



УДК 577.152.63.042

АНАЛОГ АСПАРТИЛАДЕНИЛАТА — ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР АСПАРАГИНСИНТЕТАЗЫ *

Жуков Ю. Н., Бирюков А. И., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Для большинства организмов основным путем образования аспарагина является АТР-зависимое амидирование аспартата, причем источником амидного азота может быть аммиак или амидная группа глутамина. Некоторые аспарагинсинтетазы катализируют зависимую от аспартата реакцию пирофосфатного обмена с промежуточным образованием β-аспартиладенилата, участие которого как истинного промежуточного соединения было показано в синтезе аспарагина ферментом из *E. coli*. Известны также аспарагинсинтетазы, не способные к аспартатзависимому пирофосфатному обмену, что предполагает иные возможности активации партата, например через аденилированный фермент.

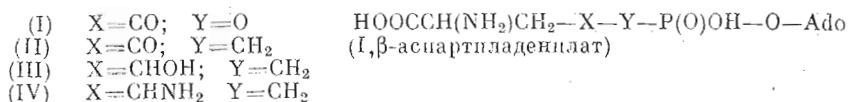
Для изучения механизма действия синтетаз и возможности воздействия на такие процессы, как образование аспарагина в растениях, суперпродукция аспарагина опухолевыми клетками и регулирование уровня глутамина посредством глутаминзависимых аспарагинсинтетаз, могли быть полезны избирательные ингибиторы этих ферментов. В настоящее время известно торможение фермента из лейкемических клеток мыши RADA1 L-2-амино-4-кето-5-хлорвалериановой кислотой [1] и неспецифическое ингибирование синтетазы из бобов Мунго (*Vigna radiata*) аналогом β-аспартиладенилата [2].

Ингибирование аспарагинсинтетаз из разных источников фосфонатными аналогами β-аспартиладенилата *

Соединение	Бактериальный фермент $K_i \cdot 10^3$, М	Растительный фермент $K_i \cdot 10^4$, М
(II)	3,1±0,3	1,9±0,13
(III)	2,4±0,2	4,5±0,4
(IV)	1,8±0,15	4,3±0,4

* Средняя величина K_i из 3—6 определений

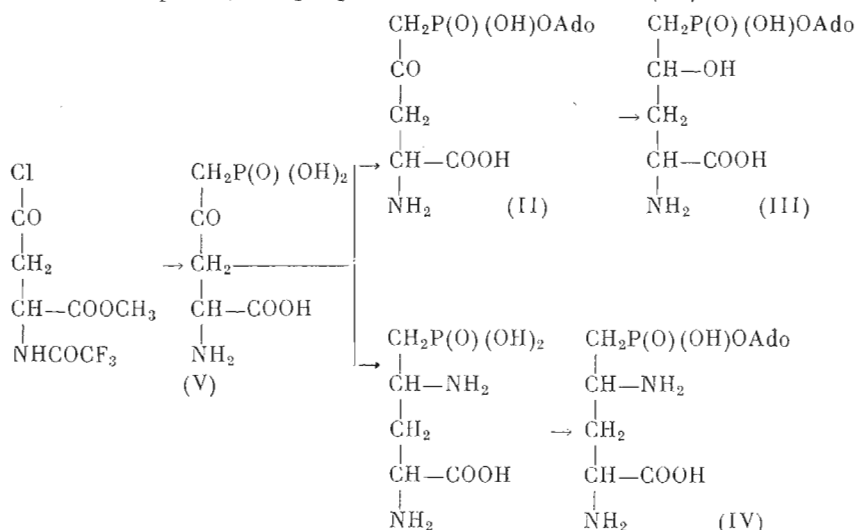
В этой работе сообщается о синтезе стабильных аналогов β-аспартиладенилата, в которых ангидридный кислород заменен на CH_2 -звено, а карбонильная группа сохранена или замещена на гидроксильную или аминогруппы, а также о действии этих веществ на бактериальную и растительную аспарагинсинтетазы



Исходным соединением в синтезе аналогов был хлорангидрид метилового эфира N-трифторацетил-L-аспарагиновой кислоты, который через

* Материалы этой работы были представлены на 2-м Международном симпозиуме «Phosphorus Chemistry Directed Towards Biology». Лодзь, Польша, 8—12 сентября 1986 г. Abst. P. 127—128.

диазокетон, иодметилкетон и диэтилфосфонат превращался в основное промежуточное вещество, β -кетофосфонат (V). Конденсация защищенного β -кетофосфоната с этоксиэтилиденаденозином и последующее удаление защитных групп приводило к соединению (II), восстановление которого давало аналог (III). Восстановительное аминирование β -кетофосфоната приводило к диаминофосфонату, который аналогичной последовательностью реакций превращался в соединение (IV).



Выходы аналогов (II)—(IV) составляли $\sim 5\%$. Выявление веществ на ТСХ-пластинках проводили по поглощению в УФ-свете, реакциями с нингидрином и на фосфор. Для (II): R_f 0,42 (ТСХ, Silufol TV₂₅₄, изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (система А); E_{Ado} 0,45 (бумага FN-18, муравьиная кислота — уксусная кислота — вода, 2 : 8 : 90, pH 2,0; 40 В/см, система Б). Для (III): R_f 0,41 (А) E_{Ado} 0,58 (Б). Для (IV): R_f 0,42 (А), E_{Ado} 0,71 (Б). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Beckman-25 (США), ПМР-спектры — на XL-100-15 (Varian, США).

Аммиакзависимую аспарагинсинтетазу (КФ 6.3.1.1) выделяли из *E. coli*. В согласно работе [3], активность фермента определяли по образованию L -[¹⁴C]аспарагина по методике [4]. Глутаминзависимый фермент (КФ 6.3.5.4) из проростков белого люпина был получен по модифицированной методике Рогнеса [5], активность его также определяли по работе [4].

В стандартном эксперименте по изучению влияния аналогов на активность фермента в инкубационную смесь, содержащую различные концентрации ингибитора, добавляли фермент и затем через 15 мин инкубации при 37° С определяли его активность. Аналогичным образом исследовали зависимость торможения от времени при постоянной концентрации ингибитора, обратимость этого торможения и конкуренцию ингибиторов с субстратами.

Как видно из данных таблицы, синтезированные аналоги, подобные по строению β -аспартилладенилату (I), оказались сильными и избирательными ингибиторами в реакции образования L -[¹⁴C]аспарагина аспарагинсинтетазой из *E. coli* В. Торможение аналогами ферментативной реакции в значительной степени зависело от их строения. Так, фосфонаты: (V), β -фосфоаланин или лишенные α -карбоксылной группы производные аналогов (II)—(IV)* действовали на несколько порядков слабее, чем соединения (II)—(IV). Сравнение средства аналогов (II)—(IV) и аденилата (I) к ферменту из *E. coli* В было затруднительным, поскольку, по данным Майстера [1], аденилат (I) весьма лабилен и в водных растворах быстро гидролизует.

* β -Фосфоаланин и лишенные α -карбоксылной группы производные соединений (II)—(IV) любезно предоставлены А. Р. Хомутовым (ИОХ АН СССР) и описаны в работе [6].

Торможение ферментативной реакции аналогами (II)—(IV) было конкурентным по отношению к аспартату и АТР, что свидетельствовало о связывании ингибитора непосредственно в активном центре фермента. Эффективность действия ингибиторов следует из сопоставления сродства аналогов (см. K_i в таблице) и субстратов (K_m аспартата 1 мМ, K_n АТР 0,63 мМ).

Соединения (II)—(IV), модифицированные в той части молекулы β -аспартиладенилата (I), которая непосредственно участвует в ферментативной реакции, имитировали структуру (I) в его основном и переходном состояниях, в том числе на стадии образования тройного комплекса при присоединении аммиака по карбонильной группе β -аспартиладенилата (соединение (IV)). К тому же для β -кетифосфонатного аналога (II) нельзя было исключить ковалентное взаимодействие с функциональными группами активного центра. Однако при длительной инкубации с ферментом аналогов (включая соединение (II)) не было отмечено усиления степени торможения, и ингибированный фермент реактивировался избытком субстрата. Приведенные в таблице константы ингибирования фермента из *E. coli* аналогами (II)—(IV) достаточно близки, что свидетельствует об одинаковом сродстве фермента к различным аналогам промежуточного соединения реакции, в том числе и соединениям, моделирующим переходные состояния. Аналогичная ситуация наблюдалась ранее для аналогов ацетиладенилата в случае ацетил-CoA-синтетазы миокарда кролика, тогда как на валил-тРНК-синтетазе из *E. coli* В соответствующие аналоги валиладенилата показывали явные различия в ингибирующей способности [7].

В случае фермента из проростков белого люпина аналогами (II)—(IV) оказались ингибиторами средней эффективности с величинами $K_i = 0,2-0,4$ мМ. Еще на порядок слабее действовали β -кетифосфонат (V) и β -фосфоаланин. Торможение было неконкурентным по отношению к субстратам и не развивалось во времени. Аспартатнезависимый изотопный АТР — PP_i -обмен и неконкурентный тип торможения аналогами (II)—(IV) делают маловероятным предположение об активации аспартата через аденилат в ходе ферментативной реакции, катализируемой аспарагинсинтетазой белого люпина.

Таким образом, в настоящей работе впервые осуществлен синтез стабильных фосфонатных аналогов β -аспартиладенилата, моделирующих его основное и переходные состояния, и показана возможность использования этих аналогов для селективного регулирования синтеза аспарагина ферментами с различными типами активации аспартата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horowitz B., Meister A. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 20. P. 6708—6719.
2. Pike D. C., Beevers L. // Biochim. et. biophys. acta. 1982. V. 708. № 2. P. 203—209.
3. Cedar H., Schwartz J. H. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 15. P. 4112—4121.
4. Hongo S., Matsumoto T., Sato T. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 522. № 1. P. 258—266.
5. Rognes S. E. // Phytochemistry. 1975. V. 14. № 3. P. 1975—1982.
6. Холматов А. Р., Северин С. Е. // Труды V Всесоюзного биохимического съезда. Киев, явн. 1986. М.: Наука, 1986. Т. 2. С. 68.
7. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Холматов Р. М. // Биорган. химия. 1984. Т. 10. № 2. С. 213—219.

Поступило в редакцию
3.II.1988

AN ASPARTYL ADENYLATE ANALOGUE AS EFFECTIVE INHIBITOR
OF ASPARAGINE SYNTHETASE

ZHUKOV Yu. N., BIRYUKOV A. I., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A number of earlier unknown phosphonate analogues of aspartyl adenylate with anhydride oxygen substituted by $-\text{CH}_2-$, and the carbonyl group substituted by $-\text{CH}(\text{OH})-$ or $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ groups were synthesized. These compounds were used to study the reaction mechanism of asparagine synthetases from white lupine and *E. coli*. The aspartyl adenylate analogues proved to be powerful competitive inhibitors ($K_i = 10^{-7}$ M) of the bacterial enzyme. In the case of white lupine enzyme catalyzing the aspartate-independent $\text{ATP}-[^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ exchange, the above compounds displayed a non-competitive type of inhibition with respect to aspartate and ATP, $K_i = 10^{-4}$ M. It is likely that for the latter enzyme the first intermediate is different from an aspartyl adenylate derivative.