



УДК 577.151.042

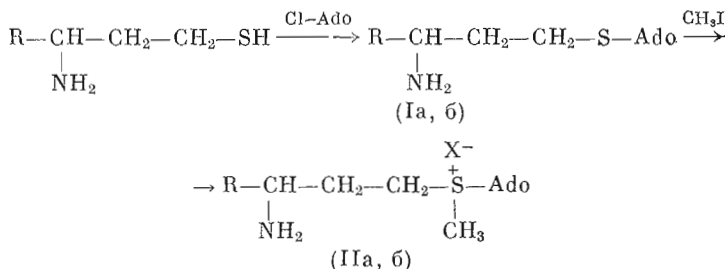
ХИМИЧЕСКОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА И S-АДЕНОЗИЛГОМОЦИСТЕИНА

Сырку В. И., Завалоба Л. Л., Хомутов Р. М.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

S-Аденозилметионин (Met(Ado)) занимает, вероятно, второе после АТР место по количеству биохимических превращений, протекающих с его участием, важнейшими из которых являются процессы ферментативного метилирования (алкилирования) и биосинтез полиаминов — спермина и спермидина. Известно, весьма небольшое число родственных Met(Ado) соединений, активность которых обусловлена торможением какой-либо конкретной ферментативной реакции, что связано с выраженной специфичностью строения Met(Ado), проявляющейся в резком снижении сродства к соответствующим ферментам при изменениях практически в любом фрагменте молекулы. Тем не менее в случае декарбоксилазы Met(Ado) использование в качестве ингибитора аналога продукта реакции, S-(5'-дезоксаденозил)-β-метилтиэтилгидроксиламина, оказалось весьма удачным [1]. Сильным ингибитором ферментативного метилирования является продукт реакции, S-аденозилгомоцистеин (Hcy(Ado)), на основе которого синтезирована большая группа биологически активных веществ [2]. В последние годы широкое применение в биохимических исследованиях находят фосфорорганические аналоги аминокислот и их производных в качестве избирательных и эффективных ингибиторов ферментов обмена аминокислот. В настоящей работе сообщается о получении и ферментативных испытаниях производных Met(Ado) и Hcy(Ado), в которых карбоксильная группа заменена на фосфоновую или фосфонистую группу.

Алкилированием синтезированных нами с использованием известных методов [3] γ-меркапто-α-аминопропилфосфонистой и фосфоновой кислот 5'-дезоксиденозином (Cl-Ado) в жидком аммиаке были получены соответственно фосфонистый (Ia) и фосфовый (Iб) аналоги Hcy(Ado), метилирование которых иодистым метилом в смеси муравьиной и уксусной кислот давало S-метильные производные (IIa) и (IIб) (схема). По этой же схеме синтезированы и меченные по углероду метильной группы [¹⁴C] (IIa)



(а) R=P(O)(OH)H

(б) R=P(O)(OH)₂

и [¹⁴C] (IIб) (уд. акт. 16 мКи/мМ). Полученные вещества охарактеризованы ТСХ на пластинах SilufolUV254 (ЧССР) в системах изопропанол —

Субстратные и ингибиторные свойства фосфорорганических аналогов Met(Ado) и Hcy(Ado) в ферментативных реакциях метилирования тРНК и декарбоксилирования Met(Ado)

| Соединение * | Декарбоксилаза Met(Ado) | | тРНК-метилтрансфераза | |
|--------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | K_m , М | K_i , М | K_m , М | K_i , М |
| Hcy(Ado) | — | $3,5 \cdot 10^{-4}$ | — | $1,7 \cdot 10^{-5}$ |
| (Ia) | — | $2,2 \cdot 10^{-4}$ | — | $1,3 \cdot 10^{-5}$ |
| (Iб) | — | $1,5 \cdot 10^{-4}$ | — | $0,9 \cdot 10^{-3}$ |
| Met(Ado) | $3,5 \cdot 10^{-4}$ | — | $1,7 \cdot 10^{-5}$ | — |
| (IIa) | — | $2,7 \cdot 10^{-4}$ | $3,0 \cdot 10^{-4}$ | — |
| (IIб) | — | $4,0 \cdot 10^{-4}$ | $3,0 \cdot 10^{-3}$ | — |

* В экспериментах использовались рацематы соединений (Ia, б)—(IIa, б).

25% NH_4OH — вода, 7:1:2 (A); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 12:3:5 (B); пиридин — уксусная кислота — вода, 10:7:3 (C) и электрофорезом на бумаге FN-17 (ГДР) в смеси муравьиная кислота — уксусная кислота — вода (2:8:90), pH 1,9, градиент потенциала 40 В/см (измеряли подвижность веществ относительно Hcy(Ado) (E)). Вещества проявляли по УФ-поглощению, известными реакциями с нингидрином и молибдатом аммония. Характеристики полученных производных: (Ia) — т. пл. 169°C ; R_f 0,55 (A), 0,14 (B), 0,64 (C); E 0,83; (Iб) — т. пл. 182°C ; R_f 0,13 (A), 0,31 (C); E 1,34; (IIa) — т. пл. $112\text{--}113^\circ\text{C}$; R_f 0,1 (A), 0,31 (C); E 1,23; (IIб) — т. пл. 168°C (разл.); R_f 0,18 (C); E 1,23. Строение полученных соединений подтверждено данными ПМР-спектров, а также активностью фосфонового и фосфонистого аналогов Met(Ado) как субстратов тРНК-метилтрансферазной реакции.

Соединения (Ia, б), (IIa, б) исследовали в реакциях ферментативного метилирования тРНК и декарбоксилирования Met(Ado). Препарат тРНК-метилтрансфераз (КФ 2.1.1) получали из печени крыс по методу [4], активность фермента определяли по тому же методу, используя в качестве субстрата [метил- ^{14}C]Met(Ado) (52 мКи/мМ), а в экспериментах по выявлению субстратных свойств соединений (IIa) и (IIб) — соответственно [^{14}C] (IIa) и [^{14}C] (IIб) (16 мКи/мМ). Частично очищенную декарбоксилазу Met(Ado) (КФ 4.1.1.50) получали из *E. coli* согласно работе [5], активность фермента определяли по методу [6], используя в качестве субстрата [карбокси- ^{14}C]Met(Ado) (1,3 мКи/мМ).

Соединения (IIa) и (IIб) оказались субстратами ферментативного метилирования тРНК, причем фосфонистая кислота (IIa) была активнее (таблица). Еще большая разница в средстве наблюдалась для соединений (Ia) и (Iб), из которых α -амино- γ -аденозилтипропилфосфонистая кислота (Ia) оказалась одним из самых эффективных ингибиторов ферментативного метилирования [7]*. Как и в случае торможения ацетоацетат-декарбоксилазы фосфонацетоном [9], сульфониевые соединения (IIa) и (IIб) оказались конкурентными обратимыми ингибиторами декарбоксилазы Met(Ado) с K_i $2,7 \cdot 10^{-4}$ и $4,0 \cdot 10^{-4}$ М соответственно (таблица). Ингибирование не развивалось во времени, что позволяет предполагать сохранение фосфор-углеродной связи аналогов в процессе взаимодействия с ферментом (для декарбоксилированного Met(Ado) K_i $0,6 \cdot 10^{-5}$ М [10]), что согласуется с известными свойствами этой связи [11] и данными работы [12]. Тиоэфирные соединения (Ia) и (Iб) обратимо ингибировали фермент с K_i $2,2 \cdot 10^{-4}$ и $1,5 \cdot 10^{-4}$ М, что соответствовало средству Hcy(Ado) (K_i $3,5 \cdot 10^{-4}$ М) к этому ферменту.

Таким образом, фосфорорганические аналоги Met(Ado) тормозят декарбоксилирование, превращаясь в процессе трансметилирования в ак-

* В стандартных условиях биосинтеза Met(Ado) пекарскими дрожжами [8] не наблюдалось образования производных (IIa) и (IIб), если метионин замещался на α -амино- γ -метилтипропилфосфонистую или фосфовую кислоту соответственно.

тивные ингибиторы, для которых следует ожидать количественных и качественных отличий от Hcy(Ado) в ферментативных превращениях последнего, что делает перспективным использование этих новых соединений для регулирования уровня Met(Ado) в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сырку В. И., Артамонова Е. Ю., Хомутов А. Р. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 130—131.
2. Роберт-Жеро М., Ледерер Э. В кн.: Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии. М.: Наука, 1978, с. 111—127.
3. Хомутов Р. М., Осипова Т. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1978, № 8, с. 1954.
4. Wickner R. B., Tabor C. W., Tabor H. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 8, p. 2132—2139.
5. Pösö H., Sinervirta R., Janne J. Biochem. J., 1975, v. 151, № 1, p. 67—73.
6. Glik J. M., Leboy P. S. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 14, p. 4790—4795.
7. А. с. 1120671 (СССР). Амино-3-(5-дезоксипентозил)-тиопропилфосфонистая кислота для ингибирования процесса биометилирования/Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сырку В. И. Заявл. 1.06.82, № 3478760. Оpubл. в Б. И., 1985, № 36.
8. Stekol J. A. Meth. Enzymol., 1963, v. VI, p. 566.
9. Kluger R., Nakaoka K. Biochemistry, 1974, v. 13, № 5, p. 910—914.
10. Yamanoha B., Samejima K. Chem. Pharm. Bull., 1980, v. 28, № 7, p. 2232.
11. Kluger R. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 15, p. 2721—2722.
12. Kluger R., Pike D. C. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 13, p. 4504—4506.

Поступило в редакцию
2.1.1986

CHEMICAL REGULATION OF S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT ENZYMATIC REACTIONS BY ORGANOPHOSPHORUS ANALOGUES OF S-ADENOSYLMETHIONINE AND S-ADENOSYLMETHIONINE

SYRKU V. I., ZAVALOVA L. L., KHOMUTOV R. M.

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

The organophosphorus analogues of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine have been prepared and their efficacy in biomethylation and decarboxylation reactions of S-adenosylmethionine has been shown.