильная 372 сл., 382 сл., 41
бензильная 117, 380, 388, 389
бензоилпропионильная 114
бензоильная 114
бифенилизопропоксикарбонильная 372
боросодержащие 372, 377
*трет*-бутильная 383, 389, 411
*трет*-бутоксикарбонильная 372, 375, 406, 411
гидразильная 382
дибутилстаннильная 115
динитрофенильная 387
изоборнилоксикарбонильная 372
изовалерильная 187
изоникотинилоксикарбонильная 372
изопропилиденовая 55, 118
левулинильная 114
мезильная 115
метилсульфонилэтоксикарбонильная 272, 376
метильная 380, 411
метоксиацетильная 114
метокситетрагидропиранильная 117
метокситритильные 117
о-нитрофенилсульфенильная 371, 376 сл., 413
пивалильная 115
пиридилметоксикарбонильная 377, 378
силильные 75, 81 сл., 117, 237, 356
тетрагидропиранильная 117, 186
2,2,2-трибромэтоксикарбонильная 114
триметилацетильная 115
триметилсилильная 237, 356
тритильная 38, 117, 185, 376, 378, 388
трифторацетильная 260, 378, 379, 383
трихлорэтильная 186
трихлорэтоксикарбонильная 372
тозильная 115, 386
уретановые 371 сл.
фенильная 380, 411
флуоренилметоксикарбонильная 372, 376
формильная 235, 378, 379, 383
фталильная 378, 379
хлорацетильная 378, 379
2-цианоэтильная 163
этильная 380
Зеин 221
Зизифин А 328

«Идеальный реагент» 375
Изовалериановая кислота, α-кето- 612
Изогуанозин 94
Изодесмозин 229, 230, 575
Изолейцин
кодирование 207
реакции 259
структура 226, 227
хроматография 261
Изотоцин 288
Иламицин В 316
Имидазол
гликозиды 92 сл.
*N*-децил- 506
*N*-метил- 506
*N*-триметилсилил- 75
*N*-циннамоил- 484
Имидазолрибонуклеотид, 5-амино- 632

Иммуноглобулины 549, 564 сл.
Иммунопротеины 221
Индолил-3-пировиноградная кислота 253
Индуцированного соответствия теория 515 сл.
Инозин 33, 93, 95, 97
*О*-бензоилпроизводные 114
Инозиновая кислота 33, 134, 171, 622
Инозин-5′-фосфат 33, 134, 171, 622
Инсулин
биосинтез 213, 214, 289
конформации 426
структура 218, 222, 256 сл., 555
функции 151, 195, 289, 555
Инсулин, предшественники 195, 555
Интеферрин 328

Казеин 153, 221
Каллидин 293, 556
Калликреин 556
Кальцитонин 289, 291
Камфорсульфоновая кислота 617
Капреомицин 300, 314
Капсиды 567
Карбенициллин 344
Карбоангидраза 558
Карбоксиангидриды аминокислот 501
Карбоксипептидазы
структура 283, 502, 503, 562
функции 272, 273, 501, 515, 562
Карноза см. *D*-Рибоза
Касугомицин 72
Катализ ферментативный 449 сл.
Катепсин С 271
Кеннига-Кнорра реакция 77 сл.
Кератины
конформации 428
структура 224, 572, 573
физ. свойства 220, 221
Керулин 293
Клавулановая кислота 364
Кластеры 203, 569
Клеверного листа структура тРНК 61 сл.
Киназы 625
Кобаламины 648 сл.
аденозил-
биосинтез 661, 671
в биосинтезе 652, 653, 676, 679 сл.
конформации 653
получение 658
реакции 666
спектры 655, 656
структура 650, 652, 657
фотохимия 674, 675
азидо- 654, 666
аква- 650, 666
гидроксипропил- 688
гидроксо-
в биосинтезе 652, 653, 661, 679, 680
получение 652, 674
реакции 666, 682
спектры 654
структура 650, 652
дициано- 654
метил-
биосинтез 661
в биосинтезе 652, 653, 676 сл.
получение 658
реакции 666, 672, 673
структура 650, 652
фотохимия 675
пропил- 677
циано-
получение 649, 651, 652, 661, 670
реакции 658, 665 сл.
спектры 654
структура 650, 652, 659
циаиометил- 650
этил- 666, 673, 675

Кобалоксимы 657, 658, 670 сл.
Кобамид 649
Кобамины 648 сл.
Кобамовая кислота 649
Кобинамид 649, 655, 667
Кобиновая кислота 649
Кобириновая кислота 649, 650, 663, 664
Кобировая кислота 649, 658, 659
Кобэстер 650, 660, 668, 669
Код генетический 177, 207 сл.
Кодекарбоксилазам, см. Пиридоксальфосфат
Кодоны 207—209
Кокарбоксилаза см. Тиаминдифосфат
Коллаген 221
биосинтез 573
конформации 428
состав 228, 229
структура 232, 549, 573, 574
функция 545, 548
Коллаген, предшественники 573
Коикавалин 561, 562
Конформации полипептидов 422 сл.
Конформационные зонды 442, 443
Коррин 648
Корриноиды 648 сл.
Корромин 663
Кортикотропин 248
структура 272, 283, 463
функции 281, 283, 563
Кофакторы 580
Коферменты 131, 80 сл., 679 сл.
А
биосинтез 611, 612
в биосинтезе 613 сл., 679 сл.
получение 165, 168, 610, 611
структура 137, 610, 611
функции 137
Q см. Убихиноны
Коэнзимы I и II 582
Креатин 626
Креатинкиназа 504
Креатинфосфат 147
Кребса цикл 26, 616
Красители
для срезов 33
интеркалирование в НК 49
Ксантозин 92, 95
Ксантозин-5′-фосфат 171

Лактальбумин 440
β-Лактамаза 364
β-Лактамные пептиды 302, 303, 336 сл.
Лактатдегидрогеназа 135, 515, 644
Лактогены 289
Лактоза 204
Ланостерин 22
Лантионин 230, 329, 330
3-метил- 329, 330
Левулиновая кислота, δ-амино- 663
Лейпептины 299
Лейцинаминопептидаза 271
Лейцил-триглицил-лейцил-октаглицил-глицин 217
Лейцин
кодирование 207, 210, 211
меченый 248
разделение изомеров 247
структура 226
хроматография 261
Лектины 561, 562
Лигазы 48
Лизергиновая кислота, производные 309, 310
Лизилгидроксилаза 545
Лизилоксидаза 232, 576
Лизин
защита групп 382, 383, 411
иодирование 207
меченый 250, 253
получение 253
Лизин
разделение изомеров 244
реакции 229, 231, 232, 265
структура 226
хроматография 261
Лизин (производные)
*N*-(4-азидо-2-нитрофенил)- 567
*N*-ацетил- 231
гидрокси- см. Гидроксилизин
гидрокситриметил- 228
динитрофенил- 266
*N*-изопропил- 481
метилпроизводные 228, 549, 578
β-Лизин 314
Лизиноаланин 231
Лизинонорлейцин 232
Лизоцим 221
выделение 450, 549
конформации 433, 437, 440
спектры 440
структура 222, 224, 528 сл., 560
функции 588 сл.
Лимонная кислота 11, 26, 611, 615
Линатин 301
Линосвая кислота 613, 633, 634
Липопротеины 221
Лулиберин 442, 448
Люмазин, гликозид 590, 591, 665
Лютеинизирующие гормоны 289, 292, 549

Максама-Гилберта метод 188, 189
Маларикандиол 24
Малатдегидрогеназа 515
Малатсинтетазная реакция 27, 28
Малеиновая кислота, диметиламид 500
эфир 470, 473
Малоиовая кислота, эфир 468, 469
Малоформины 314
*D*-Маиноза 548, 549
Масляная кислота
α-амино- 283-
2-амино-3-гидрокси- 227, 260
α-амино-, дегидро- 329
Матричные РНК 54
биосинтез 201 сл.
вторичная структура 63
минорные нуклеозиды 72
первичная структура 189, 192, 193, 196
Мевалолактон 11
Мевалоновая кислота 614, 615
Мезаконовая кислота 652
Мезотоцин 288
Миродесмозин 232
Метаболиты, вторичные и первичные 14, 15
Металлопротеины 221
Метиласпартаза 252
Метиленглутаратмутаза 676
Метилмалонил-кофермент А-мутаза 675 сл., 679 сл.
*N*-Метилтетрагидрофолат-гомоцистеинилметилтрансфераза 675 сл.
Метионин
биосинтез 677, 678
кодирование 207, 210, 280
разделение изомеров 245
реакции 231, 273
структура 226
Метионин (производные)
*S*-аденозил- 202, 545, 677
сульфоксид 247
*N*-формил- 231
Метициллин 343
Метотрексат 606, 644
Механизмы
гидролиза НК 140
«в линию» (in line) 141
Механические белки 221
Миелин 545

Микобактин 304
Минорные нуклеозиды **70 сл.**
Миоглобин 221
биосинтез 556
конформации 437
структура 224, 556, 557
функции 556
эволюция 437
Миозин 221, 575
кодирование 54
структура 578
функции 579
Миокиназа 625
Мицелианамид 306, 307
Мовеин 33
Молочная кислота 558, 615
Морфин 11, 22, 23, 294
Моффата метод 103
Музицин 19
Мукопротеины 221
Мукронин А 328
Мурамовая кислота, *N*-ацетил- **339, 528**
Мышечные белки 221

Небера реакция 240
Нейротоксины 570—572
Низин 330
Никотинамид 583
Никотинамидадениндинуклеотид
биосинтез 583
в аффинной хроматографии 643
получение 131, 134, 165, 582
спектры 588
структура 582 сл.
функции 134, 135, 151, 173, 584 сл.
Никотинамид-*N*-рибозид, фосфат **583**
Никотиновая кислота 583
Нингидринная реакция 261, 262
Нитрогеназа 213
Нокардицины 303, 364
Нокобактин 304
Носигептид 330
Нуклеаза стафилококков 145
Нуклеин 32, 33
Нуклеиновые кислоты 32 сл.
Нуклеозиды 33, 68 сл., 81 сл., 110 сл.
Нуклеопротеины 221
Нуклеосомы 51 сл., 569
Нуклеотиды 33, 131 сл., 171 сл.
Нуклеотяжи 51
Нуклеофильный катализ, механизм 461, **462,** 466

Общий кислотный катализ 464, 465, 468
Общий основной катализ 462 сл., 467
Овальбумин 54
Овокаратин 230
Оксазиномицин 101, 102
Окситоцин 287—289
Октозиловая кислота А 86
Олигопептиды, конформации 430, 431, **435,** 443
Операторы 204
Опероны 203 сл., 567
Опсин 221
Орнитин 231, 232, 250, 386
Орнитиноаланин 231
Оротидин 171, 172
фосфат 171
Орцин 18
**Остановленного потока метод 455**
**Офтальмовая кислота 298**

**Пантоевая кислота 611, 612**
**Пантолактон 611**
**Пантотеины 296, 610 сл., 626**
**Пантотенатсинтетаза 612**
**Пантотеновая кислота 611, 612, 626**

Папаин
реакция 245
структура 489, 498, 499
функция 277, 477, 498, 499
Пеларгоновая кислота
8-амино-9-меркапто-7-оксо- 620
8-амино-7-оксо- 619
Пельтогинол 11
Пенницеллаза 342, 343
Пенницилламиновая кислота, 6-амино- **327, 343**
Пенициллины 336 сл.
аналоги 342 сл., 358 сл.
Пенициллиновые кислоты 342
Пенициллоиновая кислота 348
Пентаналь 686
Пепсин 32
ингибирование 282
структура 489, 500
функция 277, 280, 500
Пепсиноген 536
Пепстатины 299
Пептидный синтез 368 сл.
активация 391 сл.
стратегия и тактика **408 сл.**
Пептиды 256 сл.
в природе **285 сл.**
конформации **422 сл.**
синтез **368 сл.**
Пероксидазы 229
Пивалиновая кислота, эфир **495**
Пикроцролин **306**
Пиносельвин 18, 19
Пиноцембрин 18, 19
Пипеколиновая кислота 325
Пиперазины, дикето- **236, 304 сл.**
Пиразомицин 101
Пиридозин 229
Пиридоксаль 458, 635 сл.
Пиридоксальфосфат 137, 282, **608, 634 сл.**
Пиридоксамин 635—637
Пиридоксин 635, 636
Пиридоксол 635—637
Пиридоксолкиназа 638
Пиридоксолфосфатоксидаза **638**
Пиримидин
2,4-диамино-6-метил- 96
4,6-диамино-2-метилтио- 92
2,4-ди-*трет*-бутокси-5-литий- **102**
1,3-диметокси- 80
2,5,6-триамино-6-оксо- 600, 604
Пировиноградная кислота 613, 622, **633 сл.,** 640
Пироглутаминовая кислота 231, **292**
Пирофосфокиназы 626
Пирофосфорилазы 626
Пирофосфотрансферазы 150
Пирролидонкарбоновая кислота 231
Плазмин 284
«Плюс-минус»-метод 188 сл.
Полиаминокислоты 429 сл., 504
Поликетидная гипотеза 17
Поликетиды 18 сл.
Полинуклеотидфосфофилаза 145, 149, **150, 187**
Полиоксин С 86
Полипептиды, конформации 422 сл.
Порфирины 648
Порфобилиногены 663
Прогестерон, производные 24
Прогормоны 286
Проколлагенпептидаза 573
Пролактин 289
Проламины 220
Пролидаза 233, **260**
Пролилгидроксилаза 514
Пролил-лейцил-глициламид 439
Пролин
анализ 262
кодирование 207, 213
меченый 248
разделение изомеров 245, 246



Пролин
реакции 256
структура 226
Пролин (производные)
1-амино- 301
гидрокси- см. Гидроксипролин
дигидрокси- 228
*N*-трифторацетил- 246
Промоторы 204
Проназа 252
Пропаналь 683, 685, 688
Пропандиол-1,2 683, 684, 688
Пропанолы, амино- 664, 677, 685
Пропионовая кислота
диамино- 314
2-гидроксифенил- 525
Простагландины 17
Простетические группы 220, 580
Протеиды 220
Протеиназы микробные 277
Протеины 216, 220
Протромбин 259, 546 сл.
Псевдоуридин 101, 102
Птеридины 590, 600 сл.
Пульхерримовая кислота 306, 307
Пурин
6-бензамидо- 86
6-хлор- 92
Пуриннуклеозид, 6-хлор- 79
Пфицнера-Моффата метод 111, 112

Регуляторные белки 221
Резервные белки 221
Резилин 230
Ренин 555
Репликация НК 198 сл.
lac-Репрессор 504, 569
Рестрикции ферменты 70, 188 сл., 192 **сл.,** 213, 214
Ретикулин 22
нор- 22, 23
*D*-Рибоза 55, 57, 69
реакции 77 сл., 88
структура 33
*D*-Рибоза, дезокси- см. 2-Дезокси-*D*-рибоза
*D*-Рибозо-5-фосфат 149, 169, 171, 626
*D*-Рибозо-5-фосфо-1-пирофосфат 149, 171, 626
Рибонуклеазы см. РНазы
Рибонуклеиновые кислоты см. РНК
Рибонуклеотидредуктазы 675 сл., 688, 689
Рибосомальные РНК 54
минорные нуклеозиды 72
структура 61, 196, 208
функции 208
Рибосомы 208 сл.
Риботимидин 36
2′,3′-дидезокси- 37
Рибофлавин 589, 590
фосфаты 589, 590
Рибофлавинкиназа 590
Рибофлавинсинтетаза 590
РНазы
А (панкреатическая) 35, 58
выделение 450
конформации 437
синтез 408, 409
спектры 437, 441
структура 142, 143, 222, **281, 282**
функция 142, 143, 193, 281, **282**
$T_1$ 58
структура 143
функция 142, 144, 193
РНК 34
гибриды с ДНК 60
гидролиз 140 сл.
вирусные см. Вирусные РНК
вторичная структура 60 сл.
выделение 53, 54
двуспиральные 60
РНК 34
информационные см. Матричные РНК
матричные см. Матричные РНК
первичная структура 55 сл., 193 сл.
рибосомальные см. Рибосомальные РНК
синтез 184 сл.
транспортные см. Транспортные РНК
третичная структура 63 сл.
формы 60
ядер 54
РНК-лигаза 187
РНК-полимераза
структура 203
функция 150, 199, 201 сл., 210, 570
РНК-репликаза 201
Родоторуловая кислота 306, 307
Рокфефортин 307, 308
Роста гормон 289
Руэмана пурпурный 261

Салутаридин 22
Сахароза 136
фосфат 136
Сверхспирализация в ДНК 48, 49
Связывания механизмы 503 сл.
Секретин 275, 289
Сенджера метод 193, 264, 265, 279
Серин
защита групп 389, 411
кодирование 207, 210, 213, **280, 281**
расщепление 231, 259 сл.
реакции 639
структура 226, 227
Серин (производные)
N-ацетил- 231
*N,O*-диацетил-, амид **491, 495, 522, 526**
фосфо- 231, 517, 555, 570
Серингидроксиметилаза **641, 642**
Сиаловые кислоты 548
Сидерохромные пептиды **304, 315**
Сномицин 330
Сквален 22, 24.
Склеропротеины 220
Склеротин 220, 221
Скотофобин 295
Сокращенные формулы
НК 41
нуклеотидов 131
Соленоиды 52, 53
Соматостатин 289, 293
Соренсена метод 234
Спермидин 298
α-Спирали в полипептидах и белках **224,** 426 сл.
Спонгонуклеозиды 72
Споридесмины 310—312
Спорыньи пептиды 309, 310
Стендомицин 326
Стереоспецифичность ферментативных реакций 24 сл.
Стероиды, биосинтез 614
Стоп-кодоны 207, 208
Стравидин 300
Стрептавидин 560
Стрептотрицин 315
Стрихнин 17, 244
Структанин Е 328
Структурные белки 221
β-Структуры в белках и полипептидах **224,** 427 сл.
Стэкинг-взаимодействия 47
Субтилизин 282, 490
Субтилин 329, 330
Сукцинатдегидрогеназа 595, 599
Сукцинимид
*N*-бром- 273
*N*-гидрокси- 394, 397
Сурфактин 326

Такадиастаза см. РНаза T$_1$
Тахикинины 293
Твердофазный синтез
пептидов 267 сл., 405 сл.
полинуклеотидов 170, 183, 184
Тебани 23
Тентоксин 313
Терминаторные кодоны 207, 208
Термолизин 277
Терпены, биосинтез 614
Терпин 16
α-Терпинеол 14 сл.
Тетрануклеотидная теория 35
Техойевые кислоты 134, 340
Тиамин 149, 627, 629
Тиаминдифосфат 459
биосинтез 626, 629
в биосинтезе 619
получение 149, 629
структура 627, 632 сл.
функции 137, 632 сл.
Тиаминфосфат 631
Тиаминфосфатсинтетаза 631
Тиеномицин 364
Тимидилатсинтетаза 174, 678
Тимидин и его производные см. Дезокситимидин и его производные
Тимин 34, 38
ациклические нуклеозиды 109
*L*-нуклеозиды 89
циклонуклеозиды 37, 101
Тиогалактозидтрансацетилаза 569
Тиоредоксин 173
Тиострептон 330
Тироглобулин 227 сл., 548
Тирозин
защита групп 389, 411
кодирование 207, 212, 281
меченый 248
разделение изомеров 244
реакции 229, 231, 265
структура 226
Тирозин (производные)
*N*-ацетил- 496
3-бром- 228
3-бром-5-хлор- 228
3,5-дииод- 228, 229
динитрофенилпроизводное 266
3,5-дихлор- 228, 229
3-иод- 228, 229
*O*-сульфат 231
фосфат 231
3-хлор- 228, 229
Тирокальцитонин 434
Тироксин 227 сл.
Тиролиберин 289, 292 сл.
Тиронин, 3,3,5-триод- 227 сл.
Тиротропин-релизинг гормон 289, 292 сл.
Тироцидины 219
Токсичные белки 570 сл.
Трансаминирования реакции 638 сл.
Транскобаламины 690
Транскриптаза обратная 188, 194, 201
Транскрипция ДНК в РНК 201 сл.
Трансляция РНК в белок 206 сл.
Транспортные белки 221
Транспортные РНК 54, 61
биосинтез 174
минорные нуклеозиды 70, 71
первичная структура 179 сл., 193, 194, 206
третичная структура 61 сл.
функция 206 сл.
Трансферин 561
Треонин
в биосинтезе 664, 677
защита групп 389, 411
кодирование 207
Треонин
расщепление 231, 259, 260
структура 226, 227
хроматография 261
Треонин, фосфат 231
Треониндегидратаза 537
Триизопропилбензолсульфонилхлорид 159, 160
Трипсин 233, 260, 269, 270
выделение 450
структура 282, 284, 489 сл., 514, 551
функция 274 сл., 492, 504, 514, 551, 561
Трипсин
ингибитор-белок 563, 564
предшественники 536, 551
Триптамин 260
Триптофан
кодирование 207, 210, 280
меченый 248, 253
получение 253, 639
разделение изомеров 244, 247
расщепление 231, 259, 260
спектры 259
структура 226
Триптофан (производные)
*N*-ацетил-, эфир 483
1-диметилаллил- 317
*N*-формил- 512, 513
Триптофансинтетаза 222
Тритилхлорид 38
Трифосфопиридиннуклеотид 582
Тромбин
биосинтез 552
структура 284, 489
функции 275, 284, 546, 548
Тромбин, про- 543, 552, 553
Тронше метод 103
Тропеластин 440
Тропинон 16, 17
Тропомиозин 578
Тропонин 578, 579
Туберактиномицин 314, 315

Убихиноны 591, 596 сл.
Уксусная кислота 27 сл., 478 с
трифтор-, эфиры 459 сл.
эфиры 459 сл.
Уотсона-Крика модель 43 сл.
Урацил
5-амино-6-рибитиламино- 591
арабинозиды 98
ациклические нуклеозиды 109
1,3-диметил- 55
ликсозид 98
1-метил- 80
3-метил- 55
6-метил- 84, 96
5-метокси- 83
5-нитро- 83, 84
циклонуклеозиды 89, 101, 106, 109
эпоксинуклеозиды 108
Уридиловая кислота 55, 57, 172
Уридин 69
получение 34, 55, 90, 116
реакции 55, 96, 97, 114, 119, 120, 121
Уридин (производные)
аза- 102, 123
5-аллил- 119
6-аллил- 122
5-ацетил- 122
5′-*O*-ацетил- 115, 116
2′,3′-бензилиден- 57
5-бром- 119, 120, 122
5-гидрокси- 119
5-гидроксиметил- 119
5-гидроксиэтил- 122
3′,5′-ди-*O*-ацетил- 115, 116
1,3-дидеаза- 69
2′,5′-ди-*O*-тритил- 112
Уридин (производные)
2′,3′-*O*-изопропилиден- 116, 119, 158
5-иод- 119
кето- 112
5-металл- 119
*N*-метил- 55
5-метил-2-тио- 90
5-нитро- 119, 122
2-*O*-(*o*-нитробензил)- 117
2-*C*-нитрометил- 105
тетраацетил- 80
тетрабензоил- 114
2-тио- 90
2′,3′,5′-три-*O*-бензоил- 78, 114
5-формил- 122
5-фтор- 120
5-циано- 90
5-циклопропил- 127
*L*-Уридин 89, 109
Уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозамин 549
Уридиндифосфатглюкоза
получение 150, 158, 169
функция 136, 137
Уридин-5′-трифосфат 158, 172
Уридин-2′-фосфат 57, 132
Уридин-3′-фосфат 57, 117
Уридин-5′-фосфат 55, 57, 172
Уридин-2′,3′-циклотиофосфат 143, 169
Уридин-2′,3′-циклофосфат 58, 143
Уридин-3′,5′-циклофосфат 117
Урри-Харранна перегруппировка 679

Фаллоидин 317, 318
Фаллоин 318
Фенантролин, 2-гидроксиметил- 148
Фенилаланилгидроксилаза 600 сл.
Фенилаланилдиазометан, *N*-тозил- 500
(*Фенилаланил*)хлоркетон, *N*-тозил- 482
Фенилаланин
кодирование 207
меченый 248, 251, 253
получение 251
разделение изомеров 244, 247
реакции 601
структура 26, 226
Фенилаланин (производные)
*N*-метил- 313
*N*-формил- 512
β-Фенилаланин 330
Фенилаланинол 330
Фенилизотиоцианат 266
Ферментативные реакции 449 сл.
кинетика 453 сл.
механизм 458 сл.
стереоспецифичность 24 сл.
Фермент-субстат, взаимодействие 510 сл.
Ферменты 24 сл., 221, 449 сл., 510 сл.
Ферритин 221, 561
Феррихромы 315, 316
Фибрин 221, 553
Фибриноген 221, 546
биосинтез 553
структура 231, 275, 553
эволюция 281
Фиброин 221, 224, 428
Физалемин 293
Флавин 588, 589
Флавинадениндинуклеотид 135, 136, 165, 588 сл.
Флавинадениндифосфат 588
Флавинмононуклеотид 135, 588 сл., 626
Флавинмонофосфат 588
Флавиноксигеназы 591, 594, 595
Флавиноксидазы 591, 594, 595
Флавогидрохинон 592 сл.
Флавопротеины 221
Флавохинон 592, 594
Флагеллин 228
Флеомицин 366
Флуорескамин 262
Флутеллин 226
Фолиевая кислота (и производные) 603 сл., 626, 677, 678
Форбрюггена синтез 83, 85
Формицин А 101, 103
β-Формы в белках и полипептидах 224, 427 сл.
Фосфатазы 36, 551, 561, 610
Фосфоглицеральдегиддегидрогеназа 282
Фосфоглюкомутаза 517, 551
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа 643
Фосфогуанидин 166
Фосфодиэстеразы 58, 59, 142
Фосфонмидазолиды 166, 167
Фосфокиназы 561
Фосфолипиды 134, 154, 160
Фосфопротеины 221
Фосфорамидный метод 163 сл.
5-Фосфорибозилпирофосфатсинтетаза 169
Фосфорилазокиназы 152, 153
Фосфорилазы 142, 536, 537, 578
Фосфорилирующие агенты 153 сл., 400, 482, 483
Фосфорные кислоты, структура 154
Фосфотраисферазы 142, 150, 171 см. также РНазы
Фосфотриэфирный метод 182 сл.
Фоторецепторы 221
Франгалании 328
Фруктозо-6-фосфат 136
Фталевая кислота
2-ацетокси- 474
моноамид 500
эфиры 469, 470
Фукоза 548
Фумитреморгин 308
Фуранозин 229

Хеморецепторы 221
Хетомин 311, 312
Химотрипсин 221, 233, 260
выделение 450
конформации 224, 427
реакции 243
спектры 441
структура 224, 282, 284, 481 сл., 511 сл., 517 сл., 551, 552
функция 276, 277, 284, 481 сл., 504, 505, 511 сл., 516 сл., 522, 523, 551, 552
Химотрипсиноген 516, 536, 551
Хинная кислота 11
Хламодоцин 313
Хлорофилл 17, 476
Холецистокинин 289
Холин, производные 163, 566
Холистерин 22, 221
Холофермент 580
Хризофаиол 20
Хроматиды 52, 53
Хроматин 33, 47, 51
Хромосомы 33, 48, 51 сл.

Цефазолин 346
Цефалексин 347
Цефалоглицин 346
Цефалоридин 346
Цефалоспорановая кислота, производные 344, 346, 351
Цефалоспорины 11, 337 сл.
аналоги 358 сл.
производные 344 сл.
Цефалотин 346, 350, 351, 361
Цианокобаламин см. Кобаламины, циано-
Цианокобамид 650, 653
2-Цианоэтилфосфат 163
Циклодекстрины 508, 509
Циклонуклеозиды 37, 89, 98 сл., 675

Циклопептиды 304 сл., 440
Циклосерин, димер 306, 307
Цистамин 544
Цистеамин 544
Цистеаминоксидаза 544
Цистеин
  защита групп 388
  кодирование 207, 213
  реакции 229, 231, 256, 259, 260, 265
  структура 226, 227
Цистеин (производные)
  2-аминоэтил- 263
  дегидро- 304, 338
  карбоксиметил- 259, 263
  2-(пиридил-4)этил- 259, 263
Цистеиновая кислота 259, 261, 263, 264
Цистин
  анализ 262 сл.
  биосинтез 256
  получение 231
  расщепление 259, 260
  структура 227
Цитидин
  конформации 55
  получение 34, 69, 80, 86, 89, 96
  реакции 95, 112, 113, 121
Цитидин (производные)
  аза- 81, 92
  *N*-ацетил- 114
  $N^4$-ацетил-2′,3′,5′-*O*-трибензоил- 114
  метил- 104
  *N*-3-оксид 112
  пентабензоил- 114
  тетраацетил- 86
  тетрабензоил- 114
  2′,3′,5′-три-*O*-бензоил- 113, 114
  5-фтор- 120
*L*-Цитидин 89, 109
Цитидиндифосфат 148
  5-хлор- 165
Цитидиндифосфатхолин 163
Цитидин-5′-трифосфат 148, 173
Цитидин-2′-фосфат 58
Цитидин-3′-фосфат 58, 132
Цитидин-5′-фосфат 55
Цитидин-2′,3′-циклофосфат 58
Цитидин-3′,5′-циклофосфат 151
Цитозин 34, 55
  арабинозиды 86, 89, 98
  ациклические нуклеозиды 109
  ликозид 98
  циклонуклеозиды 100
Цитокинины 75
Цитохромы 221
  конформации 426
  спектры 443
  структура 223, 284
  функции 223, 284, 591, 599
  эволюция 281, 282
Цитратсинтетаза 611, 615
Цитруллин 232

Чаргаффа правила 42, 43

Шоудомицин 101, 103
Штреккера синтез 101, 103

Щавелевая кислота, эфиры 475
Щавелевоуксусная кислота 611, 615, 622

Эдмана метод 256, 257, 266 сл.
Эластаза 300
  конформации 433
  структура 489, 490, 514
  функция 514
Эластин 221
  выделение 575
  структура 229, 284, 230, 440, 575
  функция 284, 545, 576
Эластиналь 300, 314
Элеутеринол 19
Эмодин 20
Энниатины 321, 324
Энтерокиназа 536, 551
Эргоалкалоиды 310
Эргопептины 310
Эстрадиол, производные 283
Эстрадиолдегидрогеназа 283
Эстрон производные 283
Этандиол 683, 686
Этанол
  2,2,2-трихлор- 182
  2-циано- 182, 187
Этаноламин 685
Этаноламинаммониалиаза 676, 685, 688
Эфедрин 244
Эхиномицин 327
Эхинулин 307, 308
  изо- 308

Яблочная кислота 28—30
Янга тест 383
Янтарная кислота
  2,3-бис(бензиламино)- 616
  2,3-дибром- 616
  2,3-ди-*трет*-бутил- 479

# ОБЩАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
## ТОМ 10
## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ

Редактор О. И. СЛУЦКИЙ
Художник Н. В. НОСОВ
Технический редактор В. М. СКИТИНА
Корректор М. В. ЧЕРНИХОВСКАЯ

ИБ 1597

Сдано в набор 18.07.85. Подписано в печать 29.11.85. Формат бумаги 60×90¹/₁₆. Бумага тип. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 44,0. Усл. кр.-отт. 44,0. Уч.-изд. л. 51,09. Тираж 15 000 экз. Заказ № 661. Цена 4 р. 10 к. Изд. № 2061а.
Ордена «Знак Почета» издательство «Химия».
107076, Москва, Стромынка, 21, корп. 2

Ленинградская типография № 2 головное предприятие ордена Трудового Красного Знамени Ленинградского объединения «Техническая книга» им. Евгении Соколовой Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 198052, г. Ленинград, Л-52, Измайловский проспект, 29