



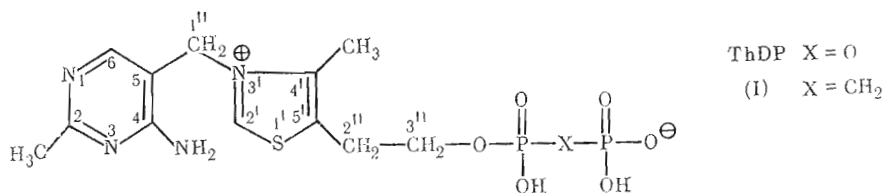
УДК 577.151.042/4

## ФОСФОНАТНЫЙ АНАЛОГ ТИАМИНДИФОСФАТА

Яковлева Г. М., Островский Ю. М.

Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, Гродно

Тиаминдифосфат (ThDP) является кофактором ряда декарбоксилаз и дегидрогеназ, участвующих в важнейших метаболических процессах [1]. Он широко используется в клинической практике при лечении различных заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ [2]. Однако есть данные, свидетельствующие, что при введении ThDP в организм происходит его гидролиз по пирофосфатной связи с образованием тиаминмонофосфата (ThMD) [3, 4]. Поэтому представляло интерес синтезировать фосфонатный аналог ThDP (I), в котором лабильная фосфоангидридная связь была бы заменена на устойчивую к гидролизу P—CH<sub>2</sub>—P-группировку.



Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР ThDP (а) и вещества (I) (б) в отсутствие (I) и в присутствии (2, 3) ионов Mn<sup>2+</sup> (32°С, <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, рН 7,4). Соотношения концентраций ThDP:Mn<sup>2+</sup> и вещества (I):Mn<sup>2+</sup> приведены над слабополюсными областями спектров. Химические сдвиги δ (м.д.) измерены относительно внутреннего стандарта — натриевой соли 3-триметилсилил-(2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)пропионовой кислоты

Синтез соединения (I) осуществляли по методу, разработанному ранее для получения фосфонатного аналога ADP [5]. Он заключался в конденсации метилендифосфоновой кислоты с соответствующим спиртовым компонентом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC). Так как тиазольевый цикл молекулы тиамин имеет высокую реакционную способность при взаимодействии с акцепторами протонов (в частности, с DCC), в конденсацию вводили тиольное производное тиамин — симметричный тиаминдисульфид. Во избежание окислительного диспропорционирования данного соединения реакцию конденсации осуществляли в атмосфере инертного газа. Восстановление реакционной смеси цистеином приводило к соединению (I), которое выделяли хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32 (Whatman) (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма). Аналог (I) элюировали водой, выход 20%, R<sub>f</sub> 0,2 (ТСХ на целлюлозе F<sub>254</sub> (Merck) в системе этанол — n-бутанол — 0,15 М цитратный буфер, 10:1:6 (рН 4)); УФ-спектр соединения (I) при рН 7 имеет два характерных для тиамин максимума при 235 и 267 нм; E<sub>ThDP</sub> 0,5, E<sub>ThMP</sub> 1,0 (бумага FN-11; 0,05 М фосфатный буфер, рН 6,8); E<sub>ThDP</sub> 1,0 (0,05 М фосфатный буфер, рН 7,4, градиент напряжения при электрофорезе 20 В/см, время 2 ч). Полученные значения электрофоретической подвижности для соединения (I) свидетельствуют о существовании фосфонатной группировки при рН 6,8 в виде дианиона, а при рН 7,4 — в виде трианиона. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР соединения (I) (δ, м.д.): 0,9 (м, P—CH<sub>2</sub>—P), 1,31 (с, 2-CH<sub>3</sub>), 1,31 (с, 4'-CH<sub>3</sub>), 2,06 (м, C<sup>2''</sup>H<sub>2</sub>), 2,90 (м, C<sup>3''</sup>H<sub>2</sub>), 4,27 (с, C<sup>1''</sup>H<sub>2</sub>), 6,77 (с, 6-H), 8,29 (с, 2'-H), измеренный в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O при рН 5,3 на спектрометре Varian SC-300 (рабочая частота 300 МГц,

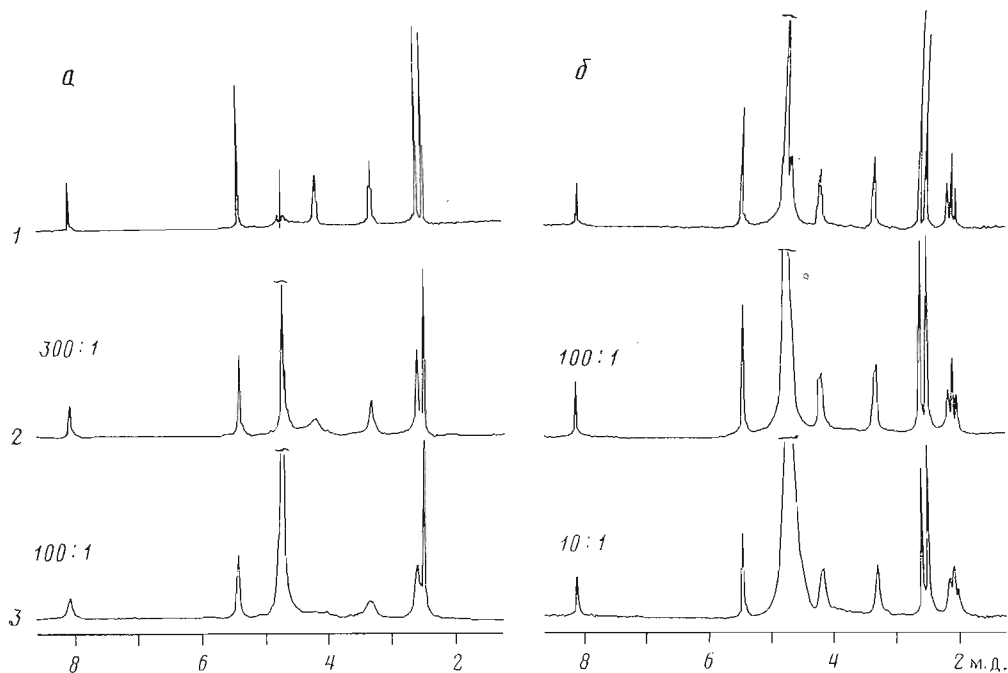
внутренний стандарт — *трет*-бутанол), помимо сигналов, характерных для тиаминового фрагмента молекулы, дополнительно обнаруживает сигналы протонов  $\text{CH}_2$ -группы фосфонатного фрагмента ( $\delta$  0,9 м. д.), взаимодействующих с ядрами атомов фосфора. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.):  $-18,39$  д ( $\text{P}^\alpha$ ),  $-15,05$  д ( $\text{P}^\beta$ ),  $^2J_{\text{P-CPB}}$  10 Гц, измеренный в  $^2\text{H}_2\text{O}$  при pH 7 на спектрометре Varian XL-100-15 (рабочая частота 40,5 МГц, внешний стандарт — 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) при подавлении спин-спинового взаимодействия ядер фосфора с протонами, близок к спектру  $^{31}\text{P}$ -ЯМР фосфонатного аналога ADP [6]. Спектр ЭПР в  $\text{H}_2\text{O}$  ионов  $\text{Mn}^{2+}$  (концентрация  $10^{-4}$  М) в присутствии эквивалентного количества соединения (I) был измерен на спектрометре ERS-200 с рабочей частотой 9,4 ГГц. Насыщение по связыванию ионов  $\text{Mn}^{2+}$  соединением (I) достигается при значении pH 7,4 что соответственно предполагает величину  $\text{p}K_{\text{a}}'$  7,4 (для сравнения:  $\text{p}K_{\text{a}}'$  ThDP 6,8). Полученное значение  $\text{p}K_{\text{a}}'$  хорошо коррелирует с данными электрофореза для вещества (I).

Было проведено исследование взаимодействия вновь синтезированного аналога кофактора с апопируватдекарбоксилазой. Пируватдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.1) из пивных дрожжей и ее апоформа были получены по описанным методикам [7, 8]. Рекомбинация апофермента в холофермент осуществлялась в ходе преинкубации апопируватдекарбоксилазы с кофактором. Активность фермента измерялась по снижению оптического поглощения NADH (при 340 нм) в сопряженной реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой [7].

Фосфонатная замена, по-видимому, не приводит к изменению каталитических свойств тиаминового фрагмента молекулы, так как кислотность по 2'-положению тиазолинового кольца сохраняется. Это было показано измерением скорости дейтерообмена 2'-H-атома аналога (I) в сравнении с аналогичным обменом для ThDP при значениях pH 2,0 и 5,3. Тем не менее в условиях, описанных для ThDP [8], соединение (I) не проявило кофакторных свойств. Отсутствие коэнзимной способности у аналога (I) могло быть обусловлено либо неспособностью модифицированного кофермента связываться с апоферментом, либо потерей им собственно каталитических функций в связанном с белком состоянии. Для выяснения относительного сродства аналога (I) к апоферменту последний инкубировали с аналогом (I) и ThDP, взятыми в соотношении 1 : 1 в избыточных концентрациях. При значении pH инкубационной смеси 6,8 (оптимум связывания ThDP) наличие вещества (I) не отражалось на определяемой активности фермента. Однако при pH 7,4 инкубация апофермента с ThDP и веществом (I) приводила к конкурентному угнетению ферментативной активности, причем значение  $K_i$  для соединения (I), равное  $4,5 \cdot 10^{-5}$  М, оказалось близким  $K_m$  ( $2,3 \cdot 10^{-5}$  М) для ThDP.

Найденное значение pH совпадает с  $\text{p}K_{\text{a}}'$  7,4 для аналога (I) и предполагает связывание фосфонатного аналога на ферменте в форме триамина. Ранее в литературе уже отмечалась существенная роль пирофосфонатного остатка при взаимодействии кофермента и апопируватдекарбоксилазы [1], но это обстоятельство не трактовалось с точки зрения степени ионизации фосфатных группировок. Участием трех ионизированных группировок в связывании кофактора можно объяснить, например, известное низкое сродство тиаминмонофосфата к апоферменту. Возможно, мы не обнаружили у аналога (I) коэнзимной способности вследствие того, что оптимум ферментативной активности пируватдекарбоксилазы находится вблизи 6, а при pH 7,4 активность фермента измерить не удается. Таким образом, частичное протонирование фосфонатной группировки может нарушать расположение вещества (I) в активном центре и не обеспечивать катализ.

Как известно, образование комплекса с ионом  $\text{Mg}^{2+}$  (или  $\text{Mn}^{2+}$ ) играет определяющую роль для кофакторных свойств ThDP [1]. Однако ранее уже отмечалось различие в комплексообразующей способности фосфонатов и фосфатных прототипов [9]. В модельных опытах по исследованию конформации ThDP в комплексе с  $\text{Mn}^{2+}$  показано определенное пространственное расположение частей молекулы, фиксируемое за счет связей



с металлом [10]. Стерические факторы, ограничивающие возможность вращения вокруг Р—С—Р-связей по сравнению с Р—О—Р [11], вероятно, затрудняют ту надлежащую ориентацию аналога кофактора в активном центре, которая обеспечивает эффективный катализ в случае ThDP.

Наши предварительные результаты по сравнительному исследованию связывания ионов  $Mn^{2+}$  с соединением (I) и ThDP методом  $^1H$ -ЯМР указывают на существенные различия в уширении сигналов, причем при идентичных экспериментальных условиях (температура, соотношения концентраций исследуемых соединений и металла, оптимальные для связывания значения pH) сигналы ThDP значительно более сильно уширены по сравнению с сигналами вещества (I) (рисунок). Это может свидетельствовать как о различной геометрии образующихся комплексов, так и о значительных различиях в константах связывания данных соединений с ионом  $Mn^{2+}$ . Для ответа на вопрос, какой из этих факторов сильнее влияет на биологическую активность соединения (I), требуются дальнейшие исследования.

Авторы выражают благодарность В. И. Кондакову, С. В. Мешкову (ИМБ АН СССР), А. Н. Ардукевичу за съемку и интерпретацию спектров ЯМР и ЭПР.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. М.: Наука, 1978.
2. Кокарбоксилаза и другие тиаминдифосфаты/Ред. Островский Ю. М. Минск: Наука и техника, 1974.
3. Воскобоев А. И., Островский Ю. М. Вopr. мед. химии, 1983, т. 29, № 4, с. 41—44.
4. Sano S., Matsuda Y., Miyamoto S., Nakagawa H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 118, № 1, p. 292—298.
5. Myers T., Nakamura K., Danielzadeh A. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 5, p. 1517—1520.
6. Лебедев А. В., Резвухин А. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149—185.
7. Ullrich J. Methods in Enzymol., 1970, v. XVIII, Part A, p. 109—116.
8. Wittorf J., Gubler C. Eur. J. Biochem., 1970, v. 14, № 1, p. 53—60.
9. Vogel H., Bridger W. Biochemistry, 1982, v. 21, № 3, p. 394—401.
10. Grande H., Houghton R., Veeger C. Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, № 3, p. 563—569.
11. Blackburn M. Chem. and Ind., 1981, № 7, p. 134—138.

Поступило в редакцию  
19.II.1985

## PHOSPHONIC ACID ANALOGUE OF THIAMINE DIPHOSPHATE

YAKOVLEVA G. M., OSTROVSKY Yu. M.

*Department of Metabolic Regulation, Academy of Sciences  
of the Byelorussian SSR, Grodno*

A phosphonic acid analogue of thiamine diphosphate, wherein the O-P bond of the parent compound is substituted for a hydrolytically stable C-P linkage, has been synthesized. The synthesis was carried out by condensation of thiamine disulfide with methylenebisphosphonic acid according to the method previously described for preparing adenosine-5-methylenediphosphonate. The analogue manifested no cofactor activity and proved to be a competitive inhibitor of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast, its  $K_i$  value ( $4.5 \cdot 10^{-5}$  mM) being close to the  $K_m$  of thiamine diphosphate ( $2.3 \cdot 10^{-5}$  mM). The absence of cofactor effect may be accounted for by either a different ionization pattern of phosphonic acid analogue, different manner of complexation with metal, or by steric factors.