



УДК 577.164.131: 577.152.2

## АЛЬДИМИНЫ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА С ФОСФОНИСТЫМИ И ФОСФОНОВЫМИ АНАЛОГАМИ АМИНОКИСЛОТ

© 1996 г. Н. П. Бажулина<sup>#</sup>, Т. И. Осипова, Л. И. Федорова, В. О. Чехов, Е. Н. Хурс, А. Р. Хомутов\*, Ю. В. Морозов, Р. М. Хомутов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32;

\* Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, 117071, Ленинский пр. 33

Поступило в редакцию 31.01.96 г.

Впервые исследовано взаимодействие кофермента пиридоксаль-5'-фосфата с  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминофосфонистыми и аминоксфоновыми кислотами в водных растворах спектрофотометрическим методом. На примере фосфоаналогов валина, аспарагиновой и глутаминовой кислот показано образование альдиминов с характерными максимумами поглощения, близкими таковым для аминоксрбонных кислот.

*Ключевые слова:* фосфорорганические аналоги аминоксрлот, пиридоксаль-5'-фосфат, основания Шиффа.

Пиридоксаль-5'-фосфатзависимые ферменты метаболизма аминоксрлот играют важную роль в азотистом обмене, катализируя трансаминирование, декарбосилирование и реакции, затрагивающие аминоксрлотный остаток, и являются одним из наиболее удобных объектов для изучения фундаментальных проблем ферментативного катализа.

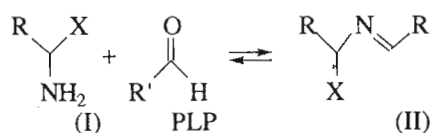
В качестве нового инструмента исследования специфичности PLP-зависимых ферментов нами выбраны аминоксрфонистые (Ia) и (Iг), а также аминоксрфоновые (Iб) и (Iд) кислоты, высокая биологическая активность которых подразумевала возможность воздействия на эти ферменты. Показано, что замена карбосильной группы субстрата на фосфорсодержащий фрагмент приводит к конкурентным ингибиторам ферментов [1]. Реальная ситуация была не столь однозначна: некоторые фосфоаналоги оказались индифферентными к ферментам, другие являлись их ингибиторами или субстратами [1,2]. При этом оставалось неясным, почему фосфоаналоги могли сохранять субстратные свойства при столь значительных различиях карбосильной и фосфорсодержащих групп в размерах, геометрии, кислотности и чем определялись особенности взаимодействия фосфоаналогов с ферментом.

В этой связи очевидный интерес приобретает изучение реакции фосфоаналогов с PLP, что до сих пор не было сделано и что является предметом настоящего сообщения.

Для  $\alpha$ -аминоксрбонных кислот (Iв) (схема 1) реакция с PLP приводит к альдиминам (IIв) (основания Шиффа), свойства которых были подробно изучены [3,4] и превращения которых лежат в основе механизма действия PLP-зависимых ферментов.

Эта реакция обратима, и в водных растворах необходим значительный избыток кислоты (Iв) для превращения PLP в альдимин (IIв), сопровождающегося характерными изменениями спектра поглощения.

При рассмотрении взаимодействия  $\alpha$ -аминоксрфоновых кислот (Iб) с PLP следовало учитывать экранирующий эффект фосфофрагмента, большую основность их  $H_2N$ -группы по сравнению



(Ia, IIa): X = P(O)(OH)H; R = Alk

(Iб, IIб): X = P(O)(OH)<sub>2</sub>; R = Alk

(Iв, IIв): X = COOH; R = Alk

(Iг, IIг): X = COOH; R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>P(O)(OH)H; n = 1, 2

(Iд, IIд): X = COOH; R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>P(O)(OH)<sub>2</sub>; n = 1, 2

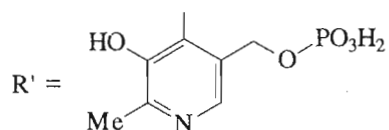


Схема 1.

Сокращения: PLP – пиридоксаль-5'-фосфат.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (7-095) 135-14-05).

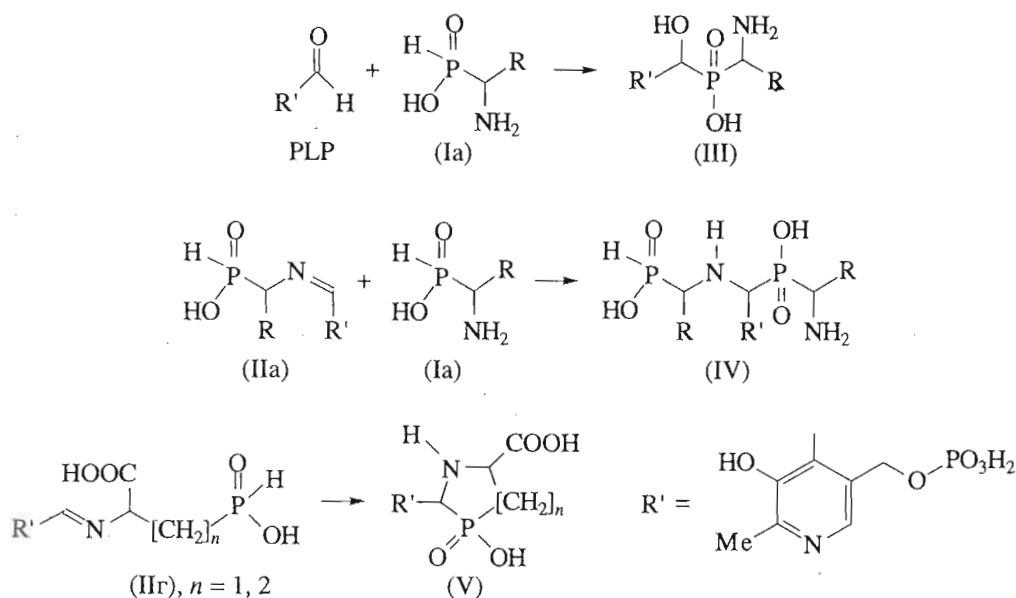


Схема 2.

с аминокарбоновыми (Iв), возможность лабильности С-Р-связи, а также неопределенность положения равновесия между альдимином (IIб) и таутомерным ему кетимином (так как α-кетофосфоновые кислоты в спиртовых растворах практически количественно превращают пиридоксамин в пиридоксаль [5]). В аналогах (Iа) фосфонистый фрагмент ближе по строению карбоксильной группе, H<sub>2</sub>N-группа менее основна, чем в аминокислотах (Iв), но существовала вероятность взаимодействия гидрофосфорильной функции аналогов (Iа) с карбонильной группой PLP (образование соединений типа (III)) или с иминогруппой альдиминов (IIа), приводящего к продуктам (IV) (схема 2).

В случае ω-фосфонистых аналогов дикарбоновых кислот Asp<sup>βP<sub>n</sub></sup> (Iг, n = 1) и Glu<sup>γP<sub>n</sub></sup> (Iг, n = 2) кроме продуктов типа (III) и (IV) можно ожидать образования продуктов (V), возникающих в результате внутримолекулярного присоединения гидрофильного фрагмента по кратной связи альдиминов (IIг).

Изложенное выше делало вероятным достаточно сложную картину взаимодействия PLP с аналогами (Iа), (Iб) и (Iг) с образованием, например, смеси продуктов, среди которых только для альдиминов (IIа) и (IIб) была бы характерна длинноволновая полоса поглощения.

Нами было найдено, что спектр поглощения PLP в водных растворах аналогов валина (Iа) (R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Val<sup>P<sub>n</sub></sup>) и (Iб) (R = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH, Val<sup>P</sup>) изменялся таким же образом, как и в водных растворах самого валина (Iв) (рис. 1), что свидетельствовало об образовании альдиминов (IIа) и (IIб).

Однозначность протекания реакции и положение ее равновесия свидетельствовали о близости свойств H<sub>2</sub>N-групп аналогов (Iа), (Iб) и валина (Iв). Для получения дальнейшей информации о свойствах альдиминов были изучены спектры поглощения водных растворов PLP (10<sup>-4</sup> М), содержащих Val<sup>P</sup> и Val<sup>P<sub>n</sub></sup> (синтез см. [6]) в интервале рН 5.0–14.0.

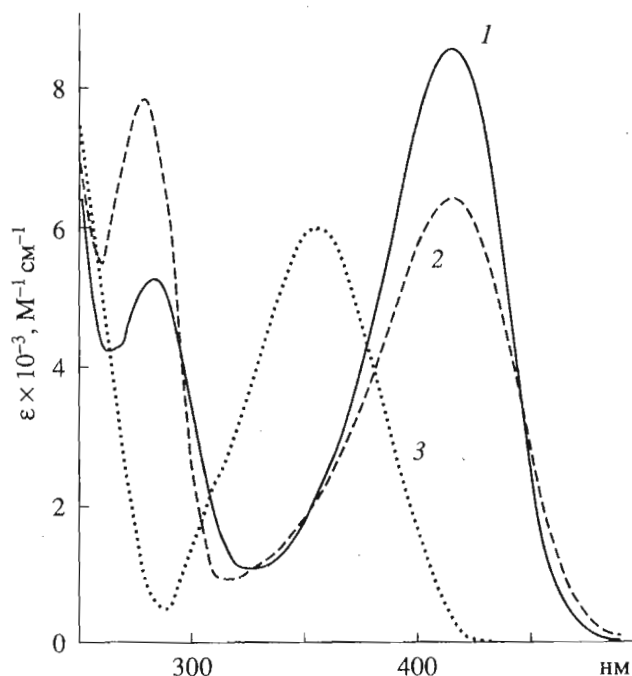
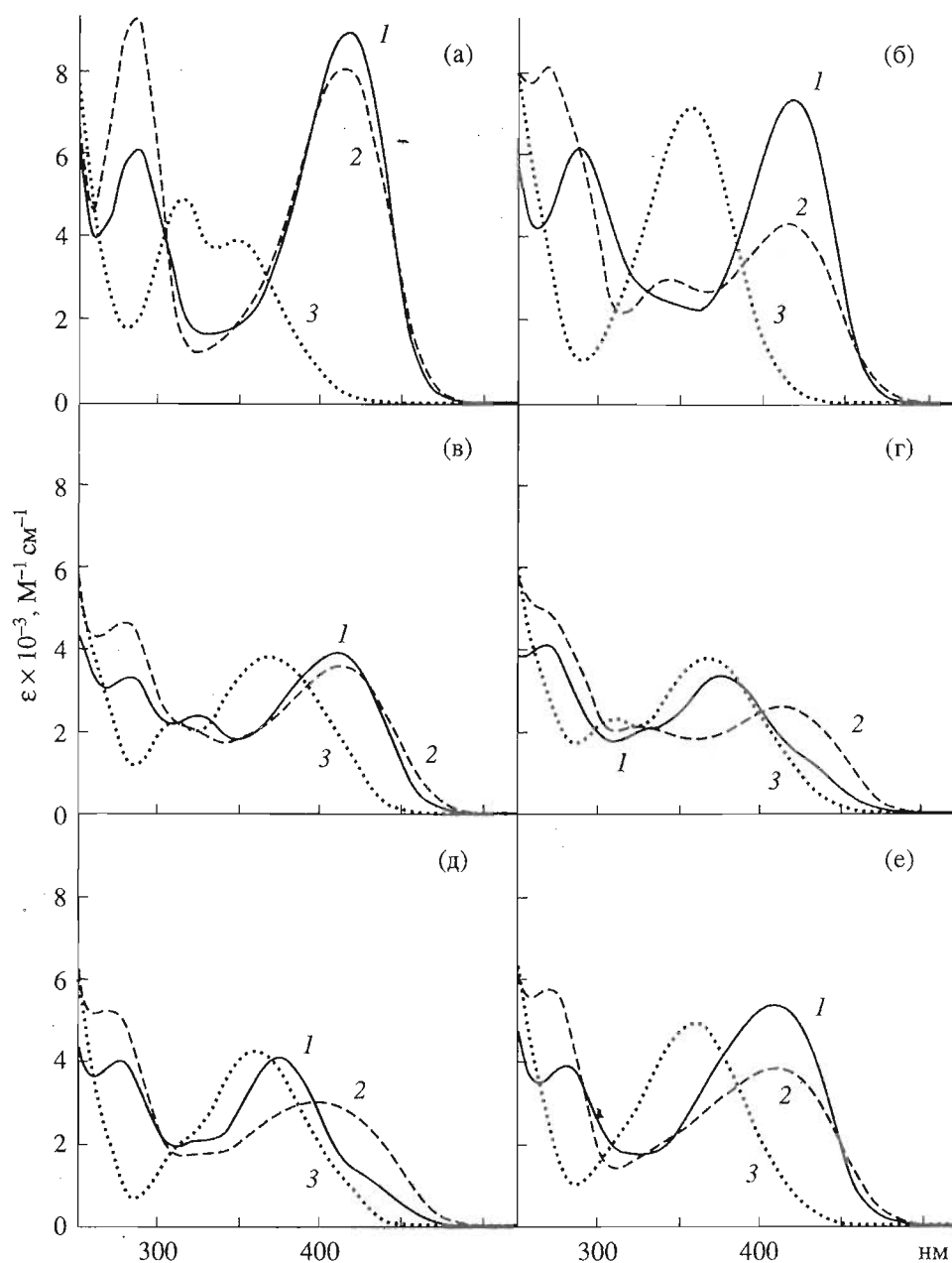


Рис. 1. Спектры поглощения ионных форм альдимина PLP с L-валином: 1 – катион, 2 – нейтральная молекула, 3 – анион. Данные из работы [9].



**Рис. 2.** Спектры поглощения ионных форм альдеминов PLP с фосфоаналогами некоторых аминокислот, полученные в результате математической обработки [8] спектров поглощения альдеминов, снятых в интервале pH 5.0–14.0. 1 – катион, 2 – нейтральная молекула, 3 – анион. (а) – Val<sup>P</sup>, (б) – Val<sup>P<sub>H</sub></sup>, (в) – Asp<sup>βP</sup>, (г) – Asp<sup>βP<sub>H</sub></sup>, (д) – Glu<sup>γP</sup>, (е) – Glu<sup>βP<sub>H</sub></sup>.

Аналогичным образом были изучены спектры поглощения PLP в присутствии ω-фосфоаналогов дикарбоновых аминокислот: фосфонистых (Гг) (Asp<sup>βP<sub>H</sub></sup> ( $n = 1$ ) и Glu<sup>γP<sub>H</sub></sup> ( $n = 2$ )) и фосфоновых (Гд) (Asp<sup>βP</sup> ( $n = 1$ ) и Glu<sup>γP</sup> ( $n = 2$ )) (синтез см. [6, 7]). Концентрация аналогов аминокислот составляла 0.5 М, за исключением Asp<sup>βP<sub>H</sub></sup>, концентрация которой была 0.25 М.

Полученные pH-зависимые наборы спектров, каждый из которых обладал достаточно хорошо

выраженными изобестическими точками, обрабатывались с помощью программы [8], позволяющей разделить спектры различных ионных форм, определив при этом константы равновесия между этими формами и их индивидуальные спектры поглощения.

На рис. 2. приведены спектры поглощения катионных (1), нейтральных (2) и анионных (3) форм продуктов, образовавшихся в результате взаимодействия PLP с фосфоновыми и фосфонистыми аналогами исследуемых аминокислот. Практически во всех изученных случаях в спектрах

поглощения катионных и нейтральных форм образовавшихся продуктов явно проявляются полосы поглощения с максимумом в районе 405–425 нм (в случае кислых растворов Asp<sup>βP<sub>n</sub></sup> и Glu<sup>γP</sup> эти полосы проявляются в виде плеч в спектрах). В то же время в спектрах анионов наиболее длинноволновая полоса имеет максимум при 350–370 нм. Эти полосы практически совпадают с таковыми для альдиминов PLP с соответствующими аминокислотами [9]. Поэтому может быть подтвержден вывод, что при взаимодействии PLP с фосфоаналогами (Ia), (Iб), (Iг) и (Iд) образуются соответствующие альдимины.

В настоящей работе не обсуждаются таутомерные и конформерные равновесия альдиминов PLP и исследуемых фосфоаналогов (Ia), (Iб), (Iг) и (Iд) аминокислот, как требующие дополнительных исследований, которые в настоящее время завершаются и будут опубликованы в отдельных сообщениях.

Настоящая работа получила поддержку INTAS (грант № 93-0119) и РФФИ (грант № 95-04-12009а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kafarski P., Mastalerz P.* Aminophosphonates. Natural Occurrence, Biochemistry and Biological Properties. Beitrage zur Wirkstoffforschung. Heft 21. Akademie-Industrie-Komplex "Arzneimittelforschung". В.: Acad. der Wissenschaften der DDR, 1984.
2. *Kafarski P., Lejczak B.* // Phosphorus. Sulfur Silicon. 1991. V. 63. P. 193–215.
3. *Морозов Ю.В., Бажулина Н.П.* Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул. М.: Наука, 1989.
4. *Metzler C.M., Cahill A., Metzler D.E.* // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 6075–6082.
5. *Хомутов Р.М., Осипова Т.И., Жуков Ю.Н.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. С. 1391–1394.
6. *Хомутов Р.М., Осипова Т.И.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. С. 1951.
7. *Хомутов А.Р., Осипова Т.И., Хурс Е.Н., Алферов К.В., Хомутов Р.М.* // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. В печати.
8. *Бородавкин А.В., Будовский Э.И., Морозов Ю.В., Савин Ф.А., Симукова Н.А.* // Итоги науки и техники. Молекулярная биология. М.: ВИНТИ, 1977. Т. 14.
9. *Бажулина Н.П., Боковой В.А., Морозов Ю.В., Федорова Л.И., Чехов В.О.* // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 678–688.

## Aldimines of Pyridoxal 5'-Phosphate with Phosphonous and Phosphonic Analogs of Amino Acids

N. P. Bazhulina\*, T. I. Osipova\*, L. I. Fedorova\*, V. O. Chekhov\*, E. N. Khurs\*,  
A. R. Khomutov\*\*, Yu. V. Morozov\*, and R. M. Khomutov\*

\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

\*\*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

**Abstract**—Interaction of the pyridoxal 5'-phosphate coenzyme with α-, β-, and γ-aminophosphonous and aminophosphonic acids in aqueous solutions has been studied spectrophotometrically. For the first time, by example of phosphor-containing analogs of valine, aspartic and glutamic acids, formation of aldimines with characteristic absorption maxima close to those of aminocarboxylic acids has been shown.

*Key words:* organophosphorous analogs of amino acids, pyridoxal 5'-phosphate, Schiff's bases.