



УДК 577.152.419\*92'135:547.241

## 1-АМИНО-2-(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)ЭТИЛФОСФОНИСТАЯ КИСЛОТА – НОВЫЙ СУБСТРАТ ТИРОЗИН-ФЕНОЛ-ЛИАЗЫ

© 1997 г. Р. М. Хомутов<sup>#</sup>, Н. Г. Фалеев\*, А. В. Белянкин, Е. Н. Хурс,  
А. Р. Хомутов\*\*, О. Е. Перышкова\*, В. М. Беликов\*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984, Москва, ул. Вавилова, 32;

\*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва;

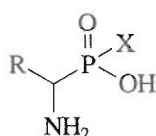
\*\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 19.06.97 г. Принята к печати 21.07.97 г.

Фосфонистые аналоги тирозина и пирувата являются субстратами реакций элиминирования и синтеза, катализируемых пиридоксаль-5'-фосфатзависимой тирозин-фенол-лиазой.

**Ключевые слова:** 1-амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистая и 1-оксоэтилфосфонистая кислоты, тирозин-фенол-лиаза.

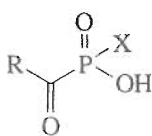
Высокая биологическая активность фосфорорганических аналогов аминокислот (I, R = Alk, X = H, OH) [1] стимулировала интерес к изучению их влияния на обмен аминокислот, что связано как с установлением механизма действия, так и с изысканием новых инструментов исследования ферментов.



(I) R = Alk, X = H или OH

(Ia) R = 4-НОС<sub>6</sub>Н<sub>4</sub>СН<sub>2</sub>; X = H

(Ib) R = 4-НОС<sub>6</sub>Н<sub>4</sub>СН<sub>2</sub>; X = OH



(II) R = Alk, X = H

или OH

(IIa) R = СН<sub>3</sub>; X = H

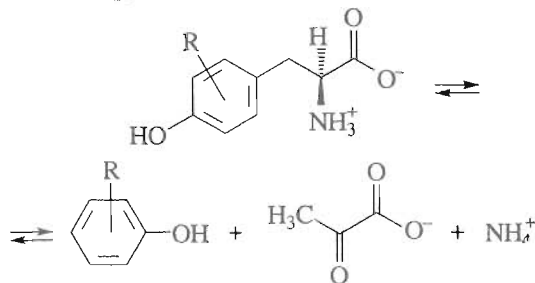
Для PLP-зависимых ферментов, играющих ключевую роль в превращениях аминокислот, известно несколько работ по конкурентному торможению аминокислотами (I; R = Alk, X = OH) ферментативного переаминирования и декарбоксилирования [2, 3]. Низкое сродство аналогов к ферментам было связано с очевидными различиями (НО)<sub>2</sub>(О)P- и НООС-групп в геометрии, размерах и основности. Эти различия были менее выражены для аминокислот (I; X = H), которые рассматриваются как близкие аналоги природных аминокислот [4, 5]. Так, фосфонистый аналог аланина является конкурентным обратимым ингибитором бактериальной PLP-зависимой рацемазы аланина, что обуславливает его антибактериальную активность [6]. Впервые возможность субстратных превращений кислот (I) в PLP-зависимых реакциях была показана

на примере аспаратаминотрансферазы, а также фосфоновых и фосфонистых аналогов аспарагиновой и глутаминовой кислот [7]. Возможность PLP-зависимых внутриклеточных превращений предполагалась и для фосфонистого аналога аланина – нового ингибитора биосинтеза меланина у фитопатогенных грибов [8].

До сих пор не было исследовано взаимодействие аналогов кислот (I) с большой и важной группой PLP-зависимых лиаз, что могло бы открыть новые возможности для воздействия на обмен аминокислот и для понимания роли НООС-группы субстратов в механизме действия PLP-зависимых ферментов.

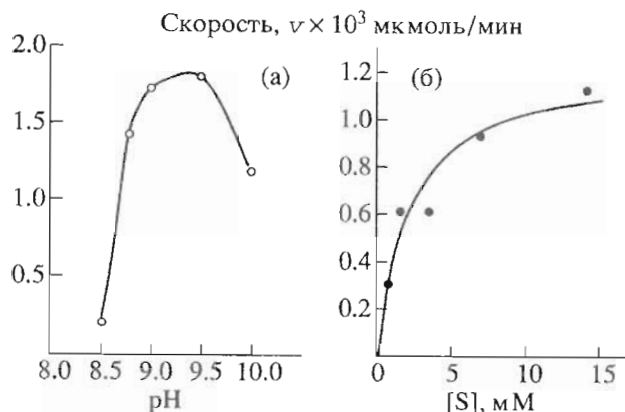
В данной работе впервые показано, что субстратом PLP-зависимой лиазы является фосфонистый аналог тирозина (Ia), который также образуется в результате обратной ферментативной реакции.

Тирозин-фенол-лиаза (ТР-лиаза; КФ 4.1.99.2) – микробный PLP-зависимый фермент, катализирующий расщепление L-тирозина или его замещенных по ароматическому ядру аналогов до пирувата аммония и соответствующих фенолов. ТР-лиаза используется и для ферментативного синтеза тирозина и его аналогов; субстратами обратной реакции служат некоторые замещенные в ядро фенолы и пируват аммония [9, 10]:



Сокращения: PLP – пиридоксаль-5'-фосфат, ТР-лиаза – тирозин-фенол-лиаза.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Образование 1-оксоэтилфосфонистой кислоты из 1-амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистой кислоты под действием ТР-лиазы. Скорость реакции определяли по образованию (IIa), количественное определение которой проводили по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином согласно [19]. (а) – зависимость скорости реакции от рН. Реакцию проводили 22.5 ч при 25° С в 0.1 М натрий-боратных буферах в общем объеме 2 мл при концентрации аминокислоты (Ia) 15 мМ, PLP 0.1 мМ и ТР-лиазы 0.5 ед. акт./мл; (б) – зависимость начальной скорости реакции от концентрации кислоты (Ia). Условия реакции как на рис. 1а; рН 9.0, концентрация ТР-лиазы 0.24 ед. акт./мл, время 3.5 ч.

Общепринятый механизм действия ТР-лиазы включает образование “внешнего” альдими́на между коферментом PLP и аминокислотой субстрата, отщепление  $\alpha$ -протона, таутомеризацию фенольного фрагмента и его последующее элиминирование [9, 10].

Исследована субстратная специфичность фермента и способность его катализировать обмен  $\alpha$ -водорода у многих аминокислот, не являющихся истинными субстратами ТР-лиазы [11]. О значении НООС-группы субстрата известно лишь то, что амиды аминокислот не являются субстратами лиазной реакции [11]. Связывание НООС-группы в активном центре ТР-лиазы достигается за счет электростатического взаимодействия с остатком Arg<sup>404</sup> [12], что наблюдается и для других PLP-зависимых ферментов [13, 14]. Роль пространственного строения кислотной группы субстрата в обеспечении фермент-субстратного соответствия для PLP-зависимых лиаз до настоящего времени не исследовалась.

ТР-лиазу из клеток *Citrobacter intermedius* получали согласно [15], рацемическую 1-амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистую кислоту (Ia) синтезировали как описано ранее [16], а 1-оксоэтилфосфонистую кислоту (IIa) – по [17].

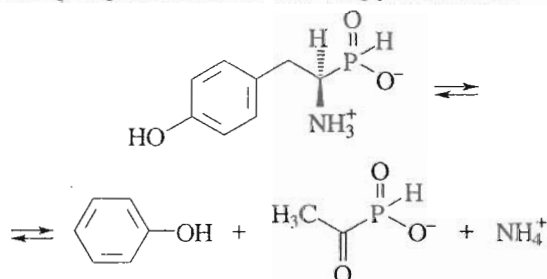
Взаимодействие ТР-лиазы с кислотой (Ia) в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 8.0), оптимальном для реакции фермента с природным субстратом, приводит к образованию фенола и фосфонистой кислоты (IIa), которая была идентифицирована в виде 2,4-динитрофенилгидразона по методике [18].

Следует отметить, что в аналогичных условиях действие ТР-лиазы на рацемическую 1-амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистую кислоту (Ib), полученную по методике [16], приводило лишь к следовым количествам фенола.

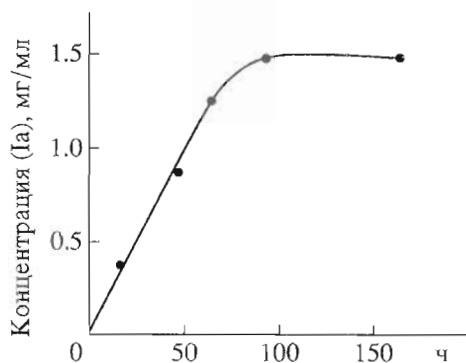
При увеличении рН наблюдалось резкое возрастание скорости ферментативного расщепления кислоты (Ia), которая достигала максимума в интервале рН 9.0–9.5 (рис. 1а), а при увеличении рН до 10.0 скорость реакции несколько снижалась. Таким образом, рН-оптимум для реакции ТР-лиазы с кислотой (Ia) значительно сдвинут в сторону более высоких значений рН по сравнению с таковым для природного субстрата.

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 1б) имеет гиперболический характер и описывается уравнением Михаэлиса–Ментен с  $K_m$ , равной 2.16 мМ. Поскольку с большой степенью вероятности можно предполагать, что субстратом фермента является лишь один из энантиомеров рацемата (Ia), то значение  $K_m$  для этого “активного” энантиомера должно быть в 2 раза меньше (1.08 мМ), что всего лишь в 4.3 раза выше по сравнению с  $K_m$  для *L*-тирозина, равной 0.25 мМ [20]. В то же время значение  $k_{кат}$  для аналога (Ia), наблюдаемое при оптимальном рН, в 440 раз ниже, чем для *L*-тирозина.

При действии ТР-лиазы на реакционную смесь, содержащую фенол, кетофосфонит (IIa) и аммиак, наблюдалось образование аминокислоты (Ia). Динамику накопления этого продукта (рис. 2) исследовали методом ТСХ. Начальная скорость синтеза была в 5 раз выше по сравнению с величиной  $k_{кат}$  для реакции расщепления. Образующийся продукт был выделен ионообменной хроматографией, и его ПМР-спектр оказался идентичен спектру кислоты (Ia), синтезированной химически. Следовательно, ТР-лиаза способна катализировать не только  $\alpha,\beta$ -элиминирование в кислоте (Ia), но и обратный процесс, в котором субстратом является фосфонистый аналог пирувата (IIa):



Таким образом, впервые для PLP-зависимой лиазы показано, что фосфонистые аналоги тирозина и пирувата являются субстратами реакций элиминирования и синтеза. Определены кинетические параметры ферментативного процесса и впервые осуществлен ферментативный синтез аминокислоты. Показано, что замена в молекуле субстрата планарной НООС-группы на Н(ОН)(О)Р-группу, имеющую тетраэдричес-



**Рис. 2.** Синтез 1-амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистой кислоты (Ia) из 1-оксоэтилфосфонистой кислоты (IIa) под действием TP-лиазы. Реакцию проводили при 25° С в 0.1 М натрий-боратном буфере, рН 9.0, при концентрации PLP 0.1 мМ и содержании TP-лиазы 0.103 ед. акт./мл в общем объеме 6 мл, содержащем 16.5 мг кетокислоты (IIa), 15 мг фенола и 200 мг ацетата аммония.

кую конфигурацию, мало сказывается на сродстве к ферменту, но существенно снижает скорость превращения. Перспективно использование аналогов в структурных исследованиях для выяснения роли кислотной группы субстрата в формировании каталитически компетентной конформации активного центра. Впервые для PLP-ферментов прямо показана возможность ферментативного взаимопревращения фосфоаналогов аминокислот.

Работа финансировалась из грантов Swiss-Russian 7SUPJ048385; INTAS (№ 93-0119) и РФФИ (№ 96-15-97699).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kafarski P., Lejczak B. // *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 1991. V. 63. P. 193–215.
- Brand L.M., Lowenstein J.M. // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 1365–1370.
- Sosnovsky G., Lukszo J., Gravela E., Zuretti F. // *J. Med. Chem.* 1985. V. 28. P. 1350–1354.
- Biryukov A.I., Osipova T.I., Khomutov R.M. // *FEBS Lett.* 1978. V. 91. P. 246–248.
- Baylis E.K., Campbell C.D., Dingwall J.G., Pickles W. // *ACS Symp. Ser.* 1981. № 171. P. 183–186.
- Badet B., Inagaki K., Soda K., Walsh C.T. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 3275–3782.
- Хурс Е.Н., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. С. 552–555.
- Хомутов Р.М., Хурс Е.Н., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. С. 1422–1424.
- Yamada H., Kumagai H. // *Adv. Appl. Microbiol.* 1975. V. 19. P. 249–288.
- Nagasawa T., Utagawa T., Goto J., Kim Chan-Jo, Tani Y., Kumagai H., Yamada H. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 117. P. 33–40.
- Faleev N.G., Ruvinov S.B., Demidkina T.V., Myagkikh I.V., Gololobov V.I., Belikov V.M. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 177. P. 395–401.
- Antson A.A., Dodson G.G., Wilson K.S., Pletnev S.V., Harutyunyan E.N., Demidkina T.V. // *Biochemistry of Vitamin B6 and PQQ / Eds G. Marino, G. Sannia, F. Bossa. Bazel: Birkhauser-Verlag,* 1994. P. 187–189.
- Kirsh J.F., Eichele G., Ford G.C., Vincent M.G., Jansoni J.N. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 174. P. 497–525.
- Isupov M., Dementieva I., Zakomirdina L., Wilson K.S., Dauter Z., Antson A.A., Dodson G.G., Harutyunyan E.G. // *Biochemistry of Vitamin B6 and PQQ / Eds G. Marino, G. Sannia, F. Bossa. Bazel: Birkhauser-Verlag,* 1994. P. 183–185.
- Antson A.A., Demidkina T.V., Gollnik P., Dauter Z., Von Tersch R.L., Long J., Berezhnoy S.N., Phillips R.S., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 4195–4206.
- Белянкин А.В., Хомутов А.Р., Жуков Ю.Н., Карташова О.Н., Хомутов Р.М. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 1997. С. 137–140.
- Baillie A.C., Wright K., Wright B.J., Earnshaw G.G. // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1988. V. 30. P. 103–112.
- Cavallini D., Frontali N., Toschi G. // *Nature.* 1949. V. 163. P. 568–569.
- Friedmann T.E., Haugen G.E. // *J. Biol. Chem.* 1943. V. 147. P. 415–443.
- Kumagai H., Yamada H., Matsui H., Ohkishi H., Ogata K. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 1767–1772.

## 1-Amino-2-(4-Hydroxyphenyl)ethyl Phosphinic Acid—a Novel Substrate of Tyrosine Phenol Lyase

R. M. Khomutov\*, N. G. Faleev\*\*, A. V. Belyankin\*, E. N. Khurs\*,  
A. R. Khomutov\*\*\*, O. E. Peryshkova\*\*, and V. M. Belikov\*\*

\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

\*\*Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*\*\*Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Abstract**—Phosphinic analogues of tyrosine and pyruvate are substrates of the elimination and synthesis reactions catalyzed by pyridoxal 5'-phosphate-dependent tyrosine phenol lyase.

**Key words:** 1-amino-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl phosphinic and 1-oxoethyl phosphinic acids, tyrosine phenol lyase