

УДК 615.038(575.2)(04)

## СТРУКТУРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОНОАМИНОСХАРОВ С ПИРИДОКСАЛЕМ И ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТОМ

**З.Ш. Шаршеналиева, Ф.В. Пищугин, А.С. Султанкулова, Б.Б. Токтосунова**

Приведены результаты изучения кинетики и механизма конденсации различной структуры моноаминосахаров с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом.

*Ключевые слова:* кинетика; механизм; конденсация; моноаминосахара; пиридоксаль; пиридоксаль-5'-фосфат; структура; коферменты.

Скорости конденсации моноаминосахаров с коферментами зависят от их структуры, основности  $\text{NH}_2$ -групп, их положения в углеводном фрагменте, структуры углеводного фрагмента и условий проведения реакций.

**Влияние конфигурации гликозидного центра на процесс конденсации.** Изучение кинетики и механизма конденсации моноаминосахаров с пиридоксалем (PL) и пиридоксаль-5'-фосфатом (PLP) показало, что присоединение амина к альдегиду протекает стереоселективно и зависит

- от расположения аминогруппы в углеводном кольце,
- от расположения ее относительно плоскости углеводного фрагмента, — от его конфигурации ( $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры) в случае нахождения ее по соседству с гликозидным центром.

Если аминогруппа расположена в экваториальном положении (2-глюкозамин, 2-галактозамин), то образование аминспиртов протекает только с  $\alpha$ -аномерами гексозаминов. Скорость же взаимодействия  $\beta$ -аномеров этих аминосхаров определяется скоростью их перехода в  $\alpha$ -аномеры (рис. 1).

Рассчитанные константы скорости мутаротации  $\beta$ -глюкозамина и константы скорости конденсации  $\beta$ -глюкозамина с PLP, по данным спектрофотометрических и полярометрических измерений, имеют близкие значения ( $k_{\text{мут}} = 5,31 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$ ; и  $k_{\text{конд.}} = 4,96 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$ ).

В случае нахождения аминогруппы в аксиальном положении (2-маннозамин) разница в образовании аминспиртов для  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров нивелируется.

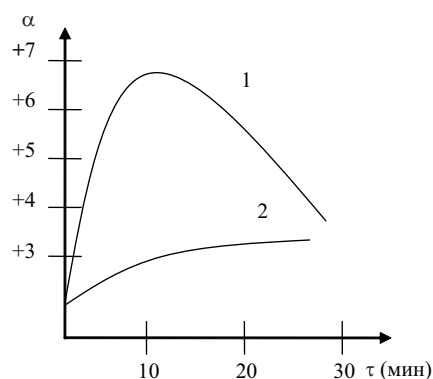


Рис. 1. Изменение удельного угла вращения эквимольных смесей растворов (0,04 М)  $\alpha$ -(1) и  $\beta$ -(2) – аномеров глюкозамина с PLP в водном ацетатном буферном растворе, pH 4,45; 20°C.

**Влияние основности  $\text{NH}_2$ -групп в моноаминосахарах.** В ряду 2-гексозаминов (глюкозамин  $pK_a$  7,8, галактозамин  $pK_a$  7,7; маннозамин  $pK_a$  7,3 25°) скорость конденсации их с пиридоксалем составляет ряд обратный уменьшению их основности (глюкозамин: галактозамин:маннозамин = 1:1,1:1,9) (рис. 2).

Причину несоответствия между относительными скоростями конденсации гексозаминов с коферментами от  $pK_a$   $\text{NH}_2$ -групп следует искать, прежде всего, в стереоспецифичности структуры коферментов на стадии присоединения. Как отмечено выше, коферменты взаимодействуют только с  $\alpha$ -аномерами в случае нахождения  $\text{NH}_2$ -группы в экваториальном положении (глюкоза-

мин, галактозамин) и почти одинаковой скоростью к  $\alpha$ - или  $\beta$ -аномерами в случае нахождения  $\text{NH}_2$ -группы в аксиальном положении (маннозамин). Поэтому концентрация реакционноспособной формы маннозамина в растворе ( $\alpha:\beta = 45:57$ ) будет почти в 2 раза выше, чем концентрация  $\alpha$ -аномера глюкозамина или галактозамина.

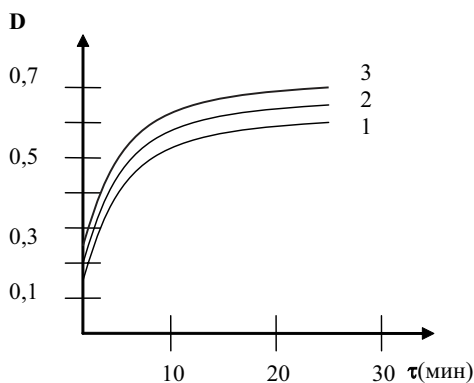


Рис. 2. Кинетика конденсации пиридоксаль с мутаротированными растворами 2-гексозаминов в 50% этанольно-водном буферном растворе, рН 5,65; 20°C (1 – глюкозамин, 2 – галактозамин, 3 – маннозамин).

#### Влияние структуры моноаминосахаров.

Интересные результаты были получены при изучении реакционной способности моноаминосахаров с различным расположением аминогруппы в углеводном кольце в реакции их конденсации с пиридоксальем (рис. 3).

Расчеты констант скоростей дали весьма неожиданные результаты: наиболее реакционноспособными из трех моноаминосахаров оказался углеводов, у которого аминогруппа стоит при  $\text{C}_2$  ( $k = 2,69 \cdot 10^{-2} \text{м/л} \cdot \text{с}$ ,  $\text{pK}_a$  7,5), вторым – ( $k = 4,23 \cdot 10^{-3} \text{м/л} \cdot \text{с}$ ,  $\text{pK}_a$  7,8) и наименее реакционноспособным углеводов с аминогруппой при  $\text{C}_6$  ( $k = 2,66 \cdot 10^{-3} \text{м/л} \cdot \text{с}$ ). Соотношение относительной их реакционной способности  $\text{C}_6:\text{C}_3:\text{C}_2=1:1,6:10,1$ .

Скорость конденсации определяется скоростью присоединения амина к альдегиду с образованием аминокспиртов и скоростью их дегидратации с образованием конечных продуктов – оснований Шиффа. В данных условиях лимитирующей стадией является стадия дегидратации аминокспиртов, поэтому несмотря на то, что  $\text{C}_6$ - $\text{NH}_2$ -замещенные гликозиды на стадии присоединения оказываются более реакционноспособными по сравнению с  $\text{C}_2$ - $\text{NH}_2$ -замещенными гликозидами (за счет большей основности атома азота и меньших стерических факторов), то из-за большего вклада скорости дегидратации в

суммарную скорость конденсации по сравнению с вкладом скорости присоединения, реакционная способность  $\text{C}_2 > \text{C}_6$ .

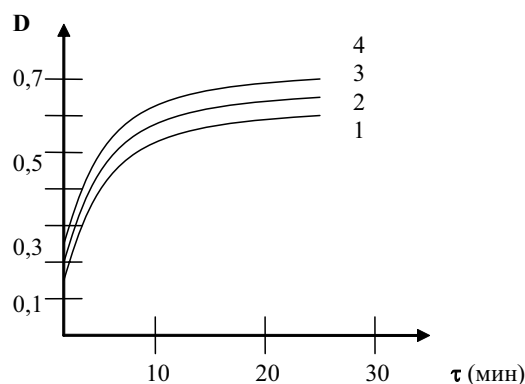


Рис. 3. Изменение оптической плотности растворов эквимольных смесей – (0,04М) пиридоксаль гидрохлорида и 6-амино-6-дезоксид (1), 3-амино-дезоксид (2), 2-амино-2-дезоксиметил- $\alpha$ -D-глюкопиранозидов и 1,2-0-изопропилиден-6-амино-6-дезоксид- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды (4) во времени в 50% водно-этанольном буферном растворе рН 5,85; 20°C.

#### Влияние размеров цикла моноаминосахаров.

Изучение влияния размера кольца моноаминосахаров (пиранозиды и фуранозиды) на скорость конденсации их с пиридоксальем показало, что при приблизительно равном значении  $\text{pK}_a$  6-амино-6-дезоксид- $\alpha$ -D-глюкопиранозидов ( $\text{pK}_a$  8,9) и 1,2-0-изопропилиден-6-амино-6-дезоксид- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды ( $\text{pK}_a$  8,6) скорость конденсации фураноз в 2,2 раза выше скорости конденсации пираноз при равных условиях проведения эксперимента. Это, по-видимому, связано с уменьшением стерических факторов у фураноз по сравнению с пиранозами.

#### 5. Роль фосфатной группы в молекуле пиридоксаль-5'-фосфата.

В литературе [1–8] роль фосфатной группы в молекуле PLP сводится преимущественно к тому, что при помощи ее, как полагают, PLP связана через углеводный фрагмент (рибоза или 2-дезоксирибоза) с остальной белковой частью фермента [8] – «фосфатная ручка». Однако, как показали наши исследования, фосфатная группа не только увеличивает реакционную способность PLP по сравнению с пиридоксальем, но и участвует в дальнейших превращениях оснований Шиффа. Введение фосфатной группы в орто-положение молекулы пиридоксаль в сопоставимых условиях увеличивает концентрацию промежуточных продуктов (аминокспиртов) в растворе в начальные проме-

жутки времени. Увеличение концентрации аминоспиртов в растворе в случае взаимодействия 2-гексозамина с PLP связано, по-видимому, с ростом скорости конденсации на стадии присоединения за счет дополнительного оттягивания электронной плотности от реакционного центра фосфатной группой (присоединение аминоксахара протекает практически мгновенно). Скорость же дегидратации в этом случае уменьшается за счет стабилизации аминоспиртов дополнительными водородными связями между фосфатной группой и близлежащими гидроксилами углеводного фрагмента.

Кроме того, нами было обращено внимание на то, что растворы оснований Шиффа моноаминосахаров и их метилгликозидов с PLP при длительном стоянии окрашиваются в интенсивно красный цвет по сравнению с растворами шиффовых оснований этих же аминоксахаров с пиридоксалем (растворы в течение такого же времени сохраняют начальную интенсивную желтую окраску) в одних и тех же условиях. Интенсивность полос поглощения в УФ-спектрах смеси растворов PLP и аминоксахаров изменяются (интенсивность полосы поглощения в области  $\lambda_{\max}$  470 нм увеличивается).

Естественно было предположить, что различия в ходе поведения кинетических кривых конденсаций моноаминосахаров, с пиридоксалем и PLP связано с фосфатной группой.

Изменения оптической плотности и данные ТСХ в различные промежутки времени показали, что в первые минуты происходит быстрое присоединение аминоксахара к альдегиду с образованием промежуточного продукта (1 – появление интенсивной желтой окраски и изменение УФ-спектров растворов, исчезновение PLP и глюкозамина). Затем по истечении некоторого времени появляются конечные продукты (2 –

основания Шиффа, ИК:КВг, 1633  $\text{см}^{-1}$ ) и, наконец, через несколько часов из конечных продуктов образуется новый продукт, концентрация которого увеличивается во времени (3 – красный продукт) (рис. 4).

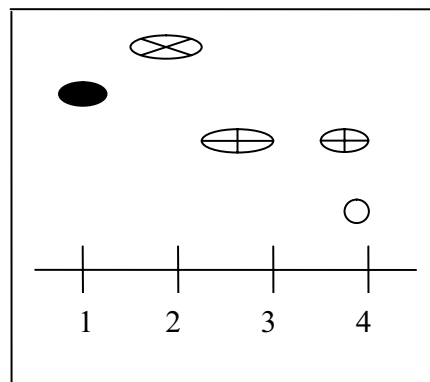


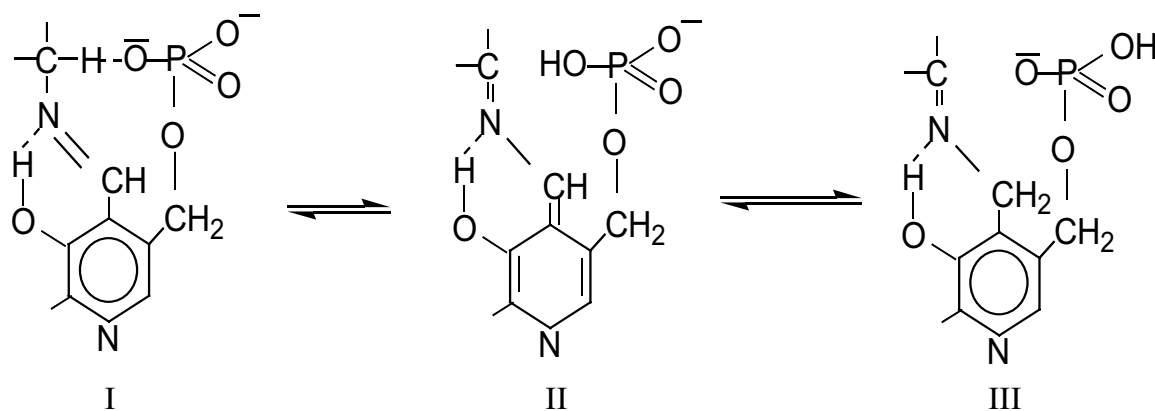
Рис. 4. Хроматограмма реакционной смеси глюкозамина и PLP в различные промежутки времени: (1 – глюкозамин, 2 – PLP, 3 – основание Шиффа, 4 – основания Шиффа и красный продукт с  $\lambda_{\max}$  470 нм).

Методом элюирования с ТСХ удалось выделить новый продукт, который, как показали данные элементного анализа и ИК-спектроскопии, очень похож на основание Шиффа.

Несмотря на схожесть ИК-спектров исходного и выделенного продуктов, УФ-спектры веществ существенно различаются.

Эти данные позволили предположить, что под действием близлежащей фосфатной группы происходит переход исходного азотина в хиноидную структуру II, а в растворе устанавливается равновесие:

Попытка использовать ЯМР<sup>13</sup>С-спектроскопию для идентификации продукта II не привела к успеху, поскольку в водных раство-



рах (продукт растворяется только в воде) быстро устанавливается равновесие  $\rightleftharpoons$ . В метилированном по  $C_1$  производном путем быстрого гидролиза продукта под действием HCl удалось идентифицировать наличие кето-группы при  $C_2$  (реакция с 2,4-динитрофенилгидразином).

На основании изложенного выше полагаем, что фосфатная группа при благоприятном расположении (орто-положение в пиридиновом кольце и непосредственная близость к  $C_2$  углеводного фрагмента) и соответствующих условиях (рН среды, растворитель, температура) может принимать участие в отщеплении протона  $C_2$ -Н-связи молекулы моносахарида и изменять структуру основания Шиффа, а следовательно, и связанные с ним последующие превращения азометинов.

Результаты кинетических исследований показали закономерности влияния структуры коферментов и моноаминосахаров на скорости и пути химических превращений аминоксидозокси-

харов, которые могут быть использованы в качестве моделей сложных ферментативных систем с их участием.

### Литература

1. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Биохимия. – М., 1953. – 18. – С. 393–411.
2. Braunstein A.E. In the Enzymes, 3<sup>rd</sup> ed. (P.D. Boyer, ed.) // Academic Press. – 1973. – V. 9. – P. 379–481. – New York.
3. Guggenheim S., Flavim M. // J. Biol. Chem. – 1969. – 244. – P. 6217–6227.
4. Мецлер Д. Биохимия. – М.: Мир, 1980. – Т.2.
5. Ленинджер А. – Основы биохимии. – М.: Мир, 1985.
6. Rubenstein P.A., Strominger J.L. // J. Biol. Chem. – 1974. № 249. – P. 3776–3781.
7. Ghosh S., Blumenthal H. I., Davidson E., Roseman S. // J. Biol. Chem. – 1960. № 235. – P. 1260.
8. Brandenberger H., Cohen P.P. // Helv. Chim. Acta. – 1953. – V. 36. – P. 549.