



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 15 \* № 4 \* 1989

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.261\*1'135

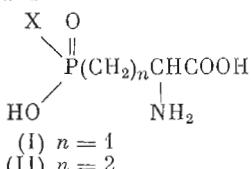
### ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ ФОСФОРОГАНИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ АСПАРТАТА И ГЛУТАМАТА

*Хурс Е.Н., Осипова Т.Н., Хомутов Р.М.*

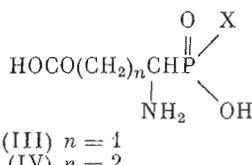
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Академии наук СССР, Москва

Среди аминофосфоновых и -фосфонистых кислот в последние годы обнаружены эффективные ингибиторы ферментов, выявлены вещества с разнообразной биологической активностью, а некоторые из них найдены в природе [1]. Плодотворность создания активных соединений в этом ряду в значительной мере зависит от степени изученности влияния фосфорсодержащих аналогов на основные ферменты метаболизма аминокислот, среди которых ключевую роль играют пиридоксалевые ферменты, в особенности трансаминазы. Однако в этом направлении выполнено лишь несколько работ. Так, гомогенаты из тканей разных организмов способны превращать  $\alpha$ -кетоглутарат в глутамат в присутствии некоторых синтетических аминофосфонатов [2]. Для наиболее распространенной природной 2-аминоэтилфосфоновой кислоты, цилиатина, найдена специфическая трансаминаза [3], природный  $\beta$ -фосфоаланин может быть субстратом [4], ингибитором [5] аспартатаминонтрасферазы или не влиять на активность фермента [6], а аналог тирозина, единственная природная  $\alpha$ -аминофосфоновая кислота, является ингибитором тирозин-трансаминазы [7]. В подобных исследованиях обычно подразумевалась идентичность свойств кетокарбоновых и кетофосфоновых продуктов реакции, что не является очевидным. Кроме того, оставался открытым вопрос о возможности ферментативного переаминирования фосфоновых и в особенности энзимологически не изученных фосфонистых аналогов  $\alpha$ -амино-карбоновых кислот.

В настоящей работе рассматривается взаимодействие аспартаттрансаминазы (КФ 2.6.1.1) из сердца свиньи с полным набором аналогов аспартата и глутамата, в которых проксимные или дистальные карбоксильные группы заменены на фосфонатный или фосфонистый фрагменты, и демонстрируется способность всех аналогов превращать альдиминную форму фермента в аминоформу.



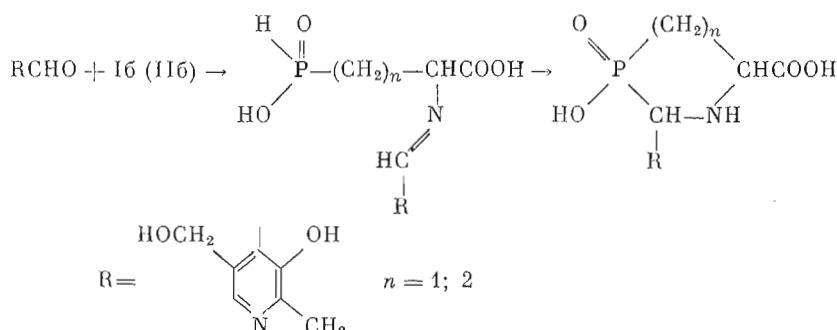
a : X = OH, b : X = H



Аналоги глутамата (IIa-б и IVa-б) были получены соответственно по [8-11], синтез аналогов аспартата (Ia-б, IIIa-б) описывается в отдельном сообщении. Все использованные соединения были рацематами, природными являются структуры (Ia), (Ib) и (IIb). Реакция аминофосфоновых и аминофосфонистых кислот с пиридоксалем, включая переаминирование, проводилась так же, как и для аминокислот [12]. Выделение аспартаттрансаминазы из свиных сердец и определение активности фермента по накоплению оксалоацетата осуществлялось по [13]. При изу-

чении влияния аналогов на активность фермента разные их количества добавляли к субстратной смеси, затем вносили фермент и измеряли скорость образования оксалоацетата. Условия взаимодействия аналогов с пиридоксилденовой формой аспартаттрансаминазы были такими же, как и для аминосубстратов; они приведены в подписи к рисунку.

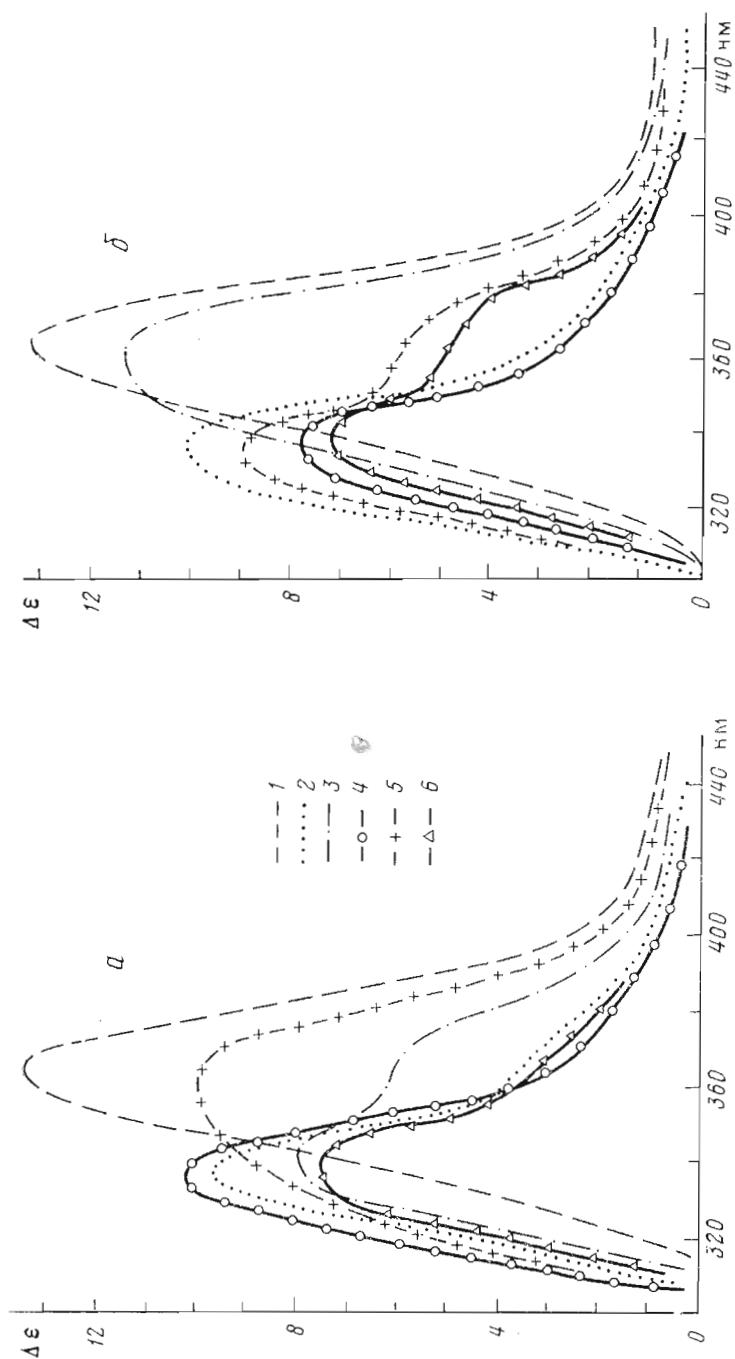
Рассматривая аналоги как потенциальные субстраты ферментативного переаминирования, целесообразно остановиться на некоторых их свойствах. В молекулах  $\alpha$ -аминофосфонатов аминогруппа более основная ( $pK_{\text{a}} 10,5$ ), чем в  $\alpha$ -аминокислотах, фосфонатная группа при нейтральных  $\text{pH}$  существует в виде дианиона ( $pK_1 1,2$ ;  $pK_2 5,6$ ). В молекулах  $\alpha$ -аминофосфонистых кислот аминогруппа более кислая ( $pK_{\text{a}} 7,7$ ), а  $pK_1$  имеет примерно такое же значение, как и для аминофосфонатов [9]. В отличие от фосфонатов фосфонистые аналоги содержат реакционноспособный Р—Н-фрагмент, который может реагировать, например, с карбонильными соединениями и азометинами. Подобные превращения могли бы иметь место в особенности для дистальных фосфонистых аналогов аспартата или глутамата и кофермента трансаминазы, что приводило бы к ингибированию фермента:



Возможность переаминирования могла зависеть и от свойств продуктов реакции, соответствующих кетофосфоновых и -фосфонистых кислот. Однако эти классы веществ, и особенно  $\alpha$ -кетофосфонистые кислоты (недавно синтезирован единственный представитель,  $\alpha$ -кетоэтилфосфонистая кислота [14]), к настоящему времени изучены слабо, поэтому предсказать их поведение в условиях превращения было затруднительно. Для переаминирования могли иметь значение лабильность Р—С-связи  $\alpha$ -кетофосфонатов и возможность превращения их в фосфаты в результате некоторых реакций с участием карбонильной группы.

Принципиальная возможность переаминирования  $\alpha$ -аминофосфоновых и -фосфонистых кислот была показана нами при взаимодействии их с пиридоксалем. В спиртовых растворах аминоаналоги образовывали с пиридоксалем нормальные азометины с характерным УФ-спектром. За одно и то же время количество образовавшегося пиридоксамина в случае реакции с аминофосфонистыми кислотами было в несколько раз меньше, чем для соответствующей реакции с аминокарбоновыми кислотами, а аминофосфонаты давали лишь следы пиридоксамина. Следует упомянуть, что неферментативное переаминирование аминофосфонатов в присутствии ионов металлов сопровождалось разрывом связи углерод — фосфор [15] и что под действием  $\alpha$ -кетофосфонатов пиридоксамин превращался в пиридоксаль [16].

Далее было изучено влияние всех восьми аналогов аспартата и глутамата на ферментативное переаминирование аспартата, катализируемое аспартаттрансаминаզой. В стандартных условиях определения активности аналоги вели себя как конкурентные ингибиторы фермента со сродством, близким субстратному (например, для соединения (Ib)  $K_i = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) или в несколько десятков раз худшим (для соединения (IIa)  $K_i = 2 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ ), и ни в одном случае не наблюдалось необратимого торможения фермента.



Влияние субстратов и их аналогов на КД-спектры аспартатаминогрантферазы (1). Условия определения: 0,25 М трикс-  
HCl-буффер, pH 8,2; концентрация фермента  $3 \cdot 10^{-5}$  М. Добавленные вещества (5 мМ): *a* — аспартат (2), Ia ( $\beta$ ), 16 (*4*), IIIa  
(*5*) и IIIб (*6*); *b* — глутамат (*2*), Ia ( $\beta$ ), IIб (*4*), IIIa (*5*) и IIIб (*6*)

Поскольку при использованном способе определения активности вопрос о субстратных свойствах аналогов оставался открытым, была изучена реакция их с альдегидной формой трансаминазы. Известно, что спектры поглощения и КД-спектры пиридоксилиденовой формы трансаминазы изменяются в присутствии аспартата и глутамата. Это свидетельствует об образовании аминоформы (кетимина) фермента, причем реакция обращается  $\alpha$ -кетоглутаратом. На рисунке показан спектр фермента в присутствии аспартата и четырех его аналогов, взятых в одинаковых концентрациях (а). Видно, что добавление аналога вызывает такие же изменения спектра фермента, что и добавление субстрата. Аналогичная картина наблюдалась для глутамата и его фосфоаналогов (б). Подобным же образом аналоги реагировали с ферментом и при pH 5, полнота превращения пиридоксилиденовой формы зависела от количества аналога, спектр и активность фермента восстанавливались после добавления избытка  $\alpha$ -кетоглутарата.

Таким образом, для фосфорорганических аналогов  $\alpha$ -аминокислот впервые прямым методом показаны субстратные свойства в полуреакции ферментативного переаминирования. Хотя вопрос о скоростях этих превращений находится в стадии изучения, возможность таких реакций следует учитывать при рассмотрении проблем биосинтеза природных фосфоаналогов аминокислот и катаболизма активных веществ этого ряда.

В заключение следует отметить принципиально новые возможности воздействия на клеточный метаболизм, которые открываются благодаря ферментативному переаминированию фосфоаналогов аминокислот. Недавно сообщалось, что 1-аминоэтилфосфонистая кислота, аналог аланина, блокирует поликетидные пути биосинтеза, в частности меланиногенез у патогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. [17]. Дальнейшие исследования, результаты которых докладывались нами на международном симпозиуме по пиридоксалевому катализу (Турку, Финляндия, 1987 г.), показали, что этот аналог *in vivo* переаминируется в  $\alpha$ -кетоэтилфосфонистую кислоту (аналог пирувата), ингибирующую превращение пирувата в ацетил-КоА, что и приводит к блокированию зависимых от последнего биосинтетических путей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kujarski P., Mastalerz P. // Aminophosphonates. Natural occurrence biochemistry and biological properties/Ed. Axt J. Berlin: Publ. Institute für wirkstoffforschung Akademie der Wissenschaften der DDR, 1984.
2. Roberts E., Simonsen D. C., Horiguchi M., Kittredge J. S. // Science. 1968. V. 159. P. 886–887.
3. Dumora K., Lacoste A.-M., Cassaigne A. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 133. № 1. P. 119.
4. Neuzil E., Cassaigne A. // Exp. Ann. Biochim. Med. 1980. V. 5. P. 165–167.
5. Brand L. M., Lowenstein J. M. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 8. P. 1365–1370.
6. Lejcak B., Starzemski H., Mastalerz P. // Experientia. 1981. V. 37. P. 401–402.
7. Iron A., Ruart M., Duboy J. P., Beranger M., Cassaigne A., Neuzil E. // Biochem. Soc. Trans. 1981. V. 9. № 2. P. 246.
8. Chambers M. E., Iesbell A. F. // J. Org. Chem. 1964. V. 29. № 5. P. 832–835.
9. Baylis E. K., Campbell C. D., Dingwall J. G. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. V. 12. № 1. P. 2845–2851.
10. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жуков Ю. Н., Гандурина Н. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. № 9. С. 2118–2122.
11. Хомутов Р. М., Осипова Т. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 8. С. 1954.
12. Matsuo J. // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. P. 2016–2019.
13. Jenkins G., Yphantis D. A., Sizer I. W. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 1. P. 51–57.
14. Baillie A. C., Wright B. J., Wright K. // Eur. Patent Appl. 1980. P. 9348–9368.
15. Martell A. E., Longohr A. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977. № 10. P. 342–344.
16. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жуков Ю. Н. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 6.
17. Хомутов Р. М., Хурс Е. Н., Джавахия В. Г., Воинова Т. М., Ермолинский Б. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 13. № 10. С. 1422–1424.

Поступила в редакцию 11.XI.1988

#### ENZYMATIC TRANSAMINATION OF PHOSPHOROUS ANALOGUES

##### OF ASPARTATE AND GLUTAMATE

KHURS E. N., OSIPOVA T. I., KHOMUTOV R. M.

V. A. Engelhardt Institute of Moleculare Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Phosphonous and phosphonic analogues of aspartate and glutamate are substrates of semireaction of enzymatic transamination catalysed by aspartate aminotransferase.