



УДК 577.164.111

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНАЛОГОВ ТИАМИНА С ДРОЖЖЕВОЙ
ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗОЙ*Островский Ю. М., Черникевич И. П., Воскобоев А. И.,
Шелленбергер А.***Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, г. Гродно*

Исследовано фосфорилирование различных производных тиамина в тиаминпирофосфокиназной реакции. Показано, что некоторые аналоги с замещениями в 2'-положении пиримидинового компонента фосфорилируются лучше природного субстрата, а удаление или модификация аминогруппы в гетероцикле не приводит к заметному ухудшению взаимодействия таких производных с киназой. Введение метильного или этильного радикалов в 6'-положение, а также замена 1'N или 3'N в пиримидиновом компоненте на СН существенно не влияют на скорость ферментативной реакции. Сера и зависящие от нее тиол-дисульфидные превращения тиазолового цикла не имеют прямого отношения к фиксации тиамина на тиаминпирофосфокиназе. Установлено, что для взаимодействия субстрата с ферментом наибольшее значение имеют четвертичный атом азота в тиазоле и 5-оксиптильный радикал. По-видимому, по этим точкам происходит связывание тиамина с активным центром фермента.

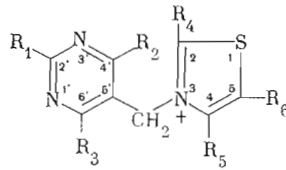
Процессы фосфорилирования различных производных тиамина** и механизмы проявления их антивитаминого действия остаются к настоящему времени далеко не выясненными. Наиболее общепринятой считается гипотеза о том, что при введении в организм эти производные фосфорилируются тиаминпирофосфокиназой (тиаминкиназа, КФ 2.7.6.2), включаясь в последующем в тиаминзависимые ферменты, как «ложные» коферменты [1]. Имеются предположения совершенно противоположного характера, указывающие на то, что ряд аналогов тиамина блокируют активный центр тиаминкиназы и, таким образом, препятствуют биосинтезу тиаминдифосфата [2], но непосредственных доказательств представленных гипотез не приводилось.

В настоящей работе изучено фосфорилирование производных тиамина или его структурных аналогов с целью получить представление о роли отдельных атомов и группировок молекулы витамина во взаимодействии с ферментом. Из-за недостаточного количества большинства испытуемых соединений мы не смогли определить основные кинетические характеристики тиаминкиназной реакции с аналогами витамина (K_s , K_i и т. д.). В связи с этим исследовалась возможность образования соответствующих пирофосфорных эфиров в сравнительном эксперименте. Используемая нами концентрация производных, по-видимому, была достаточной для насыщения фермента субстратом, поскольку средство к киназе аналогов с извест-

* Настоящий адрес: Отдел биохимии Университета им. Мартина Лютера, Галле, 402, ГДР.

** Принятые сокращения: Th — тиамин; Th PP — тиаминдифосфат.

Фосфорилирование дрожжевой тиаминкиназой производных тиамин



Производное тиаминна	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Выход шпрофосфата	
							нмоль	%
Тиамин (Th)	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	300	100
2'-Этил-Th	C ₂ H ₅	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	340	110
2'-Бензил-Th	C ₆ H ₅ CH ₂	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	360	120
2'-Фенокси-Th	O-C ₆ H ₅	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	400	135
2'-Метокси-Th	O-CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	450	150
2'-Фенил-Th	C ₆ H ₅	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	540	180
4'-Деамино-Th	CH ₃	—	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	195	65
4'-Оксп-Th	CH ₃	OH	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	100	30
N'-Метил-Th	CH ₃	NH-CH ₃	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	348	116
6'-Метил-Th	CH ₃	NH ₂	CH ₃	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	360	120
6'-Этил-Th	CH ₃	NH ₂	C ₂ H ₅	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	390	130
6'-Метил-4-дез-метил-Th	CH ₃	NH ₂	CH ₃	H	—	C ₂ H ₄ OH	160	53
4-Дезметил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	—	C ₂ H ₄ OH	340	110
4-Этил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₄ OH	267	89
2-Метил-Th	CH ₃	NH ₂	H	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₄ OH	362	121
5-β-Хлор-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	0	0
5-Окспиропил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₃ H ₆ OH	0	0
5-Оксиметил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	0	0
5-Н-4-Этил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	C ₂ H ₅	H	0	0
5-Дезоксиметил-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	CH ₃	0	0
5-Дезокси-Th	CH ₃	NH ₂	H	H	CH ₃	C ₂ H ₅	0	0
5-β-Хлор-4'-окси-Th	CH ₃	OH	H	H	CH ₃	C ₂ H ₄ Cl	0	0

ными K_i относительно высокое [3—6]. Как видно из приведенных в табл. 1 данных, производные, у которых 2'-метильная группа замещена на другие радикалы, фосфорилируются лучше природного соединения. Как близкие по своим пространственным характеристикам к тиамину и друг к другу 2'-этил-Th и 2'-метокси-Th, так и резко отличающиеся от тиаминна 2'-фенил-Th, 2'-фенокси-Th и 2'-бензил-Th являются хорошими субстратами киназы.

Известно, что полярные заместители у второго углеродного атома пиримидинового компонента (OH, OCH₃) резко ухудшают рекомбинацию соответствующих фосфорилированных аналогов тиаминна с апопируватдекарбоксилазой [7]. Напротив, 2'-этил-ThPP взаимодействует с апоферментом даже немного лучше, чем сам тиаминдифосфат [7—8]. Более высокая антивитаминальная активность 2'-этилпиритиаминна [9] по сравнению с пиритиамином, очевидно, также обусловлена более высоким сродством 2'-этилпиритиаминна к апопируватдекарбоксилазе. Однако, как показали наши опыты, замена ThPP эквимольной концентрацией 2'-этил-ThPP в апопируватдекарбоксилазной системе приводит к тому, что скорость

реакции декарбоксилирования снижалась в 5 раз. В этих условиях 2'-фенил-ThPP, 2'-феноксид-ThPP, 2'-бензил-ThPP и 2'-метокси-ThPP вообще не проявляли коферментной активности. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что 2'-метильная группа имеет важное значение как для связывания ThPP, так и для проявления им каталитических свойств. В этой связи следует ожидать, что аналоги тиаминдифосфата, у которых отсутствует радикал 2'-CH₃, не будут обладать заметной антикоферментной активностью.

Известно, что модификации групп 4'-NH₂ в различной степени влияют на каталитическую активность соединений в модельных системах, а дифосфаты таких производных лишены коферментных свойств [10]. Что же касается возможности фосфорилирования аналогов такого рода, то скорость тиаминпирофосфокиназной реакции, например, с 4'-окситиамином гораздо ниже, чем с тиаминем (табл. 1). Полученные данные однозначно свидетельствуют о фосфорилировании 4'-окси-Th, однако замена 4'-NH₂ на OH резко ослабляет взаимодействие белка с субстратом. По этой причине K_i для 4'-окси-Th является очень высокой для тиаминкиназы из разных источников [3, 4, 6].

С другой стороны, удаление аминогруппы в пиримидиновом компоненте витамина (4'-дезамин-Th) не приводит к заметному ухудшению фосфорилирования. Функции самой аминогруппы в реализации всех этапов взаимодействия субстрата и фермента не кажутся определяющими, так как другая модификация этого же участка (метилирование) мало сказывается на фосфорилировании. Замена 1'N или 3'N на группу CH₃, вероятно, не столь важна для связывания и превращения субстрата, поскольку различия в скорости ферментативной реакции как с тиаминем, так и с обоими пиримидиновыми аналогами незначительны (табл. 2). Введение метильного или этильного радикала в 6'-положение вызывает увеличение активности на 20 и 30% соответственно. Тем не менее эти же производные, лишённые группы 4-CH₃, фосфорилируются значительно хуже тиаминем. В данном случае не приходится думать о существенном влиянии 4-CH₃ на взаимодействие или ориентацию на ферменте тиазолового компонента: 4-дезметил- и 4-этил-Th фосфорилируются практически как сам витамин.

Пространственные взаимоотношения пиримидинового и тиазолового компонентов молекулы тиаминем весьма существенны для проявления тиаминкиназной каталитической активности. Действительно, аналог тиаминдифосфата с этиленовым мостиком между циклами образуется в 6,5 раз медленнее, чем природный кофермент. Этот факт, с одной стороны, может указывать на связывание витамина с ферментом на акцепторной площадке, строго соответствующей конфигурации среднего участка молекулы витамина, а с другой — подтверждает возможную роль метиленовой группы в обеспечении оптимальной конформации молекулы [10] и различных видов внутримолекулярных взаимодействий (водородные связи, индукционные эффекты и т. д.), необходимых для соответствующего «встраивания» субстрата в активный центр киназы. Следует отметить большое значение некоторых атомов и всего тиазолового компонента в каталитическом механизме. Замена тиазола на оксазол или имидазол приводит к образованию аналогов витамина, неспособных контактировать с активным центром фермента (табл. 2). Поскольку ни тиохром, ни тетрагидротиамин, ни тиотиамин не фосфорилировались, можно заключить, что четвертичный атом азота тиазола играет первостепенную роль во взаимодействии субстрата с ферментом.

Для эффективного взаимодействия тиаминем с киназой принципиальное значение имеет размер заместителя в положении 5 тиазолового компонента: 5-оксиметил-Th и 5-оксипропил-Th не фосфорилировались до соответствующих дифосфатов. Возможно, каталитический процесс на ферменте осуществляется только при строгом пространственном совмещении группы тиаминем, акцептирующей пирофосфат, с белком или соответствующим нуклео-

Фосфорилирование аналогов тиамин

Аналоги тиамин	Структурная формула	Выход пирофосфата	
		нмоль	%
3'-N-Пиридиновый аналог		375	124
1'-N-Пиридиновый аналог		270	90
Этилен-Th		48	12
Тиохром		0	0
Тетрагидро-Th		0	0
Тиотиамин		0	0

зидтрифосфатом. Модификация 5-оксиэтильного радикала (5-β-хлор-Th, 5-дезоксид-Th, 5-дезоксиметил-Th, 5-Н-4-этил-Th) приводит к потере каждым из аналогов свойств субстрата. Кроме того, все производные витамина, лишённые гидроксильной группы, в 5-C₂H₄OH очень слабо конкурируют с тиамин в киназной реакции [11—12]. Полученные результаты позволяют прийти к выводу, что данная группа является одной из обязательных точек, по которым субстрат фиксируется тиаминкиназой. Значение других участков тиазолового кольца в каталитическом процессе менее существенно, а удаление или введение определенных радикалов в положения 2 или 4 лишь изменяет средство новых соединений с ферментом. Так, удаление группы 4-CH₃ ведет к незначительному улучшению взаимодействия 4-дезметил-Th с тиаминкиназой. Подобно этому 2-метил-Th, у которого водород второго углеродного атома тиазолового компонента замещен на CH₃, лучше фосфорилировался по сравнению с тиамин. Замена 4-CH₃ на 4-C₂H₅, наоборот, несколько снижает выход соответствующего дифосфата.

Спорным остается вопрос о вероятных механизмах участия атома серы в тиаминкиназной реакции. В соответствии с имеющимися эксперименталь-

с модифицированными гетероциклами

Аналоги тиамина	Структурная формула	Выход пирофосфата	
		ммоль	%
Имидазоловый аналог		0	0
Оксазоловый аналог		0	0
Пири-Th		210	70
Th-Пропилди-сульфид		0	0
Th-Дисульфид		0	0
Th-Фенилдисуль-фид		0	0

ными данными очевидно, что сера и зависящие от нее тиолдисульфидные превращения тиазолового цикла вряд ли имеют прямое отношение к фиксации тиаминкиназе. Ранее одним из нас высказывалось предположение об участии атома серы в отщеплении уже образовавшегося на ферменте пирофосфорного эфира тиаминкиназы [8]. При этом допускалось, что пиритиамин может фосфорилироваться киназой, но остается в связанном состоянии с активным центром фермента, блокируя доступ тиамину. Если исходить из приведенных в табл. 2 результатов, биосинтез пири-ThPP был действительно несколько замедленным (70%), однако его количество в молях в 20 раз превышало концентрацию фермента. Таким образом, атом серы, вероятно, не играет существенной роли во взаимодействии витамина с тиаминкиназой и вряд ли имеет значение при выходе ThPP из ее активного центра. Фосфорилирование пиритиаминкиназы в ферментативной реакции и его отщепление в виде пиритиаминдифосфата указывает на сходство механизмов антивитаминозного действия окситиаминкиназы и пиритиаминкиназы, хотя ранее из-за большой разницы в K_i для этих ингибиторов предполагался различный механизм их взаимодействия с ферментом [1]. Следова-

тельно, основным моментом антивитаминового действия различных аналогов тиаминна является процесс их превращения в соответствующие дифосфаты с последующим присоединением к определенным белкам-апоферментам.

В ферментативном катализе важна целостность тиазолового компонента, о чем свидетельствует отсутствие активности у дисульфидных производных (тиаминдисульфид, тиаминпропилдисульфид, тиаминфенилдисульфид). Известно, что перечисленные соединения являются субстратами тиаминкиназы лишь после их восстановления [13].

Необходимо отметить, что все участки в молекуле витамина оказываются точками, от которых любые электронодонорные или электроноакцепторные воздействия легко распространяются до наиболее важных для каталитических функций атомов в тиазоловом и пиримидиновом циклах. Так, введение заместителей в 2'-положение значительно повышает способность к фосфорилированию. Замена же метильной группы у 4С-атома тиазола на группу C_2H_5 ведет к обратному результату. Ранее было установлено, что между 5-оксиэтильным радикалом и 4'-аминогруппой пиримидина образуются водородные связи, а введение донорной группировки в положение 6' пиримидина заметно изменяет тиолизацию тиазола [14]. В целом молекула витамина представляется сбалансированным и скоординированным соединением, все участки которого влияют на процесс фосфорилирования. Однако из представленных экспериментальных данных видно, что для взаимодействия тиаминна с тиаминкиназой наибольшее значение имеют четвертичный атом азота в тиазоле и 5-оксиэтильный радикал. По-видимому, по этим точкам происходит связывание субстрата с активным центром фермента, обеспечивающее последующее эффективное его фосфорилирование. Исключительное значение этих группировок в молекуле тиаминна подтверждается опытами с тioxромом, тетрагидротиамином и тиотиаминном, а также результатами, полученными с модифицированными по 5С производными витамина.

Экспериментальная часть

Гомогенный препарат тиаминпирофосфокиназы получали по разработанной ранее методике [15]. Аналоги тиаминна были получены из лаборатории проф. А. Шелленбергера. Окси-Th и тетрагидро-Th синтезированы методами работ [16—17]. АТР (Reanal, Венгрия) предварительно очищали на ионообменнике DEAE-сефадекс А-25. Ферментативную реакцию проводили в стандартных условиях: 1 мл инкубационной смеси содержал 1 мкмоль тиаминна или его аналога, 4 мкмоль АТР, 20 мкмоль $MgCl_2$, 20 мкмоль Трис-НСl-буфера, рН 8,6, и 200 мкг тиаминкиназы. Инкубацию проводили в течение 4 ч при 40°. В качестве контроля использовали те же ингредиенты, к которым добавляли 200 мкг фермента, предварительно денатурированного нагреванием. Реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин. Смесь разбавляли в 50 раз 0,005 М Трис-НСl-буфером, рН 8, и наносили на колонку (1 × 10 см) с DEAE-сефадексом А-25, уравновешенную этим же буфером. Не связавшиеся на колонке тиамин и его аналоги элюировали буфером, пирофосфорные эфиры — 0,09 М NaCl, АМР — 0,12 М NaCl, собирая фракции по 5 мл. Концентрацию ThPP определяли ферментативным и тioxромным методами [18—20]. Поскольку количество синтезированного в реакции ThPP эквивалентно содержанию АМР [21], концентрацию образовавшихся пирофосфатов находили по приросту оптической плотности АМР при λ_{256} , приняв молярный коэффициент поглощения равным $15,4 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. В контрольной пробе АМР не обнаруживался. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rindi G., Guiseppe L., Ventura U. (1963) *J. Nutr.*, **81**, 147—154.
2. Peterson J. W., Gubler C. J., Kuby S. A. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **397**, 377—394.
3. Mano Y., Tanaka R. (1960) *J. Biochem.*, **47**, 401—413.
4. Kaziro Y. (1959) *J. Biochem.*, **46**, 1587—1596.
5. Suzuoki Z. (1968) *J. Nutr.*, **94**, 427—436.
6. Gubler C. J., Peterson J. (1971) *Fed. Proc.*, **30**, 515—517.
7. Wittorf J. H. (1968) Doctor Thesis. Provo (USA).
8. Островский Ю. М. (1975) Активные центры и группировки в молекуле тиамина, с. 119, 282, 352, «Наука и техника», Минск.
9. Murdock D. S., Gubler C. J. (1973) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **19**, 237—240.
10. Schellenberger A. (1971) *Nova acta Leopoldina*, **36**, 9—13.
11. Kishi H., Hiraoka E. (1967) *Vitamins*, **35**, 146—152.
12. Kawasaki Ch. (1969) *J. Vitaminol.*, **15**, 343—350.
13. Kohvo K., Noda K., Nisobe M., Utsumi I. (1969) *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1685—1692.
14. Островский Ю. М., Мосолов Н. Н., Степура И. И., Гриневич В. П., Садовник М. Н. (1974) в сб. Витаминны, **7**, с. 140, Киев.
15. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черныкевич И. П. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1489—1497.
16. Matsukawa T., Yurugu S. (1951) *J. Pharm. Soc. Jap.*, **71**, 827—829.
17. Bonvicino L. E., Henessy D. L. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 6325—6331.
18. Ullrich I. (1969) Doctor Habilitationsschrift, Freiburg.
19. Ullrich I. (1970) *Methods Enzymol.*, **18**, 109—115.
20. Naveke R., Goedde H. W., Holzer H. (1962) *Arch. Mikrobiol.*, **44**, 93—104.
21. Hamada M. (1969) *J. Jap. Biochem. Soc.*, **41**, 837—849.

Поступила в редакцию
7.11.1977

INTERACTION OF THIAMINE ANALOGS WITH YEAST THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE

OSTROVSKY Yu. M., CHERNIKEVICH I. P., VOSKOBOYEV A. I.,
SHELLENBERGER A.

*Metabolism Regulation Division, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Grodno*

The phosphorylation in pyrophosphokinase (EC 2.7.6.2) reaction has been studied for a series of thiamine derivatives. Some analogs bearing the substitutions either in thiazole or pyrimidine moieties manifested more efficient phosphorylation than the parent compound. The implications of specific groupings and sites of the vitamin molecule in the interaction with yeast thiamine pyrophosphokinase are considered.
