



УДК 577.152.411'105

НЕОБРАТИМОЕ ТОРМОЖЕНИЕ ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ
S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА АМИНООКСИАНАЛОГАМИ
ПРОДУКТА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИАртамонова Е. Ю., Завалова Л. Л., Хомутов Р. М.,
Хомутов А. Р. *

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

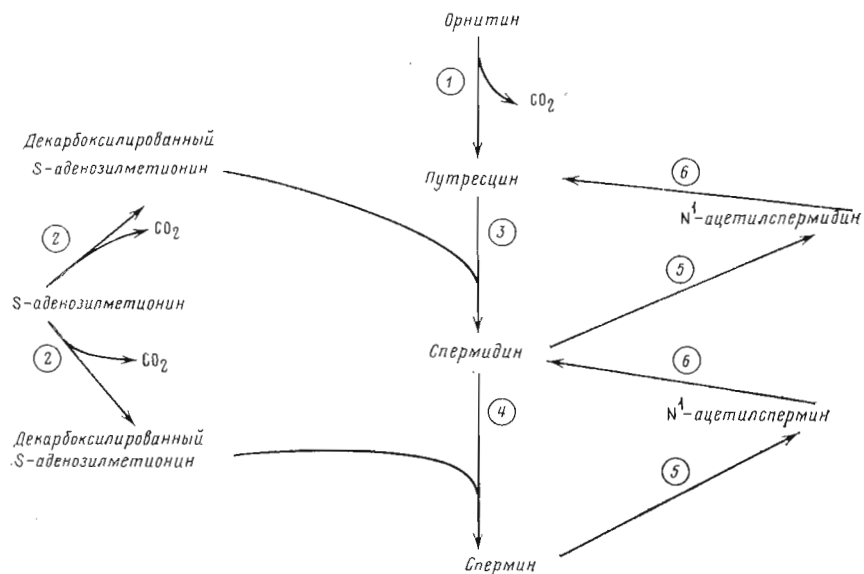
Для необратимого ингибирования декарбоксилазы S-аденозилметионина, одного из ключевых ферментов биосинтеза полиаминов, предлагается использовать гидроксиламинсодержащие аналоги продукта ферментативной реакции. Испытания ряда синтезированных соединений на соответствующих декарбоксилазах из *E. coli* и печени крысы показали, что наиболее активно действующим соединением является S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил- β -тиоэтилгидроксиламин, необратимо ингибирующий декарбоксилазы из обоих источников уже в концентрациях, равных 10^{-9} М, что почти на 3 порядка превосходит показатели лучших из известных ингибиторов.

Уровень путресцина, спермидина и спермина в животной клетке зависит от активности трех ферментов, два из которых, декарбоксилазы орнитина и S-аденозилметионина, определяют скорость образования полиаминов [1] (схема 1).

В связи с выяснением функций полиаминов проблема регулирования их биосинтеза до настоящего времени концентрировалась преимущественно на ферментативном декарбоксилировании орнитина до путресцина, поскольку этот начальный этап представлялся ключевым в синтезе полиаминов. Работами последних лет было, однако, показано, что специфический необратимый ингибитор декарбоксилазы орнитина, α -дифторметилорнитин, который полностью подавлял образование путресцина и снижал количество спермидина, мало влиял на содержание спермина. Это объяснялось активацией декарбоксилазы S-аденозилметионина (благодаря снижению уровня естественного ингибитора — спермидина), появлению в результате этого дополнительного количества декарбоксилированного S-аденозилметионина и превращению спермидина в спермин [2].

С другой стороны, активация декарбоксилазы S-аденозилметионина при дефиците акцептора аминопропильного остатка приводила к значительному увеличению количества декарбоксилированного S-аденозилметионина в клетке (на 2 порядка и более), в несколько раз превышавшего содержание S-аденозилметионина (в норме — несколько процентов от количества S-аденозилметионина). В результате снижалась активность метилтрансферазы и становились возможными неспецифические реакции алкилирования и подавление образования 5'-метилтиоаденозина, чем в совокупности могло объясняться токсичное действие ингибиторов декарбоксилазы орнитина. Таким образом, торможение активности только декарбоксилазы орнитина не изменяло кардинально уровень полиаминов, в особенности спермина, и это подтверждало значение декарбоксилирования S-аденозилметионина как скорости определяющей стадии в биосинтезе полиаминов [2].

Важное значение спермина и спермидина, органических поликатионов, в клеточном росте связано с эффективной нейтрализацией ими фосфатных групп ДНК и стабилизацией энергетически невыгодных конформаций нуклеиновых кислот. Кроме того, полиамины стимулируют активность ряда ферментов [3–5], по-видимому, способствуя возникновению опти-



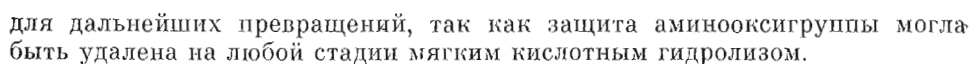
Биосинтез и превращение полиаминов в животных тканях [1]: 1 — декарбоксилаза орнитина, 2 — декарбоксилаза S-аденозилметионина, 3 — спермидинсинтаза, 4 — спермин-спермидин-N¹-ацетил-трансфераза, 5 — спермин-спермидин-N¹-ацетил-трансфераза, 6 — полиаминооксидаза

мальных для ферментативных превращений конформеров ДНК. Возможность влияния на эти процессы (а значит, и на рост клеток) путем регулирования активности декарбоксилазы S-аденозилметионина и является одной из главных причин интереса к избирательным ингибиторам этого фермента.

Декарбоксилаза S-аденозилметионина принадлежит к немногочисленному семейству декарбоксилаз аминокислот, простетической группой которых является ковалентно связанный с белком остаток α -кетокислоты (в данном случае пировиноградной). Соответственно этому фермент чувствителен к стандартным карбонильным реагентам типа боргидрида, цианида, гидроксилamina, гидразина и их простейших производных [6]. Декарбоксилаза S-аденозилметионина обладает высоким сродством к субстрату и продукту (K_m 30 и K_i 6 мкМ соответственно), модификацией которых было получено несколько конкурентных ингибиторов с K_i от 1 до 100 мкМ [7]. Особую группу ингибиторов составляют производные гуанидина, среди которых обнаружены соединения, необратимо подавляющие активность фермента [8]. Показана зависимость между их ингибирующим действием на декарбоксилазу S-аденозилметионина, влиянием на рост клеток и изменением содержания полиаминов [9]. Неспецифичность действия этих веществ связана, по-видимому, со структурным подобием спермидину (в случае Т4-ДНК-лигазы соединения этой группы полностью снимали стимулирующий эффект спермидина [5]).

Таким образом, представлялось целесообразным дополнить группу веществ, тормозящих активность декарбоксилазы S-аденозилметионина, избирательным эффективным ингибитором. Недавно кратко сообщалось о необратимом торможении декарбоксилазы S-аденозилметионина аминоксиналогом продукта ферментативной реакции [10]. Настоящая работа посвящена синтезу этого соединения и родственных веществ и изучению их влияния на активность фермента из *E. coli* и печени крысы.

Ключевым соединением в синтезе новых ингибиторов являлись аминоксикалкилмеркаптаны, которые ранее получались методически трудным путем, исходя из N-гидроксифталимида [11]. Проще и удобнее оказалось получать эти вещества алкилированием этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты дигалоидальканами с последующей заменой галоида на мер-заптогруппу. Синтезированные таким путем соединения были пригодны



Алкилированием N-защитенного аминоксиптилмеркаптана 5'-хлораденозином было получено с выходом 88% соответствующее тиоэфирное производное (I), гидролиз которого приводил к аминоксиптилтиоаденозину (Ia), а метилирование с последующим снятием защиты давало S-(5'-дезоксиаденозил)-S-метил-β-тиоэтилгидроксиламин (IIa, схема 2), достаточ-

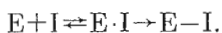
Ингибирование декарбоксилазы S-аденозилметниона из *E. coli* (А)
и печени крысы (Б) О-замещенными гидроксиламинами

Соединение	I_{50} после 30 мин преинкубации, М	
	А	Б
Ado-S-(CH ₂) ₂ -ONH ₂ (Ia)	$1 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$
Ado-S ⁺ -(CH ₂) ₂ -ONH ₂ (IIa) CH ₃	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-9}$
Ado-S ⁺ -(CH ₂) ₄ -ONH ₂ (III) CH ₃	$9 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-9}$
Ado-S-(CH ₂) ₄ -ONH ₂ (IV)	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
H ₃ C-S ⁺ -(CH ₂) ₂ -ONH ₂ (V) CH ₃	$5 \cdot 10^{-4}$	Не определяли
H ₃ C-S-(CH ₂) ₂ -ONH ₂ (VI)	$2 \cdot 10^{-4}$	»

по устойчивый при хранении в виде кристаллического сульфата и в кислых водных растворах. Сходным путем были синтезированы и другие соединения, приведенные в таблице*. Для последующего использования этих веществ в качестве ингибиторов декарбоксилазы S-аденозилметионина было существенно, что реакционная способность аминоксигруппы оставалась примерно такой же, как и у простых аминоксисоединений (в реакции образования оксимов пиридоксаль-5'-фосфата), а основность ее была, как и следовало ожидать, на порядки ниже, чем основность аминоксигруппы декарбоксилированного S-аденозилметионина.

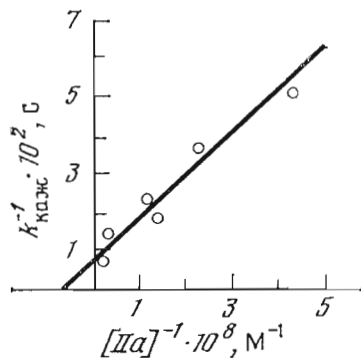
Все вновь полученные соединения оказались необратимыми ингибиторами животной и бактериальной декарбоксилазы S-аденозилметионина. Необходимость аминоксигруппы для необратимого торможения следовала из того, что превращение ее в оксим приводило к потере ингибиторных свойств. Существенными элементами структуры ингибиторов были аденозиновый фрагмент (ср. Ia, VI и IIa, V, таблица) и положительно заряженный сульфониевый центр (ср. Ia, IIa и IV, III, таблица), вклад которых в эффективность торможения составлял несколько порядков. В целом, чем ближе было строение аминоксисоединения к строению продукта реакции, тем сильнее действовало вещество, и оптимальный ингибитор представлял собой продукт реакции, декарбоксилированный S-аденозилметионин, в котором метиленовое звено было заменено на эфирный кислород.

Для бактериальной декарбоксилазы S-аденозилметионина было показано защитное действие субстрата при ингибировании соединением IIa [10]. Аналогичная картина наблюдалась и для фермента из печени крысы, что предполагало взаимодействие ингибитора непосредственно с активным центром фермента. В обоих случаях торможение развивалось во времени, и ингибированный фермент не реактивировался избытком субстрата (рисунок). В случае бактериальной декарбоксилазы S-аденозилметионина количественная оценка торможения, согласно схеме Китса и Вильсона [12], свидетельствовала о двустадийном характере необратимой инактивации, причем сродство соединения (IIa) к ферменту на интегральной обратимой стадии оказалось на 2 порядка ниже, чем для декарбоксилированного S-аденозилметионина.



Хотя в данной работе природа новых ковалентных связей в фермент-ингибиторном комплексе не устанавливалась, можно предполагать, что необратимая стадия обусловлена образованием замещенного по кислороду оксима фермента. В пользу этого свидетельствовали необходимость аминоксигруппы для торможения, наличие в ферменте кетогруппы как единственной функциональной группы белка, способной реагировать с аминоксигруппой ингибитора, и известные данные о торможении декарбоксилазы S-аденозилметионина простыми алкоксиаминами [6]. В последнем случае возможность необратимого торможения не рассматривалась, однако реакция декарбоксилазы S-аденозилметионина с другим карбонильным реагентом, фенилгидразином, исследована подробно и было доказано образование фенилгидразона фермента [13].

Как известно, равновесие в химических реакциях образования оксимов и гидразонов в водных растворах полностью смещено в сторону продукта. Реакция гидроксиламинов с пиридоксальевыми ферментами протекает очень быстро, но удаление избытка гидроксилamina приводит, как прави-



Кинетика ингибирования декарбоксилазы S-аденозилметионина из *E. coli* под действием соединения (IIa)

* Описание синтеза соединений (III)–(VI) и соответствующих исходных приводится в отдельном сообщении.

ло, к реактивации фермента. Это связано с тем, что в активном центре фермента более стабильной конструкцией, чем оксим кофермента, является внутренний альдимин, образованный пространственно сближенными альдегидной группой кофермента и аминогруппой остатка лизина. В декарбоксилазе S-аденозилметионина карбонильная группа активного центра находится в свободном состоянии и не образует активированных кетиминов с аминогруппами белка. Соответственно этому реакция фермента с гидроксилaminaми протекает медленнее, но фермент-ингибиторный комплекс в принципе более устойчив по сравнению с оксимами пиридоксальных ферментов. Таким образом, для ферментов типа декарбоксилазы S-аденозилметионина замещенные по кислороду гидроксилamины, близкие по строению субстрату или продукту, являются, по-видимому, одним из оптимальных типов ингибиторов.

Ранее уже отмечалось [10], что соединение (IIa) в концентрациях $\sim 10^{-5}$ М слабо ингибировало чувствительную к карбонильным реагентам аспартаминотрансферазу. Тем самым были получены доводы в пользу избирательного действия этого ингибитора как структурного аналога декарбоксилированного S-аденозилметионина. Однако другой пиридоксальный фермент, декарбоксилаза орнитина, оказался более чувствительным к соединению (IIa) (торможение на 20% при концентрации 10^{-6} М), несмотря на очевидные различия в строении ингибитора и путресцина. Поскольку в литературе отсутствуют данные о влиянии декарбоксилированного S-аденозилметионина на ферментативное декарбоксилирование орнитина, необходимы дальнейшие исследования для объяснения этого интересного явления. Тем не менее в любом случае разница в чувствительности декарбоксилаз S-аденозилметионина и орнитина к ингибитору (IIa) составляет 3 порядка, что достаточно для экспериментов *in vitro* и на культуре клеток, а для регулирования биосинтеза полиаминов возможность одновременного подавления активности обоих ферментов открывает определенные перспективы.

Еще один аспект специфичности действия соединения (IIa) связан с низкой основностью его аминогруппы. При нейтральных значениях pH этот ингибитор находится в отличие от декарбоксилированного S-аденозилметионина в форме монокатиона. Это благоприятно сказывается на его родстве к декарбоксилазе и предполагает, что с ферментом взаимодействует нейтральная аминогруппа субстрата или продукта. Вместе с тем это различие позволяет при использовании высокоспецифичного (IIa) избежать тех побочных эффектов, которые свойственны декарбоксилированному S-аденозилметионину или его структурным аналогам — дикатионам, применяемым в качестве ингибиторов декарбоксилазы. Кроме того, как монокатион соединение (IIa) могло бы обладать лучшей по сравнению с декарбоксилированным S-аденозилметионином проницаемостью через клеточную мембрану и не являться в отличие от последнего субстратом спермидин- и спермисинтаз.

Экспериментальная часть

ТСХ проводили на пластинках целлюлозы F₂₅₄ (Merck, ФРГ), электрофорез — на бумаге FN-18 (ГДР). Системы для хроматографии: изопропанол — 25% NH₄OH — вода, 7:1:2 (А); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 12:3:5 (Б). Буфер для электрофореза: муравьиная кислота — уксусная кислота — вода, 2:8:90, pH 2,0 (В); градиент напряжения 40 В/см. Обнаружение веществ при ТСХ и электрофорезе по УФ-поглощению и флуоресценции после обработки пиридоксальфосфатом. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Beckman 25 (США), спектры ПМР снимали в D₂O (внутренний стандарт — *трет*-бутанол) на спектрометре XL-100-15 (Varian, США), рабочая частота 100 МГц. Данные элементного анализа соединений (I), (Ia), (II) и (IIa) на С, Н, N хорошо совпадают с вычисленными.

Частично очищенную декарбоксилазу S-аденозилметионина (КФ 4.1.1.50) получали из *E. coli* [13] и печени крысы [14]. Определение

активности проводили, используя S-аденозил[карбокси- ^{14}C]метионин (60 мКи/ммоль, Amersham, Англия) в качестве меченого субстрата. Состав инкубационной среды для фермента из *E. coli* [6]: 0,08 ммоль трис-HCl (pH 7,4), 0,2 ммоль MgSO_4 , 10 пмоль S-аденозил[карбокси- ^{14}C]-метионина, фермент (2,5 мг белка). Общий объем 2 мл. Состав инкубационной смеси для фермента из печени крысы: 0,2 ммоль К-фосфатного буфера (pH 7), 5 мкмоль дитиотрепта, 5 мкмоль путресцина, 0,2 мкмоль S-аденозил[карбокси- ^{14}C]метионина (1,3 мКи/ммоль) и 5 мг белка. Общий объем 2 мл. Пробы инкубировали 30 мин при 37°С во флаконе, плотно закрытом крышкой, в которую помещали пропитанный насыщенным раствором $\text{Ba}(\text{OH})_2$ диск из стекловолокна GF/B (Whatman, Англия). Реакцию останавливали добавлением 1 мл 2 М H_2SO_4 , быстро закрывали флакон крышкой с GF/B-диск и встряхивали в течение 1 ч. Затем диски высушивали и определяли их радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на радиометре Intertechnique SL-30 (Франция). Ингибирующую активность аналогов изучали, инкубируя при 37°С исследуемые соединения с ферментом в пробах вышеуказанного состава в отсутствие субстрата; затем проводили стандартное определение активности.

S-(β -этоксиптилиденаминоксиптил)-5'-тиоаденозин (I). Раствор 1,68 г (9,05 ммоль) натриевой соли β -этоксиптилиденаминоксиптилмеркаптана и 0,84 г (2,95 ммоль) 5'-дезоксипти-5'-хлораденозина [15] в 30 мл абс. диметилсульфоксида выдерживали 6 ч при 20°С, нейтрализовали уксусной кислотой и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовали из воды и получили 1,07 г производного (I). Выход 88%, т. пл. 103°С, R_f 0,93 (А), 0,86 (В), E_{Ado} 0,92 (В). $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$.

Сернокислый S-(β -аминоксиптил)-5'-тиоаденозин (Ia). 0,18 г (0,43 ммоль) соединения (I) растворяли в 2,5 мл 2 М H_2SO_4 и вызывали кристаллизацию, добавляя порциями кипящий спирт. Получили 0,18 г соли (Ia). Выход 90%, т. пл. 158–159°С (с разл., водный спирт), R_f 0,72 (В), 0,55 (А), E_{Ado} 1,35 (В). $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. ПМР: 8,52 (с, 1H, H-8), 8,47 (с, 1H, H-2), 6,13 (д, 1H, J 4,9 Гц, H-1'), 4,15 (т, 2H, NH_2OCH_2), 3,06 (м, 2H, 5'- CH_2), 2,88 (т, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}-$).

Иодгидрат S-(5'-дезоксиптиаденозил)-S-метил-S-(β -этилиденэтоксаминоксиэтана) (II). К раствору 1,02 г (2,46 ммоль) соединения (I) в 9 мл ледяной уксусной кислоты прибавляли 9 мл иодистого метила и оставляли на 4 сут при 20°С в темноте, упаривали наполовину, к остатку прибавляли абс. эфир, выделившееся масло отделяли, растирали со свежей порцией абс. эфира, получали 1,08 г соединения (II). Выход 79%, R_f 0,69 (В), E_{Ado} 1,34 (В).

Дисульфат S-(5'-дезоксиптиаденозил)-S-метил- β -тиоэтилгидроксилами-на (IIa). *Метод А*. 0,56 г (1,003 ммоль) иодгидрата (II) растворяли в 12,6 мл 2 М H_2SO_4 , через 10–15 мин прибавляли 140 мл абс. спирта, через 16 ч (–10°С) частично закристаллизовавшееся масло отделяли, растирали со свежей порцией абс. спирта и получали 0,43 г соединения (IIa). Выход 76%, R_f 0,52 (В), E_{Ado} 1,61 (В), λ_{max} 260 нм, A_{250}/A_{260} 0,88; A_{280}/A_{260} 0,17, т. пл. 148–149°С (с разл., водный спирт). $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{HSO}_4^- \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$. ПМР: 8,50 (с, 1H, H-8), 8,48 (с, 1H, H-2), 6,18 (д, 1H, J 4,3 Гц, H-1'), 4,60 (м, 2H, NH_2OCH_2), 4,00 (м, 2H, 5'- CH_2), 3,84 (м, 2H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$), 3,05 (2с, 6H, $\text{CH}_3-\text{S}-$).

Метод Б. 25 мг соединения (Ia) растворяли в 2 мл абс. муравьиной кислоты, прибавляли 1 мл иодистого метила и оставляли на 7 сут в темноте при 20°С, упаривали досуха, растворяли в воде, экстрагировали эфиром, водную фазу нанесли на колонку с дауэксом 1×2 (100–200 меш; Bio-Rad, США; Cl-форма, объем 2 мл) и элюировали водой. Смесь соединений (Ia) и (IIa) в виде хлоргидратов разделяли препаративной хроматографией. Вещество идентично (ТСХ, электрофорез) соединению, полученному по методу А.

1. Pegg A. E., Seely J. E., Pösö H., Ragione F. D., Zagon I. S. Fed. Proc., 1982, v. 41, № 14, p. 3065-3072.
2. Pegg A. E., Pösö H., Shuttleworth K., Bennett R. A. Biochem. J., 1982, v. 202, № 2, p. 519-526.
3. Sugino A., Peebles C. L., Krenzer K. M., Cozzarelli N. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 11, p. 4767-4771.
4. Wallace H. M., Baybutt H. N., Pearson C. K., Keir H. M. J. Gen. Virol., 1980, v. 49, № 2, p. 397-400.
5. Pösö H., Kuosmanen M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 117, № 1, p. 217-222.
6. Pösö H., Sinervirta R., Jänne J. Biochem. J., 1975, v. 151, № 1, p. 67-73.
7. Samejima K., Nakazawa Y., Matsunaga J. Chem. and Pharm. Bull., 1978, v. 26, № 5, p. 1480-1487.
8. Pegg A. E., Conover C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 69, № 3, p. 766-774.
9. Pegg A. E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 2, p. 539-542.
10. Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сырку В. Н., Артамонова Е. Ю., Хомутов А. Р. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 130-131.
11. Bauer L., Suversh K. S., Jhosh B. K. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 3, p. 949-951.
12. Kitz R., Wilson I. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 10, p. 3245-3249.
13. Wickner R. B., Tabor C. W., Tabor H. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 8, p. 2132-2139.
14. Pegg A. E. Biochem. J., 1974, v. 141, № 2, p. 581-583.
15. Kikugawa K., Ichino M. Tetrahedron Lett., 1971, № 2, p. 87-90.

Поступила в редакцию
10.VI.1985

IRREVERSIBLE INHIBITION OF S-ADENOSYLMETHIONINE DECARBOXYLASE BY HYDROXYLAMINE-CONTAINING ANALOGUES OF DECARBOXYLATED S-ADENOSYLMETHIONINE

ARTAMONOVA E. Yu., ZAVALOVA L. L., KHOMUTOV R. M., KHOMUTOV A. R.,*

*Institute of Molecular Biology; * N. D. Zelinsky Institute
of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Hydroxylamine-containing analogues of decarboxylated S-adenosylmethionine have been constructed and proposed for inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase, one of key enzymes of polyamine biosynthesis. Among the substances synthesized, S-(5'-deoxy-5'-adenosyl)-S-methylthioethylhydroxylamine proved to be the most powerful inhibitor of the enzymes from *E. coli* and rat liver. Even at 10^{-9} M it inactivated, irreversibly and specifically, decarboxylases from both sources, being 1000 times more active than the best known inhibitors of these enzymes.