УДК 577.152.313+544.135

КАЛІКС[4]АРЕНМЕТИЛЕНБІСФОСФОНОВІ КИСЛОТИ ЯК ІНГІБІТОРИ КИСЛИХ ФОСФАТАЗ

І.М.Міщенко, С.О.Черенок*, О.В.Музичка, А.І.Вовк, В.І.Кальченко*, В.П.Кухар

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: vovk@bpci.kiev.ua
* Інститут органічної хімії НАН України

Ключові слова: кисла фосфатаза; метиленбісфосфонова кислота; калікс[4]арен; інгібування

Досліджено інгібування кислої фосфатази з простати людини і кислої фосфатази з зародків пшениці калікс[4]аренами, функціоналізованими на верхньому ободі макроциклу одним або двома залишками метиленбісфосфонової кислоти. Аналіз кінетичних даних показав, що вплив макроциклічних інгібіторів на активність ферменту значно перевищує дію метиленбісфосфонової кислоти.

CALIX[4]ARENEMETHYLENEBISPHOSPHONIC ACIDS AS INHIBITORS OF ACID PHOSPHATASES
I.N.Mishchenko, S.A.Cherenok, O.V.Muzychka, A.I.Vovk, V.I.Kalchenko, V.P.Kukhar
The inhibition of human prostatic acid phosphatase and wheat germ acid phosphatase by calix[4]arenes functionalysed at the macrocyclic upper rim with one or two methylenebisphosphonic acid groups has been investigated. The analysis of kinetic data has shown that effect of macrocyclic inhibitors on the enzyme's activity considerably exceeds the action of methylenebisphosphonic acid.

КАЛИКС[4]АРЕНМЕТИЛЕНБИСФОСФОНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ИНГИБИТОРЫ КИСЛЫХ ФОСФАТАЗ
И.Н.Мищенко, С.А.Черенок, О.В.Музычка, А.И.Вовк, В.И.Кальченко, В.П.Кухарь
Изучено ингибирование кислой фосфатазы из простаты человека и кислой фосфатазы из зародков пшеницы каликс[4]аренами, функционализированными на верхнем ободе макроцикла остатками метиленбисфосфоновой кислоты. Анализ кинетических данных показал, что влияние макроциклических ингибиторов на активность фермента значительно превышает действие метиленбисфосфоновой кислоты.

Кислі фосфатази з мікроорганізмів, рослин і тканин ссавців (оптимум pH в інтервалі від 4 до 7) каталізують гідроліз моноалкілфосфатів до відповідних спиртів і неорганічного фосфату та реакцію трансфосфорилювання. Незважаючи на функціональну ідентичність, кислі фосфатази з різних джерел мають значні відмінності в амінокислотному складі, молекулярній масі, організації активного центру і можуть проявляти різні властивості, в тому числі по відношенню до інгібіторів [1, 2, 3]. Високомолекулярні кислі фосфатази є гістидиновими ферментами, що в процесі каталізу формують фосфамідний інтермедіат [4].

Кислі фосфатази з рослинних джерел на певних етапах росту і розвитку рослин забезпечують накопичення та обмін неорганічного фосфату. З зародків пшениці ізольовано шість ізоензимів кислої фосфатази, які характеризуються одним оптимумом pH та однаковою спорідненістю до ряду субстратів, за виключенням фосфотирозину [3, 5].

Однією з найбільш вивчених серед кислих фосфатаз з тканин ссавців є фермент з простати. Встановлено кристалічну структуру простатичної кислої фосфатази у комплексі з L-тартратом, неорганічним фосфатом та α-бензиламінобензилфосфоновою кислотою [6, 7, 8]. Кисла фосфатаза з простати людини характеризується широкою субстратною специфічністю і здатна також гідролізувати фосфорильовані амінокислотні залишки специфічних тирозинкіназ [9, 10]. Було показано, що в ізольованих кісткових клітинах простатична кисла фосфатаза стимулює синтез лужної фосфатази [11]. Зростання активності кислих і лужних фосфатаз в організмі людини свідчить про розвиток ряду патологій [2, 10].

Пошук нових інгібіторів неспецифічних кислих і лужних фосфатаз значною мірою спрямований на вивчення синтетичних фосфорорганічних сполук. Раніше було встановлено, що похідні амінофосфонових кислот ефективно інгібують активність кислої фосфатази з простати людини [12]. Інгібуюча дія амінофосфонових кислот на активність металозалежних лужних фосфатаз є незначною, проте біфункціональні похідні фос-

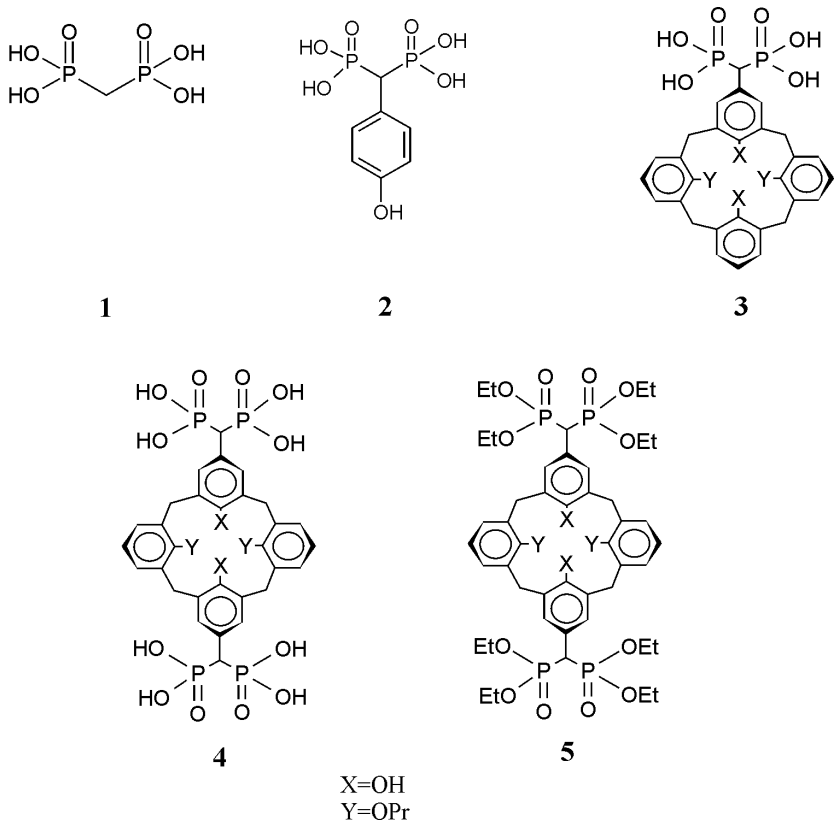

Схема 1

фонових кислот, що вміщують меркаптогрупу, можуть значно пригнічувати гідроліз моноалкілфосфатів у присутності цих ферментів [13]. Запропонований нами підхід до дизайну потенційних інгібіторів лужних фосфатаз полягав у ковалентному приєднанні фрагменту відомого інгібітора — метиленбісфосфонової кислоти — до макроциклічної платформи калікс[4]арену. Вибір метиленбісфосфонової кислоти був зроблений з огляду на те, що ця сполука або її похідні входять до складу деяких медичних препаратів (аледронат, памідронат, золедронова кислота та інші). Виявилося, що за рахунок "каліксаренового ефекту" вплив модифікованих метиленбісфосфонових кислот на активність лужної фосфатази з кишок теляти значно перевищував інгібування цього ферменту метиленбісфосфоновою кислотою [14].

Метою цієї роботи було вивчення "каліксаренового ефекту" в процесі інгібування неспецифічних кислих фосфатаз метиленбісфосфоновими кислотами. Нами представлені результати порівняльного аналізу інгібування кислих фосфатаз з простати людини і зародків пшениці метиленбісфосфоновою кислотою 1, 4-гідроксифенілметиленбісфосфоновою кислотою 2, калікс[4]аренметиленбісфосфоновою кислотою 3, калікс[4]аренбісметиленбісфосфоновою кислотою 4 та етиловим естером калікс[4]аренбісметиленбісфосфонової кислоти 5 (схема 1).

Вплив фосфорорганічних інгібіторів на активність кислих фосфатаз досліджували, вивчаючи кінетику ферментативного гідролізу α-нафтилфосфату [15]. Про оборотність інгібуючої дії сполук 1-5 свідчило відновлення активності ферменту після розбавлення реакційної суміші. Залишкову активність неспецифічних фосфатаз розраховували в процентах за співвідношенням швидкостей накопичення α-нафтолу без інгібітора в середовищі інкубації і за його наявності (від 1 мкмоль/л до 50 мкмоль/л для кислої фосфатази з зародків пшениці і від 0,5 мкмоль/л до 150 мкмоль/л для ферменту з простати людини). Аналіз залежностей залишкової активності від концентрації інгібіторів (рис.) вказує на те, що за умов дослідів метиленбісфосфонова кислота мало впливає на активність кислих фосфатаз. Вплив 4-гідроксифенілметиленбісфосфонової кислоти 2 у порівнянні з дією сполуки 1 є відчутнішим для ферменту з зародків пшениці і не проявляється для кислої фосфатази з простати. У присутності калікс[4]аренметиленбісфосфонової кислоти 3 суттєво знижується швидкість ферментативної реакції, що її каталізує простатична кисла фосфатаза. Ефективність інгібування обох ферментів зростає при подальшому введенні в структуру макроциклу двох залишків метиленбісфосфонової кислоти (сполука 4). Очевидно, інгібуючий вплив фосфорильованих калікс[4]аренів 3 і 4 пов'язаний передусім з наявністю гідроксифосфорильних залишків, бо етиловий естер 5 не спричиняє змін у активності кислих фосфатаз. При цьому зростання інгібування в присутності сполуки 4 (рис. 1) може бути наслідком впливу двох фрагментів метиленбісфосфонової кислоти, що одночасно зв'язуються

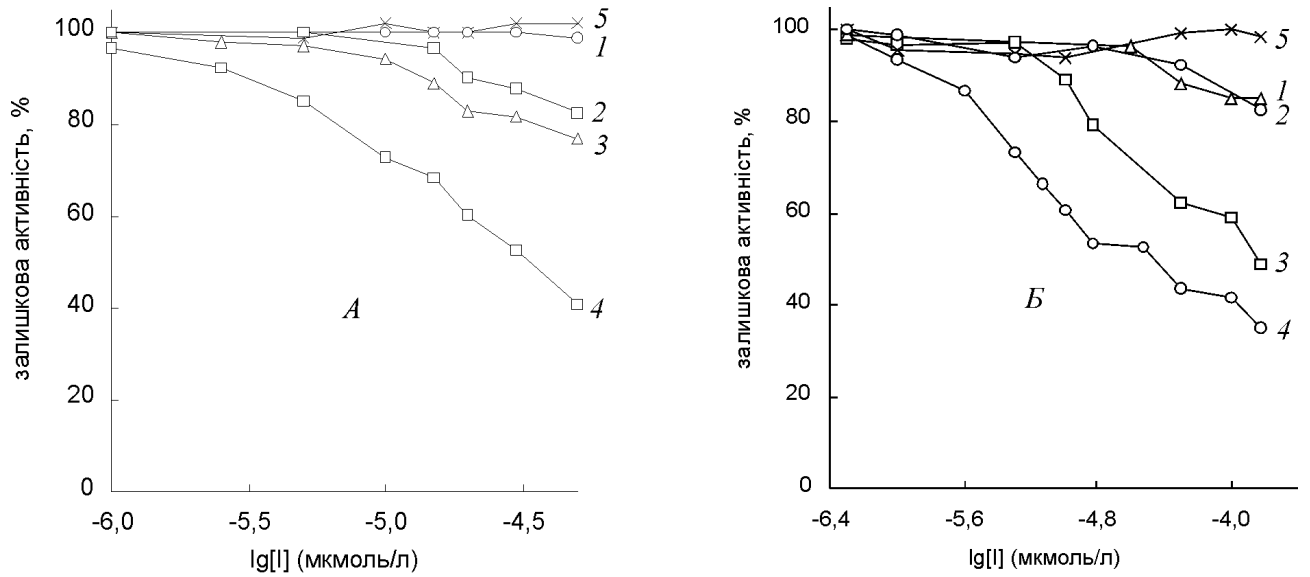

Рис. Інгібування гідролізу α-нафтилфосфату (початкова концентрація 2 ммоль/л) в присутності кислої фосфатази з зародків пшениці (А) і кислої фосфатази з простати людини (Б) метиленбісфосфоновою кислотою (1), 4-гідроксифенілметиленбісфосфоновою кислотою (2), 5-біс(дигідроксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс[4]ареном (3), 5,17-біс[біс(дигідроксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс[4]ареном (4) і 5,17-біс[біс(діетоксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс[4]ареном (5).

різними катіонними групами амінокислотних залишків, а також ролі ліпофільної каліксаренової платформи, що підсилює дію інгібітора за рахунок гідрофобних взаємодій в активному центрі ферменту.

Кінетичні дослідження показали, що вплив метиленбісфосфонової кислоти на активність кислої фосфатази з зародків пшениці описується закономірностями конкурентного інгібування. Константа інгібування (5,6±0,5 ммоль/л), яка була розрахована з залежностей Лайнуівера-Берка при різних концентраціях інгібітора, свідчить про те, що спорідненість ферменту до метиленбісфосфонової кислоти є значно меншою, ніж спорідненість до α-нафтилфосфату (K_m=0,47±0,09 ммоль/л). Разом з тим, при дії калікс[4]аренбісметиленбісфосфонової кислоти 4 відбувається як збільшення значення уявної константи Міхаеліса, так і зменшення максимальної швидкості ферментативної реакції. Розраховані значення констант змішаного інгібування K_I і K_I', що характеризують рівновагу на стадіях утворення комплексів EI і EIS (схема 2), складають 6,9±1,8 мкмоль/л і 22,7±7,8 мкмоль/л, відповідно.

Можливий механізм перетворень, які їх каталізують кислі фосфатази, включає декілька стадій, в тому числі утворення ковалентного фермент-фосфатного комплексу, його гідроліз і вивільнення неорганічного фосфату [4, 6]. Відповідно до наведених вище результатів при переході

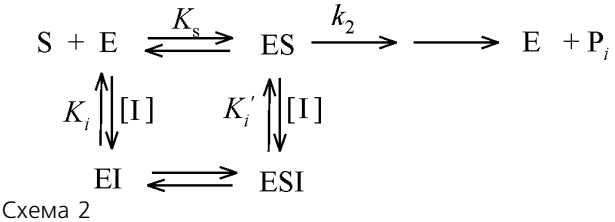

Схема 2

від метиленбісфосфонової кислоти до її структурного макроциклічного аналога конкурентний тип інгібування кислої фосфатази з утворенням комплексу EI змінюється змішаним з формуванням комплексів EI та ESI. Тобто, макроциклічний інгібітор не тільки знижує спорідненість фермента до субстрату, але й блокує розпад комплексу фермент-субстрат. При цьому константа дисоціації комплексу, утвореного кислою фосфатазою з зародків пшениці і макроциклом 4, приблизно на три порядки нижча від константи дисоціації комплексу ферменту з метиленбісфосфоновою кислотою. Слід зазначити, що механізм інгібування простатичної кислої фосфатази калікс[4]аренметиленбісфосфоновими кислотами може ускладнюватись, так як фермент здатний зв'язувати α-нафтилфосфат кооперативно. Позитивна кооперативність простатичної кислої фосфатази стосовно субстрату залежить від концентрації ферменту і характеризується коефіцієнтом Хілла в межах від 1,7 до 3,6 [15]. Тому фіксація фосфонової кислоти як аналога субстрату може відбуватися на декількох ділянках олігомерних різновидів кислої фосфатази.

Таким чином, ковалентне приєднання метиленбісфосфонової кислоти до ліпофільної макроциклічної платформи калікс[4]арену значно підсилює дію фосфорорганічного інгібітора на активність не тільки лужної [14], а й кислих фосфатаз. Гальмування активності кислої фосфатази з простати людини зростає при переході від модельної сполуки 2 до макроциклічних інгібіторів 3 та 4.

Експериментальна частина

У роботі використовували кислу фосфатазу з зародків пшениці з активністю 0,17 U/mg (Serva),

кислу фосфатазу з простати людини з активністю 40 U/mg (Sigma), α-нафтилфосфат (Fluka), метиленбісфосфонову кислоту (Sigma). 4-Гідроксифенілметиленбісфосфонова кислота (2), 5-біс(дигідроксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс [4]арен (3), 5,17-біс[біс(дигідроксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс[4]арен (4) і 5,17-біс [біс(диетоксифосфорил)метил]-25,27-дипропоксикалікс[4]арен (5) були синтезовані, як описано раніше [14]. З метою збільшення розчинності калікс[4]аренбісметиленбісфосфонової кислоти використовували її тетранатрієву сіль, отриману переосадженням сполуки 4 зі спиртового розчину еквівалентною кількістю гідроксиду натрію. Кінетику інгібування кислої фосфатази з зародків пшениці сполуками 1 і 4 досліджували в натрій-ацетатному буфері (0,038 моль/л, pH 5,5). В інших дослідах (рис. А) реакційна суміш вміщувала також 0,02% детергент Lubrol PX. Інгібування кислої фосфатази з простати людини (рис. Б) досліджували в присутності 0,02% Lubrol PX в натрій-ацетатному буфері (0,05 моль/л, pH 4,8). Реакцію розпочинали додаванням ферменту. Швидкість гідролізу α-нафтилфосфату контролювали при 25°C на спектрофотометрі Specord M-40 за зміною оптичної густини розчину при 320 нм (молярний коефіцієнт екстинції α-нафтолу 2600 (моль/л)$^{-1}$см$^{-1}$) [15].

Висновки

Нові підходи до дизайну інгібіторів неспецифічних фосфатаз можуть включати ковалентне приєднання залишків метиленбісфосфонової кислоти до верхнього ободу калікс[4]арену. Зростання інгібуючого впливу калікс[4]аренметиленбісфосфонових кислот у порівнянні з дією метиленбісфосфонової кислоти вказує на перспективність подальших досліджень "каліксаренового ефекту".

Література

1. Kostreva D., Wyss M., D'Arsy A., van Loon A.P.G.M. // J. Mol. Biol. — 1999. — Vol. 288. — P. 965-974.
2. Bull H., Murrau P.G., Thomas D. et al. // J. Clin. Pathol: Mol. Pathol. — 2002. — Vol. 55. — P. 65-72.
3. Van Etten R.L., Waymack P.P. // Arch. Biochem. Biophys. — 1991. — Vol. 288, №2. — P. 634-645.
4. Lindqvist Y., Schneider G., Vihko P. // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268, №28. — P. 20744-20746.
5. Kawarasaki Y., Nakano H., Yamane T. // Plant Science. — 1996. — Vol. 119. — P. 67-77.
6. LaCount M.W., Handy G., Lebioda L. // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273, №46. — P. 30406-30409.
7. Ortlund E., LaCount M.W., Lebioda L. // Biochemistry. — 2003. — Vol. 42, №2. — P. 383-389.
8. Lindqvist Y., Schneider G., Vihko P. // Eur. J. Biochem. — 1994. — Vol. 221, №1. — P. 139-142.
9. Luchter-Wasylevska E., Wasylevski M., Rohm K.-H. // J. Protein Chem. — 2003. — Vol. 22, №3. — P. 243-247.
10. Zhang X.Q., Lee M.S., Zelivianski, Lin M.F. // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, №4. — P. 2544-2550.
11. Ishibe M., Rosier R.N., Puzas J.E. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1991. — Vol. 73, №4. — P. 785-792.
12. Beers S.A., Schwender C.F., Loughney D.A. et al. // J. Bioorg. Med. Chem. — 1996. — Vol. 4, №10. — P. 1693-1701.
13. Myers J.K., Antonelli S.M., Widlanski T.S. // J. Am. Chem. Soc. — 1997. — Vol. 119, №13. — P. 3163-3164.
14. Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A. et al. // Org. Biomol. Chem. — 2004. — Vol. 2, №20. — P. 3162-3166.
15. Luchter-Wasylevska E. // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — Vol. 1548. — P. 257-264.

Надійшла до редакції 05.05.2005 р.