

ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА
И КАТАЛИЗ

УДК: 544.43;577.164.16

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЦИАНОКОБАЛАМИНА С ВОССТАНОВЛЕННЫМ
ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДОМ

© 2021 г. И. А. Деревеньков^{а,*}, К. А. Угодин^а, С. В. Макаров^а

^а Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: derevenkov@gmail.com

Поступила в редакцию 21.03.2021 г.

После доработки 30.03.2021 г.

Принята к публикации 01.04.2021 г.

Изучена кинетика реакции цианокобаламина (витамина V_{12} , CNCbl) с восстановленной формой флавинмононуклеотида (FMNH₂) в слабокислой, нейтральной и слабощелочной средах. Показано, что FMNH₂ способен восстанавливать CNCbl до кобаламина(II) (Cbl(II)). Установлено, что в реакции способны участвовать протонированная, моно- и дидепротонированные формы FMNH₂. Механизм реакции включает медленное замещение 5,6-диметилбензимидазольного нуклеотида молекулой FMNH₂, быстрый перенос электрона с FMNH₂ на ион Co(III) и последующую диссоциацию цианида. Реакция протекает обратимо, что объясняется способностью окисленной формы FMNH₂ (FMN) взаимодействовать с комплексом Cbl(II).

Ключевые слова: витамин V_{12} , флавины, флавинмононуклеотид, редокс реакции, кинетика

DOI: 10.31857/S004445372110006X

Кобаламины (витамин V_{12} ; Cbl; рис. 1) являются природными комплексами кобальта с корриновым макроциклом, в которых нижнее аксиальное положение занято атомом азота 5,6-диметилбензимидазольного нуклеотида (ДМБИ), а верхнее различными группами X (H_2O , CN^- , CH_3 и др.) [1, 2]. Коферментными формами кобаламинов являются метил-(MeCbl) и аденозилкобаламин (AdoCbl), входящие в состав метионинсинтазы и метилмалонил-КоА-мутазы, соответственно [3].

Одной из ключевых стадий внутриклеточной переработки кобаламинов является их делигандирование с участием CblC-белка [4–6]. Удаление верхних аксиальных лигандов в MeCbl и AdoCbl, связанных в комплекс с CblC-белком, включает нуклеофильную атаку Co–C-связи тиольной группой глутатиона, в результате чего образуется тиоэфир и Co(I)-форма кобаламина [7, 8]. Катализируемое CblC-белком децианирование цианокобаламина (CNCbl) протекает при участии флавинмононуклеотида (FMN; рис. 1). FMN переносит электрон с восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) на ион Co(III) [9, 10]. Восстановление кобаламина(III) (Cbl(III)) приводит к диссоциации цианида из комплекса [11]. При участии FMN также протекает восстановление связанного в комплекс с CblC-белком аквакобаламина (H_2OC-

bl) до Cbl(II) [12]. Показано, что рибофлавин (Rib) способен катализировать восстановление H_2OCbl до Cbl(II) восстановленным никотинамидадениндинуклеотидом (NADH) [12]. Реакция протекает через образование комплекса с переносом заряда между Rib и NADH и последующее быстрое взаимодействие комплекса с H_2OCbl . Кроме того, флавины входят в состав редуцтазы метионинсинтазы [13–15], которая восстанавливает неспособный принимать метильную группу от метилтетрагидрофолата кобаламин(II) до Cbl(I).

Механизм переноса электрона с NADPH на CNCbl при участии FMN в настоящее время не известен. В частности, не установлено, какая форма FMN непосредственно взаимодействует с CNCbl и является ли обязательным условием реакции предварительное отщепление ДМБИ от иона Co(III) для взаимодействия с восстановленным FMN. С целью установления механизма процесса в настоящей работе изучена реакция CNCbl с восстановленной формой FMN (FMNH₂).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Цианокобаламин (CNCbl; 98%; J&K Scientific), натриевая соль флавинмононуклеотида (FMN; 73%; J&K Scientific), раствор хлорида титана(III) в HCl ($\geq 12\%$; Sigma) использовались без

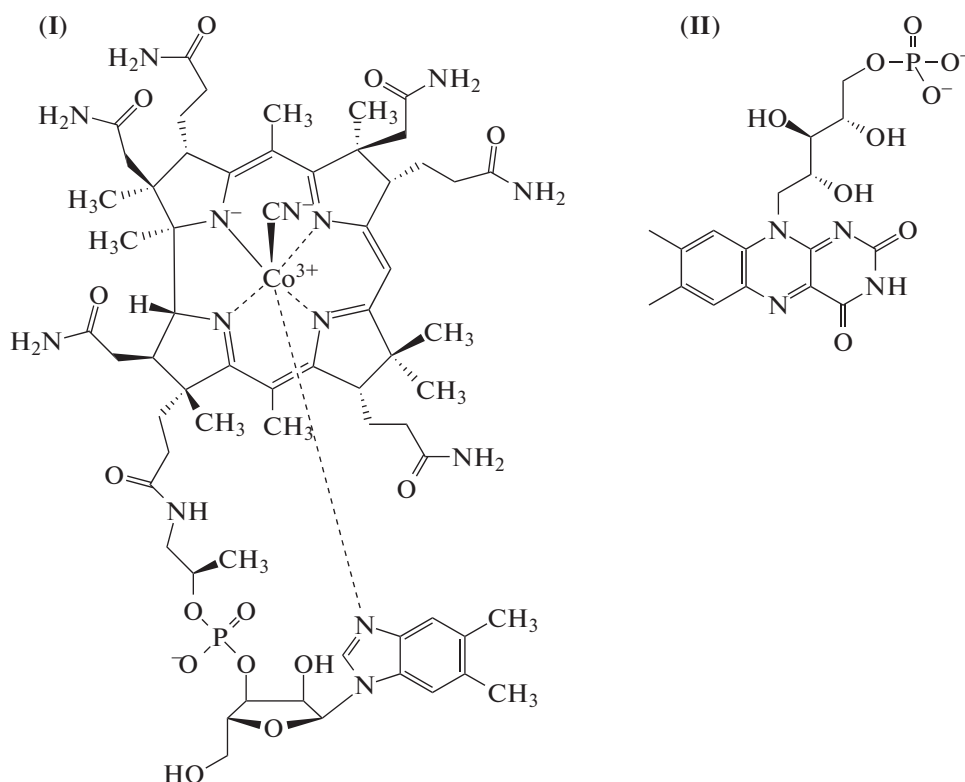


Рис. 1. Структурные формулы цианокобаламина (I) и флавиномононуклеотида (II).

дополнительной очистки. Для создания анаэробных условий через растворы пропускали аргон. FMNH₂ был синтезирован восстановлением FMN двукратным избытком титана(III) в цитратном буфере (pH 4) в анаэробных условиях. Аквацианокобинамид получали из CNCbl по методике [16].

Буферные растворы (ацетатный, фосфатный и боратный) были использованы для поддержания постоянного значения pH в ходе выполнения экспериментов.

Спектрофотометрические исследования выполнялись на термостатируемом ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) спектрофотометре Cary 50 в герметичных кварцевых кюветах при 37.0°C . Кинетика реакции CNCbl с FMNH₂ контролировалась по изменению оптической плотности при 550 нм, соответствующей максимуму поглощения CNCbl, где поглощение FMNH₂ и FMN выражено слабо. Экспериментальные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Origin 7.5.

Значения pH растворов определялись с помощью pH-метра Мультитест ИПЛ-103 (СЕМИ-КО), оснащенного электродом ЭСК-10601/7 (Измерительная техника). Электрод предварительно

был откалиброван с использованием стандартных буферных растворов (pH 1.65–12.45).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Добавление FMNH₂ к CNCbl приводит к изменениям в электронном спектре поглощения (ЭСП), представленным на рис. 2. Наблюдается падение максимума при 550 нм, соответствующего CNCbl, и рост поглощения в диапазоне 375–501 нм, что объясняется накоплением в растворе Cbl(II), имеющего максимум поглощения при 475 нм (рис. 3а) [17], и FMN, поглощающего при 445 нм (рис. 3б). ЭСП, полученный в результате вычитания из спектра смеси продуктов реакции спектра FMN (рис. 3а), показывает наличие максимума при 475 нм, что подтверждает присутствие в системе Cbl(II), а также наблюдается пик при 550 нм, характерный для исходного CNCbl. Это свидетельствует о том, что восстановление CNCbl в Cbl(II) протекает не полностью, что может быть связано с обратимостью процесса. Полное превращение CNCbl в Cbl(II) не наблюдается и в присутствии десятикратного избытка FMNH₂ по отношению к CNCbl.

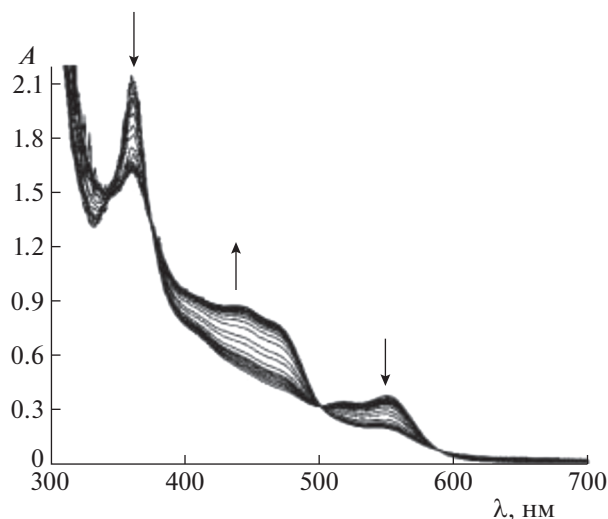
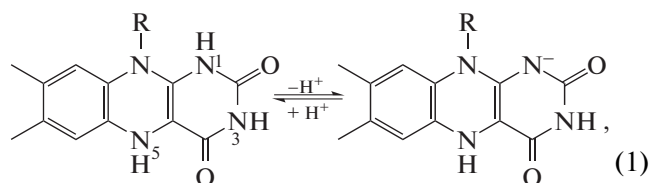


Рис. 2. ЭСП, записанные в ходе реакции CNCbl (5.0×10^{-5} M) с FMNH2 (2.0×10^{-4} M) при pH 6.8, 37.0°C.

Изучена кинетика реакции CNCbl с FMNH2. Типичная кинетическая кривая, полученная в присутствии десятикратного избытка FMNH2 по отношению к CNCbl, приведена на рис. 4. Она описывается уравнением экспоненты, что говорит о первом порядке реакции по CNCbl. Зависимость начальной скорости реакции (r_0) от концентрации FMNH2 линейна и проходит через начало координат (рис. 5), что указывает на первый порядок реакции по FMNH2.

Делением тангенса угла наклона зависимости r_0 от [FMNH2] на начальную концентрацию CNCbl получены константы скорости (k') в диа-

пазоне pH от 4.5 до 9.2. Зависимость k' от pH имеет вид S-образной кривой в диапазоне pH от 4.5 до 8.0, а при pH > 8.0 наблюдается дальнейший рост k' (рис. 6). Кислотно-основные свойства CNCbl не меняются в этом диапазоне pH, тогда как FMNH2 участвует в нейтральной среде в равновесии:



т.е. происходит депротонирование N_1 -H-группы молекулы FMNH2. Депротонирование N_3 -H-группы протекает в сильнощелочной среде ($\text{p}K_a$ около 14 при 15°C), тогда как депротонирование N_5 -H-группы в водной среде маловероятно [18].

Таким образом, в реакции с CNCbl могут принимать участие формы FMNH2 с протонированными N_1 - и N_3 -атомами азота (I), с депротонированным N_1 - и протонированным N_3 -атомом азота (II) и с депротонированными N_1 - и N_3 -атомами азота (III). С учетом этих реакций получено уравнение:

$$\begin{aligned}
 k' = & \frac{k_1}{1 + 10^{-\text{p}K_{a1} + \text{pH}} + 10^{-\text{p}K_{a1} - \text{p}K_{a2} + 2\text{pH}}} + \\
 & + \frac{k_2}{1 + 10^{-\text{pH} + \text{p}K_{a1}} + 10^{-\text{p}K_{a2} + \text{pH}}} + \\
 & + \frac{k_3}{10^{-\text{pH} + \text{p}K_{a2}} + 10^{-2\text{pH} + \text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}}, \quad (2)
 \end{aligned}$$

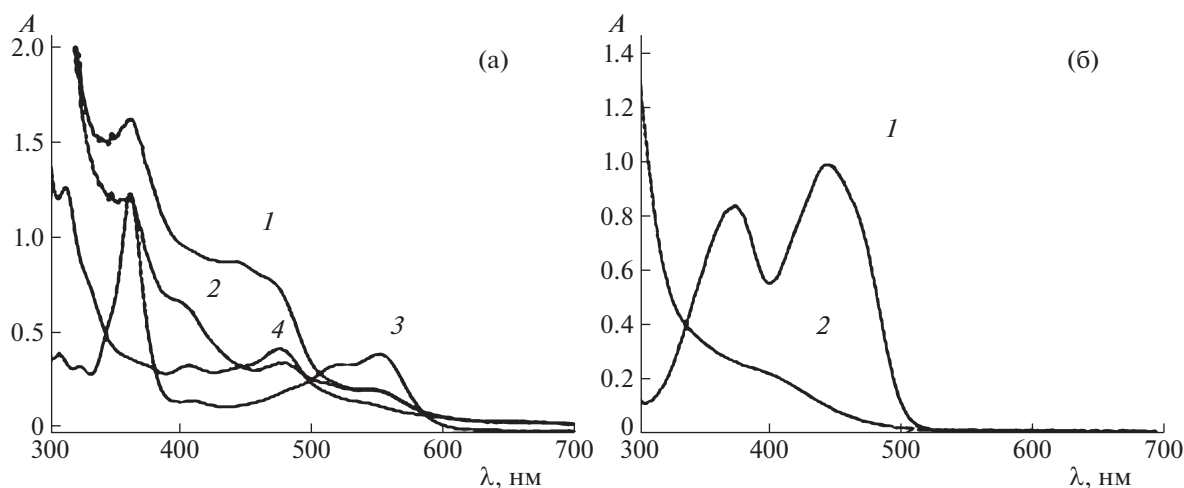


Рис. 3. ЭСП смеси продуктов реакции CNCbl (5.0×10^{-5} M) с FMNH2 (1,а; 2.0×10^{-4} M), смеси продуктов реакции CNCbl (5.0×10^{-5} M) с FMNH2 (2.0×10^{-4} M) после вычета поглощения FMN (2,а), CNCbl (3,а; 5.0×10^{-5} M), Cbl(II) (4,а; 5.0×10^{-5} M), FMN (1,б; 7.0×10^{-5} M) и FMNH2 (2,б; 7.0×10^{-5} M) при pH 7.0, 25.0°C.

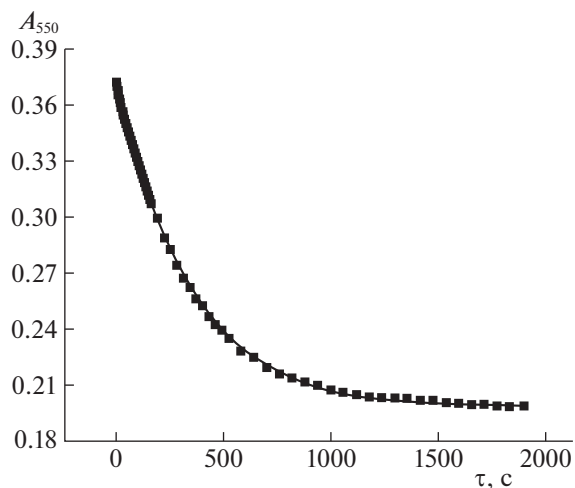


Рис. 4. Пример кинетической кривой реакции между CNCbI (5.0×10^{-5} М) и FMNH_2 (5.0×10^{-4} М) при pH 6.8, 37.0°C.

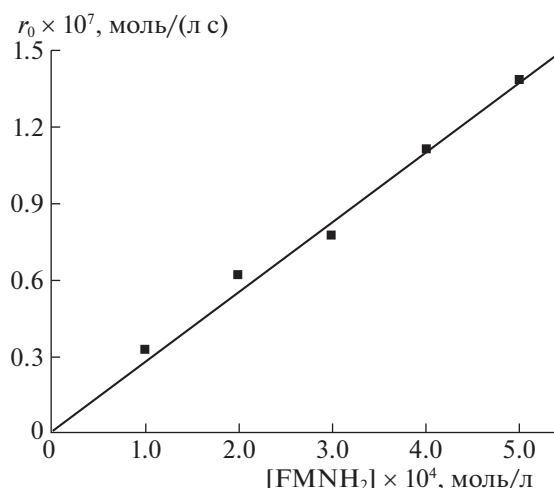


Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции (r_0) между CNCbI (5.0×10^{-5} М) и FMNH_2 от $[\text{FMNH}_2]$ при pH 6.8, 37.0°C.

где k_1 , k_2 и k_3 – константы скорости для реакций CNCbI с I, II и III формами FMNH_2 , соответственно, л/(моль с); K_{a1} и K_{a2} – константы ионизации N1–H- и N3–H-групп соответственно, л/моль. С использованием этого уравнения были получены следующие значения: $k_1 = (0.7 \pm 0.2)$ л/(моль с); $k_2 = (7.4 \pm 0.5)$ л/(моль с); $pK_{a1} = (6.5 \pm 0.1)$ (37.0°C). Надежные значения k_3 и pK_{a1} не были получены.

Проведено сравнение реакций FMNH_2 с CNCbI и аквацианокобинамидом, безнуклеотидным производным CNCbI . В случае аквацианокобинамида реакция с FMNH_2 приводит к образованию кобинамида(II) и FMN и протекает в момент смешивания реагентов, т.е. отщепление ДМБИ при связывании CblC -белком существенно облегчает децианирование CNCbI . Вероятно, это объясняется наличием в молекуле аквацианокобинамида лабильной молекулы воды, которая легко замещается молекулой FMNH_2 , после чего происходит перенос электрона.

Известно, что электрохимическое восстановление CNCbI протекает двухэлектронно до Co(I) [1]. Поскольку электродный потенциал для пары $\text{CNCbI}/\text{Cbl(I)}$ (-0.76 В по стандартному водородному электроду в смеси диметилсульфоксид/изопропанол при 22°C [11]) значительно ниже потенциала пары FMN/FMNH_2 (-0.21 В по стандартному водородному электроду при 20°C, pH 7 [19]), внешнесферный перенос электрона с FMNH_2 на CNCbI маловероятен.

Ранее установлено, что взаимодействие CNCbI с дитионитом и гидросиметансульфинатом протекает через лимитирующую стадию диссоциа-

ции ДМБИ и последующее более быстрое связывание восстановителя и перенос электрона [20]. Вероятно, в случае реакции CNCbI с FMNH_2 первой стадией является медленная диссоциация ДМБИ, после чего протекает более быстрое связывание FMNH_2 . Протекание реакции через диссоциацию цианида маловероятно из-за чрезвычайно высокой константы связывания его кобаламином(III) [21]. В результате последующего переноса электрона образуются Co(II) -форма CNCbI и семихинон FMN . Далее Co(II) -форма CNCbI распадается до Cbl(II) и CN^- , а семихинон

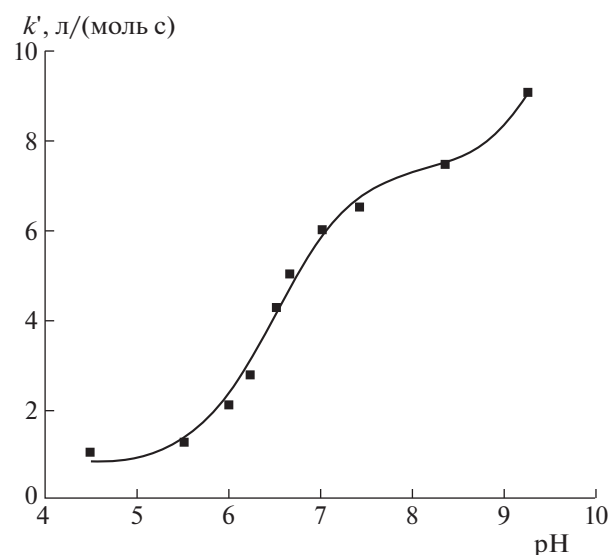
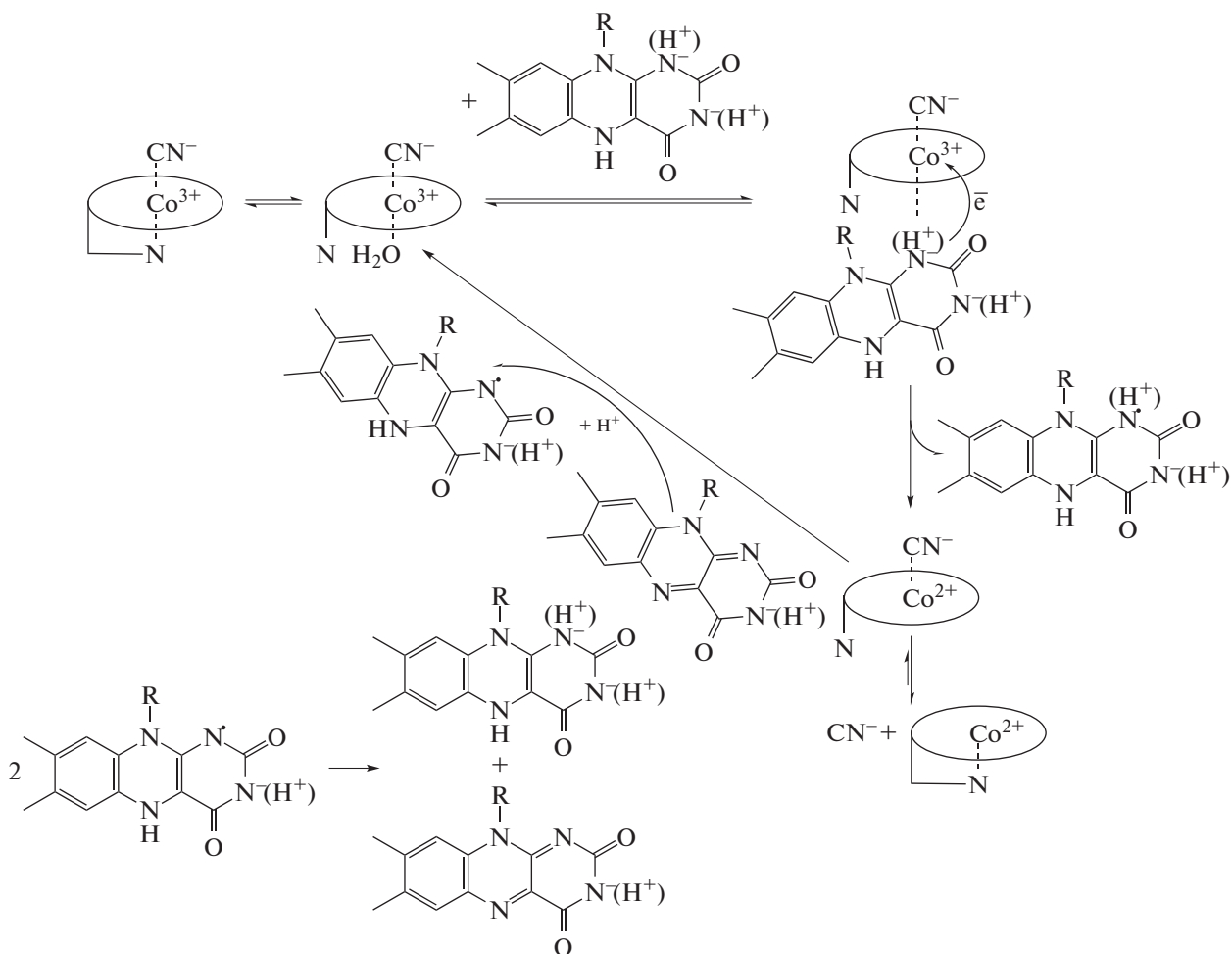


Рис. 6. Зависимость k' от pH при 25°C.

FMN неустойчив в нейтральной среде и диспропорционирует до FMN и FMNH₂ [22, 23]. Таким

образом, взаимодействие CNCbl с FMNH₂ можно представить схемой:



Поскольку восстановление CNCbl до Cbl(II) при участии FMNH₂ протекает не полностью, то можно предположить, что Cbl(II) способен окисляться флавиномононуклеотидом до Cbl(III). Однако добавление FMN к Cbl(II) не сопровождается изменениями в ЭСП. Вероятно, для протекания реакции требуется предварительная координация CN⁻ на Cbl(II), которая снижает электродный потенциал пары Co(III)/Co(II). Существование комплекса Cbl(II) с CN⁻ показано ранее [11]. Подобное поведение наблюдалось ранее в реакции дегидроаскорбиновой кислоты с Cbl(II) [24] в присутствии глутатиона: в отсутствие глутатиона реакция не протекает, а в его присутствии происходит образование Co(III)-глутатионильного комплекса и аскорбиновой кислоты.

Таким образом, в данной работе установлено, что восстановленная форма флавиномононуклеотида способна восстанавливать цианокобаламин до кобаламина(II). Механизм процесса включает

медленную диссоциацию 5,6-диметилбензимидазольного нуклеотида, последующую быструю координацию FMNH₂ на ионе Co(III) и перенос электрона. Образующаяся Co(II)-форма связывает цианид более слабо, что приводит к его диссоциации из комплекса. В реакции могут принимать участие как протонированная форма FMNH₂, так и депротонированные формы по N1- и N3-атомам. Реакция протекает обратимо, что объясняется способностью FMN окислять комплекс кобаламина(II) до Cbl(III). Установлено, что аквацианокобинамид (безнуклеотидное производное CNCbl) восстанавливается FMNH₂ до кобинамида(II) со значительно более высокой скоростью чем CNCbl.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-73-00147).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bridwell-Rabb J., Drennan C.L.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 37. P. 63.
2. *Brown K.L.* // *Chem. Rev.* 2005. V. 105. P. 2075.
3. *Kräutler B.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2005. V. 33. P. 806.
4. *Banerjee R.* // *ACS Chem. Biol.* 2006. V. 1. P. 149.
5. *Hannibal L., DiBello P.M., Jacobsen D.W.* // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. V. 51. P. 477.
6. *Gherasim C., Lofgren M., Banerjee R.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 13186.
7. *Hannibal L., Kim J., Brasch N.E. et al.* // *Mol. Genet. Metab.* 2009. V. 97. P. 260.
8. *Kim J., Hannibal L., Gherasim C., Jacobsen D.W., Banerjee R.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 33418.
9. *Kim J., Gherasim C., Banerjee R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. V. 105. P. 14551.
10. *Koutmos M., Gherasim C., Smith J.L., Banerjee R.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 29780.
11. *Lexa D., Savéant J.M., Zickler J.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 2655.
12. *Dereven'kov I.A., Hannibal L., Makarov S.V., Molodtsov P.A.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020. V. 25. P. 125.
13. *Olteanu H., Banerjee R.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 35558.
14. *Olteanu H., Munson T., Banerjee R.* // *Biochemistry* 2002. V. 41. P. 13378.
15. *Wolthers K.R., Scrutton N.S.* // *Biochemistry* 2004. V. 43. P. 490.
16. *Zhou K., Zelder F.* // *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2011. V. 15. P. 555.
17. *Stich T.A., Buan N.R., Brunold T.C.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 9735.
18. *Macheroux P., Ghisla S., Sanner C. et al.* // *BMC Biochemistry* 2005. V. 6. article number 26.
19. *Mayhew S.G.* // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 265. P. 698.
20. *Salnikov D.S., Dereven'kov I.A., Artyushina E.N., Makarov S.V.* // *Russ. J. Phys. Chem. A* 2013. V. 87. P. 44.
21. *George P., Irvine D.H., Glauser S.C.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1960. V. 88. P. 393.
22. *Land E.J., Swallow A.J.* // *Biochemistry* 1969. V. 8. P. 2117.
23. *Holmström B.* // *Photochem. Photobiol.* 1964. V. 3. P. 97.
24. *Dereven'kov I.A., Hannibal L., Dürr M. et al.* // *J. Organomet. Chem.* 2017. V. 839. P. 53.