

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА СПЕРМИНА И СПЕРМИДИНА ПРОИЗВОДНЫМИ ГИДРОКСИЛАМИНА

©2013 г. М. А. ХОМУТОВ¹, Я. ВЕЙСЕЛЬ²,
М. ХИВОНЕН², Т. А. КЕЙНАНЕН²,
Й. ВЕПСАЛАЙНЕН², Л. АЛХОНЕН²,
А. Р. ХОМУТОВ^{1, #}, С. Н. КОЧЕТКОВ¹

¹ *Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва*

² *Департамент Фармации, Биоцентр Куопио, Университет
Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия*

I. Введение. II. Гидроксиламин-содержащие аналоги декарбокси-
лированного S-аденозилметионина. III. Гидроксиламин-содержа-
щие аналоги путресцина. IV. Гидроксиламин-содержащие аналоги
спермина и спермидина. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

История исследований биогенных полиаминов спермина (Spm) и спермидина (Spd) берет начало во второй половине XVII века, когда Антуан Левенгук обнаружил в семенной жидкости неизвестные кристаллы [1], которые 250 лет спустя были идентифицированы как фосфат Spm [2]. Тем не менее, современная биохимия полиаминов представляет собой молодую и быстро развивающуюся область, которая сформировалась лишь в самом конце 60-х годов прошлого века после открытия орнитиндекарбоксилазы у млекопитающих [3, 4], что, в первом приближении, завершило формирование наших представлений о системе биосинтеза Spm и Spd (рис. 1). В начале 70-х годов XX века было установлено, что опухолевые клетки имеют повышенное, по сравнению с нормальными, содержание полиаминов [5], что послужило мощным импульсом для поступательного развития молекулярной биологии и биохимии полиаминов.

[#]Адрес для корреспонденции: alexkhom@list.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 12-04-31682, программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта «Стратегическое финансирование» Университета Восточной Финляндии г. Куопио и гранта Академии Финляндии.

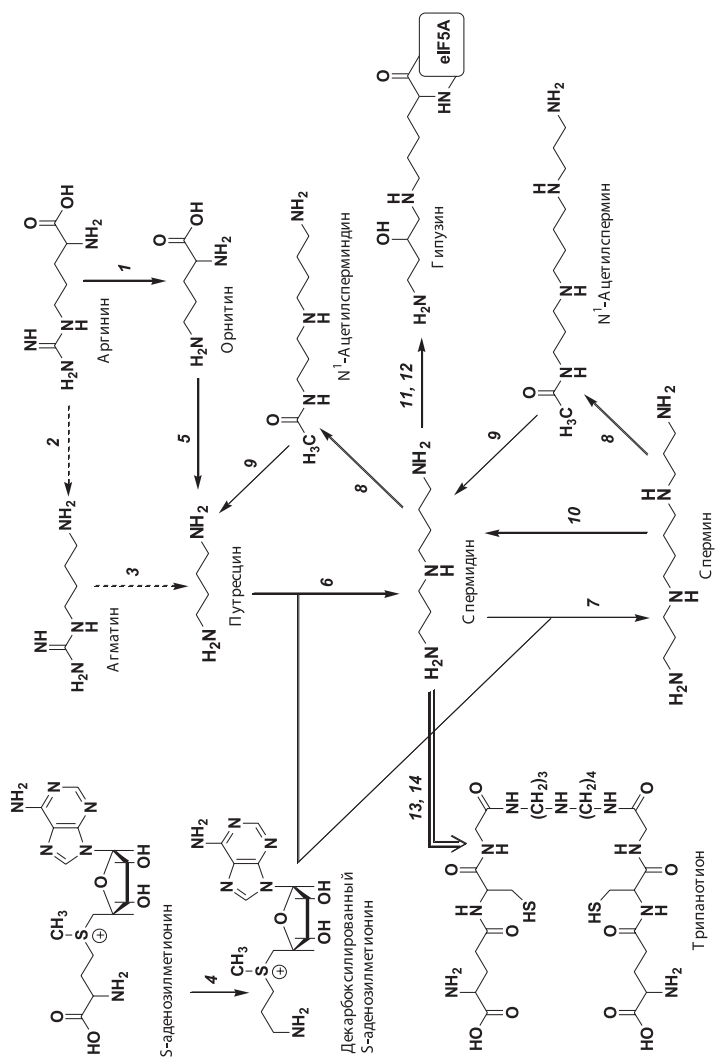


Рис. 1. Метаболизм полиаминов. 1 – аргиназа; 2 – аргининдекарбоксилаза; 3 – агматиназа; 4 – S-аденозилметилтиониндекарбоксилаза; 5 – орнитиндекарбоксилаза; 6 – спермидинсинтаза; 7 – сперминсинтаза; 8 – спермин/спермидин-N¹-ацетилтрансфераза; 9 – полиаминоксидаза; 10 – сперминоксидаза; 11 – дезоксигипузинсинтаза; 12 – гипузинсинтаза (дезоксигипузинмонооксигеназа); 13 – глутатионилспермидинсинтаза; 14 – трипанолонсинтаза. Превращения, характерные для млекопитающих (→), бактерий (---) и болезнетворных трипаносоматидов (⇒).

В норме, Spm, Spd и их предшественник путресцин (Put) присутствуют в клетках всех типов в микромолярных или даже миллимолярных концентрациях и жизненно необходимы для нормального роста [6, 7]. У человека больше всего Spm и Spd содержится в поджелудочной железе (7–8 мМ) [8]. Истощение внутриклеточного пула Spm и Spd приводит к замедлению роста и гибели клеток. Высокое содержание протонированных при физиологическом значении pH Spm и Spd *a priori* определяет множественность их клеточных функций, большинство из которых описывается в терминах специфического электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными макромолекулами, в первую очередь ДНК и РНК, а также нуклеопротеидными комплексами, участками мембран и рецепторов [6, 7, 9].

Основными ферментами биосинтеза полиаминов являются пиридоксаль-5'-фосфат-зависимая орнитиндекарбоксилаза (ODC) и пируват-зависимая S-аденозилметиониндекарбоксилаза (AdoMetDC), а в процессах катаболизма полиаминов главная роль отводится спермин/спермидин-N¹-ацетилтрансферазе (SSAT) (Рис. 1). Биосинтез этих ферментов тонко регулируется на транскрипционном и трансляционном уровнях, причем основные принципы регуляции установлены как для нормальных, так и для опухолевых клеток [7, 9]. Клетки оснащены системой активного транспорта полиаминов, которая вносит существенный вклад как во внутриклеточное содержание полиаминов, поставляя до 30% необходимых количеств Spm, Spd и Put. Центральная роль в поддержании гомеостаза полиаминов в клетке отводится небольшому (М.В. 27000) белку антизиму (AZ), биосинтез которого индуцируется в ответ на повышение внутриклеточного содержания Spm и Spd [10]. AZ, с одной стороны, блокирует поступление экзогенных полиаминов в клетку, а с другой стороны вызывает диссоциацию ODC на субъединицы и обеспечивает их доставку в 26S протеосомы [11]. Все это позволяет быстро и эффективно регулировать уровень полиаминов в клетках [12].

На протяжении многих лет одним из приоритетных направлений биохимии полиаминов было создание специфических ингибиторов ферментов биосинтеза Spm и Spd и индукторов SSAT – ключевого фермента катаболизма полиаминов [13–15]. Получение таких соединений самым тесным образом связано с медицинской практикой, где они используются в качестве противопаразитарных средств (полиамины необходимы для размножения таких болезнетворных трипаносоматидов как *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Leishmania donovani* и т.п.), а также и в терапии некоторых онкологических заболеваний (уровень полиаминов в опухолевых клетках по сравнению с нормальными существенно повышен). При помощи

этих ингибиторов были получены многочисленные данные о роли и функциях Spm и Spd в клетке и регуляторных механизмах, ответственных за поддержание их гомеостаза (см. обзоры [13, 15]). В настоящее время в распоряжении исследователей имеется также целый арсенал высокоэффективных индукторов SSAT [16, 17], позволяющих эффективно снижать содержание полиаминов в клетках, Лучшие из этих соединений активны *in vivo* и находятся на разных стадиях клинических испытаний в качестве противоопухолевых препаратов или потенциальных противопаразитарных средств (см. обзоры: [7, 9, 18, 19]).

Среди регуляторов активности ферментов метаболизма полиаминов заметное место занимают *O*-замещенные гидроксилламины. Варьируя структуру алкильного заместителя в рамках этого класса соединений, удалось получить высокоэффективные ингибиторы и регуляторы активности ферментов метаболизма Put, Spm и Spd (за исключением FAD-зависимых SMO и АРАО), эффекторы системы транспорта полиаминов, а также создать активно проникающий в клетки «проингибитор» ODC. Гидроксиламин-содержащие ингибиторы ODC и AdoMetDC (наиболее изученные соединения этого ряда) оказались ценными инструментами исследования метаболизма и клеточных функций Spm и Spd в культуре клеток и с их помощью был получен ряд результатов, значимых для биохимии полиаминов.

II. ГИДРОКСИЛАМИН-СОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАННОГО S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА

S-Аденозилметиониндекарбоксилаза (AdoMetDC, КФ 4.1.1.50) принадлежит к немногочисленному семейству декарбоксилаз, простетической группой которых служит ковалентно-связанный остаток пирувата [20]. AdoMetDC, как и другие пируват-зависимые ферменты, синтезируется в виде пробелка, аутокаталитическое расщепление которого приводит к образованию α -субъединицы, содержащей 266 аминокислотных остатков и *N*-концевой остаток пирувата, и меньшей по размерам β -субъединицы (67 аминокислотных остатков) – данные по ферменту человека [20].

Гидроксиламин-содержащие ингибиторы AdoMetDC были впервые получены в 80е годы и представляли собой сульфоний-содержащие *O*-замещенные гидроксилламины, аналоги декарбоксилированного AdoMet (deAdoMet) и метилметионина [21, 22]. Наиболее интересным представителем этого класса являлся S-(5'-дезоксис-5'-аденозил)[(метилтио)этил] гидроксилламин – АМА (табл. 1) – изостерный аналог deAdoMet, в котором аминотиленовая группа заменена

на аминоксигруппу, что позволяет сохранить подобие субстрату, а следовательно и специфичность связывания ингибитора в активном центре. Сульфониевый центр и аденозиновый фрагмент выполняют якорные функции и необходимы для адекватного узнавания ингибитора ферментом. Поэтому эффективности торможения AdoMetDC под действием АМА и соединения (I); АМА и соединения (II); отличаются почти на пять порядков (табл. 1). Правильно расположенная аминоксигруппа обеспечивает образование оксима с остатком пирувата в активном центре, что приводит к необратимому торможению, которое развивается во времени. Последнее связано с тем, что в активном центре AdoMetDC карбонильная группа пирувата, в отличие от PLP-зависимых ферментов, не образует внутреннего альдимида с остатком Lys, что существенно снижает ее реакционную способность. Субстрат не восстанавливает активности фермента, но защищает последний, конкурируя с АМА за связывание в активном центре. Совокупность этих обстоятельств приводит к тому, что в стандартных условиях определения ингибирующей активности (без преинкубации с ингибитором) АМА оказывается несколько менее активной в отношении фермента из клеток L1210 (IC_{50} 3×10^{-8} М [23]), чем в случае преинкубации с ферментом из печени крыс (IC_{50} 3×10^{-9} М [22]).

При физиологическом значении pH АМА представляет собой монокатион (pK_a H_2NO -группы $\sim 4,5$, что практически на пять порядков ниже pK_a аминогруппы deAdoMet), что оказалось существенным для узнавания ингибитора ферментом. В случае бактериальной AdoMetDC количественная оценка торможения, согласно схеме Китца и Вильсона [30], свидетельствовала о двухстадийном характере необратимого ингибирования, причем сродство АМА к ферменту на интегральной обратной стадии оказалось на 2 порядка лучше, чем K_m субстрата и в 10 раз лучше сродства deAdoMet к ферменту, а k_{inact} AdoMetDC из *E.coli* составляла $0,8 \times 10^{-2}$ сек $^{-1}$ [22]. Специфичность действия ингибитора по отношению к AdoMetDC следовала из низкой активности АМА по отношению к PLP-зависимым ODC и аспаратаминотрансферазе. Эти два фермента АМА ингибировал лишь в микро- и миллимолярных концентрациях, соответственно.

Активность AdoMetDC эукариот аллостерически регулируется Put. Механизм этой активации, по-видимому, включает Put-индуцированные конформационные изменения белка, которые приводят к 10-кратному снижению K_m субстрата (до 0,06 мМ) при pH 7,5, изменению формы pH-профиля ферментативной реакции, а также снижению k_{cat} до 2,5 сек $^{-1}$ при 37°C [32]. Напротив, бактерии, в том числе и *E.coli*, содержат Mg^{2+} -зависимую декарбоксилазу AdoMeDC.

Оказалось, что ионы Mg^{2+} также необходимы и для эффективного ингибирования AdoMet под действием АМА, поскольку в их отсутствие АМА, даже в концентрации 6×10^{-6} М (IC_{50} для фермента из *E.coli* составляет 2×10^{-8} М, см. табл. 1) оказалась неактивной [33]. Подобное же снижение активности в отсутствие Mg^{2+} наблюдалось и для 1-аминокси-3-аминопропана (АРА), являющегося неспецифическим ингибитором AdoMetDC. По-видимому, ионы Mg^{2+} вызывают конформационные изменения белка и остаток пирувата становится доступным как для аминогруппы субстрата, так и для аминоксигруппы АМА [33].

Высокая ингибирующая активность и избирательность действия АМА скорее всего обусловлена структурным соответствием оксима AdoMetDC и основания Шиффа – первого промежуточного соединения, возникающего в ходе ферментативного декарбоксилирования AdoMet (следует отметить, что рентгеноструктурные исследования комплекса АМА–AdoMetDC не проводились). Вместе с тем, для PLP-зависимой 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазы, субстратом которой также служит AdoMet, рентгеноструктурный анализ комплекса фермент-АМА показал, что его строение соответствует структуре внешнего альдимины [34]. Соответственно, можно предположить, что подобная картина будет наблюдаться и в случае комплекса АМА-AdoMetDC.

Интересной особенностью AdoMetDC является необратимое ингибирование фермента субстратом, происходящее один раз на 6000–7000 актов декарбоксилирования [35]. Дальнейшие исследования показали, что субстратное торможение обусловлено переаминированием остатка пирувата и/или присоединением Cys-140 к акрилатной системе [36, 37]. Существенно, что и инкубация AdoMetDC с deAdoMet также сопровождается развивающимся во времени необратимым торможением фермента [38]. Известно, что абортивное трансаминирование весьма характерно для PLP-зависимых декарбоксилаз [40].

Замена сульфониевого центра deAdoMet на метиламиногруппу приводит к азот-содержащему аналогу (aza-deAdoMet), который оказался весьма слабым конкурентным ингибитором AdoMetDC с K_i 0,1 мМ [38], тогда как продукт ферментативной реакции имеет на несколько порядков лучшее сродство (K_i 0.1 мкМ [31]) к ферменту. Инкубация AdoMetDC с aza-deAdoMet, в отличие от deAdoMet, не приводит к необратимому ингибированию фермента. Более того, в случае aza-deAdoMet не удается восстановить основание Шиффа при помощи $NaCNBH_3$, что принципиально отличает этот аналог от

deAdoMet [38]. Одно из объяснений подобных различий может быть связано с «неправильной ориентацией» боковой цепи ингибитора в активном центре фермента что и делает невозможным образование основания Шиффа.

Можно предположить, что непродуктивное связывание aza-deAdoMet в активном центре AdoMetDC обусловлено аномально низким значением pK_a третичной аминогруппы, подобно основности соответствующего атома азота в aza-AdoMet, который имеет pK_a 7,09 [41]. Соответственно, aza-AdoMet продуктивно заменял AdoMet, являющийся корепрессором метионинового репрессора (MetJ) *E. coli*, лишь при pH 5,5, а при pH 7,4 не узнается в качестве AdoMet [41].

Тем не менее, на основе aza-deAdoMet была создана система гидроксилламин-содержащих ингибиторов AdoMetDC, включающая в себя АОРА [24], МАОЕА и МАОРА [25] (табл. 1). Гидразин-содержащий ингибитор AdoMetDC – МНЗРА [25], также следует отнести к этой группе ингибиторов. При этом *a priori* предполагалось, что 5'-метиламиногруппа будет протонирована при физиологическом значении pH. Возможность ее пониженной основности, приводящая к рассмотрению этих ингибиторов в качестве аналогов декарбоксилированного S-аденозилгомоцистеина (deAdoHCys), а не deAdoMet, не принималась во внимание. Исследование взаимодействия AdoMetDC из предстательной железы крыс или фермента из клеток L1210 с АОРА, МАОРА и МАОЕА (табл. 1) показало, что эти ингибиторы тормозили активность фермента почти в 100 раз менее эффективно, чем АМА фермент из печени крысы (табл. 1). Эти отличия частично могут быть обусловлены различиями в методе определения активности – в работах [21, 22] проводили 30-мин прединкубацию фермента с ингибитором, тогда как в работе [25] последний вносили в субстратную смесь непосредственно перед добавлением фермента. Во всех случаях торможение было необратимым и развивалось во времени. Субстрат не восстанавливал активности фермента. Гидразин-содержащий МНЗРА оказался несколько активнее (IC_{50} 7×10^{-8} М) [25].

Инактивация рекомбинантной AdoMetDC человека МНЗРА сопровождалась появлением в УФ спектре α -субъединицы полосы поглощения при 260 нм, что свидетельствует о связывании ингибитора, содержащего адениновый хромофор, с ферментом. После ограниченного протеолиза фермент-ингибиторного комплекса удалось выделить фрагмент N-концевого пептида $\text{pYGVVoyl-Ser-Met-Phe-Val-Ser-Lys}$, содержащий по данным масс-спектрометрии ковалентно связанный МНЗРА [42]. Однако эти данные не

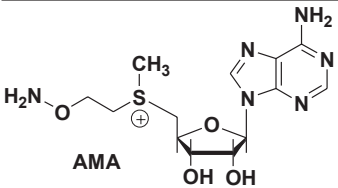
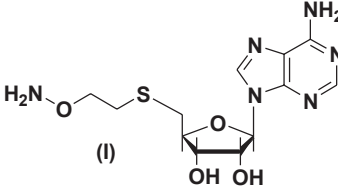
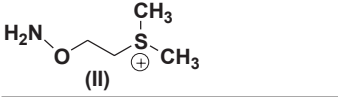
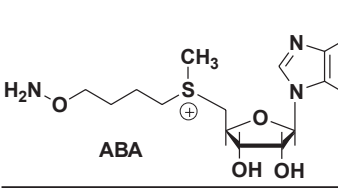
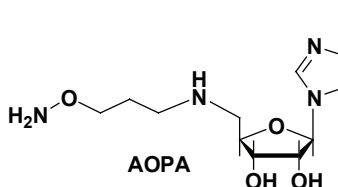
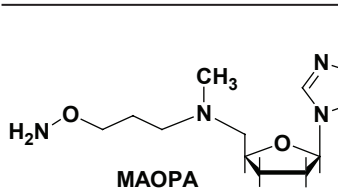
доказывают «правильного» связывания ингибитора в активном центре фермента, хотя бы потому, что еще в 1970 г. был выделен и идентифицирован фенилгидразон AdoMetDC [43], а связывание фенилгидразина в активном центре никак не может рассматриваться как субстратоподобное.

Рентгеноструктурными исследованиями комплекса AdoMetDC с метиловым эфиром AdoMet было прямо показано образование основания Шиффа и связывание аденозинового фрагмента в необычной для нуклеозидов *syn*-конформации [44]. Известно, что введение заместителя в 8-положение аденозина благоприятствует реализации этой конформации [26]. Основываясь на этом, был синтезирован ряд 8-замещенных производных MAOEA, а исследование их ингибирующей активности показало, что наиболее активным аналогом оказался 8-Ме-MAOEA [26], который ингибировал рекомбинантную AdoMetDC человека в 8 раз лучше, чем MAOEA (табл. 1).

Рентгеноструктурный анализ комплекса 8-Ме-MAOEA с рекомбинантной AdoMetDC человека показал образование оксима фермента (рис. 2А), тогда как в случае 8-Ме-aza-deAdoMet (азот-содержащий аналог deAdoMet с *N*-метиловой группой вместо сульфониового центра) не наблюдалось образования основания Шиффа с карбонильной группой AdoMetDC (рис. 2Б). Таким образом, на структурном уровне было прямо показано, что deAdoMet и aza-deAdoMet поразному связываются в активном центре фермента и была подтверждена гипотеза Abdel-Monem [38] о существовании принципиальных отличий в расположении аминопропиловых остатков deAdoMet и aza-deAdoMet в фермент-ингибиторном комплексе. Образование оксима фермента с 8-Ме-MAOEA и гидразона фермента с МНЗРА происходит благодаря определенной подвижности аминокислотной/гидразинопропиловой групп в активном центре.

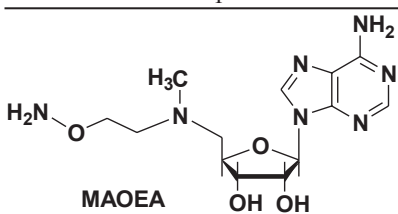
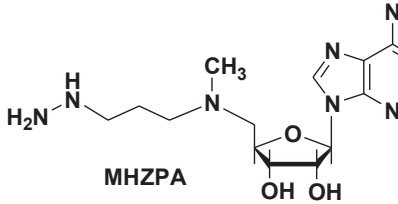
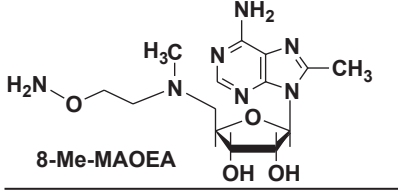
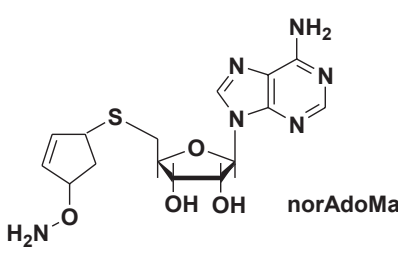
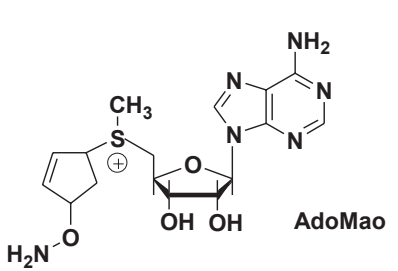
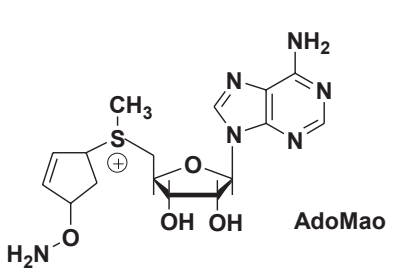
Для AdoMetDC известны два фермент-активируемых (суицидальных) ингибитора – 5-((*Z*)-амино-2-бутенил)метиламино-5'-дезоксиаденозин (AbeAdo, [45]) и *S*-(5'-дезоксиденозил)-1-амино-4-метилтиоциклопентен-2 (AdoMac, [46, 27]). Активность *Z*-(*cis*-) изомера AbeAdo в отношении AdoMetDC из *E.coli* и печени крыс почти в 1000 раз выше, чем активность *E*-(*trans*-) изомера [45, 47], что косвенно подтверждает «непродуктивное» связывание aza-deAdoMet в активном центре AdoMetDC. Обычно продуктивное связывание аминокислот в активном центре ферментов требует «вытянутой» конформации субстрата - в данном случае *cis*-конфигурация двойной связи AbeAdo возможно корректирует искажения, вызванные заменой сульфониового центра на аминокислотную, и обеспечивает правильное расположение концевой аминокислотной группы ингибитора, необходимое для

Таблица 1.
Торможение AdoMetDC гидроксилламин-содержащими аналогами deAdoMet [39]

Гидроксилламин-содержащий аналог deAdoMet	Источник фермента	Ингибирование	Ссылки
1	2	3	4
 <p>AMA</p>	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ 2×10 ⁻⁸ M	[21]
	печень крыс	IC ₅₀ 9×10 ⁻⁹ M	[21, 22]
	L1210	IC ₅₀ 3×10 ⁻⁸ M	[23]
 <p>(I)</p>	печень крыс	IC ₅₀ 4×10 ⁻⁵ M	[22]
	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ 1×10 ⁻⁴ M	[22]
 <p>(II)</p>	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ 5×10 ⁻⁴ M	[22]
 <p>ABA</p>	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ 9×10 ⁻⁷ M	[22]
	печень крыс	IC ₅₀ 8×10 ⁻⁹ M	[22]
 <p>AOPA</p>	предстательная железа крыс	IC ₅₀ 6×10 ⁻⁷ M	[24]
 <p>MAOPA</p>	предстательная железа крыс	IC ₅₀ 9×10 ⁻⁷ M	[25]

Окончание табл. 1 см. на сл. стр.

Окончание табл. 1.

1	2	3	4
 <p>MAOEA</p>	предстательная железа крыс	$IC_{50} 4 \times 10^{-7} \text{ M}$	[25]
	рекомбинантный фермент человека	$IC_{50} 5,5 \times 10^{-8} \text{ M}$	[26]
 <p>MHZPA</p>	предстательная железа крыс	$IC_{50} 7 \times 10^{-8} \text{ M}$	[25]
 <p>8-Me-MAOEA</p>	рекомбинантный фермент человека	$IC_{50} 7 \times 10^{-9} \text{ M}$	[26]
 <p>norAdoMao</p>	<i>trans-1R,4R-</i> <i>E. coli</i>	$K_1 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,04 \text{ мин}^{-1}$	[27, 28, 29]
	рекомбинантный фермент человека	$K_1 9,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,30 \text{ мин}^{-1}$	
 <p>AdoMao</p>	<i>trans-1R,4R-</i> <i>E. coli</i>	$K_1 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,03 \text{ мин}^{-1}$	[27, 28, 29]
	рекомбинантный фермент человека	$K_1 2,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,08 \text{ мин}^{-1}$	
 <p>AdoMao</p>	<i>trans-1S,4S-</i> <i>E. coli</i>	$K_1 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,01 \text{ мин}^{-1}$	[27, 28, 29]
	рекомбинантный фермент человека	$K_1 2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ $k_{\text{inac}} 0,12 \text{ мин}^{-1}$	

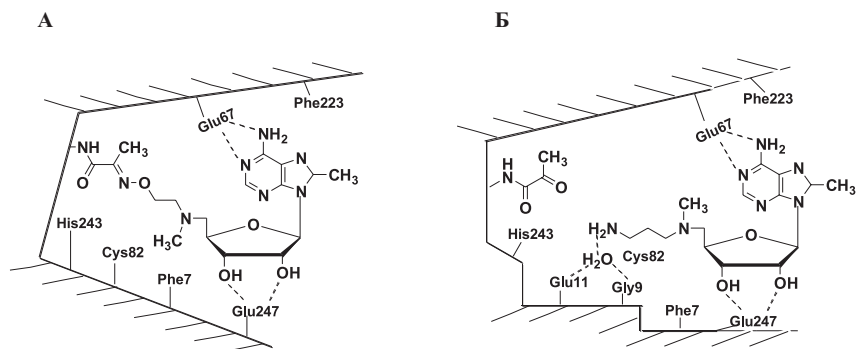


Рис. 2. Комплексы AdoMetDC с 8-Ме-МАОЕА (А) и 8-Ме-аза-deAdoMet (Б) (по данным работы [26]).

образования основания Шиффа, что и является движущей силой необратимого торможения. Ингибирование фермента из *E. coli* было Mg^{2+} -зависимым [47], подобно ингибированию AdoMetDC *E. coli* при помощи АМА (см. выше), а в случае фермента из печени крыс активность ингибитора возрастала в присутствии Put [45]. Эти данные прямо указывают на существование Mg^{2+} - и Put-опосредованных конформационных изменений фермента, делающих карбонильную группу доступной для взаимодействия с ингибитором.

Третья группа гидроксиламин-содержащих ингибиторов AdoMetDC была создана на основе скелета AdoMac путем замены аминогруппы в циклопентеновом цикле на аминоксигруппу (табл. 1). Подобный алгоритм представляется весьма механистическим, тем не менее, он привел к достаточно активным соединениям, особенности действия которых дополнили существующие зависимости ингибирующей активности аналогов deAdoMet от их строения.

AdoMaо и *nor*AdoMaо необратимо ингибировали как бактериальную, так и рекомбинантную AdoMetDC человека (табл. 1). Однако в случае фермента из *E. coli* отличия в активностях (*R,R*)- и (*S,S*)-диастереомеров были невелики. Более того, различия в активностях сульфоний-содержащего AdoMaо и не содержащего сульфонийный центр поAdoMaо в отношении фермента из *E. coli* (табл. 1), были мало выражены по сравнению с ингибированием бактериального фермента АМА и соответствующим ему сульфидом (I). В последнем случае различия в активностях составляли почти 4 порядка (табл. 1). Подобная зависимость действия от строения AdoMaо и *nor*AdoMaо скорее всего связана с конформационными ограничениями, вноси-

мыми в молекулу ингибитора циклопентеновым циклом, жестко фиксирующим положение реакционноспособной аминоксигруппы, а также стереоконфигурацией обоих хиральных центров. Наконец, различия в активностях *trans*-1*R*,4*R*- и *trans*-1*S*,4*S*-norAdoMao в отношении бактериального и человеческого ферментов (табл. 1) прямо указывают на отличия в структуре участков активных центров, обеспечивающих связывание субстрата.

Таким образом, в литературе описаны три типа гидроксилламин-содержащих ингибиторов AdoMetDC (табл. 1), лучшие представители которых АМА, 8-Ме-МАОЕА и AdoMao необратимо и специфически ингибировали ферменты из различных источников в концентрации 1–100 нМ. Высокая ингибирующая активность и избирательность действия предопределили успешное использование этих веществ для регуляции метаболизма полиаминов в культуре клеток и позволили получить ряд результатов, значимых для биохимии Spm и Spd.

АМА был первым необратимым избирательным и высокоэффективным ингибитором AdoMetDC [21]. АМА тормозил рост клеток L1210 в концентрации 0,1 мМ, снижая при этом внутриклеточное содержание Spd и Spm, тогда как количество Put резко возрастало [23]. Подобная картина свидетельствовала о специфичности действия и хорошо согласовывалась с эффектом, ожидаемым для ингибитора AdoMetDC. Сравнение эффективности торможения роста клеток L1210 показывает, что АМА несколько активнее DFMO и обладает меньшим токсическим эффектом [23]. Одновременное использование АМА и DFMO позволило впервые, используя химические регуляторы активности AdoMetDC и ODC, получить клетки с истощенным пулом всех трех полиаминов [23]. Последнее открывало возможность корректного исследования способности индивидуальных полиаминов поддерживать рост клеток L1210. Оказалось, что лишь Spd способен в полной мере восстанавливать рост клеток L1210 с истощенным пулом полиаминов, тогда как Spm, несмотря на эффективный путь его катаболизма до Spd, этой способностью не обладал (рис. 3). Последнее имеет принципиальное значение для биохимии, так как на примере клеток L1210 обнаружена наиболее уязвимая точка в системе метаболизма полиаминов, которая впоследствии оказалась тесно связанной с посттрансляционной модификацией фактора инициации трансляции 5A.

Инкубация клеток L1210 с АМА сопровождалась 50-ти кратным увеличением содержания неактивной AdoMetDC. Оказалось, что в этом случае наряду с белком, имеющим М.В. ~ 32000 кДа удается детектировать и белок с М.В. ~ 37000 кДа, также проявляющийся

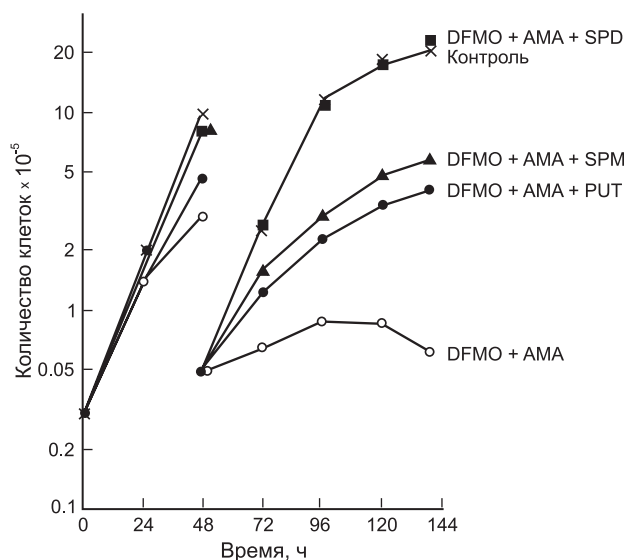


Рис. 3. Spd (1,0 мкМ), но не Spm (3,0 мкМ) и Put (1,0 мкМ), восстанавливает рост клеток L1210 с полностью истощенным пулом полиаминов (инкубация с 0,1 мМ АМА и 1,0 мМ DFMO в течение 144 ч).

антителами к AdoMetDC [48]. Таким образом, впервые, используя ингибиторный анализ, удалось показать, что AdoMetDC синтезируется в клетках в виде пробелка. Снижение внутриклеточного содержания Spd и Spm, вызываемое АМА, активировало систему транспорта полиаминов – V_{max} возрастала в 4,5 раза, но внесение в культуральную среду Spd и Spm быстро снижало V_{max} до уровня контроля [49].

Инкубация клеток L1210, или SV-3T3 с MAOEA (0,1 мМ) или 0,05 мМ MHZPA также приводила к истощению внутриклеточного пула Spd и Spm и увеличению содержания Put в клетке, а использование этих ингибиторов совместно с DFMO также приводило к истощению пула всех трех полиаминов [25]. Вращивание клеток L1210 в присутствии MAOEA или MHZPA сопровождалась увеличением количества активной ODC, из-за стимуляции ее синтеза на стадии трансляции и снижения скорости деградации фермента [50]. Экзогенные Spm и Spd обращали эффекты ингибиторов. Позднее эти данные были объяснены в терминах полиамин-опосредованной регуляции биосинтеза антизима.

Известно, что безвредный паразит *Trypanosoma brucei* не способен синтезировать пурины, но оснащен специфическим аденозиновым транспортером. Оказалось, что AdoMao использует этот путь

для проникновения в паразит и *in vitro* ингибирует рост *T. brucei* с IC_{50} 0,9 мкМ [29].

Таким образом, исследование эффектов нуклеозидных ингибиторов AdoMetDC, в основном аналогов deAdoMet, в культуре клеток позволило получить ряд результатов, значимых для биохимии полиаминов.

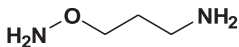
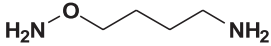
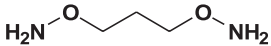
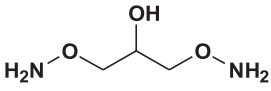
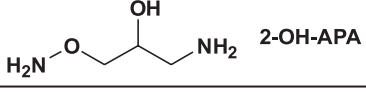
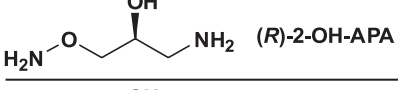
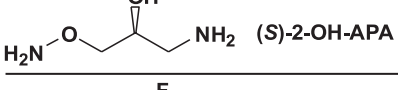
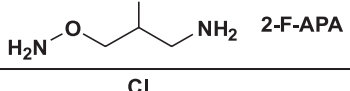
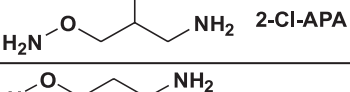

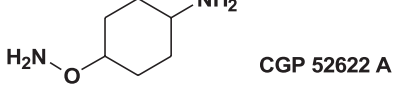
III. ГИДРОКСИЛАМИН-СОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ ПУТРЕСЦИНА

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) зависимая орнитиндекарбоксилаза (ODC, EC 4.1.1.17) является скоростью-определяющим ферментом на путях биосинтеза Spm и Spd. Каталитически активная ODC существует в виде α_2 -димера, содержащего два активных центра, в формировании которых принимают участие аминокислотные остатки обеих субъединиц, каждая с молекулярной массой 50–55 кДа, в зависимости от источника фермента [51]. В литературе описан спектр разнообразных ингибиторов фермента, включая и соединения, активные *in vivo* (см. обзоры [13, 15]). Наиболее известным среди них является α -диформетилорнитин (DFMO) [13, 52, 53], используемый (под названием Eflornithine®) для лечения африканской сонной болезни [54, 55], и гирсутизма [56] – избыточный рост терминальных волос у женщин по мужскому типу. DFMO проходит также клинические испытания в качестве превентивного противоопухолевого препарата [57].

Среди путресцин-подобных *O*-замещенных гидроксиламинов, были найдены высокоэффективные и специфические ингибиторы ODC (табл. 2). Первым, простейшим и одним из самых активных соединений в этом ряду был изостерный путресцину 1-аминоокси-3-аминопропан (АРА), который благодаря наличию в его структуре аминооксигруппы, псевдонезвратно ингибировал фермент из печени мышей и крыс в наномолярных концентрациях [58, 59]. При взаимодействии с ODC положительно заряженная аминогруппа АРА по-видимому выполняет якорную функцию и обеспечивает правильное связывание ингибитора в активном центре фермента. Непротонированная при физиологическом значении pH аминооксигруппа (pKa 4,2) [61] в активном центре ODC реагирует с PLP, образуя соответствующий оксим.

Аминооксианалог кадаверина (АВА) был в 10 раз менее активен по сравнению с АРА, а незаряженные при нейтральных pH диаминооксипроизводные не действовали на ODC даже в концентрации 1 мкМ (табл. 2). Избирательность действия АРА следует из низкой активности ингибитора ($IC_{50} \sim 0,1$ мМ) в отношении PLP-зависимой орнитин- δ -аминотрансферазы и AdoMetDC [59].

Таблица 2.
Торможение ODC гидроксиламин-содержащими аналогами путресцина [60]

Гидроксиламин-содержащий аналог путресцина	Источник фермента	Ингибирование	Ссылки
 APA	печень мышей	$IC_{50} 2 \times 10^{-8} \text{ M}$	[59]
	почки мышей	$IC_{50} 3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$	[58]
	печень крыс	$IC_{50} 3,5 \times 10^{-8} \text{ M}$	[65]
	<i>L. donovani</i>	$K_1 1 \times 10^{-9} \text{ M}$	[64]
	рекомбинантный фермент человека	$K_1 1,4 \times 10^{-9} \text{ M}$	[63]
 ABA	печень мышей	$IC_{50} 2 \times 10^{-7} \text{ M}$	[59]
		печень мышей	$IC_{50} > 10^{-6} \text{ M}$
		печень крыс	$IC_{50} 6,7 \times 10^{-4} \text{ M}$
	 2-OH-APA	печень крыс	$IC_{50} 3,8 \times 10^{-8} \text{ M}$
 (R)-2-OH-APA		печень крыс	$IC_{50} 4,9 \times 10^{-8} \text{ M}$
	 (S)-2-OH-APA	печень крыс	$IC_{50} 3,3 \times 10^{-8} \text{ M}$
 2-F-APA		печень крыс	$IC_{50} 1,4 \times 10^{-8} \text{ M}$
	 2-Cl-APA	печень крыс	$IC_{50} 9,3 \times 10^{-8} \text{ M}$
 CGP 54169 A		<i>P. falciparum</i>	$IC_{50} 2,5 \times 10^{-8} \text{ M}$
	<i>P. falciparum</i>	$K_1 7,9 \times 10^{-9} \text{ M}$	[64]
 CGP 52622 A	<i>P. falciparum</i>	$IC_{50} 6,3 \times 10^{-8} \text{ M}$	[66]
	<i>P. falciparum</i>	$K_1 2,4 \times 10^{-8} \text{ M}$	[64]

Введение гидроксильной группы в молекулу АРА мало влияло на эффективность ингибирования ODC, а соответствующие (*R*)- и (*S*)-изомеры 2-ОН-АРА действовали практически одинаково (табл. 2). 2-F-АРА, в отличие от АРА, 2-ОН-АРА и АВА (псевдо-необратимые ингибиторы), оказался необратимым ингибитором ODC [65]. Молекулярные механизмы необратимого ингибирования ODC 2-F-АРА в работе [65] не исследовались, однако можно предположить, что на первой стадии реакции образуется оксим фермента, а необратимость торможения может быть обусловлена алкилированием существенного для катализа остатка Cys-360. Альтернативный механизм может включать в себя и стабилизацию E-I комплекса посредством дополнительной прочной водородной связи, столь характерной для атома фтора.

Высокая активность АРА в отношении ODC стимулировала рентгеноструктурные исследования комплекса ODC–АРА. Ингибитор правильно связывается в активном центре фермента (протонированная при физиологическом pH аминокислотная группа АРА выполняет якорные функции), что, как и при связывании субстрата, приводит к разрыву C=N-двойной связи внутреннего альдимида, образованного карбонильной группой кофермента и аминокислотной группой Lys-69 [63]. Пиридиновый цикл поворачивается, и карбонильная группа PLP оказывается сближенной с аминокислотной группой ингибитора. Однако, в этом случае, в отличие от комплексов PLP-зависимых трансаминазы γ -аминомасляной кислоты [67], аспартаттрансаминазы [68], 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтазы [34], а также пируват-зависимой AdoMetDC [26] с аминокислотными аналогами соответствующих продуктов/субстратов ферментативных реакций, образования оксима фермента в кристалле не наблюдалось – карбонильная группа PLP и аминокислотная группа оказываются «замороженными» на расстоянии $\sim 3 \text{ \AA}$, что соответствует длине водородной связи. Таким образом, в данном случае комплекс ODC–АРА кристаллизуется в конформации, которая не реализуется в растворе, где происходит образование оксима фермента.

АРА представляет собой простейший заряддефицитный аналог путресцина и при физиологическом значении pH существует в форме монокациона. Поскольку происходящее в активном центре спермидинсинтазы (SpdSy) депротонирование концевой аминокислотной группы Put должно предшествовать переносу на нее аминокислотного остатка декарбоксилированного AdoMet, то АРА может рассматриваться как своеобразный аналог монопротонированной формы Put, промежуточно возникающей в активном центре фермента. В случае, если протонирование аминокислотного остатка активного центра не

является crucialным для ферментативной активности, то можно было ожидать, что АРА окажется эффективным конкурентным ингибитором SpdSy. Действительно, АРА обратимо ингибировал ферменты из почек мышей [58] и *P. falciparum* [69] с K_i 3,2 мкМ и K_i 35 мкМ, соответственно.

Активность АРА в культуре клеток исследована существенно подробнее, нежели активности гидроксилламинсодержащих аналогов deAdoMet (см. предыдущий раздел). АРА неустойчив в среде для культивирования клеток и разлагается под действием сывороточных аминооксидаз [70, 71]. Напротив, оксимы АРА с пиридоксалем (PL) и PLP гораздо более стабильны, но АРА-PLP медленно дефосфорилируется [70].

АРА, 2-ОН-АРА и 2-Ф-АРА ингибируют рост ряда опухолевых клеток в концентрациях 0,01–0,1 мМ [64, 65, 72–76]. АРА проникает внутрь клеток почек детенышей хомяка (ВНК) посредством пассивной диффузии, что было показано с использованием [³H]-АРА [77]. Система транспорта Put опухолевых клеток, скорее всего, также не способна идентифицировать АРА в качестве Put. Во всех случаях наблюдается истощение пула Put/Spd и накопление deAdoMet, что типично для ингибиторов ODC. Рост клеток полностью восстанавливается после внесения в культуральную среду Put или Spd. Интересно, что АРА-PL и АРА-PLP в концентрации 0,01 мМ ингибируют биосинтез ДНК в клетках ВНК, т.е. столь же эффективны, как и АРА [70]. Обработка АРА клеток асцита Эрлиха индуцирует биосинтез как AdoMetDC, так и ODC – в последнем случае фермент накапливается в ингибированной форме [75]. Комбинированное воздействие (0,1 мМ каждого) АРА и АМА на клетки Сасо-2 и НТ-29 (злокачественные опухоли прямой кишки человека) приводило к полному ингибированию ODC и AdoMetDC в этих клетках и снижению внутриклеточного пула полиаминов на 77–92% в результате 24 ч инкубации клеток с ингибиторами. Одновременная обработка клеток Сасо-2 при помощи АРА, АМА и 5-фторурацила ингибировала их рост существенно эффективнее, чем в случае использования только 5-фторурацила, или комбинации АРА-АМА [78].

Полиамины играют важную роль в жизненном цикле протозойных паразитов (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei gambiense*), вызывающих весьма распространенные в тропиках и субтропиках заболевания – малярию, лейшманиоз и сонную болезнь, соответственно. Соответственно, поиск метаболических мишеней, перспективных для создания новых средств борьбы с этими болезнетворными паразитами, весьма актуален. Одной из таких мишеней являются ферменты биосинтеза полиаминов, что

обусловлено необходимостью Put и Spd как таковых для размножения паразитов, а также и тем, что Spd входит в состав трипанотиона (Try) (рис. 1), выполняющего многочисленные функции по защите паразита от неблагоприятных внешних воздействий [54]. Одна из сложностей практического применения ингибиторов биосинтеза Spd для лечения протозойных инфекций состоит в том, что Spd жизненно необходим и для клеток хозяина. Тем не менее, DFMO (ингибитор ODC) с успехом используется для лечения поздних стадий сонной болезни, вызываемой *Trypanosoma brucei gambiense* [55].

Среди многочисленных ингибиторов ODC одним из наиболее эффективных является АРА, действующий на изолированный фермент в наноМ концентрациях (табл. 2) и специфически подавляющий рост нормальных и опухолевых клеток. Оказалось, что АРА высокоактивен по отношению к *P.falciparum* (IC_{50} 1 мкМ [64]), а также эффективно подавляет рост промастигот (IC_{50} 42 мкМ [62]) и амастигот (IC_{50} 5 мкМ [62]) *L. donovani*, снижая уровни Put, Spd и Try у этих паразитов. Размножение и *L. donovani* и *P.falciparum*, полностью восстанавливается после добавления в среду Put/Spd, что указывает на специфичность действия ингибитора. Вместе с тем, формы *L. donovani* гиперэкспрессирующие ODC устойчивы к АРА, что также свидетельствует о том, что эффект ингибитора определяется в первую очередь взаимодействием с ODC [62].

Так как АРА пассивно проникает внутрь паразита, то в случае *L. donovani* была предпринята попытка преобразовать АРА в активно транспортирующийся ингибитор/проингибитор – 1-гуанидин-окси-3-аминопропан (GAPA). Этот ингибитор (рис. 4) представляет собой изостер агматина, в котором терминальная гуанидиноксигруппа имеет pK_a 6,71 [79].

Сопоставление активностей АРА и GAPA по отношению к ODC (10^{-9} М и $6 \cdot 10^{-5}$ М, соответственно) и амастиготам *L. donovani* (5 мкМ и 9 мкМ, соответственно) свидетельствует, что GAPA, скорее всего, активно проникает в паразиты и, следовательно, может считаться первым активно-транспортируемым ингибитором ODC [79]. Возможность внутриклеточной трансформации GAPA в АРА (рис. 4) определяется наличием в клетке низкоспецифичных уреидо-гидролаз. Известно, что многие аргиназы способны превращать канаванин в каналин, а некоторые из них способны даже расщеплять Agm до Put [80]. Кроме того, макрофаги, в которых локализована *L. donovani*, обладают агматиназной активностью [81]. Проникнув в *L. donovani*, GAPA подобно АРА вызывает снижение уровня Put и Spd, а экзогенные Put и/или Spd полностью нейтрализуют эффекты ингибитора, что свидетельствует о связи биохимической мишени GAPA с метаболизмом полиаминов.

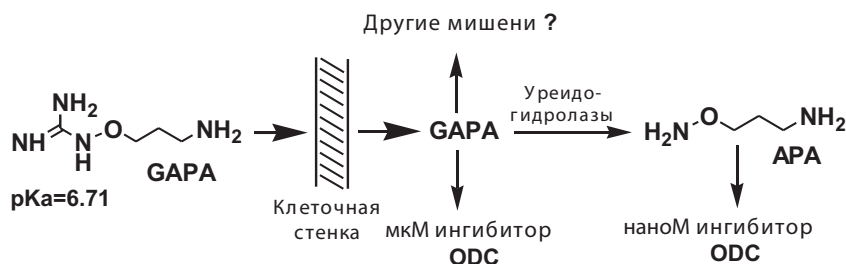


Рис. 4. Возможные механизмы действия GAPA.

Однако GAPA, в отличие от APA, мало влияет на уровень трипанотиона в *L. donovani* [79]. Таким образом, наблюдаемая картина, по-видимому, не может быть описана только в терминах ингибирования ODC под действием GAPA или в результате ее расщепления до APA (рис. 4), а взаимосвязь уровень Spd – уровень Tгу у *L. donovani* может иметь достаточно сложный характер.

Другим принципиальным отличием GAPA от APA и DFMO является его высокая эффективность по отношению к формам *L. donovani*, отличающимся повышенной активностью ODC [82], что, по-видимому, и снижает эффективность APA и DFMO. Таким образом, нельзя исключить, что GAPA имеет еще одну метаболическую мишень, отличную от ODC.

Еще с начала 80-х годов известно, что DFMO обладает выраженной фунгицидной активностью по отношению к *Uromyces phaseoli*, в том числе и в полевых условиях [83]. Исследование влияния APA и DFMO на рост фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav., вызывающего пирикулярриоз (основное заболевания риса во всех рисосеющих районах мира) показало, что оба ингибитора тормозят рост *P. oryzae* в 0,1–1,0 мМ концентрациях [84]. Однако, APA, в противоположность DFMO, обесцвечивал колонии гриба и обычно коричневый или черный мицелий превращался в мелкие бесцветные колонии [84]. Интересно, что рост и окраска мицелия вновь восстанавливалась после добавления Put [84]. Биосинтез меланина у *P. oryzae* начинается с поликонденсации ацетил- и малонил-CoA. Промежуточно возникающий петакетид является предшественником фитотоксичного гептакетида пирикуллола и сциталона, который далее превращается в диоксиафталин (рис. 5). В результате инкубации с APA *P. oryzae* была не способна синтезировать пирикуллол, что указывает на ингибирование ранних стадий биосинтеза меланина – предположительно мультиферментного комплекса, осуществляющего поликонденсацию ацетил- и малонил-CoA [84]. APA, в отличие от

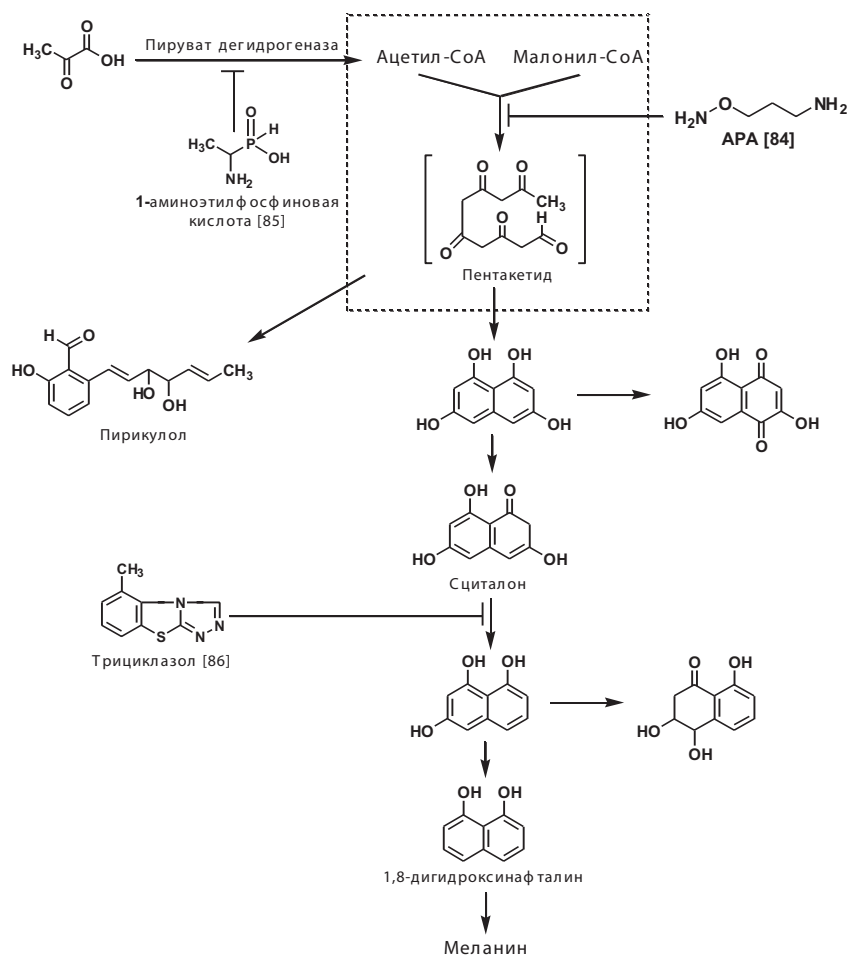


Рис. 5. Регуляторы биосинтеза меланина у фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav.

1-аминоэтилфосфиновой кислоты, не действует на пируватдегидрогеназный комплекс, а ингибирование превращения сциталона в дигидроксинаф талин под действием трициклазола, приводит не к бесцветному, а слегка розоватому мицелию. Эти данные являются первым указанием на возможное участие Put в регуляции пентакетидных биосинтетических путей у микомицетов.

Еще одним примером различий в клеточных эффектах АРА и DFMO может быть их влияние на аппарат Гольджи. Инкубация клеток

ВНК с АРА вызывала изменения аппарата Гольджи и структуры эндоплазматического ретикулума, а инкубация с DFMO – нет [87].

Описаны единичные эксперименты, в которых исследуется противоопухолевая активность АРА и родственных ему гидроксиламинов *in vivo*. Так, 2-F-АРА ингибирует рост клеток карциномы Т24 мочевого пузыря *in vivo* и *in vitro* несколько эффективнее DFMO и АРА [88, 89].

IV. ГИДРОКСИЛАМИН-СОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ СПЕРМИНА И СПЕРМИДИНА

Биохимические свойства Spm, Spd и Put определяются суперпозицией структуры и заряда молекулы, т.е. правильным расположением протонированных при физиологическом значении pH аминокислотных групп. Однако, вклад зарядовой составляющей в активность полиаминов, по сравнению со структурным фактором, исследован мало. Рациональным подходом для изучения роли протонированных аминокислотных групп в функционировании полиаминов является конструирование изостерных «зарядодефицитных» аналогов, в которых pK_a одной или двух аминокислотных групп понижена на несколько порядков по сравнению с аминокислотными группами Spm, Spd и Put. Один из подходов к решению этой задачи заключается в замене остатков гидроксилamina в аминотетраметиленовую цепь полиаминов, что вызывает минимальные стерические изменения. В зависимости от структуры аналога полиаминов значение pK_a концевой аминокислотной группы составляет 3,2–4,5 (рис. 6), что примерно на пять порядков ниже основности соответствующего амина, тогда как pK_a $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ группы составляет уже 2,5–2,7. Таким образом, гидроксиламин-содержащие аналоги полиаминов по своей структуре соответствуют природным прототипам, что дает возможность детально исследовать вклад протонирования аминокислотных групп во взаимодействие Spm и Spd с биологическими мишенями.

Активность гидроксиламинсодержащих аналогов Spd – АОЕ-PU и АР-АРА, в отношении ODC и AdoMetDC была весьма умеренной и сравнима с таковой для простейших *O*-замещенных гидроксиламинов. Так, АОЕ-PU и АР-АРА в концентрации 1 мМ ингибировали активность AdoMetDC на 54% и 70%, соответственно; а в концентрации 0,01 мМ активность ODC на 12% и 20%, соответственно [90].

Гораздо более интересными оказались результаты взаимодействия АОЕ-PU и АР-АРА с SpmSy. АР-АРА представляет собой изостер Spd дважды протонированный по N^1 и N^4 , т.е. моделирует ионное состояние субстрата промежуточно возникающее в активном центре фермента. АОЕ-PU, напротив, моделирует Spd дважды протонированный по N^4 и N^8 и не является аналогом промежуточного соединения.

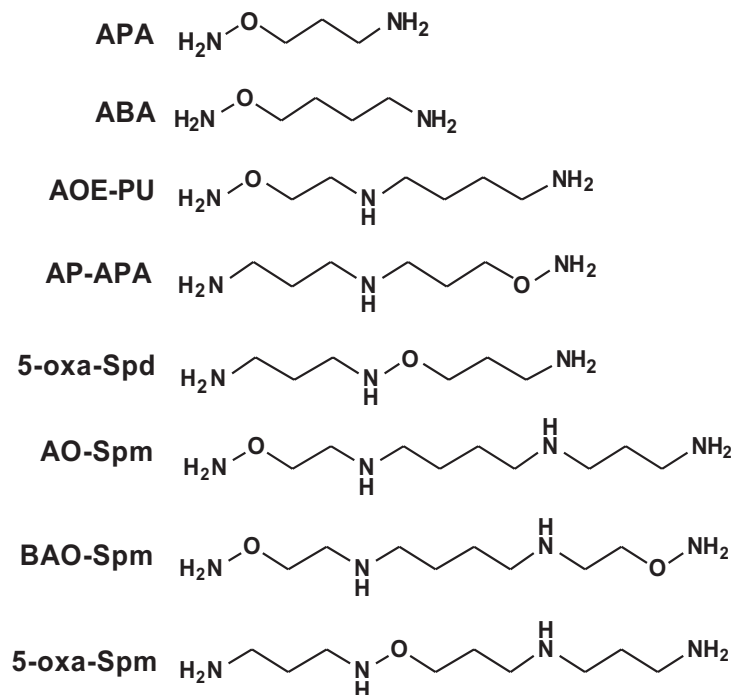


Рис. 6. Структура некоторых аминокси- и оксаналогов полиаминов.

Соответственно, AP-APA оказался в 100 раз активнее AOE-PU, а его сродство к ферменту – в 10 раз выше, чем у субстрата [90]. Эти данные свидетельствуют о том, что AP-APA действительно хорошо моделирует дважды протонированный Spd, который, в соответствии с теорией переходного состояния и должен иметь большее сродство к ферменту по сравнению с существующей в растворе трижды протонированной формой Spd. Более того, AP-APA оказался и субстратом SpmSy, но скорость образования 5-оха-Spm была очень небольшой и ее кинетические параметры не были определены. Низкая скорость аклилирования AP-APA декарбоксилированным AdoMet (фермент осуществляет прямой перенос аминопропильного остатка deAdoMet на аминогруппу Spd) скорее всего, обусловлена тем, что свободная аминогруппа является гораздо лучшим нуклеофилом, по сравнению с H_2NO -группой, а нуклеофильность акцептора представляет собой один из важных скорость-определяющих факторов сперминсинтазной реакции [90].

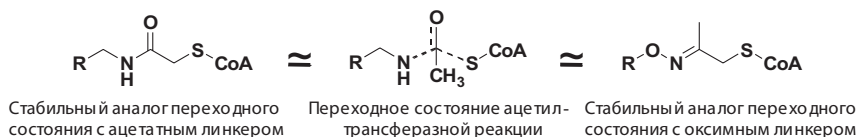


Рис. 7. Моделирование переходного состояния бисубстратного комплекса, возникающего в ходе SSAT-реакции, с помощью конъюгатов CoA-полиамин с ацетатным и ацетоновым линкерами.

Взаимодействие АОЕ-PU и AP-APA с SSAT показало, что оба аналога являются субстратами фермента [90], но эксперименты с клетками ВНК показали, что хотя и АОЕ-PU и AP-APA проникают в клетки, но лишь АОЕ-PU метаболизирует до соответствующего N^1 -ацетильного производного [91].

Поскольку спермин/спермидин-ацетилтрансферазная реакция протекает путём прямого переноса ацетильной группы Ac-CoA на субстрат, то для ингибирования фермента ранее использовались конъюгаты HS-CoA со Spm или Spd, в которых HS-CoA и полиамин были соединены при помощи ацетатного линкера (рис. 7). Синтезированные производные симметричных полиаминов ингибировали изолированный фермент с IC_{50} 0,5–5,0 мкМ в зависимости от строения полиаминного фрагмента [92]. Для получения конъюгатов SH-CoA, а также *D*-пантетеина, избирательно по N^1 - или N^8 -положениям Spd позднее был разработан достаточно сложный многостадийный синтез [93].

Располагая набором аминоксиданалогов Spm и Spd (рис. 6), которые представляют собой не только зарядодефицитные изостерные аналоги полиаминов, но являются еще и классическими карбонильными реагентами, естественным представлялось использовать различия в реакционной способности H_2NO - и H_2N -групп для получения конъюгатов CoA-полиамин [94, 95]. Наиболее активным в этом ряду оказалось соединение моделирующее аддукт по N^8 -положению Spd (IC_{50} 1 мкМ), тогда как соединение, моделирующее N^1 -замещенный Spd, было не столь эффективным (IC_{50} 6 мкМ) [94, 95]. Конъюгат AP-APA и HS-CoA с ацетоновым линкером был в 22 раза активнее исходного кетона, что подтверждает вклад полиаминного фрагмента в эффективность торможения SSAT. Вклад аденозинового фрагмента CoA в ингибирование фермента был определяющим, что следует из низкой активности ($IC_{50} > 100 \mu M$) пантетеиновых производных. Подобная зависимость активности от строения ингибитора *a priori* была неочевидной, т.к. известно, что в случае сукцинил-CoA-ацетоацетаттрансферазы пантетеиновая часть субстрата вносит значительный вклад в эффективность связывания субстрата [96].

Из других данных по взаимодействию аминоксианалогов полиаминов с ферментами их метаболизма можно выделить субстратные свойства N^1 -Ас-АОЕ-PU в АРАО-реакции (k_{cat} 0.54 сек⁻¹) [97], и субстратные свойства АО-Spm (рис. 6) по отношению к SSAT из клеток опухоли прямой кишки (Caco-2) – K_M составляла 2.2 мМ [73].

АР-АРА и АОЕ-PU неустойчивы в среде для культивирования клеток и подобно АРА окисляется под действием сывороточных аминоксидаз [71]. Эти аналоги Spd ингибируют рост клеток L1210 существенно эффективнее, чем клеток ВНК [74, 91]. Напротив, АО-Spm не ингибирует рост клеток Caco-2 [73] и ВНК [74], но тормозит рост клеток L1210 [74]. Удивительно, но АО-Spm восстанавливал рост клеток ВНК, обработанных АРА [98], то есть один *O*-замещенный гидроксилламин обращал ростингибирующие свойства другого (АРА). По-видимому, АО-Spm ацетируется в клетках ВНК, подобно происходящему в клетках Caco-2 [73], а катализируемое АРАО расщепление *моно*-ацетильного производного АО-Spm приводит к образованию Spd.

Изостерные аналоги Spd – АОЕ-PU и АР-АРА по-разному взаимодействовали с NMDA рецептором. АР-АРА был антагонистом, а АОЕ-PU – агонистом, что можно рассматривать в качестве прямого указания на функциональную неэквивалентность терминальных аминоксирупп Spd в комплексе с NMDA рецептором [99].

Таким образом, аминоксианалогов Spd оказались полезным инструментом исследования ферментов метаболизма полиаминов и их использование еще раз продемонстрировало функциональную неэквивалентность концевых аминоксирупп Spd.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные гидроксилламина занимают важное место среди ингибиторов и химических регуляторов активности ферментов метаболизма полиаминов. В рамках этого класса химических соединений удалось одновременно создать необратимые ингибиторы карбонил-зависимых AdoMetDC и ODC, действующие на изолированные ферменты в наномолярных концентрациях; эффективные ингибиторы SSAT, SpdSy и SpmSy; эффекторы транспорта полиаминов; а также оригинальный проингибитор ODC. Используя производные гидроксилламина, были получены значимые для биохимии полиаминов данные о роли и функциях Spm и Spd в метаболизме клетки, а также о регуляторных механизмах, контролируемых биосинтез и деградацию короткоживущих ODC, AdoMetDC и SSAT, согласованная работа которых обеспечивает поддержание гомеостаза полиаминов в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van Leeuwenhoek, A.* (1678) *Philos. Trans. R. Soc. London*, **12**, 1040–1043.
2. *Dudley, H.W., Rosenheim, M.C., Rosenheim, O.* (1924) *Biochem. J.*, **18**, 1263–1272.
3. *Russell, D., Snyder, S.H.* (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 1420–1427.
4. *Jänne, J., Raina, A.* (1968) *Acta Chem. Scand.*, **22**, 1349–1351.
5. *Russell, D.H.* (1973) *Polyamines in Normal and Neoplastic Growth*, New York: Raven Press, 287 p.
6. *Cohen, S.S.* (1998) *A guide to the polyamines*. New York.: Oxford University Press. 565 p.
7. *Pegg, A.E., Casero, R.A.* (2011) In: *Polyamines: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, **720**, 3–35.
8. *Rosenthal, S.M., Tabor, C.W.* (1956) *J. Pharm. Exp. Ther.*, **116**, 131–138.
9. *Casero, R.A., Marton, L.J.* (2007) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 373–390.
10. *Kahana, C.* (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2479–2488.
11. *Coffino, Ph.* (2001) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 188–194.
12. *Kurian, L., Palanimurugan, R., Godderz, D., Dohmen, R.J.* (2011) *Nature*, **477**, 490–494.
13. *Seiler, N.* (2003) *Curr. Drug Targets.*, **4**, 537–564.
14. *Wallace, H.M., Fraser, A.V., Hughes A.* (2003) *Biochem. J.*, **376**, 1–14.
15. *Wallace, H.M., Fraser, A.V.* (2004) *Amino Acids*, **26**, 353–365.
16. *Casero, R.A., Woster, P.M.* (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 1–26.
17. *Casero, R.A., Woster, P.M.* (2009) *J. Med. Chem.*, **52**, 4551–4573.
18. *Wallace, H.M.* (2007) *Expert. Opin. Pharmacother.*, **8**, 2109–2116.
19. *Birkholz, L.-M., Williams, M., Niemand, J., Louw, A.I., Persson, L., Heby, O.* (2011) *Biochem. J.*, **438**, 229–244.
20. *Pegg, A.E., McCann, P.P.* (1992) *Pharmacol. Ther.*, **56**, 359–377.
21. *Хомутов Р.М., Завалова Л.Л., Сырку В.И., Артамонова Е.Ю., Хомутов А.Р.* (1983) *Биоорг. Химия*, **9**, 130–131.
22. *Артамонова Е.Ю., Хомутов А.Р., Завалова Л.Л., Хомутов Р.М.* (1986) *Биоорг. Химия*, **12**, 206–212.
23. *Kramer, D.L., Khomutov, R.M., Bukin, Yu.V., Khomutov, A.R., Porter, C.W.* (1989) *Biochem. J.*, **259**, 325–331.
24. *Kolb, M., Barth, J.* (1985) *Liebigs Ann. Chem.*, 1036–1040.
25. *Pegg, A.E., Jones, D.B., Secrist III, J.A.* (1988) *Biochemistry*, **27**, 1408–1415.
26. *McCloskey, D.E., Bale, S., Secrist 3rd, J.A., Tiwari, A., Moss 3rd, T.H., Valiyaveetil, J., Brooks, W.H., Guida, W.C., Pegg, A.E., Ealick, S.E.* (2009) *J. Med. Chem.*, **52**, 1388–1407.
27. *Wu, Y.Q., Woster, P.M.* (1993) *Bioorg. Med. Chem.*, **1**, 349–360.
28. *Wu Y.Q., Woster, P.M.* (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1125–1133.
29. *Guo, J.Q., Wu, Y.Q., Donna Rattendi, D., Cyrus, J. Bacchi, J.C., Woster, P.M.* (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 1770–1777.
30. *Kitz, R., Wilson, I.B.* (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 3245–3249.
31. *Pegg, A.E.* (1983) *Methods Enzymol.*, **94**, 239–247.
32. *Pegg, A.E.* (1984) *Cell Biochem. Funct.*, **2**, 11–15.
33. *Wetkamp, E.L.C., Dixon, H.B.F., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M.* (1991) *Biochem. J.*, **277**, 643–645.
34. *Capitani, G., Eliot, A.C., Gut, H., Khomutov, R.M., Kirsch, J.F., Grutter, M.G.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1647**, 55–60.

35. Anton, D.L., Kutney, R. (1987) *Biochemistry*, **26**, 6444–6447.
36. Diaz, E., Anton, D.L. (1991) *Biochemistry*, **30**, 4078–4081.
37. Li, Y.-F., Hess, S., Pannell, L.K., Tabor, C.W., Tabor, H. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **98**, 10578–10583.
38. Pankaskie, M., Abdel-Monem, M.M. (1980) *J. Med. Chem.*, **23**, 121–127.
39. Хомутов, М.А. (2012) Новые биологически активные эфиры гидроксилamina и С-метилованные аналоги полиаминов: Дисс. канд. хим. наук. М.: Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, 147 с.
40. O'Leary, M.H., Banghin, R.L. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 7168–7173.
41. Parsons, I.D., Persson, B., Mekhalifa, A., Blackburn, G.M., Stockley, P.G. (1995) *Nucl. Acids Res.*, **23**, 211–216.
42. Shantz, L.M., Stanley, B.A., Secrist III, J.A., Pegg, A.E. (1992) *Biochemistry*, **31**, 6848–6855.
43. Wickner, R.B., Tabor, C.W., Tabor, H. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 2132–2139.
44. Tolbert, D.W., Ekstrom, J.L., Mathews, I.I., Secrist III, J.A., Kapoor, P., Pegg, A.E., Ealick, S.E. (2001) *Biochemistry*, **40**, 9484–9494.
45. Danzin, C., Marchal, P., Casara, P. (1990) *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1499–1503.
46. Wu, Y., Woster, P.M. (1992) *J. Med. Chem.*, **35**, 3196–3201.
47. Casara, P., Marchal, P., Wagner, J., Danzin, C. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9111–9113.
48. Antelli, R., Stjernborg, L., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Persson, L. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **196**, 551–556.
49. Kramer, D.L., Miller, J.M., Bergeron, R.J., Khomutov, R.M., Khomutov, A.R., Porter, C.W. (1993) *J. Cell. Physiol.*, **155**, 399–407.
50. Madhubala, R., Secrist III, J.A., Pegg, A.E. (1988) *Biochem. J.*, **254**, 45–50.
51. McCann, P.P., Pegg, A.E. (1992) *Pharmacol. Ther.*, **54**, 195–215.
52. Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M.J., Casara, J., Vever, J.P. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2551–2553.
53. Raul, F. (2007) *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 353–355.
54. Heby, O., Persson, L., Rentala, M. (2007) *Amino Acids*, **33**, 359–366.
55. Burri, C.C., Brun, R. (2003) *Parasitol. Res.*, **90**, 49–52.
56. Shapiro, J., Lui, H. (2001) *Skin. Ther. Lett.*, **6**, 1–3.
57. Babbar, N., Gerner, E.W. (2011) *Recent Results Cancer Res.*, **188**, 49–64.
58. Khomutov, R.M., Hyvonen, T., Karvonen, E., Kauppinen, L., Paalanen, T., Paulin, L., Eloranta, T., Pajula, R.L., Andersson, L.C., Poso, H. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 596–602.
59. Хомутов Р.М., Денисова Г.Ф., Хомутов А.Р., Белостоцкая К.М., Шлошман Р.Б., Артамонова Е.Ю. (1985) *Биоорган. Химия*, **11**, 1574–1576.
60. Weisell, J.M. (2012) Structure and function of charge deficient polyamines: *Ph.D. Thesis*, Kuopio, University of Eastern Finland, 103 p.
61. Weisell, J., Hyvonen, M.T., Alhonen, L., Vepsalainen, J., Keinanen, T.A., Khomutov, A.R. (2013) *Curr. Pharm. Des.*, May 16 [Epub ahead of print].
62. Singh, S., Mukherjee, A., Khomutov, A.R., Persson, L., Heby, O., Chatterjee, M., Madhubala, R. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 528–534.
63. Dufe, V.T., Ingner, D., Heby, O., Khomutov, A.R., Persson, L., Al-Karadaghi, S. (2007) *Biochem. J.*, **405**, 261–268.

64. DasGupta, R., Krause-Ihle, T., Bergmann, B., Muller, I.B., Khomutov, A.R., Muller, S., Walter, R.D., Lueresen, K. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2857–2864.
65. Stanek, J., Frei, J., Mett, H., Schneider, P., Regenass, U. (1992) *J. Med. Chem.*, **35**, 1339–1344.
66. Birkholtz, L.-M., Joubert, F., Neitz, A.W.H., Louw, A.I. (2003) *Protein Struct. Funct. Genet.*, **50**, 464–473.
67. Liu, W., Peterson, P.E., Carter, R.J., Zhou, X., Langston, J.A., Fisher, A.J., Toney, M.D. (2004) *Biochemistry*, **43**, 10896–10905.
68. Markovic-Housley, Z., Schirmer, T., Hohenester, E., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Karpeisky, M.Ya., Sandmeier, E., Christen, Ph., Jansoni, J.N. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1025–1032.
69. Haider, N., Eschbach, M.L., Dias, Sde S., Gilberger, T.W., Walter, R.D., Liersen, K. (2005) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **142**, 224–236.
70. Keinänen, T.A., Hyvönen, T., Pankaskie, M.C., Vepsäläinen, J.J., Eloranta, T.O. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)*, **116**, 1056–1062.
71. Hyvönen, T., Keinänen, T.A., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Eloranta, T.O. (1992) *J. Chromatogr.*, **574**, 17–21.
72. Poulin, R., Secrist III, J.A., Pegg, A.E. (1989) *Biochem. J.*, **263**, 215–221.
73. Turchanowa, L., Shvetsov, A.S., Demin, A.V., Khomutov, A.R., Wallace, H.M., Stein, J., Milovic, V. (2002) *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 649–655.
74. Хомутов А.Р., Швецов А.С., Венсалайнен Й., Крамер Д.Л., Хивонен Т., Кейнанен Т., Элоранта Т.О., Портер К.В., Хомутов Р.М. (1996) *Биорган. Химия*, **22**, 557–559.
75. Persson, L., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M. (1989) *Biochem. J.*, **257**, 929–931.
76. Hyvönen, T., Alakuijala, L., Andersson, L., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Eloranta, T. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 11138–11144.
77. Hyvönen, T., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Lapinjoki, S., Eloranta, T.O. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, **107**, 817–820.
78. Milovic, V., Turchanowa, L., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Caspary, W.F., Stein, J. (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 199–206.
79. Singh, S., Jhingran, A., Sharma, A., Simonian, A.R., Soininen, P., Vepsäläinen, J., Khomutov, A.R., Madhubala, R. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 168–172.
80. Dabir, S., Dabir, S., Somranshi, B. (2005) *Int. J. Biol. Sci.*, **1**, 114–122.
81. Sastre M., Galea, E., Feinstein, D., Reis, D.J., Regunathan, S. (1998) *Biochem. J.*, **330**, 1405–1409.
82. Khomutov, M.A., Mandal, S., Weisell, J., Saxena, N., Simonian, A.R., Vepsäläinen, J., Madhubala, R., Kochetkov, S.N. (2010) *Amino Acids*, **38**, 509–517.
83. Rajam, M.V., Weinstein, L.H., Gals-ton, A.W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6874–6878.
84. Хомутов А.Р., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С., Хомутов Р.М. (1989) *Биорган. Химия*, **15**, 707–709.
85. Хомутов Р.М., Хурс Е.Н., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С. (1989) *Биорган. Химия*, **13**, 1422–1424.
86. Yamaguchi, I. (1982) *J. Pestic. Sci.*, **7**, 307–316.
87. Parkkinen, J.J., Lammi, M.J., Ågren, U., Tammi, M., Keinänen, T.A., Hyvönen, T., Eloranta, T.O. (1997) *J. Cell. Biochem.*, **66**, 165–174.
88. Mett, H., Stanek, J., Lopez-Ballester, J.A., Jänne, J., Alhonen, L., Sinervirta, R., Frei, J., Regenass, U. (1993)

- Cancer Chemother. Pharmacol., **32**, 39–45.
89. *Frei, J., Stanek, J.*, (1997) United States Patent US005610195A.
90. *Eloranta, T.O., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Hyvonen, T.* (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**, 593–598.
91. *Hyvonen, T., Keinanen, T.A., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Eloranta, T.O.* (1995) *Life Sciences*, **56**, 349–360.
92. *Ervin, B.G., Persson, L., Pegg, A.E.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 4250–4255.
93. *Roblot, G., Wylde, R., Martin, A., Parello, J.* (1993) *Tetrahedron*, **29**, 6381–6398.
94. *Simonian, A., Khomutov, A., Hyvonen, T., Grigorenko, N., Keinanen, T., Vepsalainen, J., Alhonen, L., Janne, J.* (2007) *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **26**, 1245–1248.
95. *Кейнанен Т.А., Хивонен Т., Вепсалайнен Й., Алхонен Л., Хомутов А.Р., Янне Ю.* (2014) *Биоорганическая химия*, **40** (в печати).
96. *Fierke, C.A., Jencks, W.P.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 7603–7606.
97. *Jarvinen, A.J., Cerrada-Gimenez, M., Grigorenko, N.A., Khomutov, A.R., Vepsalainen, J.J., Sinervirta, R.M., Keinanen, T.A., Alhonen, L.I., Janne, J.E.* (2006) *J. Med. Chem.*, **49**, 399–406.
98. *T.A.Keinanen*, unpublished data.
99. *Berger, M.L., Khomutov, A.R., Rebernik, P.* (1996) *Neuro. Sci. Lett.*, **203**, 25–28.