



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.261\*1'135

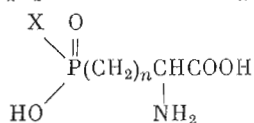
### ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ ФОСФОРГАНИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ АСПАРТАТА И ГЛУТАМАТА

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

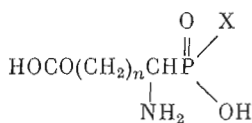
*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Академии наук СССР, Москва*

Среди аминокислотных 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 пиридоксальные ферменты, в особенности трансминазы. Однако в этом направлении выполнено лишь несколько работ. Так, гомогенаты из тканей разных организмов способны превращать  $\alpha$ -кетоглутарат в глутамат в присутствии некоторых синтетических аминокислот [2]. Для наиболее распространенной природной 2-аминоэтилфосфоновой кислоты, цилиатина, найдена специфическая трансминаза [3], природный  $\beta$ -фосфоаланин может быть субстратом [4], ингибитором [5] аспартаминотрансферазы или не влиять на активность фермента [6], а аналог тирозина, единственная природная  $\alpha$ -аминофосфоновая кислота, является ингибитором тирозин-трансминазы [7]. В подобных исследованиях обычно подразумевалась идентичность свойств кетокислотных и кетопосфоновых продуктов реакции, что не является очевидным. Кроме того, оставался открытым вопрос о возможности ферментативного переаминирования фосфоновых и в особенности энзимологически не изученных фосфонистых аналогов  $\alpha$ -аминокислотных кислот.

В настоящей работе рассматривается взаимодействие аспараттрансминазы (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 аминиминную.



(I)  $n = 1$   
(II)  $n = 2$

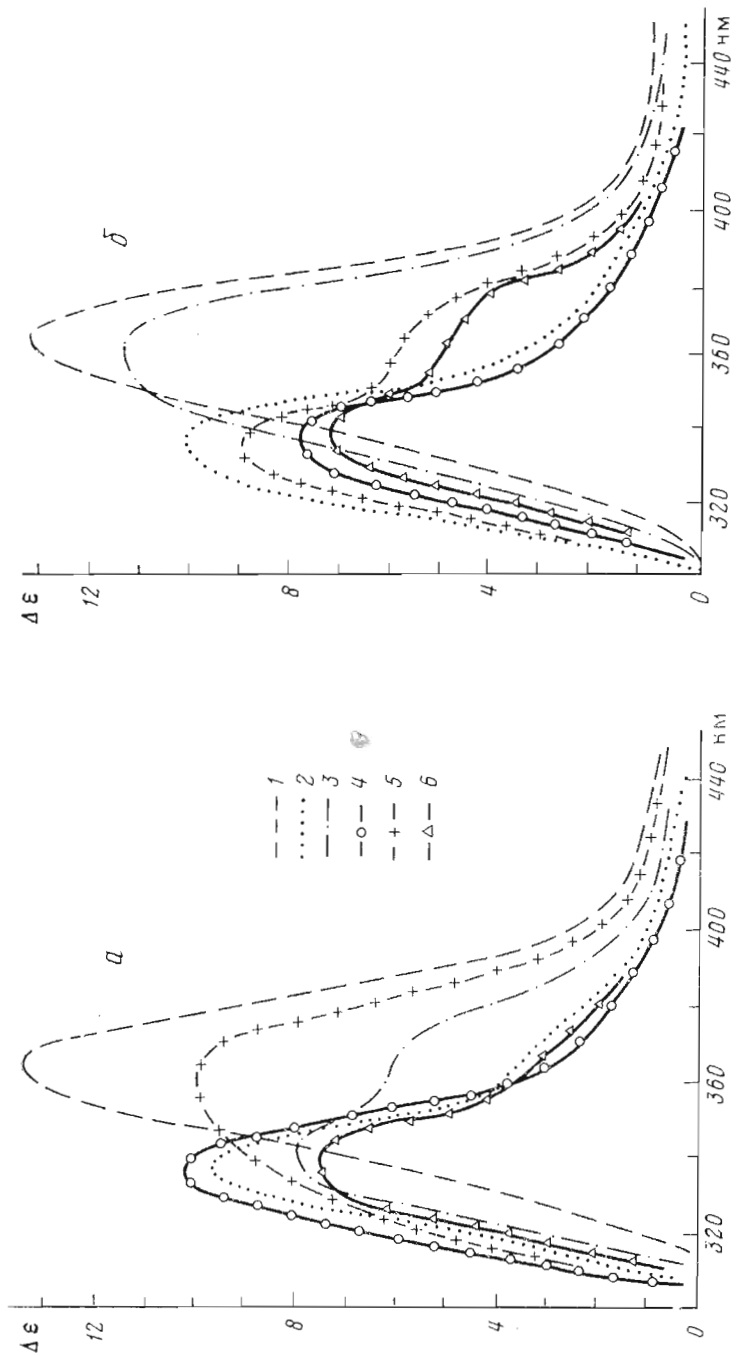


(III)  $n = 1$   
(IV)  $n = 2$

$a : X = \text{OH}, b : X = \text{H}$

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), (Iб) и (IIб). Реакция аминокислотных и аминокислотных кислот с пиридоксалем, включая переаминирование, проводилась так же, как и для аминокислот [12]. Выделение аспараттрансминазы из свиных сердец и определение активности фермента по накоплению оксалоацетата осуществлялось по [13]. При изу-





Влияние субстратов и их аналогов на КД-спектры аспартагаминотрансферазы (1). Условия определения: 0,25 М трис-НСl-буфер, рН 8,2; концентрация фермента 3-10<sup>-5</sup> М. Добавленные вещества (5 мМ): а — аспаргат (2), Ia (3), Ib (4), IIIa (5) и IIIб (6); б — глутамат (2), IIa (3), IIб (4), IVa (5) и IVб (6)

Поскольку при использованном способе определения активности вопрос о субстратных свойствах аналогов оставался открытым, была изучена реакция их с альдегидной формой трансминазы. Известно, что спектры поглощения и КД-спектры пиридоксалиденовой формы трансминазы изменяются в присутствии аспартата и глутамата. Это свидетельствует об образовании аминокетимина 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 рН 5, полнота превращения пиридоксалиденовой 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 пиридоксальемому катализу (Турку, Финляндия, 1987 г.), показали, что этот аналог *in vivo* переаминируется в  $\alpha$ -кетоетилфосфонистую кислоту (аналог пирувата), ингибирующую превращение пирувата в ацетил-КоА, что и приводит к блокированию зависимых от последнего биосинтетических путей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kajarski P., Mastalerz P.* // Aminophosphonates. Natural occurrence biochemistry and biological properties/Ed. Axt J. Berlin: Publ. Institute für wirkstofforschung 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. *Lejczak B., Starzemska 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 И. 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 В. 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., KHMUTOV R. M.  
V. A. Engelhardt Institute of Molecular 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.