

**КОНСТАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОФЕРМЕНТА
ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА С ГЛИЦИНОМ
И ЕГО ОЛИГОПЕПТИДАМИ
В ВОДНОМ БУФЕРНОМ РАСТВОРЕ**

© 2020 г. В. П. Баранников^{а,*}, Е. А. Венедиктов^а

^а Российская академия наук, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова, Иваново, Россия

*e-mail: vpb@isc-ras.ru

Поступила в редакцию 07.02.2020 г.

После доработки 06.03.2020 г.

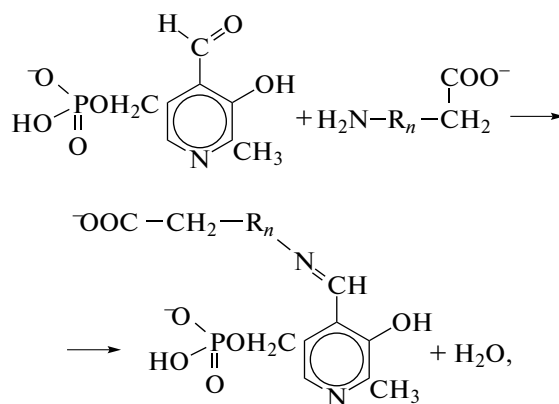
Принята к публикации 17.03.2020 г.

Методом электронной спектроскопии изучены закономерности связывания олигопептидов глицил–глицина и глицил–глицил–глицина с коферментом пиридоксаль-5'-фосфатом при 293 К в фосфатном буферном растворе при pH 7.35 в сравнении с аналогичным процессом для мономерного глицина. Определены константы взаимодействия и спектральные параметры продуктов реакции. Наблюдаемое возрастание константы связывания пептидов с коферментом в ряду Gly–Gly–Gly–Gly–Gly обусловлено понижением основности реакционной аминогруппы и увеличением в растворе доли пептидов с неионизированными аминогруппами. Возрастание длины цепи пептида сопровождается уменьшением коэффициента экстинкции образующегося основания Шиффа.

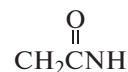
Ключевые слова: взаимодействие олигопептидов с пиридоксаль-5'-фосфатом, метод электронной спектроскопии

DOI: 10.31857/S0044453720110035

Пиридоксаль-5'-фосфат (PP) выступает в роли кофермента во многих процессах метаболизма аминокислот и пептидов (АА) [1]. Известно, что продуктом реакции взаимодействия PP с аминокислотами и пептидами в модельных условиях являются основания Шиффа (ShB) [1, 2]. Выполненные ранее исследования термодинамики реакции PP с различными аминокислотами [3] показали, что эффективность связывания пиридоксальфосфатным коферментом зависит от структуры аминокислот и зарядов их ионогенных групп. В данной работе проведено сравнительное изучение эффективности связывания глицина и его олигопептидов коферментом PP в водном буферном растворе. Реакция конденсации аминокислоты или пептида к PP при pH 7.35 может быть описана следующим уравнением:



где символом R обозначен фрагмент



Индекс $n = 0$ для глицина; $n = 1$ для глицил-глицина; $n = 2$ для диглицил-глицина.

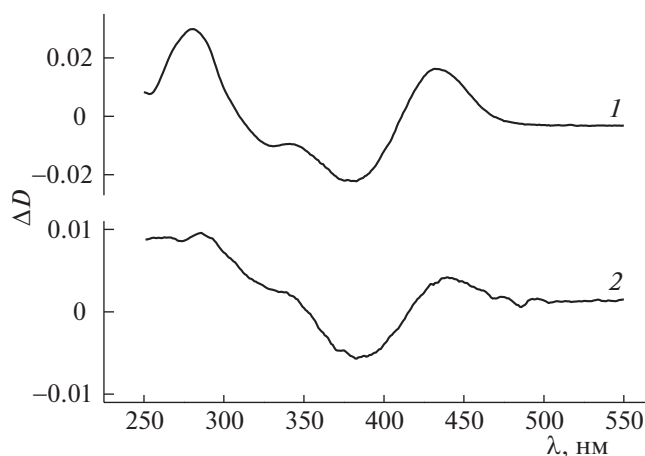


Рис. 1. Разностный спектр 0.4 мМ пиридоксаль-5'-фосфата в водном фосфатном буферном растворе, рН 7.35, $T = 293.15$ К в присутствии добавок: 1 – 1.4 мМ глицина, 2 – 1.4 мМ глицил-глицил-глицина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали пиридоксаль-5'-фосфат фирмы Aldich с содержанием основного вещества 0.98; глицин, диглицин и триглицин фирмы Merck имели чистоту ≥ 0.99 . Перед использованием реактивы высушивали в вакууме при 50°C до постоянной массы. Реакцию проводили в водном фосфатно-буферном растворе (0.04165 М $\text{NaN}_2\text{PO}_4/0.20492$ М Na_2HPO_4) при рН 7.35 и температуре 293 ± 0.3 К. Точное значение рН 7.35 фосфатного буферного раствора обеспечивали варьированием компонентов буферной смеси с использованием рН-метра. Использование буферного раствора обеспечивало стабильность ионных форм реагентов в растворе в ходе реакции. Концентрации пептидов варьировали от 0.2 до 1.8 мМ, концентрация пиридоксаль-5'-фосфата составляла 0.04 мМ.

Ход реакции между пептидом и РР наблюдали с использованием спектрофотометра Agilent 8455 по изменениям в разностном электронном спектре поглощения РР при различных добавках пептида, регистрируемом относительно раствора свободного РР той же концентрации в интервале длин волн от 250 до 600 нм. Для измерений использовали кварцевые кюветы размером 1×1 см. Регистрация изменений в разностном спектре со временем показала, что реакция кофермента с аминокислотами и пептидами в условиях эксперимента заканчивалась через 600 с. Поэтому для определения равновесных концентраций реагентов период ожидания перед измерением оптической плотности составлял не менее 20 мин после смешения растворов РР и АА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставление электронных спектров РР с добавками мономерного глицина или его пептидов (рис. 1) указывает на однотипный характер наблюдаемых превращений. Общая тенденция изменения спектров при добавках аминокислоты и пептидов – убывание интенсивности поглощения при 375 нм и появление полос, характерных для поглощения основания Шиффа при 275–280 и 430–440 нм. Появление новых полос вызвано изменением состояния ароматического пиридинового кольца при образовании оснований Шиффа. Ароматическая электронная система входит в сопряжение с двойной связью между атомами углерода и азота, что приводит к заметному смещению исходной полосы поглощения РР от 388 до 444 нм. Кинетические исследования деградации продуктов конденсации РР с триглицином показали высокую стабильность спектральных полос при 430 и 450 нм в нейтральной среде [4]. Интенсивность данной полосы зависит от мольного соотношения реагентов. Поэтому измерение ее интенсивности было использовано для нахождения концентрации продукта взаимодействия пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотой и пептидами (ShB) и равновесной константы этого взаимодействия.

Методика определения равновесной концентрации образующихся оснований Шиффа из спектральных данных подробно описана нами ранее [3]. Молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы основания Шиффа находили из линейного соотношения изменений оптической плотности и молярных коэффициентов экстинкции для двух полос разностного спектра: поглощения РР при 375 нм (ΔD^{375} , $\epsilon^{375} = 6250 \text{ см}^{-1} \text{ л моль}^{-1}$) и поглощения основания Шиффа при 430–444 нм (ΔD^{ShB} , ϵ^{ShB}).

$$\frac{\Delta D^{\text{ShB}}}{\Delta D^{375}} = \frac{\epsilon^{\text{ShB}}}{\epsilon^{375}} \quad (1)$$

Величины ϵ^{ShB} определяли с погрешностью $\delta\epsilon^{\text{ShB}} = 125 \text{ см}^{-1} \text{ л моль}^{-1}$ и использовали для спектрофотометрического определения равновесных концентраций оснований Шиффа [ShB] по уравнению Бугера–Ламберта–Бера:

$$\Delta D^{\text{ShB}} = \epsilon^{\text{ShB}} [\text{ShB}] \quad (2)$$

Равновесные концентрации кофермента [PP] и пептида [AA] рассчитывали по соотношениям

$$[\text{PP}] = c_{\text{PP}}^{\circ} - [\text{ShB}],$$

$$[\text{AA}] = c_{\text{AA}}^{\circ} - [\text{ShB}],$$

где c_{PP}° и c_{AA}° – начальные молярные концентрации исходных веществ.

Эффективные константы образования оснований Шиффа определяли по соотношению

$$K = K[\text{H}_2\text{O}] = \frac{[\text{ShB}]}{[\text{PP}][\text{AA}]}, \quad (3)$$

где [ShB], [PP] и [AA] – равновесные концентрации основания Шиффа, пиридоксаль-5'-фосфата и пептида или аминокислоты соответственно. В выражении для константы образования использованы суммарные равновесные концентрации для всех форм и ионных состояний реагентов и продукта реакции. Рассчитанные эффективные константы образования и спектральные характеристики оснований Шиффа приведены в табл. 1. Рассчитанные константы образования были усреднены для изученного концентрационного интервала аминокислот от 0.2 до 1.8 мМ, стандартное отклонение при этом составило $\delta(\lg K') = 0.05$. Ранее полученные значения констант образования с участием глицина качественно согласуются с нашими результатами с учетом отличий в условиях и методах оценки констант. Для реакции в среде фосфатного буфера с рН 7.5 при значительном избытке аминокислоты ($C_{\text{AA}}/C_{\text{PP}} = 2000$), в работе [5] получена величина $\lg K' = \lg(K/[C_{\text{H}_2\text{O}}]) = 1.99 \pm 0.26$, в пределах ошибки совпадающая с полученной нами. Для реакции в водном растворе (NaOH + KCl) при ионной силе 0.5 М и рН 7.5 измерена близкая величина $\lg K' = 2.15$ [6]. Использование концентраций отдельных ионных форм PP, в отличие от его общей концентрации, приводит к сильно отличающимся оценкам констант, как это сделано в работе [7]: $\lg K = 2.93$ или 1.12.

Анализ полученных спектральных характеристик свидетельствует, что изменения в электронной структуре ароматического пиридинового кольца PP зависят от структуры и свойств присоединяемого пептида. Значительный спад в молярных коэффициентах поглощения оснований Шиффа, образованных Gly; Gly-Gly или Gly-Gly-Gly, свидетельствует об уменьшении степени сопряжения алдиминной группы $\text{CH}=\text{N}$ с ароматическим оксипиридиновым хромофором в структуре молекулы при удлинении цепи пептидного фрагмента. Это может быть связано с нарушением их компланарности вследствие увеличения степени свободы пептидного фрагмента и, по-видимому, ослаблением индуктивного эффекта карбоксильной группы, расположенной на конце пептидной цепи.

Увеличение расстояния между карбоксильной группой и аминокислотной группой в ряду Gly – Gly-Gly – Gly-Gly-Gly приводит к понижению основности реакционного NH_3^+ центра пептида. Известно, что константы кислотной диссоциации протонированной аминокислотной группы возрастают в ряду от глицина ($\text{p}K^\circ = -\lg K^\circ = 9.78$) к триглицину

Таблица 1. Положение максимума поглощения, коэффициенты экстинкции и эффективные константы образования оснований Шиффа (л/моль) при взаимодействии пиридоксаль-5-фосфата с пептидами глицина при 293.15 К

Пептид	λ , нм	ϵ , $\text{см}^{-1}\text{л моль}^{-1}$	$\lg K'$
Глицин	430.5	8160	1.78
Глицил-глицин	438	3960	2.00
Глицил-глицил-глицин	444	1060	2.41

Примечание. Погрешность $\delta\epsilon = 125 \text{ см}^{-1}\text{л моль}^{-1}$, стандартное отклонение $\delta(\lg K') = 0.05$.

($\text{p}K^\circ = 8.04$) [8]. Расчеты долевого распределения ионных форм пептидов при рН 7.35 с использованием полученных констант диссоциации показывают значительное увеличение в растворе доли пептидов с неионизированными аминокислотными группами в указанном ряду: 0.4% для Gly; 31.0% для Gly-Gly-Gly. Повышение доли пептида с молекулярной формой аминокислотной группы и ослабление специфической гидратации данной группы из-за снижения ее основности приводят к возрастанию степени превращения и константы связывания пептида в реакции конденсации с коферментом PP. Логарифм константы связывания возрастает от 1.78 до 2.41 при переходе от мономерного глицина к его трипептиду. Наличие закономерной корреляции между константами связывания пептидов с PP и константами диссоциации протонированных аминокислотных групп пептидов (рис. 2) подтверждает указанные положения.

Таким образом, полученные данные показывают, что в условиях физиологического показателя рН 7.35 концевые аминокислотные группы в составе пеп-

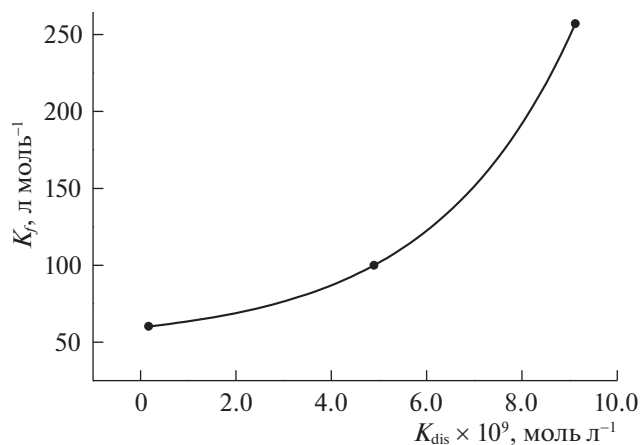


Рис. 2. Зависимость константы взаимодействия пиридоксаль-5'-фосфата с пептидами глицина при рН 7.35 от константы диссоциации протонированной аминокислотной группы пептидов.

тидов, расположенные вдали от заряженной карбоксильной группы, более реакционно-способны в ферментативных пиридоксаль-зависимых реакциях по сравнению с α -аминогруппами мономерных аминокислот. Химическая активность молекул аминов, не содержащих в своем составе других полярных групп, и аминов, содержащих полярные незаряженные группы, близка к активности пептидов в реакциях с РР. Так, константы образования оснований Шиффа, образующихся с *n*-амиламином, $\lg K' = \lg(K/[C_{H_2O}]) = 2.24 \pm 0.55$ [5], и *трис*-(гидрокси-метил)-аминометаном, $\lg K' = \lg(K/[C_{H_2O}]) = 2.08 \pm 0.26$ [5], лежат в области значений, характерных для пептидов, в которых реакционная аминогруппа удалена от ионизированной карбоксильной группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Snell E.E.* // Vitamin B-6 Pyridoxal Phosphate. Chemical, Biochemical and Medical Aspects / Ed. by *D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic.* N.Y.: Wiley, 1986. P. 1–12.
2. *Angees Garcia del Vado M. et al.* // J. Mol. Catalysis A: Chemical. 1997. V. 123. P. 9.
3. *Баранников В.П., Баделин В.Г., Венедиктов Е.А. и др.* // Журн. физ. химии. 2011. Т. 85. № 1. С. 20.
4. *Pishchugin F.V., Tuleberdiev I.T.* // Russ. J. Gen. Chem. 2008. V. 78. № 6. P. 1225.
5. *Matsuo Y.* // J. Am. Chem. Soc. 1957. V. 79. P. 2011.
6. *Felty W.L., Ekstrom C.G., Leussing D.L.* // Ibid. 1970. V. 92. № 10. P. 3006.
7. *Mitra J., Metzler D.E.* Biochimica et Biophysica Acta. 1988. V. 965. № 1. P. 93.
8. *Баделин В.Г., Баранников В.П., Тарасова Г.Н. и др.* // Журн. физ. химии. 2012. Т. 86. № 1. С. 46.