

La δ -N-yodoacetil ornitina y la ϵ -N-yodoacetil lisina como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de la ornitina descarboxilasa

L. RODRÍGUEZ-PÁEZ,* C. D., NERI*,
R. I. BAEZA* y R. C. WONG.*

Departamento de Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás
Apartado Postal 42-186, 11340 México, D.F.

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L., NERI, C. D., BAEZA, R. I. y WONG, R. C., 1998. La δ -N-yodoacetil ornitina y la ϵ -N-yodoacetil lisina como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de la ornitina descarboxilasa. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **44**:99–115.

RESUMEN: Se sintetizaron la δ -N-yodoacetil-L-ornitina y su homólogo superior, la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina y se estudiaron como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata. Se encontró que la δ -N-yodoacetil-L-ornitina fue un potente inhibidor de esta enzima, con una K_i de 0.5 mM y que se trata de un inhibidor irreversible dirigido al sitio activo de la ornitina descarboxilasa, en tanto que la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina produjo una inhibición menor ($K_i = 4$ mM), también irreversible, pero fuera del sitio activo. Se estableció que el sitio activo de la ornitina descarboxilasa presenta tolerancia de grupos químicos voluminosos alrededor o en las cercanías del grupo δ -amino de la ornitina en el complejo enzima-sustrato. Además, se detectó también un grupo nucleofílico, probablemente un grupo sulfhidrilo aproximadamente a 11 Å del sitio de anclaje del carboxilato de la ornitina.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina están íntimamente asociadas con el crecimiento, diferenciación y síntesis de macromoléculas, tanto en organismos procarióticos como en eucarióticos (Tabor and Tabor, 1984, 1985). Cuando las células disminuyen su contenido de poliaminas al usar inhibidores específicos de su síntesis, su proliferación cesa; por el contrario, cuando a las células carentes de poliaminas se les proporcionan poliaminas, adquieren una velocidad de crecimiento normal (Mamont *et al.*, 1976; Pegg, 1982, 1986). Es evidente que las poliaminas tienen un papel importante en el crecimiento y la división celular. Por esta razón, la inhibición del metabolismo de las poliaminas se ha seleccionado como blanco para la posible quimioterapia del cáncer

*Becario DEDICT-COFAA y EDD.

(Quemener *et al.*, 1994; He *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 1994, 1997) y de infecciones por protozoarios (Sjoerdsma and Schechter, 1984; Sarilc and Clarkson, 1994; Yarlett and Bacchi, 1994).

El inhibidor de la síntesis de poliaminas más utilizado como agente quimioterapéutico para el tratamiento de estas enfermedades ha sido la difluorometil ornitina (DFMO), inhibidor suicida de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima limitante de la síntesis de las poliaminas (Metcalfe *et al.*, 1978; Pegg, 1988; Seiler, 1991; Lu *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1992). Se han obtenido efectos significativos contra una variedad de tumores inducidos químicamente o implantados en roedores (Seiler, 1991; Sjoerdsma and Schechter, 1984) y tumores humanos desarrollados en ratones desnudos (Luk *et al.*, 1986). También se ha utilizado la DFMO en combinación con otros fármacos y se han obtenido muy buenos resultados contra una variedad de tumores animales y humanos *in vitro* (Pegg, 1988; Meyskens and Gerner, 1995). Por otro lado, se ha encontrado que la DFMO inhibe la replicación de varios protozoarios parásitos, entre los que se incluyen varios tripanosomas africanos, *Eimeria tenella*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* y *Pneumocystis carinii* (Sjoerdsma and Schechter, 1984; Pegg, 1986; Hunter, 1990; Seiler, 1991; Das *et al.*, 1995; Wang, 1991). La DFMO es activa contra infecciones por *Trypanosoma brucei brucei* en ratones y contra cepas de *Trypanosoma congolense* que son resistentes a drogas tripanomicidas. La DFMO también es efectiva contra la enfermedad del sueño causada por los tripanosomas africanos, tanto en modelos animales como en humanos (Pegg, 1986; Heby and Persson, 1990). Además, la actividad de la ODC en esquizogonias de *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria humana se inhibe con la DFMO. La DFMO también es efectiva contra infecciones causadas por *Pneumocystis carinii*, un agente infeccioso oportunista en pacientes con SIDA (Seiler, 1991; Merali and Clarkson, 1996).

El uso clínico de la DFMO en el tratamiento del cáncer y en enfermedades por protozoarios, requiere de dosis elevadas y frecuentes debido a que presenta una eliminación muy rápida y, aunque su toxicidad es relativamente baja, llega a provocar efectos gastrointestinales, trombocitopenia y anemia, generalmente reversibles al reducir o terminar el tratamiento (Pegg, 1986; Crowell *et al.*, 1994) y a pesar de estas dificultades clínicas con la DFMO, todos los estudios realizados han demostrado que la inhibición del metabolismo de las poliaminas es un blanco disponible para la obtención de nuevos fármacos contra procesos cancerígenos e infecciones por parásitos.

En la actualidad se está trabajando en obtener otros inhibidores del metabolismo de las poliaminas que sean más potentes y selectivos, menos tóxicos, que puedan atravesar fácilmente las membranas celulares y cuyo metabolismo y excreción no sea muy acelerado, con lo cual se tendrían mejores posibilidades de éxito contra estas enfermedades que representan importantes problemas de salud en el hombre (Bergeron *et al.*, 1994, 1997; Keinanen *et al.*, 1994; Marton and Pegg, 1995; Quemener, 1994).

Previamente, en nuestro laboratorio encontramos que la δ -N-formil ornitina inhibe competitivamente a la ornitina descarboxilasa (Rodríguez-Páez *et al.*, 1997b) y en este estudio proponemos que la δ -N-yodoacetil-L-ornitina, compuesto con una similitud estructural muy estrecha con la δ -N-formil ornitina, y su homólogo, la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina, conteniendo grupos alquilantes, podrían comportarse como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de esta enzima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos o hembras de 200 a 250 g de peso, provenientes de

la granja de la ENCB-IPN.

Los reactivos: 2,2' p-fenilen-bis(5-fenil-oxazol), 2,5-difenil-oxazol y ninhidrina, de *Merck*. Fosfato de piridoxal, α -metil ornitina, ditiotreitól, albúmina bovina, N,N'-díciclohexil carbodiimida, de *Sigma Chemical Co*. Reactivo de Folin, de *Sigma-México*. Ornitina-1- 14 C, de *Amersham*. Los demás reactivos utilizados fueron químicamente puros.

La síntesis de la δ -N-yodoacetil-L-ornitina y de la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina se hizo de acuerdo a un método previamente descrito (Rodríguez-Páez et al., 1997a).

La obtención de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata y la medición de su actividad se hizo de acuerdo a un método previamente descrito (Rodríguez-Páez et al., 1997b).

Efecto de la concentración del inhibidor sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa

Se midió la actividad de la ornitina descarboxilasa en presencia de diferentes concentraciones (0-10 mM) de δ -N-yodoacetil ornitina y ϵ -N-yodoacetil lisina. Los inhibidores se adicionaron en un volumen de 0.1 ml de solución acuosa.

Determinación del tipo de inhibición producido por la δ -N-yodoacetil ornitina y la ϵ -N-yodoacetil lisina

Se determinó la actividad de la ornitina descarboxilasa a diferentes concentraciones de L-ornitina (0-2 mM), en ausencia y en presencia de dos concentraciones diferentes del inhibidor, de tal forma que a una concentración de 0.8 mM de L-ornitina produzcan aproximadamente el 30 y el 60% de inhibición, respectivamente.

Inhibición de la ornitina descarboxilasa en función del tiempo

Se empleó el método de Metcalf et al., 1978. Para un experimento típico, se mezclaron 2,688 μ l de la solución enzimática (actividad específica de 0.14 nmol de CO₂/min/mg de proteína) con 672 μ l de la solución del inhibidor y se incubaron a 37°C. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 300 μ l y se transfirieron a frascos de reacción, los cuales contenían, en 1 ml, la mezcla de reacción enzimática.

Determinación de la irreversibilidad de la inhibición de la ornitina descarboxilasa por medio de diálisis

Se empleó el método de Danzin et al., 1981. A 10 ml de la solución enzimática se le agregaron 3.4 ml de la solución del inhibidor y se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente se dializó contra 250 ml de regulador de fosfatos, 0.05 M, pH 7.0, con 0.1 mM EDTA, 0.1 mM fosfato de piridoxal y 5 mM de ditiotreitól (condiciones en las que la enzima es estable). Se hicieron cambios de regulador para diálisis a las 12 horas. Se midió la actividad de la ornitina descarboxilasa a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, haciendo correcciones por el cambio de volumen.

Descarboxilación enzimática de la δ -N-yodoacetil ornitina por la ornitina descarboxilasa

Se utilizó la δ -N-yodoacetil ornitina marcada con 14 C, que nos fue proporcionada por

el doctor Ricardo Yáñez de la Escuela Superior de Medicina, del IPN. Este inhibidor se utilizó como sustrato de la ornitina descarboxilasa. En los frascos apropiados, se adicionó 0.025 μCi de $\delta\text{-N-yodoacetil-L-ornitina-1-}^{14}\text{C}$, con una actividad específica de 1.6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ en sustitución de la ornitina, el sustrato natural. Los demás reactivos se adicionaron en la forma usual para determinar la actividad de la ornitina descarboxilasa. Al mismo tiempo, se realizó un experimento testigo, utilizando la ornitina-1- ^{14}C (0.025 μCi , con una actividad específica de 1.6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$).

RESULTADOS

Efecto de la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina y de la $\epsilon\text{-N-yodoacetil}$ lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa

Se determinó si la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina, un derivado de la ornitina y la $\epsilon\text{-N-yodoacetil}$ lisina, derivado de la lisina, eran capaces de inhibir a la ornitina descarboxilasa. En la figura 1 se observa que estas sustancias son capaces de inhibir a la ornitina descarboxilasa de hígado de rata, ya que a medida que aumenta la concentración de la sustancia aumenta la inhibición enzimática, y a una concentración de 6 mM la inhibición es casi del 100% en el caso de la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina, en tanto que a 10 mM la $\epsilon\text{-N-yodoacetil}$ lisina inhibe un 75%. Procedimos entonces a caracterizar las inhibiciones producidas por estos dos compuestos.

Determinación del tipo de inhibición producido por la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina sobre la ornitina descarboxilasa

Estudiamos el efecto de la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina sobre la cinética de la ornitina descarboxilasa a dos concentraciones del inhibidor (2 y 4 mM). El compuesto se adicionó a la mezcla de reacción e inmediatamente después se adicionó la solución enzimática para iniciar la reacción. Estas condiciones de reacción se llamaron "sin preincubación de la enzima con el inhibidor". Los resultados demuestran claramente que se trata de una inhibición de tipo competitivo (Fig. 2). Esto indica que esta sustancia, por su similitud estructural con el sustrato, compete con él por el sitio activo, produciendo una inhibición de tipo competitivo cuando la enzima no se preincuba con el inhibidor. Se determinó la K_i del sistema ornitina descarboxilasa- $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina para este tipo de inhibición y encontramos que fue de 0.5 mM (inserto de la figura 2). Al realizar el mismo experimento, pero preincubando la enzima con el inhibidor durante 30 min a 37°C, para que pueda interaccionar la enzima con el inhibidor y se produzca la alquilación de la enzima en ausencia del sustrato, se obtuvo una inhibición de tipo no competitivo, con una K_i de 0.7 mM (resultados no mostrados).

Determinación del carácter irreversible de la inhibición producida por la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina sobre la ornitina descarboxilasa

Como el grupo yodoacetilo de la $\delta\text{-N-yodoacetil}$ ornitina es un grupo alquilante, este compuesto podría formar un enlace covalente con algún grupo nucleofílico de la enzima, lo que daría lugar a una inhibición irreversible. Para evaluar la capacidad alquilante de este inhibidor, se incubó a diferentes tiempos con la enzima, ya que se sabe que

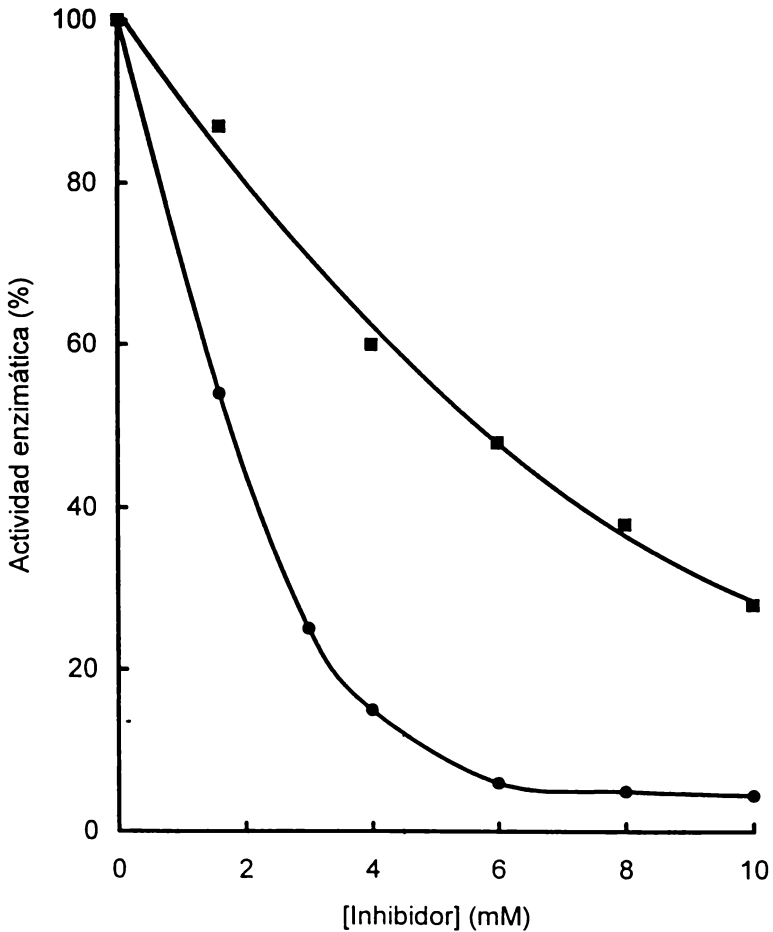


FIG. 1. Efecto de la concentración de la δ -N-yodoacetil ornitina (●) y de la ϵ -N-yodoacetil lisina (■) sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata. El 100% de la actividad enzimática equivale a 0.32 nmol de CO_2 liberados por minuto.

usualmente las reacciones de alquilación son mucho más lentas que la reacción de competencia por el sitio activo. Para la caracterización *in vitro* de este tipo de inhibición, empleamos el método de Kitz y Wilson (1962), el cual se basa en la pérdida de la actividad enzimática por un proceso de primer o pseudoprimer orden dependiente del tiempo, que evidencia la alquilación de la enzima. Además, la velocidad de inactivación debe ser proporcional a la concentración del inhibidor a concentraciones bajas, pero independiente a concentraciones altas (cinética de saturación). Al estudiar estas posibilidades, encontramos que cuando la δ -N-yodoacetil ornitina se incubó con la ornitina descarboxilasa, se comportó como un inhibidor irreversible, porque la inhibición se incrementó con el tiempo de acuerdo a una cinética de primer orden (Fig. 3). Las constantes cinéticas, vida media de inactivación a concentración infinita de inhibidor ($t_{1/2\infty}$) y la constante de inactivación (K_i), de la δ -N-yodoacetil ornitina se determinaron

por el método de Kitz y Wilson (1962) (inserto de la figura 3). El hecho de que se obtenga una ordenada al origen, que corresponde a la vida media de inactivación a concentración infinita de inhibidor ($t_{1/2 \infty}$) significa que en la inhibición producida ocurre un proceso de saturación enzimática, lo que nos habla también de la participación del sitio activo de la enzima en el proceso inhibitorio. Cuando la enzima se preincubó con 3 mM de δ -N-yodoacetil ornitina y luego se dializó, también se demostró que la inhibición es irreversible, ya que no se recuperó la actividad al dializar, en tanto que la inhibición producida por 3 mM de α -metil ornitina, un inhibidor competitivo de la ornitina descarboxilasa, se revirtió con la diálisis, indicando la reversibilidad de esta inhibición (Fig. 4).

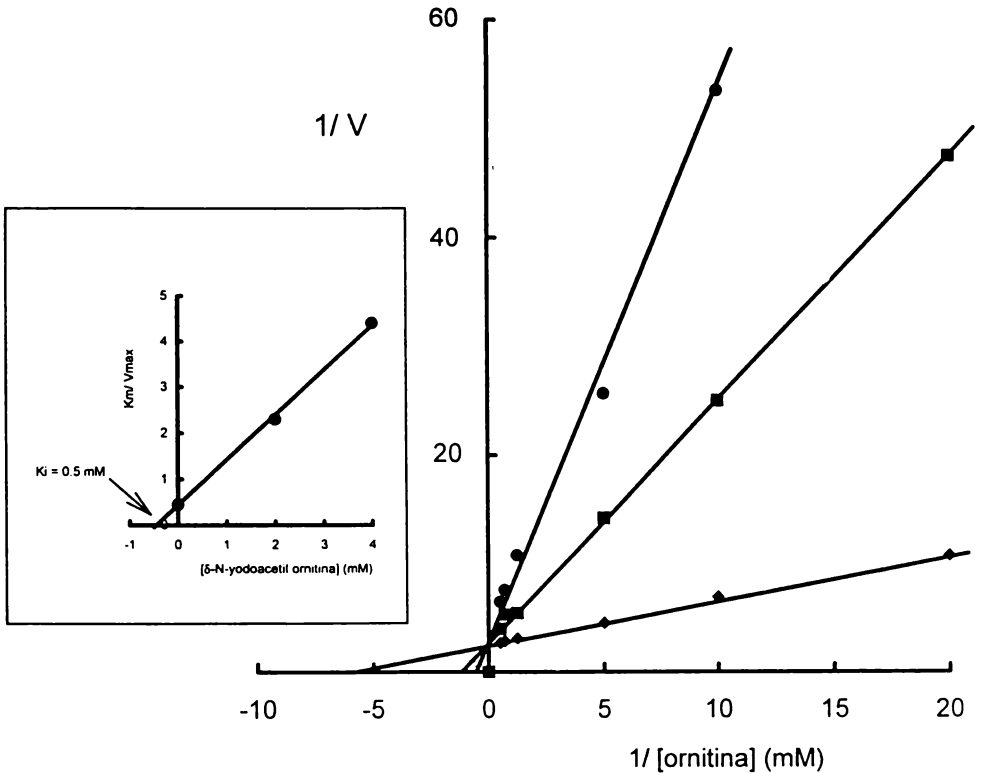


FIG. 2. Determinación del tipo de inhibición que produce la δ -N-yodoacetil ornitina sobre la ornitina descarboxilasa de hígado de rata (método de Lineweaver-Burk). (◆) Sin inhibidor, (■) con 2 mM de inhibidor, (●) con 4 mM de inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la constante de inhibición (K_i).

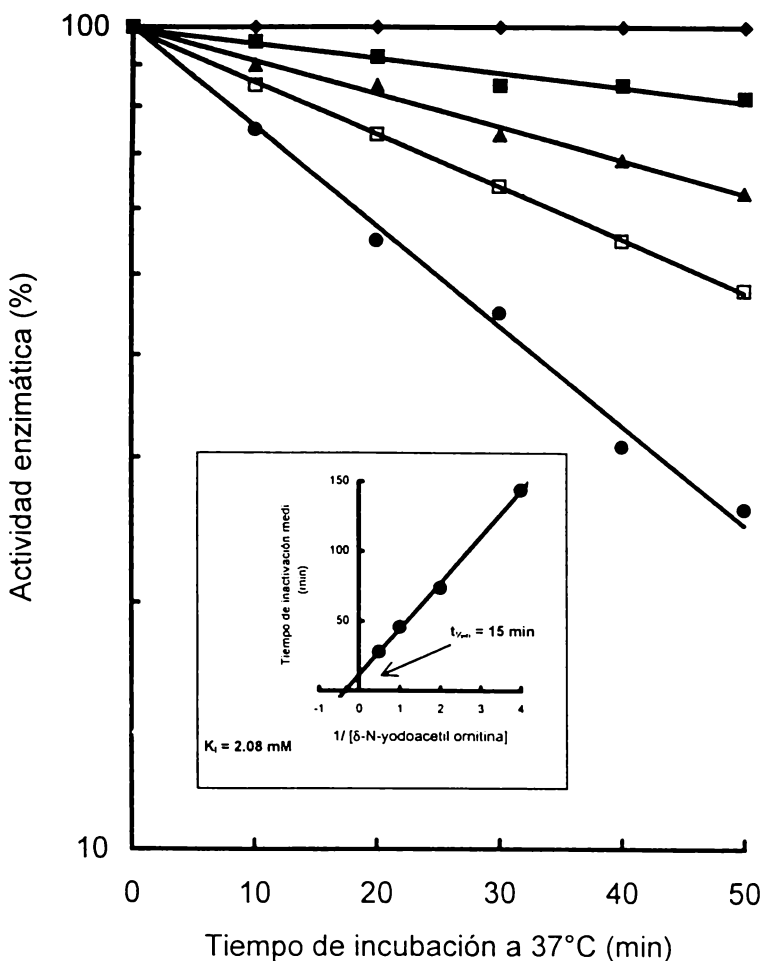


FIG. 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa a diferentes concentraciones de la δ -N-yodoacetil ornitina. (◆) Testigo, (■) con 0.25 mM, (▲) 0.5 mM, (□) 1 mM y (●) 2 mM del inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la constante de inactivación (K_i) de la inhibición irreversible y la vida media de inactivación a concentración infinita del inhibidor ($t_{1/2\infty}$).

Demostración del sitio de la alquilación producida por la δ -N-yodoacetil ornitina en la ornitina descarboxilasa

Una vez demostrado que la δ -N-yodoacetil ornitina produjo una inhibición irreversible por alquilación de la ornitina descarboxilasa, se determinó el sitio de la alquilación, que podría realizarse tanto en el sitio activo, como fuera de él, o incluso en los dos sitios. Para discernir entre estas opciones de alquilación, se hizo el experimento que se presenta en la figura 5, donde se compara el efecto de un inhibidor irreversible (δ -N-yodoacetil ornitina) con el de un inhibidor reversible (α -metil ornitina), y se observa

la inhibición por la α -metil ornitina protege a la ornitina descarboxilasa de la inactivación, lo cual indica que hay competencia por el sitio activo, entre la α -metil ornitina y la δ -N-yodoacetil ornitina. Esto demuestra también que la alquilación es únicamente en el sitio activo. Además, en la figura 4, donde se muestra el efecto de la diálisis, se empleó un experimento para revertir la inhibición, incluyendo un inhibidor competitivo de la ornitina descarboxilasa, protector del sitio activo (Fig. 4). Cuando la enzima se preincubó con la α -metil ornitina y la δ -N-yodoacetil ornitina y luego se dializó, se observó que la actividad de la ornitina descarboxilasa se recuperó aproximadamente en un 60% después de 24 horas, esto es una evidencia de que hubo protección del sitio activo por la α -metil ornitina, ya que impidió que la δ -N-yodoacetil ornitina se uniera irreversiblemente en el sitio activo.

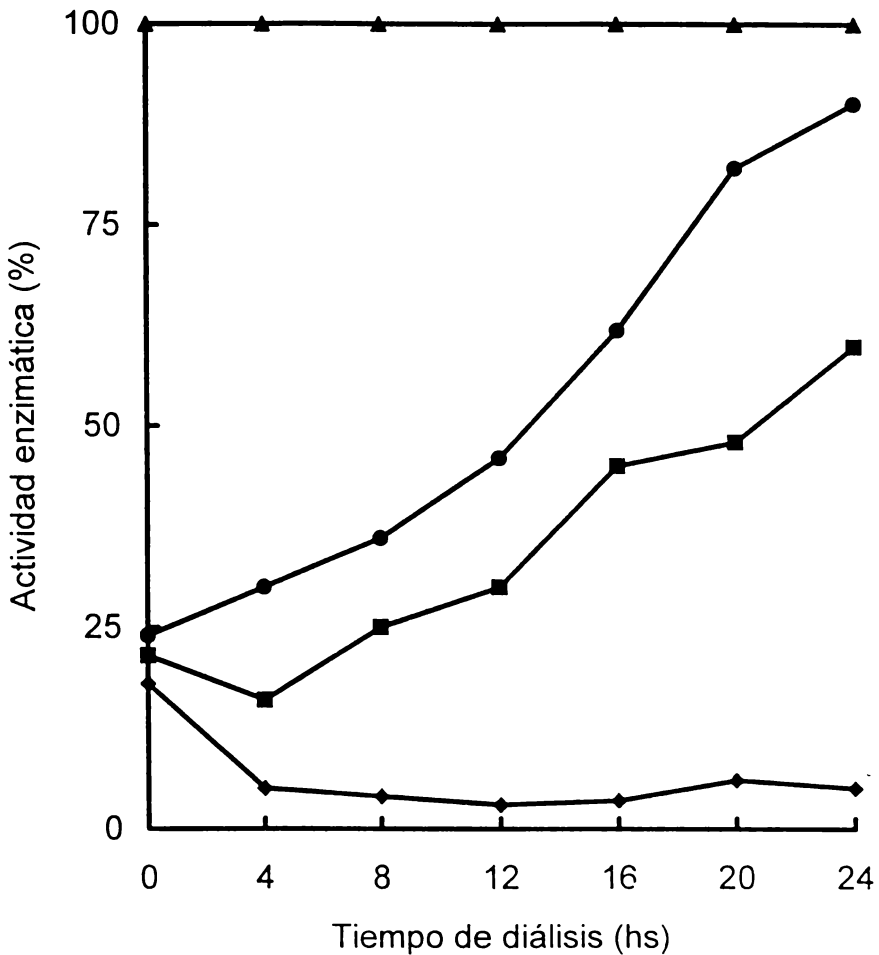


FIG. 4. Efecto de la diálisis sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa en presencia de α -metil ornitina y δ -N-yodoacetil ornitina. (▲) Testigo, (●) con 3 mM de α -metil ornitina, (■) con 3 mM de α -metil ornitina + 3 mM de δ -N-yodoacetil ornitina, (◆) con 3 mM de δ -N-yodoacetil ornitina.

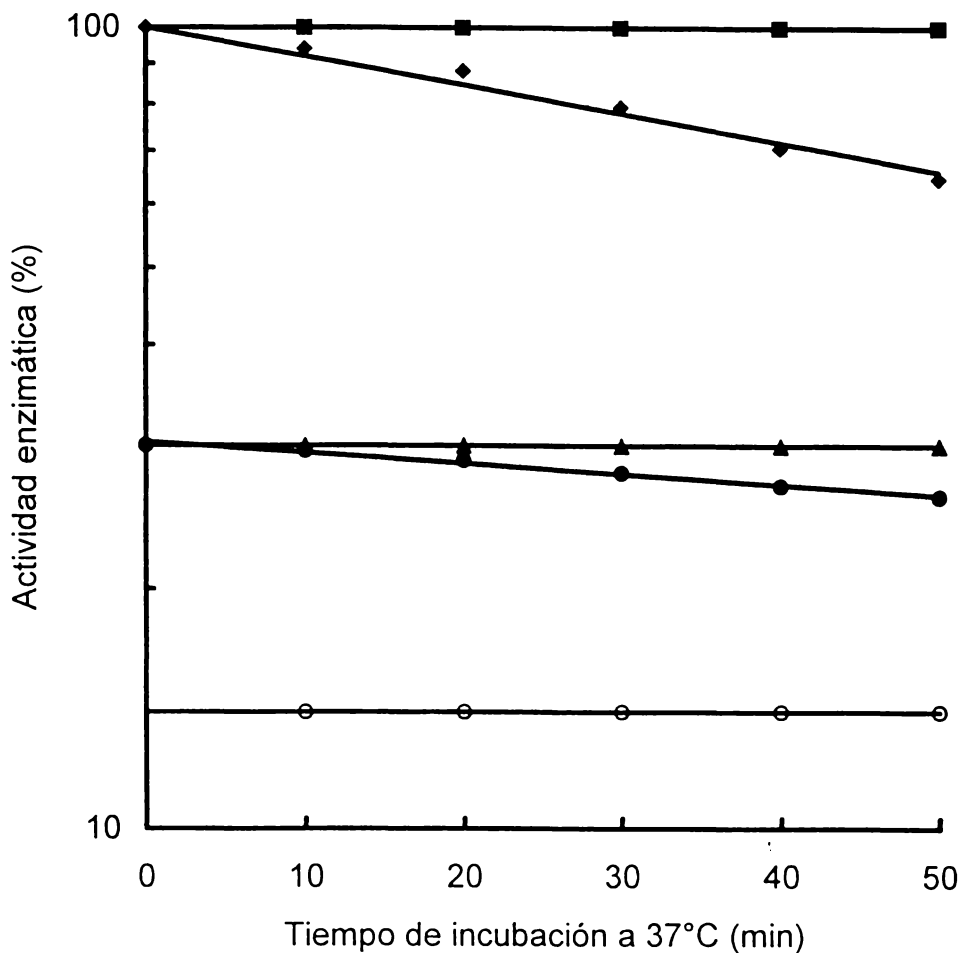


FIG. 5. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa en presencia de δ -N-yodoacetil ornitina (N-YAO) y α -metil ornitina (MO). (■) Testigo, (◆) con N-YAO 0.5 mM, (▲) con MO 2 mM, (●) con N-YAO 0.5 mM + MO 2 mM y (○) con N-YAO 0.5 mM + MO 4 mM.

Por otro lado, al utilizar la δ -N-yodoacetil ornitina-1- 14 C, es decir, el inhibidor marcado en el carbono-1 con 14 C como sustrato de la ornitina descarboxilasa, encontramos que la enzima pudo utilizar como sustrato al propio inhibidor, porque produjo un 20% de descarboxilación de la δ -N-yodoacetil ornitina (tabla I), lo cual confirmó, sin lugar a dudas, que el inhibidor entró al sitio activo de la ornitina descarboxilasa.

TABLA I. Descarboxilación de la δ -N-yodoacetil ornitina por la ornitina descarboxilasa de hígado de rata.

SUSTRATO	DESCARBOXILACIÓN	
	$^{14}\text{CO}_2$ (cpm)	%
L-ornitina-1- ^{14}C	3,060	100
δ -N-YAO-1- ^{14}C	660	20

La actividad de la ornitina descarboxilasa se determinó midiendo la descarboxilación ($^{14}\text{CO}_2$) en cpm a 37°C. En los experimentos se utilizaron 0.14 U/mg de proteína. δ -N-YAO-1- ^{14}C es la δ -N-yodoacetil ornitina-1- ^{14}C .

Determinación del tipo de inhibición producida por la ϵ -N-yodoacetil lisina sobre la ornitina descarboxilasa

Se determinó el efecto del inhibidor a diferentes concentraciones de sustrato. Los datos cinéticos demostraron que la ϵ -N-yodoacetil-L-lisina es un inhibidor de tipo no-competitivo (Fig. 6). Esto significa que este inhibidor, con un átomo de carbono más que la δ -N-yodoacetil ornitina, actúa fuera del sitio activo de la ornitina descarboxilasa. La constante de inhibición (K_i) asociada a este proceso inhibitorio fue de 4 mM.

Determinación del carácter irreversible de la inhibición producida por la ϵ -N-yodoacetil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa

Ya que era probable que la ϵ -N-yodoacetil lisina produjera una inhibición irreversible, porque su grupo yodoacetilo puede formar un enlace covalente con grupos nucleofílicos fuera del sitio activo de la enzima, se determinó la irreversibilidad de la inhibición. Al medir la actividad enzimática a través del tiempo, en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor, se encontró que la ϵ -N-yodoacetil lisina es un inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa, ya que la reacción de inactivación sigue una cinética de primer orden (Fig. 7) y la inhibición fue más pronunciada a medida que se aumentó la concentración del inhibidor. No fue posible caracterizar la inhibición irreversible ($t_{1/2}$ y K_i) ya que la curva representativa se inicia en el origen (inserto de la figura 6), esto es probablemente debido a que el proceso irreversible es directo.

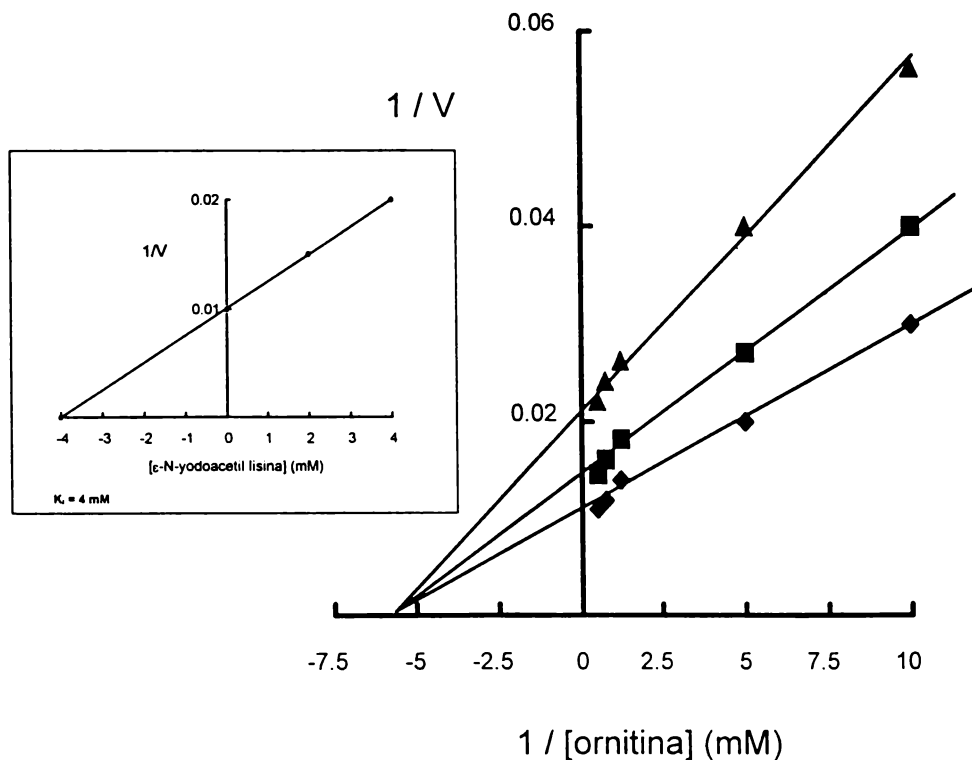


FIG. 6. Determinación del tipo de inhibición que produce la ϵ -N-yodoacetyl lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa (método de Lineweaver-Burk). (♦) Testigo, (■) con 2 mM y (▲) 4 mM del inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la constante de inhibición (K_i).

DISCUSIÓN

En estudios previos en nuestro laboratorio, demostramos que la introducción de grupos químicos voluminosos, como el grupo formilo en el δ amino de la ornitina, sustrato natural de la ornitina descarboxilasa, no modifica la afinidad por el sitio activo de la enzima (Rodríguez-Páez, *et al.*, 1997b) por lo que en este estudio propusimos y estudiamos a la δ -N-yodoacetyl ornitina como un posible inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa. Este compuesto es un derivado de la ornitina, modificado en su grupo δ amino, conteniendo un grupo alquilante (yodoacetilo), que podría entrar al sitio activo de la ornitina descarboxilasa, encontrar ahí grupos nucleofílicos y formar un enlace covalente. Baker (1967) nombró a este tipo de inhibidores como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo. Se estudió también a la ϵ -N-yodoacetyl lisina como un homólogo de la δ -N-yodoacetyl ornitina, para determinar si el sitio activo de la ornitina descarboxilasa puede aceptar un grupo metileno más entre los dos grupos amino del sustrato original.

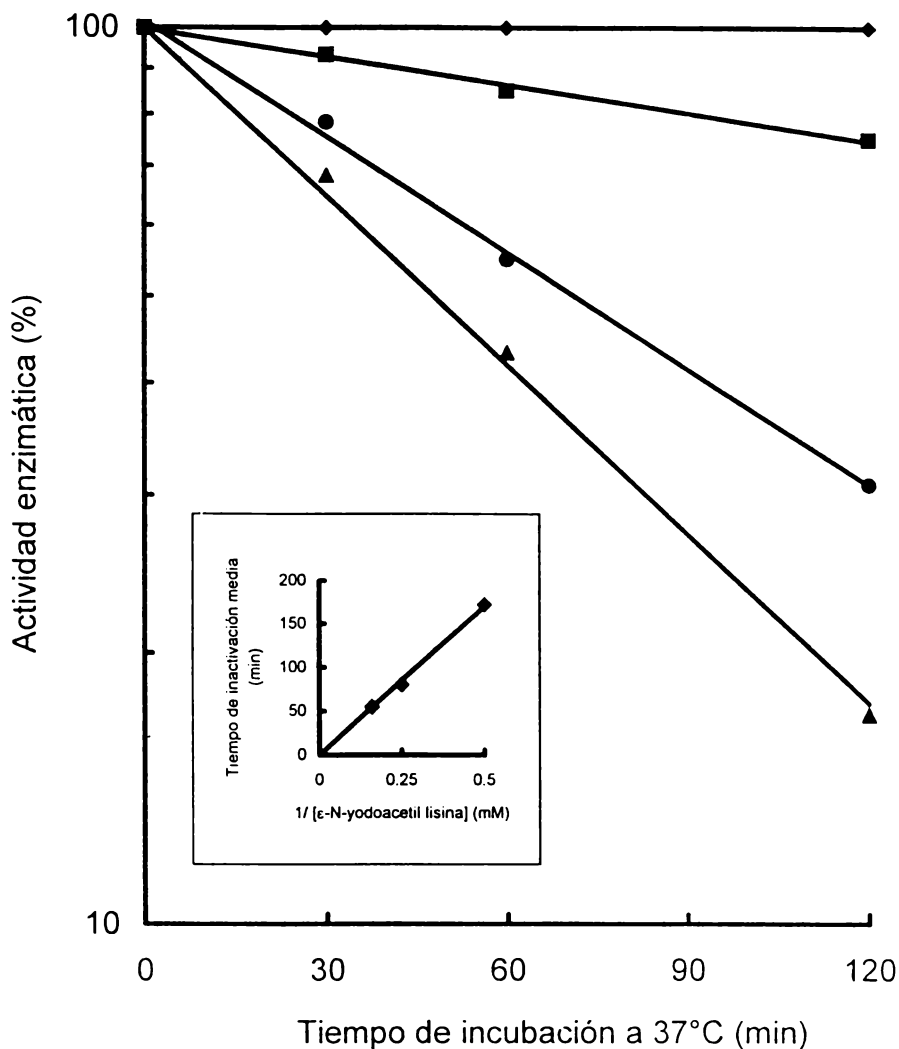


FIG. 7. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa a diferentes concentraciones de ϵ -N-yodoacetil lisina. (◆) Testigo, (■) con 2 mM, (●) 4 mM y (▲) 6 mM del inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la K_i de la inhibición irreversible.

La δ -N-yodoacetil ornitina resultó ser, en efecto, un potente inhibidor de la ornitina descarboxilasa, con una K_i de 0.5 mM y una cinética de inhibición de tipo competitivo. Sin embargo, cuando se preincubó la enzima con el inhibidor durante 30 min antes de cada determinación, encontramos que la cinética de inhibición claramente cambiaba de competitiva a no-competitiva. Este diferente comportamiento cinético nos planteó lo siguiente: por un lado, la cinética de tipo competitivo indicaba que la inhibición era reversible y en el sitio activo, y por otro lado la inhibición no-competitiva mostraba que la inhibición ocurría fuera del sitio activo. Además, tanto los inhibidores reversibles como

los irreversibles pueden dar una cinética de tipo no-competitiva. Así que tratamos de establecer si la inhibición era reversible o irreversible y, además, si la δ -N-yodoacetil ornitina actuaba dentro o fuera del sitio activo de la ornitina descarboxilasa.

El método de Kitz y Wilson (1962) establece que las inhibiciones irreversibles producidas por alquilación de la enzima, ocurren mediante una reacción de primer orden o pseudoprimer orden, y además que la inhibición aumenta con el tiempo y es dependiente de la concentración del inhibidor. Al emplear este método y trazar el logaritmo de la actividad enzimática contra el tiempo de incubación, se encontró una relación lineal con pendiente negativa, lo cual es indicativo de que la reacción de inhibición es de primer orden. Por otro lado, al aumentar la concentración del inhibidor, la pendiente de la recta se hizo cada vez más pronunciada, indicando que la inhibición aumentó en función del tiempo de incubación y de la concentración del inhibidor, lo cual demostró que la cinética de inhibición no-competitiva, obtenida al incubar la ornitina descarboxilasa con la δ -N-yodoacetil ornitina, corresponde a una inhibición irreversible producida por la alquilación de la enzima. Baker (1967) demostró que para los inhibidores competitivos reversibles, la relación semilogarítmica de la velocidad enzimática con el tiempo de incubación es también lineal, pero en este caso la inhibición permanece constante en el tiempo de incubación y lo que se observa es una recta horizontal. Por lo tanto, cuando un inhibidor irreversible se hace actuar junto con un inhibidor competitivo y la pendiente de la inhibición irreversible disminuye debido a que el inhibidor competitivo protege al sitio activo de la inhibición irreversible, demuestra que el inhibidor irreversible actúa también en el sitio activo. En nuestros estudios con la δ -N-yodoacetil ornitina, se obtuvo una pendiente negativa en función del tiempo de incubación, la cual disminuyó en presencia de la α -metil ornitina, lo que nos permite aseverar que el sitio de alquilación de la δ -N-yodoacetil ornitina es el sitio activo de la ornitina descarboxilasa, puesto que la α -metil ornitina, un inhibidor que actúa en el sitio activo, está impidiendo que el inhibidor irreversible entre a dicho sitio para producir la alquilación. Incluso, cuando la concentración del inhibidor competitivo α -metil ornitina se aumenta (a una concentración mayor que la de la δ -N-yodoacetil ornitina), la enzima se protege por completo de la inhibición irreversible. Esto confirma que la δ -N-yodoacetil ornitina sólo actúa en el sitio activo de la ornitina descarboxilasa. Los experimentos de diálisis también demostraron y confirmaron la irreversibilidad de la inhibición, porque cuando la enzima se incubó con la δ -N-yodoacetil ornitina y luego se dializó, la actividad enzimática no se recuperó aun después de 24 horas, en cambio, la inhibición producida por un inhibidor competitivo como la α -metil ornitina, se revirtió completamente por la diálisis. Cuando se hizo actuar la δ -N-yodoacetil ornitina sobre la ornitina descarboxilasa, en presencia de la α -metil ornitina, la actividad se recuperó en más de un 60% después de la diálisis, mostrando que la α -metil ornitina protegió al sitio activo de la ornitina descarboxilasa de la inhibición irreversible producida por la δ -N-yodoacetil ornitina, lo cual nos reafirma que el sitio de alquilación es el sitio activo. Por otro lado, la relación lineal del tiempo de inactivación media en función de la inversa de la concentración del inhibidor, genera una recta con una ordenada al origen, que demuestra, por un lado, un efecto de saturación de la enzima y por lo tanto la participación del sitio activo de la enzima en el proceso inhibitorio y, por otro, que antes de que ocurra la reacción irreversible, debe de formarse un complejo enzima-inhibidor reversible inicial (Kitz and Wilson, 1962). Finalmente, el hecho de que la ornitina descarboxilasa pueda usar como

sustrato a la δ -N-yodoacetil ornitina-1- 14 C es un apoyo fuerte de que este inhibidor entra al sitio activo de la enzima. Estos experimentos nos han permitido concluir que la δ -N-yodoacetil ornitina es un inhibidor irreversible dirigido al sitio activo de la ornitina descarboxilasa ya que por su semejanza estructural con el sustrato de la enzima, compite por el sitio activo, y una vez dentro del sitio activo la inhibición se torna irreversible debido a la alquilación producida probablemente con residuos de Cys presentes en el sitio activo (Tobias and Kahana, 1993).

De acuerdo a esto, el sitio activo de la ornitina descarboxilasa presenta tolerancia de grupos químicos voluminosos alrededor o en las cercanías del grupo δ -amino de la L-ornitina, ya que es capaz de aceptar un grupo tan voluminoso como el yodoacetilo unido a la ornitina en el δ -amino y es la primera vez que se informa esta característica estructural del sitio activo de la ornitina descarboxilasa. Se han hecho estudios de la tolerancia de grupos químicos voluminosos en el sitio activo de la ornitina descarboxilasa, con sustituciones en el carbono α y se ha encontrado que este espacio acepta desde la α -metil ornitina hasta la α -octil ornitina (Abdel Monem *et al.*, 1975; Bey *et al.*, 1978; Metcalf *et al.*, 1978; Schirlin *et al.*, 1992). Esto explica por qué la mayoría de los inhibidores de la ornitina descarboxilasa existentes, son derivados α -sustituidos.

La inhibición de la ornitina descarboxilasa por alquilación con δ -N-yodoacetil ornitina, implica que en su sitio activo debe de existir un grupo nucleofílico, aproximadamente a 11 Å del sitio de anclaje del carboxilato del sustrato. Lo más probable es que se trate de algún grupo sulfhidrilo, ya que esta enzima es altamente susceptible a los reactivos para grupos sulfhidrilo, a los agentes oxidantes (Kitani and Fujisawa, 1983) y recientemente se ha demostrado que la Cys-360 constituye una parte esencial del sitio activo (Tobias and Kahana, 1993).

La ornitina descarboxilasa también fue inhibida por la ϵ -N-yodoacetil lisina, pero en mucho menor grado que por la δ -N-yodoacetil ornitina. Esta inhibición fue no-competitiva y de carácter irreversible, ya que al incubar la ornitina descarboxilasa en presencia de la ϵ -N-yodoacetil lisina y medir su actividad en función del tiempo, se obtuvo una cinética de inhibición de primer orden, que es la característica de los inhibidores irreversibles. Por otro lado, la relación lineal del tiempo de inactivación media con la inversa de la concentración del inhibidor, pasa por el origen, lo que indica que la inhibición irreversible es fuera del sitio activo, y además que la reacción irreversible se presenta sin la formación inicial de un complejo reversible enzima-inhibidor.

Los resultados de este estudio nos muestran que el aumento de un átomo de carbono en el inhibidor, hace que se pierda su afinidad por el sitio activo: la δ -N-yodoacetil ornitina actúa en el sitio activo y la ϵ -N-yodoacetil lisina fuera de él. El hecho de que la ϵ -N-yodoacetil lisina produzca una inhibición irreversible fuera del sitio activo, implica que en la superficie de la enzima existe algún sitio por el cual este compuesto tiene afinidad y el carácter irreversible de la inhibición se podría explicar por una reacción de alquilación con algún nucleófilo en ese lugar.

La demostración de que la δ -N-yodoacetil ornitina actúa también como sustrato de la ornitina descarboxilasa, hace probable que en esta sustancia se pudieran introducir grupos químicos en el carbono α , con la idea de interferir con el mecanismo de acción normal de la enzima, que quizás redundaría en la obtención de inhibidores más efectivos.

CONCLUSIONES

La δ -N-yodoacetil ornitina es un potente inhibidor competitivo de la ornitina descarboxilasa, es decir, el sustrato, modificado con un sustituyente yodoacetilo, es aceptado en el sitio activo de la enzima, y una vez ahí el grupo yodoacetilo reacciona con algún grupo nucleofílico, probablemente residuos de Cys produciendo una inhibición irreversible. Así, la δ -N-yodoacetil ornitina es un inhibidor irreversible dirigido al sitio activo de la ornitina descarboxilasa.

El aumento de un átomo de carbono a la δ -N-yodoacetil ornitina, como en la ϵ -N-yodoacetil lisina hace que la inhibición de la ornitina descarboxilasa sea de tipo no-competitivo e irreversible y en menor grado que la producida por la δ -N-yodoacetil ornitina, es decir, la inhibición irreversible no ocurre en el sitio activo.

Se encontraron las siguientes características del sitio activo de la ornitina descarboxilasa de hígado de rata: la presencia de un grupo nucleofílico aproximadamente a 11 Å del anclaje del carboxilato del sustrato y la tolerancia a grupos químicos voluminosos.

SUMMARY

The δ -N-iodoacetyl-L-ornithine and its higher chemical homolog ϵ -N-iodoacetyl-L-lysine were synthesized and tested as active-site-directed irreversible inhibitors of rat liver ornithine decarboxylase. We found that δ -N-iodoacetyl-L-ornithine was a powerful inhibitor of ornithine decarboxylase, with $K_i = 0.5$ mM, whereas the ϵ -N-iodoacetyl-L-lysine produced a lower inhibition ($K_i = 4$ mM), also irreversible, but outside of the active site. The active site of ornithine decarboxylase showed tolerance of bulky chemical groups around or nearby the ornithine δ -amine group in the enzyme-substrate complex. Besides, we also detected a nucleophilic group, probably a sulfhydryl group, at approximately 11 Å of the ornithine carboxylate anchorage site.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, B. R., 1967. Design of active site directed irreversible enzyme inhibitors. John Wiley & Sons. New York. London. Sydney.
- BERGERON, R. J., J. S. MCMANIS, C. Z. LIU, Y. FENG, W. R. WEIMAR, G. R. LUCHETTA, Q. WU, J. ORTIZ-OCASIO; J. R. VINSON and D. KRAMER, 1994. Antiproliferative properties of polyamine analogues: a structure-activity study. *J. Med. Chem.*, **37**:3464-3476.
- BERGERON, R. J., Y. FENG, W. R. WEIMAR, J. S. MCMANIS, H. DIMOVA, C. PORTER, B. RAISLER and O. PHANSTIEL, 1997. A comparison of structure-activity relationships between spermidine and spermine analogue antineoplastics. *J. Med. Chem.*, **40**:1475-1494.
- CROWELL, J. A., E. I. GOLDENTHAL, G. J. KELLOFF, W. F. MALONE and C. W. BOONE, 1994. Chronic toxicity studies of the potential cancer preventive 2-(difluoromethyl)-dl-ornithine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**:341-354.
- DANZIN, C., P. CASARA, N. CLAVERIE and B. W. METCALF, 1981. α -ethynyl and α -vinyl analogues of ornithine as enzyme-activated inhibitors of mammalian ornithine decarboxylase. *J. Med. Chem.*, **24**:16-20.

- DAS, B., B. GUPTA, B. and R. MADHUBALA, 1995. Combined action of inhibitors of polyamine biosynthetic pathway with a known antimalarial drug chloroquine on *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Res.*, **31**:189-193.
- DAVIS, R. H., D. R. MORRIS and P. COFFINO, 1992. Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiol. Rev.*, **56**:280-290.
- GHODA, L., D. SIDNEY, M. MACRAE and P. COFFINO, 1992. Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**:2178-2185.
- GOHJI, K., S. I. MURAO, S. MAEDA, T. SUGIYAMA and S. KAMIDONO, 1986. Enhanced inhibition of colony formation of human renal cell carcinoma in soft agar by the combination of α -difluoromethylornithine and recombinant γ -interferon. *Cancer Res.*, **46**:6264-6268.
- HE, Y., T. SHIMOGORY, K., KASHIWAGI, A., A. SHIRAHATA and K. IGARASHI, 1995. Inhibition of cell growth by combination of alpha-difluoromethylornithine and an inhibitor of spermine synthase. *J. Biochem.*, **117**:824-829.
- HEBY, O. and L. PERSSON, 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukariotic cells. *TIBS*, **15**:153-158.
- HUNTER, K. J., C. A. M. STROBOS and A. H. FAIRLAMB, 1990. The interaction of trypanocidal drugs with polyamine and trypanothione metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**:1094-1096.
- KEINANEN, T. A., T. HYVONEN, M. C. PANKASKIE, J. J., VEPSALAINEN and T. O. ELORANTA, 1994. Derivatives of 1-aminooxy-3-aminopropane as polyamine antimetabolites: stability and effects on BHK21/C13 cells. *J. Biochem.*, **116**:1056-1062.
- KITANI, T. and H. FUJISAWA, 1983. Purification and properties from ornithine decarboxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **258**:235-239.
- KITZ, R. and I. B. WILSON, 1962. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, **237**:3245-3249.
- LU, L., B. A. STANLEY and A. E. PEGG, 1991. Identification of residues in ornithine decarboxylase essential for enzymic activity and for rapid protein turnover. *Biochem. J.*, **277**:671-675.
- LUK, G. D., M. D. ABELOFF, P. P. MCCANN, A. SJOERDSMA and S. B. BAYLIN, 1986. Long-term maintenance therapy of established human small cell variant lung carcinoma implants in athymic mice with a cyclic regimen of difluoromethylornithine. *Cancer Res.*, **46**:6091-6094.
- MAMONT, P. S. P., BOHLEN, P. MCCANN, P. BEY, F. SCHUBER and C. TARDIF, 1976. α -methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**:1626-1630.
- MAMONT, P. S. P., M. C. DUCHESNE, J. GROVE, J. and P. BEY, 1978. Antiproliferative properties of DL- α -difluoromethylornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**:58-66.
- MAMONT, P. S. P., C. DANZIN, M. KOLB, F. GERHART, P. BEY and A. SJOERDSMA, 1986. Marked and prolonged inhibition of mammalian ornithine decarboxylase *in vivo* by esters of (E)-2-(fluoromethyl) dehydroornithine. *Biochem. Pharmacol.*, **35**:159-165.
- MARTON, L. J. and A. E. PEGG, 1995. Polyamines as a targets for therapeutic intervention. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**:55-91.
- MERALI, S. and A. B. CLARKSON, Jr., 1996. Polyamine content of *Pneumocystis carinii* and response to the ornithine decarboxylase inhibitor DL-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**:973-978.
- MEYSKENS, F. L. Jr. and E. W. GERNER, 1995. Development of difluoromethylornithine as a chemoprevention agent for the management of colon cancer. *J. Cell. Biochem.*, **22**:126-131.
- METCALF, B. W., P. BEY, C. DANZIN, M. J. JUNG, P. CASARA and J. P. VEVERT, 1978. Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**:2551-2553.
- PEGG, A. E. and P. M. MCCANN, 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.*, **243**:C212-C221.

- PEGG, A. E., 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukariotes. *Biochem. J.*, **234**:249-262.
- _____, 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as target for chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**:759-774.
- PEGG, A. E., L. M. SHANTZ and C. S. COLEMAN, 1995. Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *J. Cell. Biochem.*, **22**:132-138.
- QUEMENER, V., Y. BLANCHARD, L. CHAMAILLARD, R. HAVOUI, B. CIPOLLA and J. P. MOULINOX, 1994. Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment. *Anticancer Res.*, **14**:443-448.
- RODRÍGUEZ-PÁEZ, L., C. D. NERI, R. I. BAEZA y R. C. WONG, 1997a. Estudio de los N-formil y N-yodoacetil derivados de la L-ornitina y de la L-lisina, como posibles inhibidores de la arginasa. *An. Esc. nac. Cienc. Biol., Méx.*, **42**:11-20.
- _____, 1997b. Efecto de la δ -N-formil ornitina y de la ϵ -formil lisina sobre la actividad de la ornitina descarboxilasa, enzima clave de la biosíntesis de las poliaminas. *An. Esc. nac. Cienc. Biol., Méx.*, **42**:21-30.
- SARILC, M. and A. B. CLARKSON Jr., 1994. Ornithine decarboxylase in *Pneumocystis carinii* and implications for therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**:2545-2552.
- SEILER, N., 1991. Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Progr. drug Res.*, **37**:107-159.
- SJOERDSMA, A. and P. J. SCHECHTER, 1984. Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**:287-300.
- TABOR, C. W. and H. TABOR, 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**:749-790.
- _____, 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **49**:81-99.
- TOBIÁS, K. E. and C. KAHANA, 1993. Intersubunit location of active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site-directed mutants. *Biochemistry*, **32**:5842-5847.
- WANG, C. C., 1991. A novel suicide inhibitor strategy for antiparasitic drug development. *J. Cell. Biochem.*, **45**:49-53.
- YARLETT, N. and C. J. BACCHI, 1994. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. *Biochem. Soc. Trans.*, **22**:875-879.