



УДК 577.164.131+577.158.45

СИНТЕЗ 5'-ДЕЗОКСИ-5'-(β -СУЛЬФООКСИЭТИЛ)-
ПИРИДОКСАЛЯ И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С АПОАСПАРТАТТРАНСАМИНАЗОЙ

Хурс Е. Н., Метцлер Д. Е., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

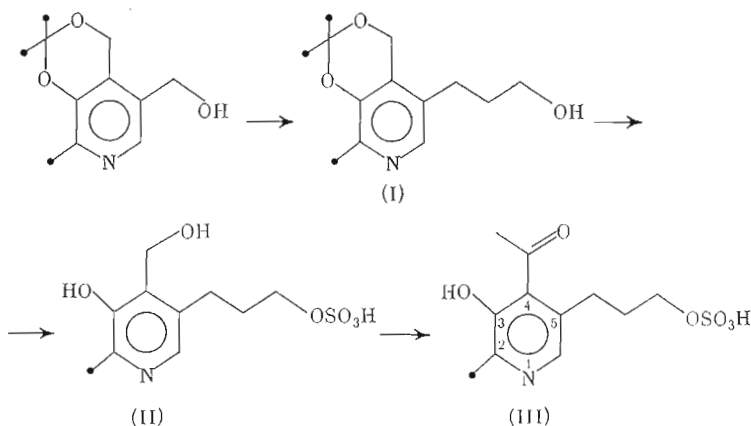
Департамент биохимии и биофизики университета в Эймсе, Айова, США

Осуществлен синтез нового аналога пиридоксаль-5'-фосфата, изучены реакции его с цистеином и апоаспартаттрансаминазой, и показано, что аналог в отличие от пиридоксаль-5'-сульфата является обратимым ингибитором апофермента.

В исследовании механизма действия пиридоксальных ферментов широко используются различные аналоги кофермента — пиридоксаль-5'-фосфата, среди которых особенный интерес представляют несколько соединений, способных к ковалентному связыванию с группами активного центра. Так, аналоги кофермента, содержащие в положении 4 заместитель с двойной или тройной связью вместо формильной группы, необратимо ингибировали апоаспартаттрансаминазу [1,2]. Было показано также, что пиридоксаль-5'-сульфат прочно связывался в активном центре апофермента, причем необратимость процесса была объяснена алкилирующими свойствами 5'-фрагмента [3]. В развитие этого подхода нами был предпринят синтез нового аналога кофермента, 5'-сульфата 5'-дезоксипиридоксаль-5'-(β -оксиэтил)пиридоксала (III), и изучено его взаимодействие с апотрансаминазой.

Исходным соединением в синтезе неизвестного ранее сульфата (III) было изопропилиденовое производное пиридоксала, которое описанной последовательностью реакций превращалось в изопропилиденовое производное β -(5'-дезоксипиридоксил-5')этанола (I) [4]. Для введения сульфогруппы использовался метод, разработанный ранее для получения O-сульфатов лабильных β -замещенных серингидроксамовых кислот [5] и примененный недавно в синтезе пиридоксаль-5'-сульфата [3]. При обработке изопропилиденового производного (I) избытком 100%-ной серной кислоты быстро образовывался соответствующий эфир. Последующие гидролиз защитной группы и окисление приводили к сульфату пиридоксала (III).

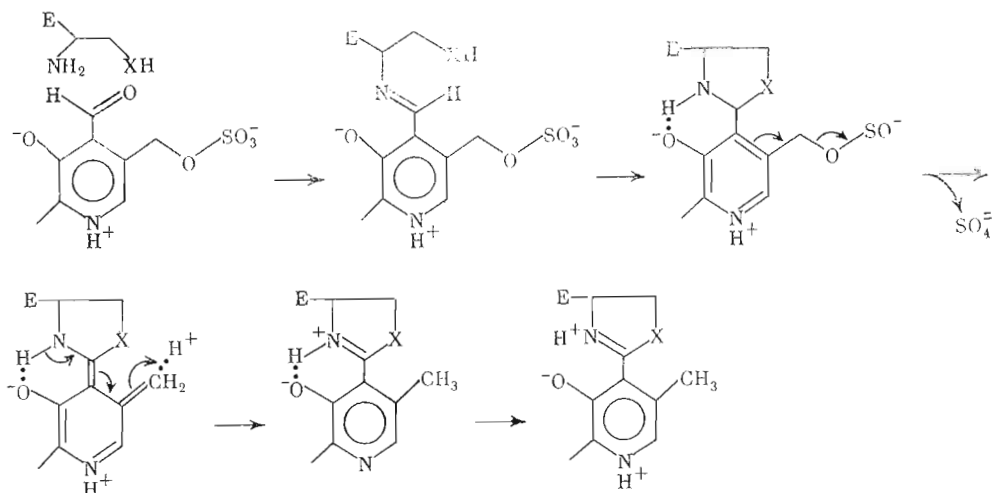
В задачу данного исследования входило получение независимых подтверждений механизма реакции пиридоксаль-5'-сульфата с апоферментом и изучение фосфорилсвязывающего участка активного центра, для чего и был получен сульфат (III), содержащий в 5'-фрагменте кислотную функцию с потенциально алкилирующими свойствами. Обычно кислые эфиры серной кислоты проявляют алкилирующие свойства в достаточно жестких условиях, далеких от условий реакции с апоферментом. Вместе с тем было показано, что внутримолекулярное алкилирование для O-сульфоэфиров серингидроксамовых кислот, приводящее к соответствующим изоксазолидинонам-3, происходило под действием слабых оснований [5]. Следовательно, при достаточной сближенности в активном центре нуклеофильной



группы и алкилирующей функции аналога могла иметь место реакция алкилирования.

Апотрансаминаза в присутствии сульфата (III) не катализировала переаминирование, и, следовательно, аналог не обладал свойствами кофермента. Он не влиял на активность нативного фермента при обычных временах инкубации. При смешении эквимольных количеств с апоферментом при pH 8,2 наблюдалось быстрое изменение спектра аналога с появлением поглощения в области 400 нм (рис. 1). Полученный комплекс был стабилен, и спектр его не изменялся во времени, т. е. имелось определенное сходство с конечной стадией реакции пиридоксаль-5'-сульфата с апоферментом. Однако добавление избытка пиридоксаль-5'-фосфата к комплексу приводило к вытеснению аналога и восстановлению активности фермента. Таким образом, сульфат (III) действовал как конкурентный ингибитор апофермента и не образовывал прочных ковалентных связей с белком.

Необратимое взаимодействие пиридоксаль-5'-сульфата с апоферментом было объяснено следующей последовательностью реакций [3]:



E — апофермент (или карбоксильная группа в модельной реакции с цистеином); X — нуклеофильная группа активного центра (или S в модельной реакции).

Первоначально возникавшее нормальное основание Шиффа быстро превращалось в циклическое производное (в случае цистеина — в замещенный тиазолидин), которое через промежуточную хиноидную структуру переходило в конечный стабильный комплекс — циклическое замещенное

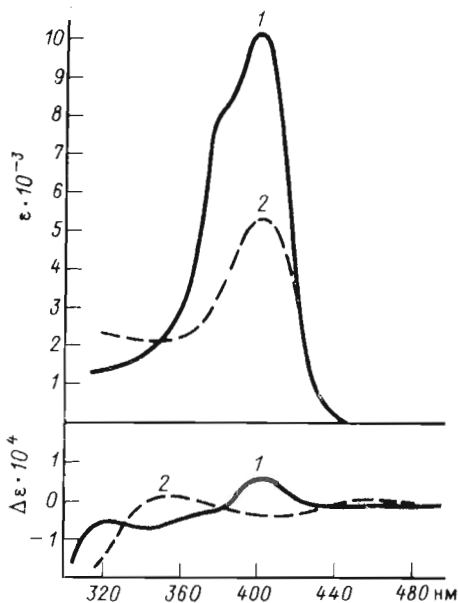


Рис. 1

Рис. 1. УФ- и КД-спектры комплексов аспараттрансаминазы с пиридоксаль-5'-сульфатом (I) и аналогом (II) (2), pH 8,2

Рис. 2. Взаимодействие 10^{-4} М пиридоксаль-5'-сульфата (I, 3) или сульфата (III) (2) с 0,1 М цистеином, pH 9,0. Спектры 1,2 снимались через 25 мин после смешения, 3 — через 340 мин, 2 во времени не изменялся

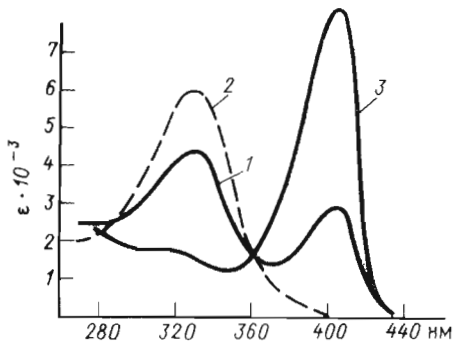


Рис. 2

основание Шиффа. В модельной реакции с цистеином аналог (III) подобно пиридоксаль-5'-сульфату давал нормальный тиазолидин, который был, однако, вполне устойчив и не превращался в замещенный тиазолин (рис. 2). Это согласовалось с невозможностью образования для сульфата (III) хиноидного производного как в модельной реакции, так и при взаимодействии с ферментом и являлось независимым подтверждением вышеприведенной схемы.

В недавних исследованиях свойств 5'-тиофосфорных эфиров пиридоксала и пиридоксамина как коферментов аспараттрансаминазы было обнаружено расщепление тиофосфатной связи на стадиях фермент-субстратных комплексов, тогда как в отсутствие субстратов тиофосфатные формы трансаминазы были устойчивы [6]. Взаимодействие пиридоксаль-5'-сульфата с апоферментом не могло рассматриваться как подтверждение этих данных, так как алкилирование всегда протекало как внутримолекулярная перегруппировка, что приводило к образованию связей с группой, сближенной с формильным углеродом (хотя алкилирующая функция находилась в 5-фрагменте). Для сульфата (III) наиболее вероятным был обычный механизм алкилирования, причем центр нуклеофильной атаки находился на таком же расстоянии от пиридинового ядра, как и для тиофосфорных эфиров. Обратимость реакции аналога (III) с апоферментом подтверждала вывод о том, что в отсутствие субстратов участок активного центра, фиксирующий 5-фрагмент молекулы кофермента или аналога, не содержит активных нуклеофильных групп.

Экспериментальная часть

ТХС проводили на пластинах Silufol UV-254 в системах 0,2% водный аммиак (А) и метилэтилкетон — этанол — конц. аммиак — вода, 3:1:1:1 (Б), электрофорез — на бумаге Ватман № 1 и № 3 при pH 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1:10:189) и 6,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 33:1:300), градиент напряжения 100 В/см. Вещества обнаруживали в УФ-свете и цветной реакцией с дихлорхинонхлоримингом. УФ-спектры снимались на приборе Specord UV-VIS (ГДР), спектры КД — на дихрографе Jouan II (Франция).

Сульфозфир β -(5'-дезоксипиридоксил-5')этанола (II). Изопропилиденное производное β -(5'-дезоксипиридоксил-5')этанола (I) (0,25 г) добавляли небольшими порциями при перемешивании и охлаждении (ледяная баня) к 3 мл 100%-ной серной кислоты. Через 30 мин образовавшийся раствор медленно выливали при хорошем перемешивании в 60 мл холодного (-50°) сухого эфира. Когда температура смеси достигла 20° , декантировали эфир с осадка, который промывали сухим эфиром (3×50 мл). Затем осадок растворяли в 5 мл воды, добавляли раствор хлористого бария до прекращения выпадения осадка, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме при 50° . После очистки на сульфосмоле дауэкс 50×8 (100—200 меш, H^+ -форма, колонка 50×2 см, элюция водой) и кристаллизации из водного спирта получали 0,13—0,15 г сульфатного эфира (II) (выход 45—50%), R_f 0,82 (A), 0,65 (B). Найдено, %: C 43,13; H 5,25; S 11,63. $C_{10}H_{14}O_6SN$. Вычислено, %: C 43,47; H 5,07; S 11,59.

5'-Дезокси-5'-(β -сульфооксиэтил)пиридоксаль (III). К раствору 0,136 г (0,5 ммоль) сульфозэфира (II) в 13,6 мл воды прибавляли порциями 0,175 г (2 ммоль) активированной двуокиси марганца, полученной согласно работе [7], перемешивали в темноте при 20° , контролируя ход реакции по ТСХ (в системах А, Б). Через 1 ч фильтровали, осадок промывали водой (3×2 мл), объединенные фильтраты упаривали в вакууме до объема 2 мл и хроматографировали на сульфосмоле дауэкс 50×8 (100—200 меш, H^+ -форма), собирая фракции с максимальным соотношением D_{388}/D_{310} . После препаративного электрофореза получали гомогенный сульфат (III) с выходом 15—20%, R_f 0,9 (A), 0,77 (B), ϵ_{390} 6800 (0,1 н. NaOH), ϵ_{305} 1300 (0,1 н. NaOH). Найдено, %: C 43,29; H 4,95; S 11,17. $C_{10}H_{13}O_6SN$. Вычислено, %: C 43,63; H 4,73; S 11,63.

Получение аспартаттрансминазы из свиных сердец, апотрансминазы, определение активности фермента проводили так, как указано ранее [8].

Взаимодействие аналога (III) (использовались свежеполученные препараты, растворы готовились непосредственно перед опытом) с цистеином и апоферментом исследовалось аналогично описанному в работе [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Khurs E. N., Khomutov R. M., Korytnyk W. (1974) in Abstracts of Joint US—USSR Symposium on Biological Pyridoxal Catalysis, p. 73, Leningrad.
2. Yang In-Yu, Harris C. M., Metzler D. E., Karytnyk W., Lachmann B., Potti P. P. G. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 2947—2955.
3. Yang In-Yu, Khomutov R. M., Metzler D. E. (1974) Biochemistry, **13**, 3877—3884.
4. Korytnyk W. (1965) J. Med. Chem., **8**, 116—117.
5. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Гуляев Н. Н. (1967) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1622—1624.
6. Хурс Е. Н., Хомутов Р. М. (1975) Биохимия, **40**, 662—664.
7. Mancera O., Rosenkraz G., Sondheimer F. (1953) J. Chem. Soc., 2189—2192.
8. Хурс Е. Н., Диксон Г. Б., Северин Е. С., Хомутов Р. М. (1976) Молекулярн. биология, **10**, 897—906.

Поступила в редакцию
13.III.1978

SYNTHESIS OF 5'-DEOXY-5'-(β -SULFOHYDROXYETHYL)PYRIDOXAL AND ITS INTERACTION WITH APOENZYME OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

KHURS E. N., METZLER D. E., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow, and Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State
University, Ames, USA*

The sulfate ester of 5'-deoxy-5'-(β -hydroxyethyl)pyridoxal, a new analog of pyridoxal-5'-phosphate has been prepared and its reactions with cysteine and aspartate-aminotransferase apoenzyme have been investigated.