

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 моноаминосхаров с пиридоксалем и пиридоксаль-5'-фосфатом.

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

Скорости конденсации моноаминосхаров с коферментами зависят от их структуры, основности 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 моноаминосхаров 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 (α - и β -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 α -аномерами гексозаминов. Скорость же взаимодействия β -аномеров этих аминосхаров определяется скоростью их перехода в α -аномеры (рис. 1).

Расчитанные константы скорости мутаротации β -глюкозамина и константы скорости конденсации β -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 α - и β -аномеров нивелируется.

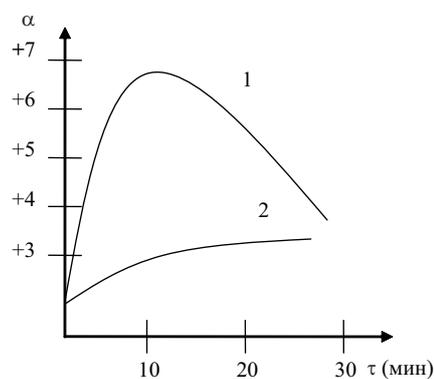


Рис. 1. Изменение удельного угла вращения эквимольных смесей растворов (0,04 М) α -(1) и β -(2) – аномеров глюкозамина с PLP в водном ацетатном буферном растворе, pH 4,45; 20°C.

Влияние основности NH_2 -групп в моноаминосхарах. 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 NH_2 -групп следует искать, прежде всего, в стереоспецифичности структуры коферментов на стадии присоединения. Как отмечено выше, коферменты взаимодействуют только с α -аномерами в случае нахождения NH_2 -группы в экваториальном положении (глюкоза-

мин, галактозамин) и почти одинаковой скоростью к α - или β -аномерами в случае нахождения 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 α -аномера глюкозамина или галактозамина.

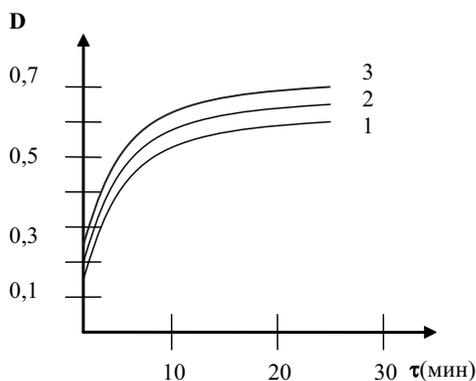


Рис. 2. Кинетика конденсации пиридоксаль с мутаротированными растворами 2-гексозаминов в 50% этанольно-водном буферном растворе, рН 5,65; 20°C (1 – глюкозамин, 2 – галактозамин, 3 – маннозамин).

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 углевод, у которого аминогруппа стоит при C_2 ($k = 2,69 \cdot 10^{-2}$ м/л·с, pK_a 7,5), вторым – ($k = 4,23 \cdot 10^{-3}$ м/л·с, pK_a 7,8) и наименее реакционноспособным углеводом с аминогруппой при C_6 ($k = 2,66 \cdot 10^{-3}$ м/л·с). Соотношение относительной их реакционной способности $C_6:C_3:C_2=1:1,6:10,1$.

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 C_6 - NH_2 -замещенные гликозиды на стадии присоединения оказываются более реакционноспособными по сравнению с C_2 - 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 $C_2 > C_6$.

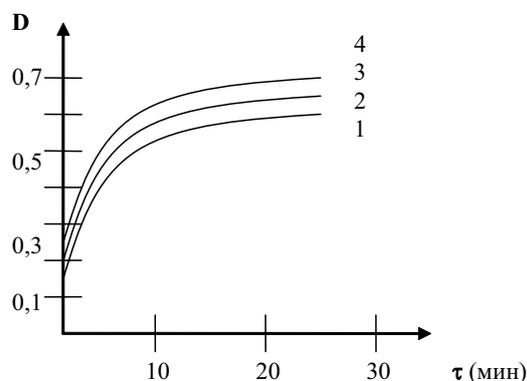


Рис. 3. Изменение оптической плотности растворов эквимольных смесей – (0,04М) пиридоксаль гидрохлорида и 6-амино-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозидов (1), 3-амино-дезоксид (2), 2-амино-2-дезоксиметил- α -D-глюкопиранозидов и 1,2-0-изопропилиден-6-амино-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозы (4) во времени в 50% 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 pK_a 6-амино-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозидов (pK_a 8,9) и 1,2-0-изопропилиден-6-амино-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозы (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-дезоксидрибоза) 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 аминсахара 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 аминсахаров 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 аминсахаров изменяются (интенсивность полосы поглощения в области λ_{\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 аминсахара 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 см^{-1}) и, наконец, через несколько часов из конечных продуктов образуется новый продукт, концентрация которого увеличивается во времени (3 – красный продукт) (рис. 4).

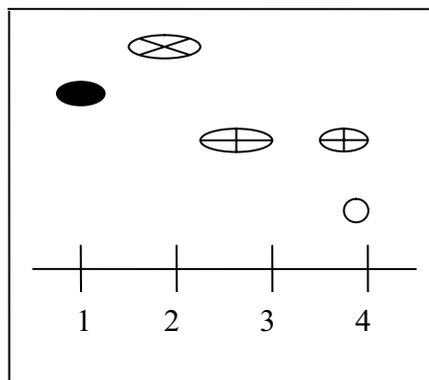


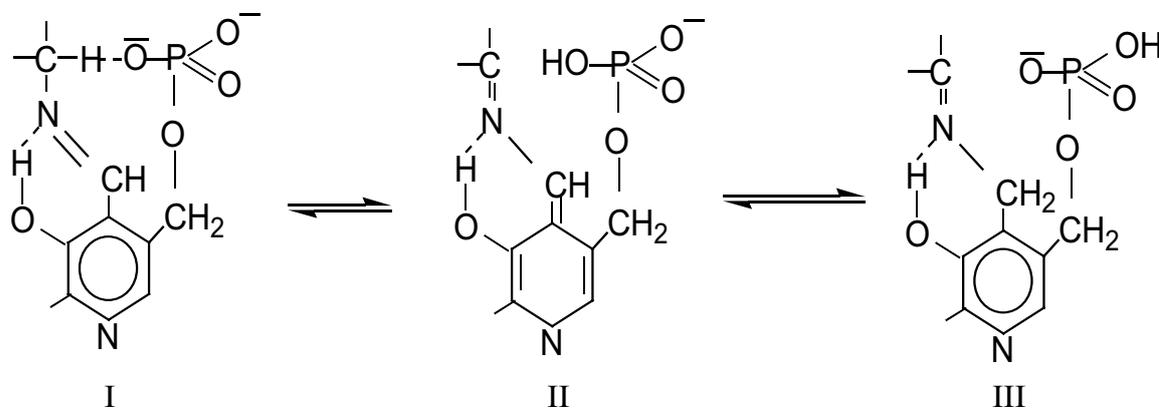
Рис. 4. Хроматограмма реакционной смеси глюкозамина и PLP в различные промежутки времени: (1 – глюкозамин, 2 – PLP, 3 – основание Шиффа, 4 – основания Шиффа и красный продукт с λ_{\max} 470 нм).

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 ЯМР¹³С-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 -H-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, 3rd ed. (P.D. Boyer, ed.) // Academic Press. – 1973. – V. 9. – P. 379–481. – New York.
3. Guggenheim S., Flavin 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.