

УДК 577.29+547.415.577

## ***Leishmania donovani*: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ УЗНАВАНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ СПЕРМИДИНА В КАЧЕСТВЕ ПРИРОДНОГО ПОЛИАМИНА**

© 2011 г. S. Mandal<sup>1</sup>, М. А. Хомутов<sup>2\*</sup>, А. Р. Симонян<sup>2</sup>, С. Н. Кочетков<sup>2</sup>, R. Madhubala<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, 110067, India

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 27.01.2011 г.

Принята к печати 15.02.2011 г.

Исследована способность  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\omega$ -метилированных производных спермидина восстанавливать рост промастигот *L. donovani* с истощенным в результате ингибирования орнитиндекарбоксилазы пулом спермидина и путресцина. Показано, что только  $\beta$ -метилспермидин, подобно природному спермидину, способен восстанавливать рост *L. donovani*, тогда как три остальные C-метилированные производные спермидина, включая и  $\alpha$ -метилспермидин, неактивны. Учитывая, что  $\alpha$ -метилспермидин заменяет спермидин *in vivo* и *in vitro*, этот аналог можно рассматривать в качестве своеобразного антидота в системе хозяин–паразит при использовании ингибиторов биосинтеза полиаминов для терапии лейшманиоза.

**Ключевые слова:** спермидин, C-метилированные аналоги спермидина, лейшманиоз.

**LEISHMANIA DONOVANI: STRUCTURAL INSIGHT IN THE RECOGNITION OF C-METHYLATED ANALOGUES OF SPERMIDINE AS NATURAL POLYAMINE**, by S. Mandal<sup>1</sup>, M. A. Khomutov<sup>2\*</sup>, A. R. Simonian<sup>2</sup>, S. N. Kochetkov<sup>2</sup>, R. Madhubala<sup>1</sup> (<sup>1</sup>School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, 110067 India; <sup>2</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: hommaximus@mail.ru). The ability of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -methylated spermidine analogues to restore the growth of *L. donovani* promastigotes that were depleted of putrescine and spermidine was investigated. Only  $\beta$ -methylated spermidine, like natural spermidine was capable of restoring the growth of *L. donovani*, while the remaining three analogues turned out to be inactive. Considering that  $\alpha$ -methylated spermidine is a functionally active spermidine surrogate both *in vivo* and *in vitro*, this analogue can be considered as an antidote in the host-parasite system, especially in cases where inhibitors of polyamine biosynthesis are used for the therapy of leishmaniasis.

**Keywords:** spermidine, C-methylated spermidine analogues, leishmaniasis.

Биогенные полиамины спермин (Spm), спермидин (Spd) и их предшественник путресцин (Put) участвуют в регуляции процессов дифференцировки, роста и апоптоза клеток эукариот [1–3]. Полиамины играют важную роль и в жизненном цикле протозойных паразитов, например *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma cruzi*, вызывающих весьма распространенные в тропиках и субтропиках заболевания – лейшманиоз, малярию, сонную болезнь и болезнь Чагаса соответственно [4]. В последние го-

ды возникли формы *L. donovani*, устойчивые к противолейшманиозным препаратам, в том числе и к широко используемому Солсурсьмину®, что делает весьма актуальным поиск метаболических мишеней, перспективных для создания новых средств борьбы с лейшманиозом [5]. Одной из таких мишеней служат ферменты биосинтеза полиаминов, что обусловлено необходимостью Put и Spd, как таковых, для размножения *L. donovani*, а также и тем, что Spd входит в состав трипанотиона (Тру, N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-бис(глутатионил)спермидин), выполняющего мно-

Принятые сокращения: АРА – аминоксипропиламин (3-аминокси-1-аминопропан); DFMO –  $\alpha$ -диформетилорнитин; ГАРА –  $\gamma$ -гуанидиноксипропиламин (1-гуанидинокси-3-аминопропан);  $\alpha$ -MeSpd –  $\alpha$ -метилспермидин (1,8-диамино-5-азанонан);  $\beta$ -MeSpd –  $\beta$ -метилспермидин (1,8-диамино-2-метил-4-азаоктан);  $\gamma$ -MeSpd –  $\gamma$ -метилспермидин (1,8-диамино-3-метил-4-азаоктан);  $\omega$ -MeSpd –  $\omega$ -метилспермидин (1,8-диамино-4-азанонан); ОДС – орнитиндекарбоксилаза; Put – путресцин (1,4-диаминобутан); Spd – спермидин (1,8-диамино-4-азаоктан); Тру – N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-бис(глутатионил)спермидин; Spm – спермин (1,12-диамино-4,9-диазадодекан).

\* Эл. почта: hommaximus@mail.ru

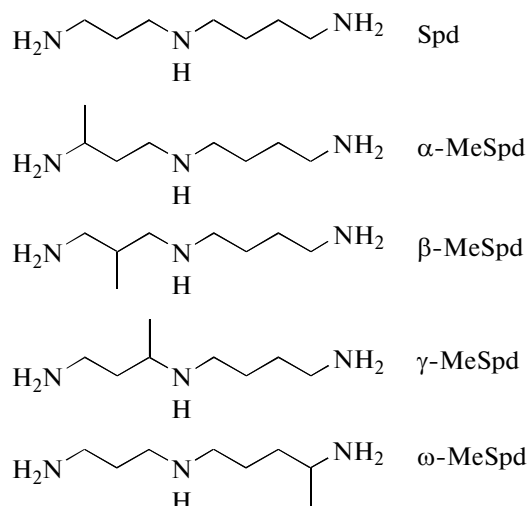


Рис. 1. Спермидин и его С-метилованные аналоги.

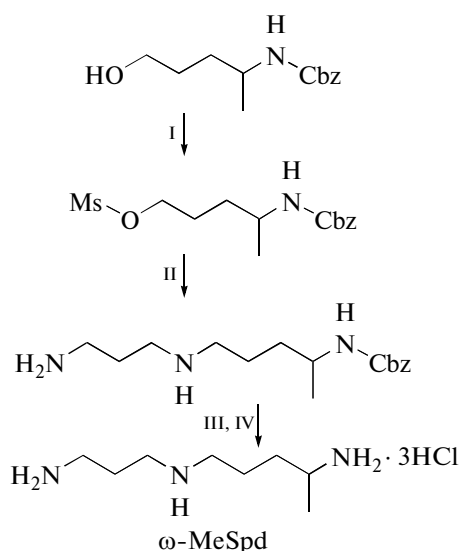


Рис. 2. Синтез  $\omega$ -метилованного аналога спермидина. I –  $\text{Ms-Cl}/\text{C}_6\text{H}_6/\text{Et}_3\text{N}$ ; II –  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2/\text{THF}$ ; III –  $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{AcOH}/\text{MeOH}$ , IV –  $\text{HCl}/\text{EtOH}$ .

гочисленные функции по защите паразита от неблагоприятных внешних воздействий [4, 5]. Основные сложности, возникающие при использовании ингибиторов биосинтеза полиаминов в качестве лекарственных средств в системе хозяин–патоген, связаны с тем, что полиамины необходимы и организму хозяина. Поэтому целесообразно создание аналогов полиаминов, способных компенсировать возникающий в клетках хозяина дефицит Put и Spd и не восстанавливать при этом рост *L. donovani*.

В настоящей работе на примере *L. donovani* впервые показана возможность получения таких веществ на основе С-метилованных производных Spd (рис. 1). Оказалось, что  $\alpha$ -MeSpd, способный

выполнять основные клеточные функции Spd *in vitro* [6–12] и *in vivo* [13], не восстанавливал рост *L. donovani* с истощенным в результате ингибирования орнитиндекарбоксилазы (ODC) пулом Put и Spd.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

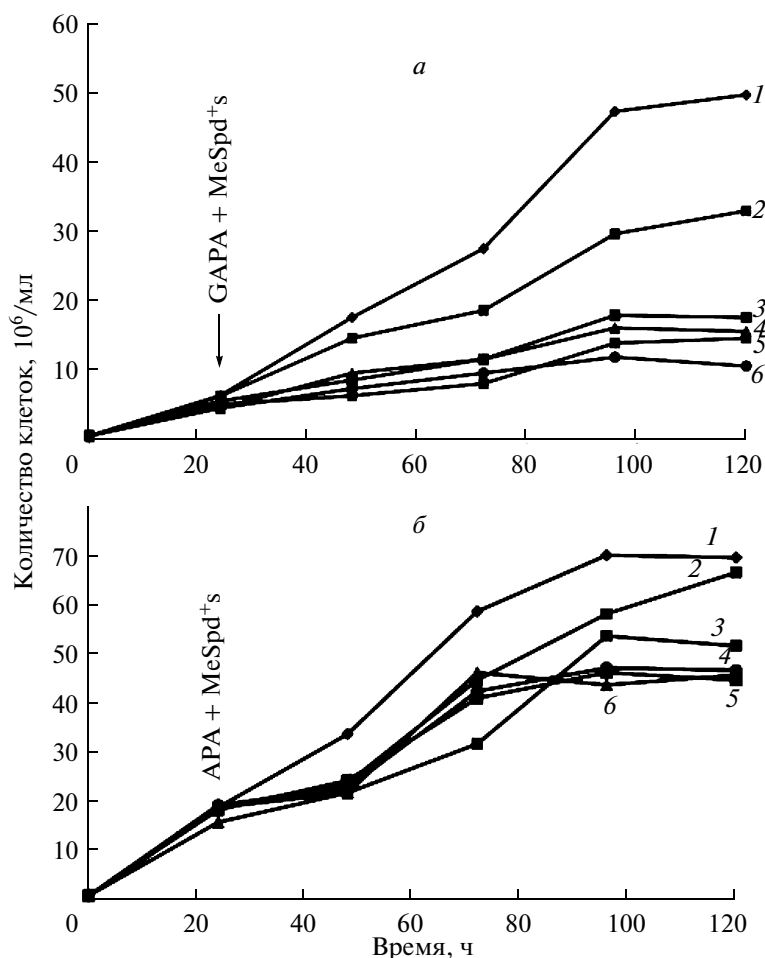
Промастиготы *L. donovani* (изолят AG83-S) культивировали при 22°C в модифицированной среде M-199 (“Sigma”), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; Gibco/BRL, Life Technologies Scotland, UK) и по 0.13 мг пенициллина и стрептомицина на мл среды согласно описанной ранее методике [14]. Профиль чувствительности промастигот *L. donovani* к С-метилованным аналогам Spd охарактеризовали, используя стандартный МТТ-тест [15].  $\alpha$ -MeSpd получен по описанной ранее методике [10],  $\beta$ -MeSpd и  $\gamma$ -MeSpd синтезированы в соответствии с работой [16]. Синтез  $\omega$ -MeSpd осуществлен алкилированием избытка 1,3-диаминопропана мезилатом 4-(*N*-бензилоксикарбонил)-аминопентанола-1, что после удаления Cbz-группы каталитическим гидрированием и последующей кристаллизацией привело к тригидрохлориду  $\omega$ -MeSpd с суммарным выходом 45% (рис. 2). 1-Аминоокси-3-аминопропан (АРА) и 1-гуанидиноокси-3-аминопропан (ГАРА) получены в соответствии с работами [17] и [18].

В настоящей работе для изучения способности С-метилованных аналогов Spd восстанавливать рост *L. donovani* с истощенным в результате инкубации с АРА/ГАРА пулом полиаминов, промастиготы *L. donovani* выращивали в течение 24 ч в 96-луночной планшете, содержащем  $1 \times 10^6$  паразитов/лунку в 0.2 мл среды M-199, не содержащей FBS. Затем в соответствующие лунки вносили ГАРА (конечная концентрация 40 мкМ) или аминоксипропил-амин, АРА (конечная концентрация 50 мкМ), а также С-метилованные аналоги Spd (конечные концентрации 0.1–0.5 мМ) и инкубировали еще 96 ч. Восстанавливающие рост свойства С-метилованных аналогов Spd оценивали каждые 24 ч, используя камеру Горяева для определения количества живых паразитов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система метаболизма полиаминов у болезнетворных трипаносоматидов (рис. 3) проще, чем у млекопитающих – у паразитов, как правило, отсутствует Spm и ферменты, осуществляющие превращения Spd в Put, – спермидин/спермин  $N^1$ -ацетилтрансфераза и ацетилполиаминоксидаза. Таким образом, в случае *L. donovani* существует ограниченный набор решений, позволяющий понижать внутриклеточное содержание Spd, тогда как в клетках млекопитающих наряду с ингибиторами ферментов биосинтеза полиаминов с успехом применяются и индукторы ферментов катаболизма Spm и Spd [19].





**Рис. 5.** Восстановление роста промастигот *L. donovani* C-метилированными аналогами спермидина. *a* – Внутриклеточное содержание Put и Spd снижено при помощи GAPA. 1 – Контроль; 2 – GAPA 40 мкМ +  $\beta$ -MeSpd (0.1 мМ); 3 – GAPA 40 мкМ; 4 – GAPA 40 мкМ +  $\alpha$ -MeSpd (0.5 мМ); 5 – GAPA 40 мкМ +  $\gamma$ -MeSpd (0.35 мМ); 6 – GAPA 40 мкМ +  $\omega$ -MeSpd (0.3 мМ). *б* – Внутриклеточное содержание Put, Spd и Tгу снижено при помощи APA. 1 – Контроль; 2 – APA 50 мкМ +  $\beta$ -MeSpd (0.1 мМ); 3 – APA 50 мкМ +  $\gamma$ -MeSpd (0.35 мМ); 4 – APA 50 мкМ +  $\omega$ -MeSpd (0.3 мМ); 5 – APA 50 мкМ +  $\alpha$ -MeSpd (0.5 мМ); 6 – APA 50 мкМ.

промастигот *L. donovani*, обработанных как APA [15], так и GAPA [14].

Эти данные послужили основанием для изучения в качестве функционально активных миметиков Spd его C-метилированных производных Spd (рис. 1), которые, как оказалось, обладают весьма умеренной токсичностью в отношении *L. donovani* (таблица). Так как *a priori* трудно предсказать, какие

из четырех C-метилированных производных Spd окажутся субстратами ферментов биосинтеза Tгу, то сначала мы исследовали возможность восстановления роста промастигот *L. donovani*, обработанных GAPA, т.е. в тех условиях, когда внутриклеточное содержание Spd понижено, а уровень Tгу мало отличен от контрольного [14]. Оказалось, что из всех исследованных в настоящей работе аналогов лишь  $\beta$ -MeSpd восстанавливал рост *L. donovani* (рис. 5*a*). Следует отметить, что это восстановление роста было неполным, по-видимому, из-за того, что использованная концентрация  $\beta$ -MeSpd составляла  $\approx 1/2$  от *ИД*<sub>50</sub>. Напротив, три других аналога Spd, взятые при такой же концентрации, оказались неспособны восстанавливать рост *L. donovani* с пониженным уровнем Spd, но с практически нормальным содержанием Tгу (рис. 5*a*).

Вызываемое APA ингибирование роста промастигот *L. donovani* приводило к снижению не только

Ингибирование роста промастигот *L. donovani* C-метилированными аналогами спермидина

C-метилированные аналоги Spd	<i>ИД</i> <sub>50</sub> , мМ
$\alpha$ -MeSpd	0.9 ± 0.02
$\beta$ -MeSpd	0.26 ± 0.03
$\gamma$ -MeSpd	0.7 ± 0.07
$\omega$ -MeSpd	0.6 ± 0.05

уровня Put и Spd, но и к значительному падению внутриклеточного содержания Tгу [15].  $\alpha$ -MeSpd,  $\gamma$ -MeSpd и  $\omega$ -MeSpd, как и в случае промастигот *L. donovani*, обработанных GAPA, не восстанавливали рост *L. donovani*, тогда как  $\beta$ -MeSpd был весьма эффективен (рис. 5б). Таким образом, возникли косвенные указания на возможность биосинтеза функционально-активного аналога Tгу из  $\beta$ -MeSpd.

Известно, что (*S*)-изомер  $\alpha$ -MeSpd способен поддерживать рост *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофных по полиаминам [9], а также рост нормальных и опухолевых клеток даже в условиях полного истощения внутриклеточного пула Spd, которое делает невозможным затрагиваемую в последнюю очередь посттрансляционную модификацию – гипузинилирование фактора инициации трансляции 5A (eIF5A) [7]. Кроме того,  $\alpha$ -MeSpd активен и *in vivo*, предотвращая развитие острого панкреатита у SSAT-трансгенных крыс [13], и, подобно Spd, стимулирует регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии [13]. Все это, вместе с неспособностью  $\alpha$ -MeSpd поддерживать рост промастигот *L. donovani* с истощенным пулом Put, Spd и Tгу, позволяет рассматривать  $\alpha$ -MeSpd в качестве своеобразного антидота при использовании избирательных ингибиторов биосинтеза Put и Spd в терапии лейшманиоза. Следует отметить, что значение подобных веществ велико еще и потому, что регуляция биохимических процессов подразумевает не только возможность вызывать необходимый ответ клетки или организма, но и наличие в распоряжении исследователя способов обращения эффекта и способов защиты клеток хозяина, в том числе и с помощью химических соединений. Это позволяет оценить избирательность исходного воздействия и адекватность наших представлений о том или ином биохимическом процессе.

Исследования поддержаны грантами Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-01272\_а, 10-04-92661-Инд\_а), программой президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и совместным Индо-Российским грантом DST-RFBR (RUSP-1030).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen S.S. 1998. *A guide to the polyamines*. N.Y.: Oxford Univers. Press, P. 595.
- Wallace H.M., Fraser A.V., Hughes A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* **376**, 1–14.
- Seiler N., Raul F. 2005. Polyamines and apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 623–642.
- Heby O., Persson L., Rentala M. 2007. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease and leishmaniasis. *Amino Acids.* **33**, 359–366.
- Croft S.L., Sundar S., Fairlamb A.H. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 111–126.
- Lakanen J.R., Coward J.K., Pegg A.E. 1992. alpha-Methyl polyamines: metabolically stable spermidine and spermine mimics capable of supporting growth in cells depleted of polyamines. *J. Med. Chem.* **35**, 724–734.
- Hyvonen M.T., Keinänen T.A., Cerrada-Gimenez M., Sinervirta R., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Janne J. 2007. Role of hypusinated eukaryotic translation initiation factor 5A in polyamine depletion-induced cytostasis. *J. Biol. Chem.* **282**, 34700–34706.
- Hyvonen M.T., Howard M.T., Anderson C.B., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Janne J., Keinänen T.A. 2009. Divergent regulation of the key enzymes of polyamine metabolism by chiral alpha-methylated polyamine analogs. *Biochem. J.* **422**, 321–328.
- Chattopadhyay M.K., Park M.H., Tabor H. 2008. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **105**, 6554–6559.
- Jarvinen A.J., Cerrada-Gimenez M., Grigorenko N.A., Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Sinervirta R.M., Keinänen T.A., Alhonen L.I., Janne J.E. 2006. alpha-Methyl polyamines: efficient synthesis and tolerance studies *in vivo* and *in vitro*. First evidence for dormant stereospecificity of polyamine oxidase. *J. Med. Chem.* **49**, 399–406.
- Хомутов А.Р., Keinänen T.A., Григоренко Н.А., Hyvonen M.T., Uimari A., Pietila M., Cerrada-Gimenez M., Симонян А.Р., Хомутов М.А., Vepsäläinen J., Alhonen L., Janne J. 2009. Метилированные аналоги биогенных полиаминов спермина и спремидина как инструмент исследования клеточных функций полиаминов и ферментов их метаболизма. *Молекуляр. биология.* **43**, 274–285.
- Vuohelainen S., Pirinen E., Cerrada-Gimenez M., Keinänen T.A., Uimari A., Pietila M., Khomutov A.R., Janne J., Alhonen L. 2010. Spermidine is indispensable in differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1683–1692.
- Rasanen T.L., Alhonen L., Sinervirta R., Keinänen T., Herzig K.H., Suppola S., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Janne J. 2002. A polyamine analogue prevents acute pancreatitis and restores early liver regeneration in transgenic rats with activated polyamine catabolism. *J. Biol. Chem.* **277**, 39867–39872.
- Singh S., Jhingran A., Sharma A., Simonian A.R., Soinen P., Vepsäläinen J., Khomutov A.R., Madhubala R. 2008. Novel agmatine analogue,  $\gamma$ -guanidinooxypropylamine (GAPA) efficiently inhibits proliferation of *Leishmania donovani* by depletion of intracellular polyamine levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 168–172.
- Singh S., Mukherjee A., Khomutov A.R., Persson L., Heby O., Chatterjee M., Madhubala R. 2007. Antileishmanial effect of 3-aminooxy-1-aminopropane is due to polyamine depletion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 528–534.
- Khomutov A.R., Weisell J., Khomutov M.A., Grigorenko N.A., Simonian A.R., Häkkinen M.R., Keinänen T.A., Hyvönen M.T., Alhonen L., Kochetkov S.N., Vepsäläinen J. 2011. Methylated polyamines

- as research tools. In: *Polyamines: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Eds Pegg A.E., Casero R.A. N.Y.: Springer Science+Business Media, LLC. vol. **720**, Ch. 29, pp. 449–461.
17. Khomutov A.R., Vepsalainen J.J., Shvetsov A.S., Hyvonen T., Keinanen T.A., Pustobaev V.N., Eloranta T.O., Khomutov R.M. 1996. Synthesis of hydroxylamine analogues of polyamines. *Tetrahedron*. **52**, 13751–13766.
  18. Симонян А.Р., Григоренко Н.А., Вепсалайнен Й., Хомутов А.Р. 2005. Новые зарядодефицитные аналоги агматина. *Биоорганическая химия*. **31**, 645–650.
  19. Casero R.A., Marton L.J. 2007. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 373–390.
  20. Svensson F., Ceriani C., Wallström E.L., Kockum I., Algranati I.D., Heby O., Persson L. 1997. Cloning of a trypanosomatid gene coding for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 397–402.
  21. Kahana C. 2009. Regulation of cellular polyamine levels and cellular proliferation by antizyme and antizyme inhibitor. *Essays Biochem.* **46**, 47–61.
  22. Burri C.C., Brun R. 2003. Eflornithine for the treatment of human african trypanosomiasis. *Parasitol. Res.* **90**, S49–S52.
  23. Khomutov M.A., Mandal S., Weisell J., Saxena N., Simonian A.R., Vepsalainen J., Madhubala R., Kochetkov S.N. 2010. Novel convenient synthesis of biologically active esters of hydroxylamine. *Amino Acids*. **38**, 509–517.