



УДК 577.164.131:577.152.2

## СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АЛЬДИМИНОВ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА С НЕКОТОРЫМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ И ИХ АНАЛОГАМИ. ТАУТОМЕРНЫЕ И ИЗОМЕРНЫЕ РАВНОВЕСИЯ

© 1998 г. Ю. В. Морозов, Н. П. Бажулина<sup>#</sup>, В. А. Боковой, Н. В. Кузнецова,  
О. Н. Карташева, Т. И. Осипова, Е. Н. Хурс

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

Поступила в редакцию 17.11.97 г.

Принята к печати 27.03.98 г.

Изучены спектральные свойства ионных форм альдиминов пиридоксаль-5'-фосфата с фенилаланином, тирозином, с фосфоновым и фосфонистым аналогами фенилаланина и рН-зависимые переходы между этими формами; определен их таутомерный и изомерный состав. Показано, что спектральные свойства рассматриваемых соединений очень близки к спектральным свойствам ранее изученных альдиминов пиридоксаль-5'-фосфата с другими аминокислотами. В то же время наблюдаются существенные различия в содержании таутомерных и конформерных форм. Замена карбоксильной группы на фосфонистую или фосфовую также влияет главным образом на содержание разных таутомерных форм, плоских и поворотных конформеров.

*Ключевые слова:* пиридоксаль-5'-фосфат, альдимины; ароматические аминокислоты; фосфоаналоги аминокислот; электронная спектроскопия; таутомерия; поворотная изомерия.

Альдимины пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами (внешние основания Шиффа) – ключевые структуры в различных PLP-зависимых ферментативных реакциях, осуществляющих разнообразные превращения аминокислот [1, 2]. Именно поэтому исследованию спектральных характеристик их ионных форм и определению констант протолитических равновесий между этими формами, а также изучению таутомерного состава альдиминов в равновесных состояниях посвящено большое число работ [3–7]. Однако если для кислых и нейтральных растворов альдиминов были получены сравнительно надежные и воспроизводимые спектральные данные, то для щелочных растворов альдиминов результаты неоднозначны [5]. Учет зависимостей констант образования альдиминов PLP и констант их протолитических равновесий от ионной силы растворов частично объяснил расхождение экспериментальных результатов [6]. И лишь введение в расчетную модель наряду с плоскими *син*- и *анти*-изомерами альдиминов PLP их поворотных изомеров (альдиминная группа выведена

из плоскости пиридинового цикла), аналогично тому, как это было сделано нами ранее для оксимов [8] и кетоаналогов [9] PL и PLP, позволило полностью и однозначно интерпретировать экспериментальные результаты.

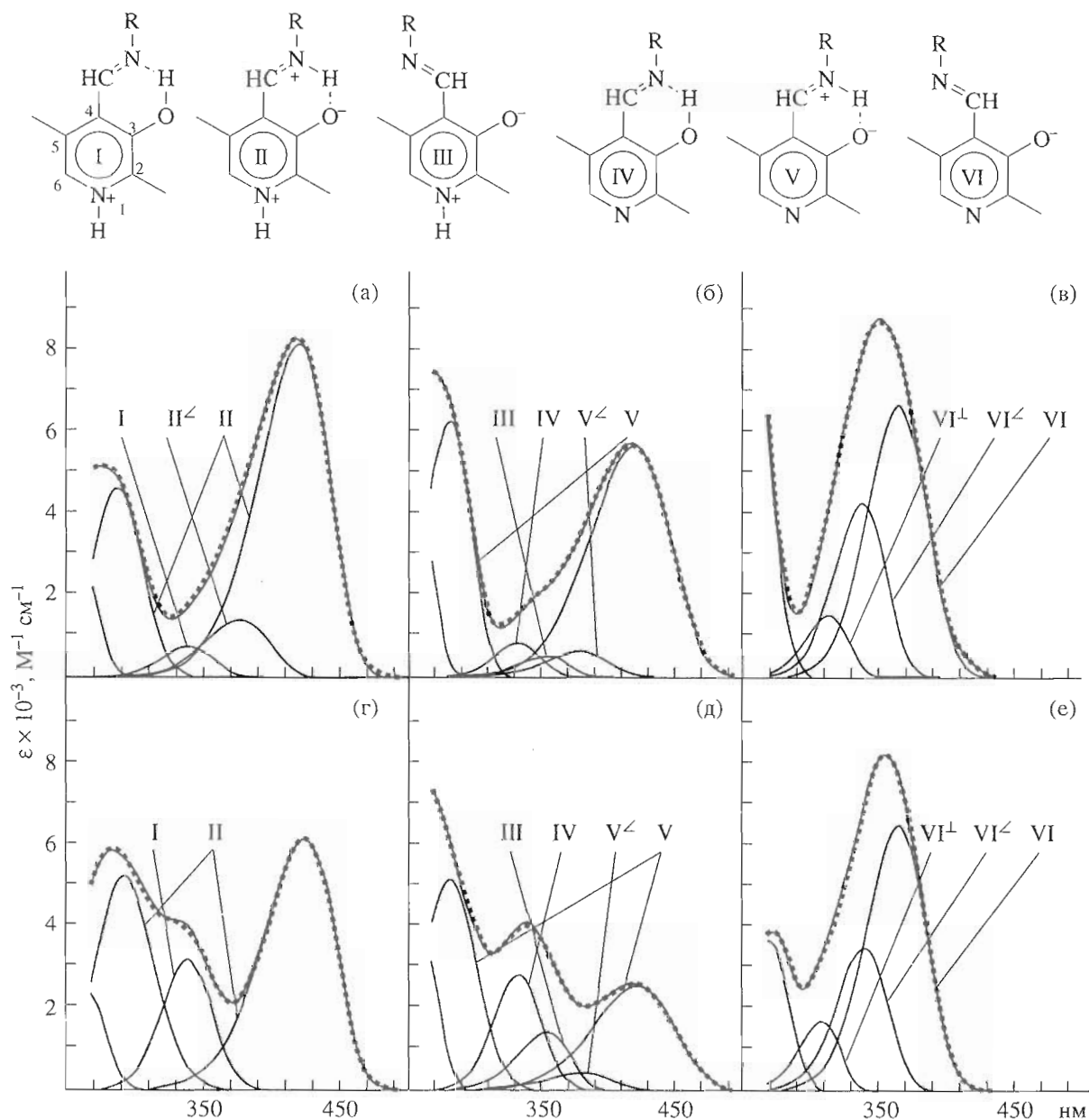
К настоящему времени опубликованы результаты исследований альдиминов PLP с большинством аминокислот, однако данные по альдиминам PLP с ароматическими аминокислотами практически отсутствуют. Это может быть связано с тем, что для альдиминов PLP-Phe измерения в спектральной области с  $\lambda < 300$  нм, а для альдимина PLP-Tyr с  $\lambda < 330$  нм затруднены, так как концентрационный избыток аминокислоты над PLP, необходимый для образования альдиминов, составляет примерно 2–3 порядка, а сами ароматические аминокислоты обладают значительным поглощением в указанных областях длин волн. Все это, естественно, весьма усложняет спектральные исследования обсуждаемых соединений.

Все изложенное побудило нас посвятить настоящую работу изучению спектральных характеристик ионных форм альдиминов PLP с фенилаланином и тирозином, а также определению их равновесного таутомерного и изомерного состава.

Кроме того, недавно нами была экспериментально показана возможность образования альдиминов PLP с фосфовыми и фосфонистыми аналогами природных аминокислот [10], у которых карбоксильная группа замещена соответственно на фосфовую или фосфонистую. Такие соедине-

Сокращения: PLP – пиридоксаль-5'-фосфат; Phe<sup>P</sup> – фосфовый аналог фенилаланина; Phe<sup>P<sub>H</sub></sup> – фосфонистый аналог фенилаланина; PLP-Phe (Tyr) – альдимин PLP с Phe (Tyr); PLP-Phe<sup>P(P<sub>H</sub>)</sup> – альдимин PLP с фосфовым (фосфонистым) аналогом Phe; 1 эВ = 8066 см<sup>-1</sup>.

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



Спектры поглощения ионных форм альдиминов пиридоксаль-5'-фосфата с *L*-фенилаланином (а-в) и его фосфонистым аналогом (г-е) в растворе 2 М NaCl при температуре 298 К, разложенные на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам форм I-VI: (а), (г) – катионы; (б), (д) – нейтральные молекулы; (в), (е) – анионы. Точки – экспериментальные кривые. Вверху приведены структурные формулы ионных и таутомерных форм альдиминов пиридоксаль-5'-фосфата. Римские цифры с соответствующими стрелками указывают, к какому таутомеру относятся приведенные величины, а надстрочные значки  $\angle$  и  $\perp$  – к какому поворотному изомеру (см. текст).

ния очень важны для изучения субстратной специфичности ферментов. Поэтому в число объектов изучения настоящей работы были включены также альдимины PLP с фосфоновым ( $\text{Phe}^P$ ) и фосфонистым ( $\text{Phe}^{P_n}$ ) аналогами фенилаланина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены спектры поглощения ионных форм альдиминов PLP-Phe и PLP-

$\text{Phe}^{P_n}$ , а в табл. 1 – значения параметров полос поглощения и содержание таутомеров и изомеров для всех исследованных альдиминов PLP. Ионное состояние аминокислоты и ее аналогов в составе альдимины не учитывалось, так как оно не проявляется в исследуемом спектральном диапазоне. В табл. 1 приведены наши новые расчетные данные электронных переходов [11]. И хотя они несущественно отличаются от использованных

**Таблица 1.** Параметры<sup>а</sup> полос поглощения альдиминов PLP с фенилаланином, тирозином, с фосфоновым и фосфонистым аналогами фенилаланина

Ионная формула	Соединение	Таутомерная формула	Теория <sup>б</sup>	Эксперимент					
			$E(f)$	$E(f)$	$\lambda$	$W$	$\rho$	$n, \%$	
Катионная	PLP- <i>L</i> -Phe ( <i>D</i> -Phe)	II <sup>а</sup>	2.88(0.46)	2.95(0.36)	420	3.61	1.50	73	
		II <sup>с</sup>	—	3.29(0.27)	377	4.00	1.40	17	
		I	3.67(0.31)	3.66(0.30)	339	3.88	1.33	10	
		I	4.34(0.27)						
		II	4.52(0.11)	4.33(0.29)	286	5.26	1.18		
					4.78(0.11) <sup>г</sup>	260	4.95	1.35	
	PLP-Phe <sup>PH</sup>	II			2.92(0.31)	425	3.51	1.55	61
		I			3.65(0.28)	340	3.88	1.23	39
		II			4.25(0.43)	292	5.76	1.08	
						4.68(0.11) <sup>г</sup>	265	4.95	1.35
	PLP-Phe <sup>P</sup>	II			2.95(0.33)	420	3.58	1.53	79
		I			3.67(0.29)	337	3.78	1.25	21
		II			4.32(0.29)	287	5.74	1.16	
						4.70(0.05) <sup>г</sup>	264	4.95	1.35
	Нейтральная	PLP- <i>L</i> -Phe ( <i>D</i> -Phe)	V	2.87(0.40)	2.97(0.29)	418	4.16	1.43	72
V <sup>с</sup>			—	3.29(0.24)	377	3.92	1.37	8	
III			3.43(0.56)	3.53(0.31)	352	3.65	1.45	6	
IV			3.68(0.24)	3.74(0.20)	332	3.68	1.22	14	
V			4.43(0.16)	4.41(0.37)	281	4.88	1.23		
					4.82(0.18) <sup>г</sup>	257	4.85	1.35	
PLP- <i>L</i> -Tyr		V			2.97(0.30)	418	4.06	1.43	76
		V <sup>с</sup>			3.29(0.24)	377	3.92	1.37	8
		III			3.53(0.31)	352	3.65	1.45	6
		IV			3.74(0.20)	332	3.78	1.22	10
					4.43(0.14) <sup>г</sup>	280	4.98	1.02	
PLP-Phe <sup>PH</sup>		V			2.95(0.28)	420	4.16	1.43	32
		V <sup>с</sup>			3.27(0.24)	379	3.92	1.37	4
		III			3.51(0.30)	354	3.65	1.45	17
		IV			3.73(0.19)	332	3.78	1.22	47
	V			4.40(0.81)	282	5.88	1.22		
				4.77(0.17) <sup>г</sup>	260	4.95	1.35		
PLP-Phe <sup>P</sup>	V			2.97(0.29)	417	4.06	1.43	87	
	III			3.53(0.31)	352	3.65	1.45	3	
	IV			3.73(0.20)	333	3.78	1.22	10	
	V			4.38(0.44)	283	5.87	1.40		
				4.79(0.07) <sup>г</sup>	259	4.94	1.53		
Анионная	PLP- <i>L</i> -Phe ( <i>D</i> -Phe)	VI	3.47(0.56)	3.40(0.51)	365	3.96	1.36	47	
		VI <sup>с</sup>		3.67(0.42)	338	3.94	1.34	34	
		VI <sup>д</sup>	4.02(0.24)	3.96(0.24)	313	3.80	1.35	19	
				4.81(0.37) <sup>г</sup>	258	4.75	1.16		
	VI	4.95(0.03)							
	PLP- <i>L</i> -Tyr	VI			3.40(0.47)	365	3.96	1.31	53
		VI <sup>с</sup>			3.67(0.40)	338	3.94	1.34	43
		VI <sup>д</sup>			3.96(0.24)	313	3.80	1.40	4
					4.46(1.23) <sup>г</sup>	278	4.85	1.04	

Таблица 1. Окончание

Ионная формула	Соединение	Таутомерная формула	Теория <sup>б</sup>	Эксперимент				
			$E(f)$	$E(f)$	$\lambda$	$W$	$\rho$	$n, \%$
Анионная	PLP-Phe <sup>P<sub>H</sub></sup>	VI		3.40(0.49)	365	3.96	1.38	47
		VI <sup>&lt;</sup>		3.66(0.42)	339	3.94	1.34	28
		VI <sup>⊥</sup>		4.03(0.24)	308	3.70	1.40	25
				4.60(0.16) <sup>г</sup>	270	4.95	1.30	
	PLP-Phe <sup>P</sup>	VI		3.39(0.36)	365	3.96	1.48	36
		VI <sup>&lt;</sup>		3.60(0.30)	345	3.94	1.34	56
VI <sup>⊥</sup>			4.02(0.24)	309	3.70	1.40	8	
			4.65(0.13) <sup>г</sup>	267	4.45	1.28		

Примечания: <sup>а</sup> Расчетные и экспериментальные значения энергий электронных переходов ( $E$ , эВ;  $\lambda$ , нм) и соответствующих им сил осцилляторов ( $f$ ); величины полуширин ( $W \times 10^{-3}$ ,  $\text{см}^{-1}$ ), асимметрий ( $\rho$ ) и содержания ( $n$ ) таутомеров и конформеров альдиминов PLP в 2 М растворе NaCl при 298 К.

<sup>б</sup> Теоретические значения энергий и сил осцилляторов переходов (в  $\pi$ -электронном приближении) взяты из работы [11].

<sup>в</sup> Структура таутомеров показана на рис. 1; надстрочные символы  $\angle$  и  $\perp$  обозначают тип поворотного изомера (см. текст).

<sup>г</sup> Полоса не может быть отнесена к определенной таутомерной форме из-за недостатка экспериментальных данных или поскольку она является суперпозицией нескольких полос.

нами ранее [6, 7] (для значений энергий первого электронного перехода различие не превышает 0.06 эВ), эти данные более надежны и достоверны.

Полученные экспериментально значения параметров полос поглощения альдиминов PLP с *L*- и *D*-формами фенилаланина близки между собой. По энергиям и полуширинам полос различия отсутствуют, по силам осцилляторов разброс значений менее  $\pm 0.02$ , а по асимметрии полос – менее  $\pm 0.05$ . В табл. 1 приведены средние значения по *L*- и *D*-формам.

Энергии в столбце “теория” для форм I, II, IV и V приведены с учетом поправок на внутримолекулярную водородную связь [12], а для форм III и VI даны расчетные данные для плоских *анти*-изомеров.

В основу проведенных разложений спектров на полосы отдельных электронных переходов положена модель, предполагающая, что рассматриваемые соединения могут существовать в растворах в виде не только плоских *син*- и *анти*-изомеров, но и поворотных изомеров, у которых альдиминная группа выведена из плоскости пиридинового цикла примерно на 20–30° (надстрочный индекс  $\angle$ ) или же локализована в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла ( $\perp$ ). Здесь следует заметить, что спектральное поведение форм II<sup><</sup> и V<sup><</sup> соответствовало бы таковому для плоских изомеров II и V, но без внутримолекулярной водородной связи между атомами O3' и N4' (см. рисунок). Однако нет никаких данных, которые говорили бы в пользу разрыва водородной связи, и, кроме того, для анионов существуют изомеры и VI<sup><</sup>, и VI<sup>⊥</sup>, поэтому ниже мы будем говорить только об изомерах II<sup><</sup> и V<sup><</sup>, не исключая в принципе и возможность разрыва обсуждаемой водородной связи. При проведении

спектральных разложений не учитывались явно вторые полосы таутомеров I, III и IV, а также их возможных поворотных изомеров. Это мало влияло на точность разложения, так как содержание таутомеров I, III и IV в растворе невелико.

Анализ результатов, суммированных в табл. 1, показывает, что проведение спектральных разложений с учетом существования не только плоских, но и поворотных изомеров позволило детально разобраться в таутомерных и изомерных соотношениях равновесных состояний исследованных соединений. При этом спектральные параметры полос поглощения (по крайней мере наиболее длинноволновых) практически совпадают для всех соответствующих таутомеров и изомеров не только рассматриваемых альдиминов, но и альдиминов PLP с другими аминокислотами и их аналогами [7]. Необходимо отметить, что таутомерный и изомерный состав альдиминов очень сильно зависит от конкретной аминокислоты или ее аналога.

Для плоских конформеров экспериментально определенные значения энергий электронных переходов и их сил осцилляторов находятся в очень хорошем соответствии с расчетными величинами, а спектральные свойства изомеров VI<sup>⊥</sup>, как и ожидалось, весьма близки к таковым для производных витамина B<sub>6</sub> (без дополнительного сопряжения в положении 4' [12]).

Остановимся теперь на некоторых наблюдаемых различиях параметров полос поглощения альдиминов PLP с разными аминокислотами или их аналогами и обсудим их возможные причины. В случае катионов у альдиминов PLP-Phe (см. табл. 1) полуширина второй полосы поглощения формы II на 200  $\text{см}^{-1}$  шире соответствующей полосы альдиминов PLP-Val [7]. В то же время для

альдиминов PLP-Phe<sup>P</sup> и PLP-Phe<sup>P<sub>H</sub></sup> эта же полоса уширена еще на 500 см<sup>-1</sup>. Для нейтральной формы V вторая полоса поглощения альдиминов PLP с фосфоаналогами уширена по сравнению с таковой у альдиминов PLP-Phe примерно на 1000 см<sup>-1</sup>. Эти уширения могут быть связаны с тем, что при проведении спектральных разложений не учитывалось присутствие в растворе поворотных изомеров I<sup>z</sup> и IV<sup>z</sup> соответственно. Кроме того, как уже отмечалось, следует также иметь в виду, что спектральные измерения для альдиминов PLP-Phe и PLP-Phe<sup>P(P<sub>H</sub>)</sup> в УФ-области с  $\lambda < 300$  нм затруднены и, следовательно, менее надежны.

Из табл. 1 видно, что спектральные характеристики всех ионных и таутомерных форм альдиминов PLP-Tyr очень близки к таковым для соответствующих форм альдиминов PLP-Phe. Однако мы привели их в настоящей работе, так как если для нейтральных форм альдиминов PLP-Phe полоса поглощения при  $E$  4.41 эВ определена вполне достоверно, то для альдиминов PLP-Tyr, для которого измерения в спектральном диапазоне с  $\lambda < 330$  нм уже ненадежны, аналогичная полоса ( $E$  4.43 эВ) определена заведомо менее достоверно. Подобная ситуация имеет место и для анионных форм. Полоса поглощения формы VI<sup>1</sup> для альдиминов PLP-Tyr в большой мере закрыта полосами поглощения изомера VI<sup>z</sup> и тирозинового остатка в составе альдиминов PLP-Tyr, поэтому эта полоса определяется ненадежно и, следовательно, содержание ( $n$ ) изомеров VI<sup>z</sup> и VI<sup>1</sup> также определено с меньшей степенью точности.

Соотношения между содержанием таутомерных форм в кислых и нейтральных растворах альдиминов PLP-Phe и PLP-Phe<sup>P</sup> примерно одинаковы, а в случае альдиминов PLP-Phe<sup>P<sub>H</sub></sup> заметно понижается содержание форм II и V. В то же время в щелочных растворах изомерные равновесия альдиминов PLP-Phe и PLP-Phe<sup>P<sub>H</sub></sup> качественно аналогичны, а для альдиминов PLP-Phe<sup>P</sup> заметно понижается содержание плоских изомеров и возрастает – поворотных. Это связано, по-видимому, с возможностью дополнительной ионизации фосфоновой группы по сравнению с карбоксильной.

Из табл. 2 видно, что для альдиминов PLP-Phe и PLP-Tyr значения  $pK$  примерно одинаковы и близки к значениям  $pK$  альдиминов PLP с другими исследованными нами аминокислотами [7]. Замена карбоксильной группы на фосфоновую, не влияя на величину  $pK_1$  соответствующих альдиминов, заметно увеличивает значение  $pK_2$ . В то же время замена карбоксильной группы на фосфонистую понижает оба значения  $pK$ . Качественно совершенно аналогичная картина имеет место и для альдиминов PLP с фосфоаналогами валина [13].

Таблица 2. Значения  $pK$  альдиминов PLP

Соединение	$pK_1$	$pK_2$
PLP-L-Phe	$6.1 \pm 0.1$	$11.6 \pm 0.1$
PLP-D-Phe	$6.0 \pm 0.1$	$11.6 \pm 0.1$
PLP-L-Tyr	–	$11.3 \pm 0.1$
PLP-Phe <sup>P<sub>H</sub></sup>	$5.1 \pm 0.1$	$11.2 \pm 0.1$
PLP-Phe <sup>P</sup>	$6.1 \pm 0.1$	$12.5 \pm 0.1$
PLP-A*	$6.2 \pm 0.2$	$11.5 \pm 0.3$

\* А – аминокислоты: глицин, аланин, валин, серин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота (по данным работы [7]).

Следует заметить, что альдимины PLP с фосфоаналогами фенилаланина образуются более эффективно, чем с природным фенилаланином. Под эффективностью мы подразумеваем количество образовавшегося альдиминов при прочих равных условиях (одинаковые концентрации PLP и аминокислоты и условия протекания реакции: растворитель, температура, pH и т.д.).

Заканчивая рассмотрение спектральных свойств альдиминов PLP с ароматическими аминокислотами, подчеркнем еще раз, что спектральные характеристики полос поглощения (особенно длинноволновых) как плоских, так и поворотных изомеров различных ионных и таутомерных форм альдиминов PLP практически не зависят от конкретного типа аминокислоты или ее аналога.

Именно это обстоятельство позволяет в дальнейшем существенно упростить решение рассмотренной в методическом разделе задачи определения спектральных характеристик различных форм обсуждаемых альдиминов и констант равновесия между ними. Зная спектры поглощения PLP при конкретных экспериментальных условиях [12], а также полосы поглощения плоских и поворотных изомеров альдиминов PLP (см. настоящую работу или [7]), вполне достаточно измерить несколько суммарных спектров поглощения ( $F_{jv}$ ) при одной концентрации аминокислоты и нескольких значениях pH (например, при pH 6.0, 9.0 и 12.0) и далее определить процентные содержания всех искомым форм при этих значениях pH из выражения

$$F_{jv} = \sum_i C_{ij} f_{jv}$$

Здесь  $f_{jv}$  – спектр поглощения  $i$ -го компонента,  $v$  – номер частоты или длины волны в спектре, а  $C_{ij}$  – процентное содержание  $i$ -го компонента при  $j$ -м значении pH. При этом  $\sum_{i=1}^N C_{ij} = 1$ , где  $N$  – число компонентов. Определив величины  $C_{ij}$ , можно рассчитать значения  $pK$ . Естественно, что результаты решения этой упрощенной задачи менее точны, но для ряда практических целей этого может быть вполне достаточно.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

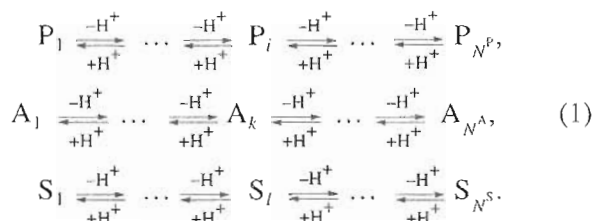
В работе были использованы PLP, *D*-фенилаланин, *L*-тирозин (Sigma) и *L*-фенилаланин (Fluka). Фосфоновый и фосфонистый аналоги фенилаланина были синтезированы как в работе [13]. В качестве растворителя использовали 2 М раствор NaCl (ос.ч.), приготовленный на бидистиллированной воде. Для получения альдиминов PLP с исследуемыми аминокислотами и их аналогами к соответствующему раствору аминокислоты или ее аналога, концентрацию которых меняли от 0.02 до 0.2 М, добавляли раствор PLP, при этом суммарная концентрация образовавшегося альдимины и оставшегося в растворе PLP была  $10^{-4}$  М. Водные растворы титровали NaOH (ос.ч.) в области pH 5.0–14.0. Растворы же *L*-Тур титровали лишь в области pH 9.5–14.0. Концентрации водородных ионов определяли на ионометре “ЭВ-74” с точностью 0.04 ед. pH.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре “EPS-3Т” (Hitachi) при 298 К.

Индивидуальные спектры поглощения различных ионных форм альдиминов PLP с аминокислотами и константы равновесия между этими формами определяли из экспериментальных данных с помощью программы, рассмотренной в нашей работе [6].

Смысл алгоритма этой программы заключается в следующем.

В растворах при разных pH существует сложная динамическая система, которая может быть представлена в виде



Здесь  $P_j$ ,  $A_k$  и  $S_l$  обозначают ионные формы соответственно PLP, аминокислоты и альдимины PLP с этой аминокислотой ( $P_{ij}$ ,  $A_{kj}$  и  $S_{lj}$  – их концентрации при некотором значении pH, характеризующем индексом  $j$ );  $N$  – полное число ионных форм, а надстрочные индексы при  $N$  указывают, к какому соединению относится это обозначение.

Поведение обсуждаемой системы (1) зависит не только от протолитических равновесий ее компонентов с константами  $K_s^P$ ,  $K_s^A$  и  $K_s^S$  [5, 6] (подстрочный индекс  $s$  – номер константы каждого из равновесий), но и от констант образования альдиминов из исходных PLP и аминокислоты, которые (при прочих равных условиях: температура, концентрация металлов и т.д.) зависят от ионного состояния реагентов.

Для решения обсуждаемой задачи необходимо и достаточно измерить при различных pH сум-

марные спектры поглощения  $F_{jv}^I$  и  $F_{jv}^{II}$ , соответствующие некой постоянной концентрации PLP  $P_0$ , удобной для проведения спектральных измерений, и двум концентрациям аминокислоты  $A_0^I$  и  $A_0^{II}$ , причем  $A_0 > P_0$ , которая, как правило, не поглощает в исследуемом спектральном диапазоне (надстрочные знаки  $I$  и  $II$  соответствуют этим двум концентрациям). При этом должно обязательно выполняться условие

$$F_{jv}^P \neq F_{jv}^I \neq F_{jv}^{II}, \quad (2)$$

где  $F_{jv}^P$  – спектры поглощения PLP, определяемые при различных значениях pH в отсутствие аминокислоты. Так как индивидуальные спектры поглощения ионных форм PLP, ( $f_{jv}^P$ ) и константы равновесия  $K_s^P$  между этими формами известны [14], то при любом  $j$  может быть рассчитан и  $F_{jv}^P$  [15].

Таким образом, известны исходные концентрации PLP ( $P_0$ ) и аминокислоты ( $A_0^I$  и  $A_0^{II}$ ), спектры  $F_{jv}^P$ , а также измеренные экспериментально  $F_{jv}^I$  и  $F_{jv}^{II}$  (в общем виде  $F_{jv}^{\text{эксп}}$ ). Требуется определить  $f_{jv}^S$  и  $K_s^S$ .

Так как  $F_{jv}^{\text{эксп}}$  содержит случайные ошибки измерений, для решения рассматриваемой задачи целесообразно использовать метод наименьших квадратов и находить искомые величины из минимума функционала

$$Q = \sum_{j=1}^R \sum_{v=1}^n (F_{jv} - F_{jv}^{\text{эксп}})^2, \quad (3)$$

где

$$F_{jv} = \sum_{l=1}^{N^S} S_{lj} f_{lv}^S + \sum_{i=1}^{N^P} P_{ij} f_{iv}^P. \quad (4)$$

Здесь естественно выполняется  $S_{0j} + P_{0j} = P_0$ , где

$$S_{0j} = \sum_{l=1}^{N^S} S_{lj} \quad \text{и} \quad P_{0j} = \sum_{i=1}^{N^P} P_{ij}.$$

Для решения такой итерационной задачи необходимо задать начальные значения констант протолитических равновесий аминокислоты и исследуемого альдимины PLP. Для природных аминокислот мы брали эти величины из справочной литературы [16], а для фосфоаналогов фенилаланина определяли их в результате спектрофотометрического титрования. Значения этих констант приведены в табл. 3. Для соответствующих альдиминов PLP эти константы задавались приблизительно на основании экспериментальной



**Таблица 3.** Начальные значения  $pK$  аминокислот, используемые при расчетах спектров поглощения ионных форм альдиминов PLP

Соединение	$pK_1$	$pK_2$
L-Phe	—	9.24[16]
D-Phe	—	9.29
L-Tyr	—	9.11[16]
Phe <sup>pH</sup>	—	7.60
Phe <sup>p</sup>	6.30	10.10

pH-зависимости суммарных спектров поглощения  $F'_{jv}$  и  $F''_{jv}$ .

Разложение спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам, с учетом их согласования и самосогласования проводили с помощью процедуры, подробно рассмотренной в работах [17, 18].

Настоящая работа получила поддержку РФФИ (гранты № 94-04-12009, 96-15-97699) и INTAS (грант № 93 0119-ext.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. // Биохимия 1953. Т. 18. С. 393–411.
2. Metzler D.E., Ikawa M., Snell E.E. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 648–652.
3. Heinert D., Martell A.E. // J. Am. Chem. Soc. 1962. V. 84. P. 3257–3263.
4. Johnson R.J., Metzler D.E. // Methods Enzymol. 1970. V. 18(A). P. 433–471.
5. Metzler C.M., Cahill A., Metzler D.E. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 6075–6082.
6. Морозов Ю.В., Бажулина Н.П., Боковой В.А., Федорова Л.И., Чехов В.О. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 1571–1581.
7. Бажулина Н.П., Боковой В.А., Морозов Ю.В., Федорова Л.И., Чехов В.О. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 678–688.
8. Боковой В.А., Бажулина Н.П., Морозов Ю.В., Чехов В.О. // Биофизика. 1989. Т. 34. С. 741–752.
9. Боковой В.А., Бажулина Н.П., Морозов Ю.В., Чехов В.О. // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 522–532.
10. Бажулина Н.П., Осипова Т.И., Федорова Л.И., Чехов В.О., Хурс Е.Н., Хомутов А.Р., Морозов Ю.В., Хомутов Р.М. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 628–631.
11. Морозов Ю.В., Чехов В.О., Бажулина Н.П. // Биофизика. 1997. Т. 42. С. 301–312.
12. Морозов Ю.В., Бажулина Н.П. Электронное строение, спектроскопия и реакционная способность молекул. М.: Наука, 1989. С. 98–99.
13. Белянкин А.В., Хомутов А.Р., Жуков Ю.Н., Карташова О.Н., Хомутов Р.М. // Изв. РАН. Сер. хим. 1997. № 1. С. 137–140.
14. Morozov Yu.V. // Coenzymes and Cofactors. Vitamin B<sub>6</sub>. Pyridoxal Phosphate. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. V. 1 / Eds D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic. N.Y.: Wiley-Intersci., 1986. V. 1. Part A. P. 131–222.
15. Бородавкин А.В., Будовский Э.И., Морозов Ю.В., Савин Ф.А., Симукова Н.А. // Итоги науки и техники. Сер. молекуляр. биология / Ред. М.В. Волькенштейн. М.: ВИНТИ, 1977. Т. 14. С. 227.
16. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. И.Л. Кнунянц, М.: Сов. энциклопедия, 1983. С. 580, 611.
17. Морозов Ю.В., Бажулина Н.П., Боковой В.А., Чехов В.О. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 699–715.
18. Морозов Ю.В., Боковой В.А. // Журн. физ. химии. 1989. Т. 63. С. 662–668.

## Spectral Properties of Pyridoxal 5'-Phosphate Aldimines with Some Aromatic Amino Acids and Their Analogues: Tautomeric and Isomeric Equilibria

Yu. V. Morozov, N. P. Bazhulina<sup>#</sup>, V. A. Bokovoi,  
N. V. Kuznetsova, O. N. Kartasheva, T. I. Osipova, and E. N. Khurs

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP-1 Moscow, 117984 Russia

Spectral properties of the ionic forms of pyridoxal 5'-phosphate aldimines with phenylalanine, tyrosine, phosphonic, and phosphonous phenylalanine analogues and pH-dependent transitions between these forms were studied. The tautomeric and isomeric composition of these equilibrium mixtures was determined. The spectral properties of these compounds were shown to be very close to those of the aldimines of pyridoxal 5'-phosphate with the other amino acids studied previously. At the same time, significant differences in the content of the tautomeric and conformational forms were observed. The substitution of the phosphonic or phosphonous group for the carboxyl group also influenced the content of various tautomeric forms, planar and rotational conformers.

*Key words:* pyridoxal 5'-phosphate, aldimines; aromatic amino acids; phosphoanalogues of amino acids; electron spectroscopy, tautomerism, rotational isomerism

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 135-1405.