

АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ, МЕЧЕННЫЕ СТАБИЛЬНЫМИ ИЗОТОПАМИ

О. В. МОСИН

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.
Ломоносова, 117571, г. Москва, проспект Вернадского, д.86*

ВВЕДЕНИЕ

Метод включения атомов стабильных изотопов (дейтерия ^2H , углерода ^{13}C , азота ^{15}N , и кислорода ^{18}O) в молекулы является важным современным направлением в биохимических и структурно-функциональных исследованиях разнообразных природных соединений, включая аминокислоты и белки. Молекулы изотопно-меченых биологически активных соединений (БАС), полученные данным методом являются удобными инструментами для разнопрофильных метаболических и биохимических исследований, медицинской диагностики различных заболеваний, а также химических синтезов разнообразных изотопно-меченых соединений на их основе.

Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с их радиоактивными аналогами обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной- и лазерной спектроскопией, масс-спектрометрией. Развитие методов детекции стабильных изотопов за последние годы позволило повысить эффективность проведения многочисленных биологических исследований *de novo*, а также изучать структуру и механизм действия многих клеточных БАС на молекулярном уровне. Селективное введение атомов в молекулы может приводить к включению лишь одного отдельно выбранного атома по определённой позиции углеродного скелета молекулы. Это имеет большой интерес для *нанотехнологии*, когда в полученной молекуле фигурирует лишь один или несколько атомов, замещённых на стабильные изотопы по определённым положениям молекулы.

Разные методы, используемые для введения стабильных изотопов в молекулы БАС, обычно приводят к получению продуктов, представляющих собой смеси молекул, различающихся количеством атомов, замещённых на стабильные изотопы. Поэтому необходимо разрабатывать и применять новые подходы по получению изотопно-меченых соединений с использованием генно-инженерных методов, комбинации биотехнологических и химико-ферментативных подходов и т. п.

В зависимости от цели исследования при реализации того или иного подхода по получению изотопно-меченых аминокислот и белков должны учитываться их стоимость, выходы, возможности более полного выделения и очистки, а также изотопная чистота синтезированных молекул.

При получении изотопно-меченых молекул аминокислот и белков основные затраты связаны с закупкой сырья (субстрата), расходом электроэнергии (на перемешивание, аэрацию и процессы массопереноса) и охлаждением (теплообменом). При использовании

природных сырьевых источников (пептонов, белково-витаминных концентратов и т. п.) в качестве субстратов для производства изотопно-меченых соединений необходимо также учитывать расход электроэнергии, пара и топлива на предварительную глубокую обработку сырья, чтобы превратить его в поддающиеся микробиологическому воздействию соединения. Сравнительная оценка различных способов производства изотопно-меченых аминокислот и белков показывает, что основные расходы связаны со стоимостью сырья, составляющей 70-80% всех затрат.

Использование молекул аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами, в значительной мере определяется ограниченной доступностью и дороговизной самих высокоочищенных изотопов, выделяемых из различных природных источников. Природная распространенность стабильных изотопов варьирует от 0,015% (относительно общего количества элемента) для дейтерия ^2H , до 1,11% для изотопа углерода ^{13}C , однако, несмотря на низкое содержание изотопов в пробах, разработанные в последние годы высокие методы обогащения стабильных изотопов позволяют получать молекулы изотопно-меченых субстратов с высокой степени изотопной чистоты.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВКЛЮЧЕНИЯ АТОМОВ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ В МОЛЕКУЛЫ

Химический синтез

Синтетические методы включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот представляют собой модифицированный классический синтез аминокислот, в котором стадии карбоксилирования, аминирования, восстановления, гидрирования или гидролиза проводят с использованием меченых реагентов, содержащих вместо обычных атомов стабильные изотопы дейтерия, углерода ^{13}C , азота ^{15}N , и кислорода ^{18}O . Для синтезов $[^2\text{H}]$ -, $[^{15}\text{N}]$ - и $[^{18}\text{O}]$ аминокислот используются такие реагенты, как тяжёлая вода $^2\text{H}_2\text{O}$, дейтероводород $^2\text{H}_2$, дейтерохлористоводородная кислота ^2HCl ; LiAl_2H_4 ; B_2^2H_6 ; $^{15}\text{NH}_3$; $\text{Na}^{15}\text{NH}_2$; $^{15}\text{NH}_2\text{Cl}$, $^{18}\text{H}_2\text{O}$ и др.

Основным недостатком химического синтеза является то, что он приводит к получению молекул $[^{13}\text{C}]$ аминокислот, у которых атомы углерода ^{13}C локализуются по карбоксильным COOH -положениям молекул. Это существенно ограничивает использование полученных этим методом $[^{13}\text{C}]$ аминокислот для биологических исследований из-за возможной потери изотопной метки углерода ^{13}C за счёт функционирования многочисленных реакций ферментативного декарбоксилирования, происходящих в организме. Разработанные за последние годы синтетические методы введения атома углерода ^{13}C в молекулы аминокислот направлены на решение этой проблемы и затрагивают такие положения углеродных атомов в молекулах аминокислот, как метильная группа метионина, C_2 -положение в имидазольном кольце молекулы гистидина, а также атомы углерода при карбоксильных COOH -группах аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Любому химику известно, что химический синтез – многостадийная трудоёмкая операция, и требует больших расходов ценных реагентов и меченых субстратов и приводит в результате к продукту, представляющему собой рацемическую смесь *D*- и *L*-форм молекул аминокислот, для разделения которых требуются специальные методы. Более тонкие способы включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот

связаны с использованием комбинации химических и ферментативных подходов.

Изотопный (^1H - ^2H)- и (^{16}O - ^{18}O)-обмен.

При помещении молекулы в тяжёлую воду происходит быстрый **изотопный (^1H - ^2H)-обмен** атомов водорода на дейтерий в гидроксильных -ОН, карбоксильных -СООН, сульфгидрильных -SH, аминогруппах -NH₂ и амидных -NH группах. Реакция изотопного (^1H - ^2H)-обмена протекает по механизму электрофильного замещения протонов на дейтерий и затрагивает определённые, наиболее чувствительные к замещению протоны в молекулах. Этим методом могут быть получены в граммовых количествах дейтерированные ароматические аминокислоты - L-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланин в 85% $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ при 500 °C, L-[3,5- ^2H]тирозин в 6 н. $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ при слабом кипячении раствора, L-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофан в 75% [^2H]трифторуксусной кислоте при температуре 25 °C и L-[2- ^2H]гистидин в 6 н. NaO ^2H при 80 °C.

Но этот метод ограничен нестабильностью белков в жестких условиях (85-90% HCl/ H_2SO_4 , 80-100 °C), необходимых для проведения реакции изотопного обмена. Кроме того, проведение изотопного обмена в более жёстких условиях сопровождается рацемизацией аминокислот. Избежать этого позволяет непосредственное введение полученных за счёт (^1H - ^2H)-обмена дейтерированных аналогов аминокислот - L-[2,3,4,5,6- ^2H]фенилаланина, L-[3,5- ^2H]тирозина и L-[2,4,5,6,7- ^2H]триптофана в молекулы индивидуальных белков например, в мембранный белок бактериородопсин галофильных бактерий *Halobacterium halobium*, при росте бактерий на средах с этими аминокислотами [1].

Имеются и другие интересные схемы реализации изотопного обмена. Например, разработанный нашим соотечественником *Ю. Золотарёвым* метод включения атомов дейтерия в молекулы алициклических аминокислот (глицин, аланин, валин, изолейцин, серин, треонин, пролин, гистидин) реакцией *высокотемпературного твёрдофазного каталитического изотопного обмена* [2]. В соответствии с этим методом L-аминокислота в протонированной форме реагирует с газообразным дейтерием при 200-250 °C в присутствии высокодисперсного катализатора группы платины (Pt, Pd, Rh), и неорганического носителя (BaSO_4 , CaCO_3 , Al_2O_3).

С помощью изотопного обмена можно также включать изотоп кислорода-18 в молекулы аминокислот. Для этого используют аналогичную (^1H - ^2H)-обмену реакцию изотопного (^{16}O - ^{18}O)-обмена по атомам кислорода карбоксильных COOH- групп в молекулах аминокислот в присутствии H_2^{18}O в качестве источника метки. Использование этого метода на практике лимитируется высокой стоимостью полученных таким способом [^{18}O]аминокислот. Однако, он полностью оправдывает себя при проведении многочисленных биомедицинских исследований с применением синтезированных молекул [^{18}O]аминокислот, так как они, в отличие от их дейтерированных аналогов, стабильны по отношению к обратному изотопному обмену. [^{18}O]аминокислоты стабильно циркулируют в плазме крови в течении нескольких дней после инъекции. Обратный изотопный (^{18}O - ^{18}O)-обмен по карбоксильным положениям в молекуле [^{18}O]тирозина и других молекулах [^{18}O]аминокислот проявляется лишь при длительной инкубации клеток крови с питательной средой.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВКЛЮЧЕНИЯ АТОМОВ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ В МОЛЕКУЛЫ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Выращивание микроорганизмов на средах со стабильными изотопами.

Биотехнология предлагает альтернативный химическому способ включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот и белков, который приводит к высоким выходам синтезируемых продуктов, к эффективному включению атомов изотопов в молекулы соединений, и, самое главное, к сохранению природной L-конфигурации (*стереоселективности*) конечных продуктов. Метод заключается в выращивании штаммов-продуцентов необходимых БАС на ростовых средах, содержащих различные субстраты. Эти субстраты могут быть и органическими соединениями и неорганическими солями, содержащие стабильные изотопы дейтерия ^2H , углерода ^{13}C , азота ^{15}N и кислорода ^{18}O .

Решающее значение для биотехнологического введения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот и белков имеет правильный выбор микроорганизмов, способных к устойчивому росту на средах, содержащих стабильные изотопы и к продукции нужных БАС. Наиболее доступными объектами для получения многих изотопно-меченых белков признаны *микроводоросли*, большое разнообразие которых в природе позволяет выбирать среди них отдельные виды, способные к эндогенному накоплению белков. В то же время комплексное использование компонентов меченой биомассы микроводорослей позволяет выделять, например, дейтерированные аминокислоты из гидролизатов суммарных белков биомассы, выращенной на тяжёловодородной среде.

Другие традиционные штаммы микроорганизмов также могут эффективно применяться для получения изотопно-меченых молекул аминокислот и белков. Основными требованиями к микроорганизмам, используемым для этих целей являются устойчивый рост на средах, содержащих стабильные изотопы и высокий уровень продукции нужных БАС, который можно повысить за счёт применения генно-инженерных методов, а также *мутационной селекции*. Это создаёт предпосылки для конструирования новых бактериальных штаммов-продуцентов с заданными свойствами. Биотехнологический подход экономически целесообразен и особенно незаменим, когда необходимы высокая стереоселективность и максимальные уровни изотопного обогащения синтезируемых соединений.

При *биосинтетическом включении* атомов стабильных изотопов в молекулы используют несколько подходов – ***селективное*** по определённым положениям молекулы и ***униформное*** включение стабильных изотопов по всему углеродному скелету молекул.

Селективного включения атомов стабильных изотопов в определённые положения молекул аминокислот и белков достигается за счёт применения комбинации меченых и немеченых субстратов в ростовых средах, меченых предшественников аминокислот, или при использовании *ауксотрофных* по определённым аминокислотам штаммов микроорганизмов. Для этих целей очень хорошо подходит такая распространённая бактерия как *E. coli*, биосинтез аминокислот в которой к настоящему времени изучен наиболее детально и для которой получен многочисленный набор мутантных форм.

Униформное включение стабильных изотопов в молекулу достигается за счёт выращивания микроорганизмов на средах, содержащих меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты и с последующим фракционированием компонентов биомассы на различные классы природных соединений. Так, например, получают дейтерированные

аминокислоты и белки выращивая бактерии на средах с 99,9%-ной тяжёлой водой.

Молекулы аминокислот с равномерным характером включения атома углерода-13 по скелету молекулы получают, в основном, при выращивании автотрофных микроорганизмов на ростовых средах, содержащих вместо обычных углеродных субстратов их низкомолекулярные [^{13}C]аналоги, например $^{13}\text{CO}_2$. Этим методом на практике были получены многие [^{13}C]белки, синтезируемые микроводорослями: *ферридоксин*, *цитохром*, *флаводоксин* и др.

Включения атома азота ^{15}N в молекулы аминокислот добиваются аналогичным путём за счёт выращивания микроорганизмов на водных средах, содержащих K^{15}NO_3 или другие ^{15}N -содержащие соли, а высокообогащённые дейтерием аминокислоты можно получать с использованием ростовых сред, содержащих вместо обычной воды 99,9% тяжёлой воды.

Что же касается тяжёлой воды, то существует ряд определённых трудностей при использовании H_2O при выращивании клеток организмов, поскольку необходимо учитывать эффекты, связанные с клеточной адаптацией к ней. Известно, что тяжёлая вода действует токсически на клетки, ингибируя жизненно-важные функции роста и развития многих микроорганизмов. Однако, несмотря на биостатический эффект тяжёлой воды, разные таксономические роды бактерий могут быть достаточно легко адаптированы к росту и биосинтезу на средах содержащих максимальные концентрации тяжёлой воды, в то время как клетки высших растений способны выдерживать не более 60% тяжёлой воды, а животные клетки не более 30%.

Адаптация клетки к тяжёлой воде является комплексным феноменом и может привести к изменениям активностей ферментативных реакций, что сказывается косвенно на структуре и функциях молекул синтезируемых БАС, процессах биосинтеза и метаболизма и даже морфологии клетки. В связи с этим, разработка методов адаптации клетки к тяжёлой воде для получения высокообогащённых дейтерием молекул является актуальной задачей. При адаптации биологических объектов к тяжёлой воде учитываются химические изотопные эффекты, обусловленные различием в атомной массе, которые для изотопных пар протий/дейтерий могут быть аномально высокими. Различают первичные и вторичные изотопные эффекты. К **первичным изотопным эффектам** следует отнести изменение констант скоростей химических реакций, протекающих в тяжёлой воде по отношению к таковым в обычной воде, измеренных как соотношение k_p/k^2h . Это соотношение меняется для различных связей, образованных с участием дейтерия и может варьировать в пределах от 7 до 10 единиц. К **вторичным изотопным эффектам** относятся изменения в константах скоростей химических реакций, обусловленных действием $^2\text{H}_2\text{O}$ как растворителя (большая структурированность и вязкость, плотность, коэффициент диффузии и т. п.).

Кроме того, тяжёлая вода является соединением, активно поглощающем пары влаги из воздуха, неорганических солей среды, при стерилизации и т. п., и поэтому все этапы, связанные с выращиванием бактерий на тяжёловодородных средах необходимо проводить в герметических условиях с использованием безводных реагентов, предварительно перекристаллизованных в тяжёлой воде неорганических солей и т. п.

Атомы изотопа кислорода ^{18}O можно включать в молекулы аминокислот за счёт выращивания микроорганизмов на средах, содержащих другой изотопный аналог воды - H_2^{18}O воду. Адаптация клеток к H_2^{18}O в данном случае не является лимитирующим этапом как в случае с тяжёлой водой. Однако, H_2^{18}O используется в качестве источника изотопной

метки в редких случаях, вследствие высокой стоимости изотопных соединений кислорода.

Использование ауксотрофных мутантов бактерий для включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот и белков.

Использование *ауксотрофных* (т.е. требующих для своего роста дополнительных аминокислот) по определённым аминокислотам форм микроорганизмов для включения атомов стабильных изотопов в молекулы стало настолько популярным в биотехнологии, что сегодня его следует рассматривать как отдельное направление. Селективность включения атомов стабильных изотопов в молекулы достигается в результате добавления в ростовую среду меченого аналога соответствующей аминокислоты или её предшественника, по которым штамм ауксотрофен и которые непосредственно или через биосинтетический цикл предшественников *de novo* заменяют в белке нативную аминокислоту. При этом ауксотрофные штаммы могут относиться к различным таксономическим группам микроорганизмов, включая метаногенные и метилотрофные бактерии, биотехнологический потенциал которых для получения изотопно-меченых аминокислот в настоящее время общепризнан.

Метаногенные (образующие метан) ***бактерии***, относящиеся к группе облигатных анаэробов, которые получают энергию за счёт ассимиляции газовой смеси водород/диоксид углерода (H_2 - CO_2), чаще всего используют для включения изотопа углерода ^{13}C . Эффективность мечения аминокислот изотопом углерода ^{13}C достигается за счёт использования ацетатзависимых мутантов метаногенных бактерий, неспособных синтезировать ацетил-СоА из CO_2 и поэтому для их роста необходим экзогенный ацетат. Выращивание этих бактерий проводят на ростовых средах, содержащих наряду с (H_2 - CO_2) добавки ацетата, которые могут заменяться их [^{13}C]аналогами. При росте этих метанотрофов на средах с (H_2 - $^{13}CO_2$ диоксид углерода) и [^{13}C]ацетатом удаётся достичь равномерного характера включения изотопа углерода ^{13}C по углеродным скелетам в молекулах аминокислот, а также резкого уменьшения уровня включения экзогенного $^{13}CO_2$ в конечный продукт ассимиляции углерода - метан. При этом удаётся почти полностью избежать разбавления метки в молекулах синтезируемых [^{13}C]аминокислот.

Селективного включения атомов углерода ^{13}C в молекулы аминокислот можно достичь за счёт использования ростовых сред, содержащих немеченую смесь (H_2 - CO_2) и [^{13}C]ацетат либо $^{13}CO_2$ в составе смеси (H_2 - $^{13}CO_2$) и немеченый ацетат. Вследствие высокой стоимости $^{13}CO_2$ диоксида углерода и неудобств, связанных с его компрессией, включение атомов углерода ^{13}C в молекулы чаще всего осуществляют по первому варианту, т. е. с использованием смеси (H_2 - CO_2) и [^{13}C]ацетата. Но ассимилирующим [^{13}C]ацетат метанотрофам требуются значительные концентрации ацетата для оптимального роста. Вследствие этого основным недостатком использования этих бактерий является значительный расход изотопной метки.

При биотехнологическом включении атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот необходимо учитывать пути их биосинтеза в клетке, которые для метаногенных бактерий хотя и являются характеристичными, но несколько отличаются от известных для *E. coli*. Ниже приведены результаты американского исследователя *Патела* [3] по биосинтезу [^{13}C]аминокислот, полученных при выращивании ауксотрофной по ацетату бактерии *M. hungatei* в среде, содержащей в качестве источников углерода и

энергии ($\text{H}_2\text{-CO}_2$) и [1,2- ^{13}C]ацетат.

[^{13}C]Аланин. Включение атома изотопа углерода ^{13}C в молекулу аланина происходит за счет реакции карбоксилирования ацетил-СоА до пирувата. Такой путь биосинтеза был продемонстрирован для других таксономических родов и видов метаногенных бактерий.

[^{13}C]Серин и [^{13}C]глицин. Характер распределения атомов изотопа углерода ^{13}C в молекулах серина и глицина объясняется частичным фосфорилированием пирувата до фосфопирувата и образованием 3-фосфоенолпирувата по гликогенному пути ассимиляции углерода. Подтверждением этому служат значительные уровни активности ферментов-фосфоенолпируватсинтетазы, енолазы и 2-фосфоглицератмутаза, которые были обнаружены в клеточных экстрактах других метаногенов.

[^{13}C]Аспарагиновая кислота, [^{13}C]треонин и [^{13}C]метионин. Включение атома изотопа углерода ^{13}C по атому углерода α -карбоксильной группы аспартата, происходящего из С1-ацетата и по β -углеродному атому С2-ацетата и включение атома изотопа углерода ^{13}C в карбоксильные группы аминокислот из диоксида углерода, свидетельствует о том, что биосинтез аспартата в этой бактерии происходил через цикл трикарбоновых кислот в результате ферментативного карбоксилирования пирувата до оксалоацетата. Распределение атомов изотопа углерода ^{13}C в молекулах треонина и метионина происходит в соответствии с путем биосинтеза этих аминокислот из аспартата. Атом углерода в метильной группе молекулы метионина происходил из диоксида углерода.

[^{13}C]Лизин. Распределение атома изотопа углерода ^{13}C в молекуле лизина свидетельствует о том, что лизин синтезировался из пирувата и аспартата по типичному для бактерий диаминопимелиновому пути.

[^{13}C]Глутаминовая кислота, [^{13}C]аргинин и [^{13}C]пролин. В молекуле глутаминовой кислоты атомы изотопа углерода детектировались в C_β и C_γ положениях углеродного скелета молекулы. Атомы углерода при карбоксильной COOH -группе молекулы глутаминовой кислоты и в α -положении происходили из диоксида углерода. Этот результат свидетельствовал о том, что цикл трикарбоновых кислот приводил к образованию α -кетоглутарата. Распределение атомов изотопа углерода ^{13}C в молекулах аргинина и пролина аналогично таковому в глутаминовой кислоте.

[^{13}C]Лейцин, [^{13}C]валин и [^{13}C]изолейцин. Характер изотопного включения углерода ^{13}C в молекулы лейцина и валина свидетельствовал об их образовании из α -ацетолактата, в то время как биосинтез изолейцина отличался от ожидаемого пути биосинтеза этой аминокислоты из треонина. В клетках *M. hungatei* изолейцин образовывался из ацетата. Аналогичный путь биосинтеза изолейцина был обнаружен у спирохеты, у лейцинассимилирующего мутанта *Serratia marcescens*, и у мутанта *Saccharomyces cerevisiae*, у которого дефектен ген треониндезаминазы.

[^{13}C]Фенилаланин и [^{13}C]тирозин. Меченые позиции атома углерода в молекулах фенилаланина и тирозина полностью совпадали с типичным для бактерий путем биосинтеза этих аминокислот из шикимовой и хоризмовой кислот.

[^{13}C]Гистидин. Атом углерода в положении C_γ имидазольного кольца гистидина происходил из диоксида углерода. Углеродный атом в положении C_ϵ имидазольного кольца гистидина был замещен на изотоп углерода ^{13}C с участием С2-ацетата.

Другими перспективными источниками изотопно-меченых аминокислот и белков

признаны *метилотрофные микроорганизмы*, способные ассимилировать метанол и C1-углеродные соединения по *рибулозофосфатному* и *сериновому* циклам ассимиляции углерода. Метилотрофы представлены в таксономическом аспекте грамположительными, грамотрицательными бактериями и дрожжами, интерес к которым в настоящее время все возрастает благодаря разработке новых технологий химического синтеза метанола. Эти бактерии привлекают внимание исследователей прежде всего как дешевые источники микробного белка и аминокислот. Знание путей бактериального метаболизма позволяет осуществлять направленное введение атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот.

Метилотрофные бактерии окисляют метанол с использованием фермента - метанолдегидрогеназы, последующие окислительные реакции катализируют формальдегид- и формиатдегидрогеназа. Лишь затем продукт окисления метанола в виде формальдегида фиксируется клеткой одним из двух путей ассимиляции углерода: рибулозо-5-монофосфатным и сериновым (*табл.1*).

Табл. 1

Параметры роста некоторых используемых в биотехнологии штаммов метилотрофных бактерий

Штаммы бактерий	Молярный выход биомассы, г/моль метанола	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Эффективность конверсии углерода метанола, %	Количество потребленного азота, %
<i>Рибулозо-5-монофосфатный путь ассимиляции углерода</i>				
<i>Pseudomonas</i> C1	17,3	0,49	67,5	13,2
<i>Pseudomonas methanolica</i>	17,0	0,63	66,5	11,0
<i>Methylomonas methanolica</i>	15,7	0,52	62,0	11,7
<i>Сериновый путь ассимиляции углерода</i>				
<i>Pseudomonas</i> 1	12,1	0,176	47,5	11,37
<i>Pseudomonas</i> 135	12,1	0,14	47,5	11,37
<i>Pseudomonas</i> AM1	9,8	0,093	37,6	11,20
<i>Pseudomonas</i> M27	13,1	0,108	51,0	9,40
<i>Pseudomonas roseus</i>	13,1	0,15	51,0	10,60

Мы начали эффективно использовать ауксотрофные штаммы метилотрофных бактерий для получения изотопно-меченых молекул аминокислот и белков в группе академика РАН *В.И. Швеца* на кафедре биотехнологии Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова. Для этих целей мы использовали биологическую конверсию дешёвых низкомолекулярных меченых субстратов - (¹³C)метанола, (²H)метанола и тяжёлой воды ²H₂O в клетках метилотрофов в молекулы дорогостоящих меченых БАС [4-13]. Традиционным подходом при этом было выращивание соответствующих штаммов-продуцентов аминокислот, устойчивых к росту на средах, содержащих стабильные изотопы водорода, углерода, азота и др.

Наши исследования совместно с ведущим научным сотрудником Госцентра ГЕНЕТИКА *Д. А. Складневым* показали, что [¹³C]метанол в отличие от тяжёлой воды не оказывает существенного биостатического эффекта на ростовые и биосинтетические характеристики

метилотрофов. Данный подход эффективно можно использовать для введения в молекулы синтезируемых БАС двойной изотопной метки (например, введение изотопа углерода ^{13}C в молекулы на фоне максимальных концентраций тяжёлой воды в ростовых средах). Нами были получены $[\text{2H}]$ - и $[\text{13C}]$ аминокислоты с разными уровнями изотопной обогащённости при росте ауксотрофного по L-лейцину штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* и ауксотрофного по L-изолейцину штамма облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum*. Эти микроорганизмы выращивались на минимальных средах с (^{13}C)метанолом, (^2H)метанолом и тяжёлой водой $^2\text{H}_2\text{O}$ с последующим выделением $[\text{13C}]$ - и $[\text{2H}]$ аминокислот из культуральных жидкостей, так из гидролизатов белков биомассы.

Биосинтетически полученные молекулы $[\text{2H}]$ - и $[\text{13C}]$ аминокислот представляли собой смеси, в которых присутствовали изотопно-замещённые формы молекул, различающиеся количеством атомов водорода и углерода, замещённых на дейтерий ^2H и изотоп углерода ^{13}C . При этом распределение зависело как от общего включения изотопа в молекулу, так и от способа их получения. Наши исследования показали, что в условиях ауксотрофности по лейцину уровень изотопного обогащения молекулы лейцина, а также метаболически связанных с ним молекул аминокислот немного ниже, чем для других молекул аминокислот, вероятно, за счёт сохранения минорных путей метаболизма, связанных с биосинтезом данных аминокислот *de novo*. При выращивании *B. methylicum* на среде, содержащей 98% тяжёлую воду $^2\text{H}_2\text{O}$ и немеченый L-лейцин, уровни включения дейтерия в молекулы индивидуальных аминокислот культуральной жидкости составил 51% для молекулы лейцина/изолейцина, 58,8% для молекулы валина, в то время как уровни изотопного включения для молекулы аланина составили 77,5%, а для молекулы фенилаланина -75% (табл. 2).

Аналогичная корреляция наблюдается и в молекулах аминокислот белковых гидролизатов. Уровни включения атомов дейтерия ^2H и углерода ^{13}C в молекулы метаболически связанных аминокислот в пределах одинаковых концентраций меченых субстратов, обнаружили определённую корреляцию: уровни изотопного включения для молекул валина и лейцина (семейство пирувата), фенилаланина и тирозина (семейство ароматических аминокислот) коррелировали. Уровни изотопного включения для молекул глицина и серина (семейство серина), аспарагиновой кислоты и лизина (семейство аспарагина) также имели близкие величины. Важным результатом являются высокие уровни включения атомов стабильных изотопов ^2H и ^{13}C в молекулы полученных аминокислот.

Табл. 2

Суммарные уровни включения стабильных изотопов в молекулы секретируемых аминокислот и аминокислотные остатки суммарных белков биомассы *B. methylicum** и *M. flagellatum***.

Аминокислоты	Концентрация $^2\text{H}_2\text{O}$ в ростовой среде, об%								1 % $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$	
	24,5		49,0		73,5		98,0			
	КЖ#	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок	КЖ	белок
Глицин	-	15,0	-	35,0	-	50,0	-	90,0	60,0	90,0
Аланин	24,0	20,0	37,5	45,0	62,5	62,5	77,5	97,5	35,0	95,0
Валин	20,0	15,0	46,3	36,3	43,8	50,0	58,8	50,0	50,0	50,0
Лейцин/изолейцин	15,0	10,0	47,0	42,0	46,0	45,0	51,0	49,0	38,0	49,0

фенилаланин	15,0	24,5	27,5	37,5	51,2	50,0	75,0	95,0	95,0	80,5
Тирозин	-	20,0	-	25,6	-	68,8	-	92,8	-	53,5
Серин	-	15,0	-	36,7	-	47,6	-	86,6	-	73,3
Аспарагиновая кислота	-	20,0	-	36,7	-	60,0	-	66,6	-	33,3
Глутаминовая кислота	-	20,0	-	40,0	-	53,4	-	70,0	-	40,0
Лизин	-	10,0	-	35,3	-	40,0	-	58,9	-	54,4

*Данные по включению дейтерия в молекулы аминокислот приведены для *B. methylicum* при росте на средах, содержащих 2% CH₃OH и 24,5; 49,0; 73,5; 98,0% ²H₂O

**Данные по включению ¹³C приведены для *M. flagellatum* при росте на среде, содержащей обычную воду и 1% ¹³CH₃OH.

#Термином КЖ обозначены культуральные жидкости, полученные после отделения клеток из ростовых сред

Также нами была изучена адаптация этих бактерий к тяжёлой воде на предмет получения клеточных БАС. Было обнаружено, что способность к адаптации к тяжёлой воде у разных родов и видов бактерий различная и может варьировать в пределах даже одной таксономической группы метилотрофных бактерий. Адаптация к тяжёлой воде определяется как таксономической специфичностью микроорганизмов, так и особенностями их метаболизма, функционированием различных путей ассимиляции субстратов, а также эволюционной нишей, которую занимает исследуемый объект.

Полученные данные подтверждают устойчивое представление о том, что адаптация к тяжёлой воде является фенотипическим явлением, поскольку адаптированные к тяжелой воде клетки возвращаются к нормальному росту и биосинтезу в протонированных средах после некоторого лаг-периода. По-видимому, клетка реализует лабильные адаптивные механизмы, которые способствуют функциональной реорганизации работы жизненно-важных систем в тяжёлой воде. Так, например, нормальному биосинтезу и функционированию в тяжёлой воде таких биологически активных соединений, как нуклеиновые кислоты и белки способствует поддержание их структуры посредством формирования водородных (дейтериевых) связей в молекулах. Связи, сформированные атомами дейтерия различаются по прочности и энергии от аналогичных водородных связей. Различия в нуклеарной массе атома водорода и дейтерия косвенно могут служить причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить в свою очередь к структурным различиям и, следовательно, к функциональным изменениям в клетке.

Ферментативные функции и структура синтезируемых белков также изменяются при росте клеток на тяжёлой воде, что может отразиться на процессах метаболизма и деления клетки. После обратного изотопного (¹H-²H)-обмена ферменты не прекращают своей функции, но изменения в результате изотопного замещения за счет первичного и вторичного изотопных эффектов, а также действие тяжёлой воды как растворителя (большая структурированность и вязкость по сравнению с обычной водой) приводили к изменению скоростей и специфичности ферментативных реакций в тяжёлой воде.

Структурно-динамические свойства клеточной мембраны, которые в большинстве зависят от качественного и количественного состава липидов, также изменяются в присутствии тяжёлой воды. Полученный результат объясняется тем, что клеточная мембрана является

одной из первых органелл клетки, которая испытывает воздействие тяжёлой воды, и тем самым компенсирует реологические параметры мембраны (вязкость, текучесть, структурированность) изменением количественного состава липидов.

В общих чертах, при попадании клетки в дейтерированную среду из неё не только исчезает протонированная вода за счёт реакции обмена вода-тяжёлая вода, но и происходит очень быстрый изотопный (^1H - ^2H)-обмен в гидроксильных, карбоксильных, сульфгидрильных и аминогруппах всех органических соединений, включая нуклеиновые кислоты, липиды, белки и сахара. Известно, что в этих условиях только C-H связь не подвергается изотопному обмену и вследствие этого только соединения со связями типа C- ^2H могут синтезироваться *de novo*.

Кроме вышеобозначенных эффектов, возможное изменение соотношения основных метаболитов в процессе адаптации к тяжелой воде также может негативно сказываться на рост клетки. Возможно, что эффекты, наблюдаемые при адаптации к тяжёлой воде связаны с образованием в тяжёлой воде конформаций молекул с иными структурно-динамическими свойствами, чем конформаций, образованных с участием водорода, и поэтому имеющих другую активность и биологические свойства. Так, по теории абсолютных скоростей разрыв C ^1H -связей может происходить быстрее, чем C ^2H -связей, подвижность иона $^2\text{H}^+$ меньше, чем подвижность $^1\text{H}^+$, константа ионизации тяжёлой воды несколько меньше константы ионизации обычной воды.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что чувствительности различных клеточных систем к тяжёлой воде отличны. С точки зрения физиологии, наиболее чувствительными к замене $^1\text{H}^+$ на $^2\text{H}^+$ могут оказаться аппарат биосинтеза макромолекул и дыхательная цепь, т. е., именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей. В настоящее время исследование по изучению биотехнологического потенциала метилотрофных бактерий для направленного синтеза изотопномеченых аминокислот и других БАС ведутся на кафедре биотехнологии МГАТХТ им. М.В. Ломоносова и в ГНИИ Генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов в группе д.б.н. Д. А. Складнева.

Генно-инженерные методы включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот и белков.

Осуществлять направленное биосинтетическое включение атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот и белков удобно за счёт использования специальных сконструированных генетически *векторов экспрессии* нужных генов, ответственных за биосинтез того или иного интересующего исследователей белка. Оправдано и целесообразно использование для этих целей векторов экспрессии на основе плазмидной ДНК бактерии *E. coli*, например, вектор экспрессии T4 *лизоцима*. Метод также может применяться для получения индивидуальных меченых белков, экспрессия которых происходит в системах, отличных от *E. coli*, например, системы экспрессии на основе клеток насекомых или млекопитающих.

Другие микробные системы, в которых белки экспрессируются с высокими выходами, также могут быть пригодны для включения атомов стабильных изотопов в молекулы. К ним относятся такие хорошо изученные биологические объекты, как дрожжи, бактерии и бактериофаги. Так, за счёт использования вышеперечисленных микробных объектов в качестве векторов экспрессии были получены препаративные количества индивидуальных очищенных [^{15}N]белков: *нуклеаза стафилококка, интерлейкин, тиредоксин E. coli*,

гемоглобин, α-протеаза, ингибитор субтилизина, репрессор фага лямбда и др.

Ведущим научным сотрудником ГосНИИ ГЕНЕТИКА Д. А. Складневым разработан метод включения атомов дейтерия в молекулы индивидуальных белков на основе вектора экспрессии на основе штамма облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus flagellatum* [14]. Метод состоит в том, что в метилотрофах клонируют структурный ген исследуемого белка. Таким методом можно в будущем получать, например, [²H]-интерфероны, хорошо экспрессируемые в клетках метилотрофов, либо другие интересующие исследователей белки. Метод также позволяет вводить в молекулы аминокислот и белков другие атомы стабильных изотопов, например, изотоп углерода ¹³C.

Основным недостатком при использовании полученных данным методом [¹³C]аминокислот в ЯМР-исследованиях являются недостаточно высокие уровни изотопного обогащения аминокислот, что обуславливает усложнение спектров ЯМР за счет ¹²C-¹³C-спин-спинового взаимодействия между близлежащими атомами углерода в молекуле. Так как мультиквантовые резонансы близлежащих атомов углерода в молекуле являются основным препятствием для интерпретации спектров ЯМР, необходимо применять усовершенствованные методы включения атома изотопа углерода ¹³C в молекулы аминокислот, позволяющие лимитировать процесс разбавления изотопной метки. Так, в последнее время были генетически сконструированы новые штаммы бактерий, которые несут мутации по генам метаболизма определенного круга предшественников этих аминокислот. Это позволяет избежать разбавления изотопной метки при росте микроорганизма на среде, содержащей те или иные меченые субстраты за счет ингибирования биосинтеза аминокислот *de novo* у данных мутантных штаммов бактерий.

Выделение изотопно-меченых молекул аминокислот из белковых гидролизатов биомассы микроорганизмов.

Биомасса микроорганизмов, выращенных на средах, содержащих стабильные изотопы, является ценным источником различных изотопно-меченых БАС, в том числе аминокислот. Но для того чтобы выделить эти соединения из биомассы необходимо проводить её гидролитическое разложение (*гидролиз*) с использованием ферментативных или химических методов и последующей ионообменной хроматографией на катионо- и анионообменных смолах (дауэкс, амберлит, пермутит, аминекс, дуолит и др.).

Большое значение при проведении гидролиза белка имеет выбор того или иного гидролизующего агента, который определяется целью исследования. Ферментативное расщепление протеолитическими ферментами может протекать ступенчато с концов молекулы (экзопептидазами) или путём расщепления специфических отдельных пептидных связей полипептидной цепи (эндопептидазами), причём специфичность зависит от конфигурации, аминокислотной последовательности и конформации белка. Для селективного химического расщепления белков разработано очень много методов, среди которых имеется несколько методов расщепления по α-углеродному атому молекулы аминокислоты (например, через остатки дегидроаланина).

Щёлочи и кислоты обладают высокой гидролизующей способностью и поэтому их использование приводит к разрушению некоторых аминокислот и к изотопному обмену в триптофане, тирозине и гистидине и в некоторых других аминокислотах. В условиях

щелочного гидролиза (4 н. Ва(ОН)₂ или NaOH, 24 ч, 110 °С) реакций изотопного обмена водорода на дейтерий практически не наблюдается (исключением является протон (дейтерон) у атома С2 гистидина). Существенным недостатком щелочного гидролиза, лимитирующим его использование, является значительная рацемизация аминокислот. Поэтому на практике щелочной гидролиз используется крайне редко, а вот кислотный - очень широко.

Кислотный гидролиз в стандартных условиях (6 н. HCl или 8 н. H₂SO₄, 24 ч, 110 °С) приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот. Добавление в реакционную среду фенола, тиогликолевой кислоты, меркаптоэтанола, позволяет сохранить до 80-85% триптофана в гидролизате. Кроме этого, в условиях кислотного гидролиза с высокой скоростью протекает изотопный обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов (дейтеронов) при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот. Поэтому для получения реальных данных о биосинтетическом включении дейтерия в белок рекомендуется проводить кислотный гидролиз в присутствии дейтерированных реагентов. Этим способом могут быть выделены и анализированы с использованием ионообменной хроматографии большинство молекул аминокислот в составе гидролизатов белка.

Метод выделения молекул аминокислот из гидролизатов биомассы, будучи широко применяем на практике часто требует использования вредных буферных растворов (ацетат, формиат, пиридин и др.), нескольких колонок с последующей рехроматографией для полного выделения чистых аминокислот из гидролизатов биомассы.

Большой практический интерес представляет реализация преимуществ препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) при разделении оптически чистых изотопно-меченых молекул аминокислот и их N-производных в количествах, необходимых для биоаналитических и синтетических целей. Научным сотрудником МГАТХТ им. М.В. Ломоносова *Егоровой Т. А.* разработан метод препаративного разделения индивидуальных молекул аминокислот из различных микробиологических источников с помощью ОФ ВЭЖХ в виде бензилоксикарбонильных производных (N-Cbz производных) аминокислот [15]. Этот метод позволяет выделять аминокислоты с высоким выходом (от 67% до 89%) и хроматографической чистотой (96-99%) и может быть использован для выделения [²H]-, [¹³C]-, [¹⁵N] и [¹⁸O]аминокислот из белковых гидролизатов различных источников.

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ВКЛЮЧЕНИЯ АТОМОВ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ В МОЛЕКУЛЫ.

Другим альтернативным подходом по включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот является химико-ферментативный метод, основанный на комбинации синтетических и ферментативных реакций. Для этого перспективно и экономически оправдано использование препаратов очищенных ферментов и их экстрактов, безклеточных ферментативных систем, а также иммобилизованных ферментов.

Ферментативные реакции осуществляют на иммобилизованных на твёрдом носителе ферментах, таких как *аланиндегидрогеназе* (КФ 1.4.1.1) в присутствии NADH при получении [²H]аланина, *иммобилизованной на сахарозе фенилаланинаммонийлиазе* (КФ 4.3.1.5) и *фенилаланингидроксилазе* (КФ 1.14.16.1), при получении [²H]фенилаланина и

[²H]тирозина, *триптофансинтазе* (КФ 4.2.1.20), при получении [²H]триптофана, глутаматдегидрогеназе (КФ 1.4.1.2), при получении [²H]глутаминовой кислоты, аспартазы (КФ 4.3.1.1), при получении [²H]аспарагиновой кислоты и *серингидроксиметилазе* (КФ 2.5.1.6) при получении [²H]серина.

Осуществление различных методов включения атомов изотопа азота ¹⁵N в молекулы аминокислот связано с использованием методов *газовой подпитки* ¹⁵NH₃, *иммобилизацией клеток* с последующей активацией носителя ¹⁵N-меченным сульфатом аммония, или с оптимизацией концентраций [¹⁵N]предшественников аминокислот в ростовых средах.

Для включения атомов изотопа углерода ¹³C в молекулы аминокислот могут применяться аналогичные ферментативные подходы с применением [¹³C]глюкозы, однако при проведении ферментативной реакции требуются значительные количества высокообогащённой [¹³C]глюкозы и поэтому данный метод является слишком дорогим для получения [¹³C]аминокислот. Кроме того, большая часть глюкозы (до 70%) идёт на обеспечение процесса дыхания клетки, поэтому эффективность мечения молекул БАС изотопом углерода за счёт ферментативного окисления [¹³C]глюкозы невысокая. Перспективны также подходы с использованием комбинации химико-ферментативных и биотехнологических способов включения атомов стабильных изотопов в молекулы аминокислот.

Ферментативный метод используется для препаративного лабораторного и промышленного получения оптически активных аминокислот, благодаря высокой субстратной специфичности ферментов и возможности селективного введения стабильных изотопов по определённым положениям молекул аминокислот. Основными аспектами использования ферментативных систем являются каталитические реакции асимметрического образования связи на прохиральных субстратах и ферментативное разделение рацематов L- и D-аминокислот. Что касается хроматографического разделения рацематов на прохиральных сорбентах, то оно все же недостаточно эффективно для разделения и обеспечивает в лучшем случае больше половины меченого продукта в виде одного из оптических L- и D-антиподов. Ферментативная стадия часто завершает химический синтез изотопно-меченых аналогов аминокислот, причем использование для этих целей интактных клеток или их экстрактов так же эффективно, как использование очищенных ферментов. Однако, субстратная специфичность ферментов, их ограниченная доступность, сложность их выделения и очистки ограничивают их применение для этих целей. Несмотря на то, что ферментативные синтезы преодолевают все вышеперечисленные проблемы, низкие выходы очищенных ферментов лимитируют использование химико-ферментативных реакций. С другой стороны, методы генной инженерии открывают возможности для получения большинства ферментных препаратов в препаративных количествах.

В заключение отметим, что несмотря на многочисленность описанных в современной литературе подходов по включению атомов стабильных изотопов в молекулы БАС, в настоящее время практически не существует способов, которые позволяют получать аминокислоты и белки, меченные ²H, ¹³C, ¹⁵N и ¹⁸O за счет того или иного универсального подхода, хотя химико-ферментативные методы позволяют использовать одну и ту же химико-биохимическую реакцию для получения меченых аминокислот за счет применения различных меченых низкомолекулярных реагентов (субстратов). Включение атомов стабильных изотопов в молекулы удобнее всего проводить с использованием биотехнологических подходов, в то время как селективности включения стабильных изотопов в молекулы БАС можно

достичь за счёт применения комбинации синтетических и ферментативных реакций. Выбор метода получения молекул БАС, несущих тот или иной атом изотопа, определяется прежде всего целью исследования.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Мосин О. В., Егорова Т. А., Чеботаев Д. А., Складнев Д. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 4. - С. 27-34.
2. Золотарёв Ю. А., Зайцев Д. А., Татур В. Д., Мясоедов Н. Ф. Способ получения равномерно меченных дейтерием оптически активных α -аминокислот: А. с. N 1685903 СССР. - // ВНИИГПЭ. - 1991. - N 39. - С. 92.
3. Patel G. B., Roth L. A. // *Can. J. Microbiol.* - 1978. - V. 24. - P. 1007-1010.
4. Mosin O. V., Karnaukhova E. N., Skladnev D. A. // *Application of methylotrophic bacteria for preparation of stable isotope labelled amino acids. Proc. 7th Int. Symp. Genetics of Industrial Microorganisms. - Quebec. Canada. - 26 June 1994. - P. 163.*
5. Mosin O. V., Karnaukhova E. N., Skladnev D. A. // *Preparation of $2H$ - and $13C$ -amino acids via bioconversion of C1-substrates. Proc 8th Int. Symp. Microb. Growth on C1-Compounds. - San Diego. U.S.A. - 27 August 1995. - P. 80.*
6. Karnaukhova E. N., Mosin O. V., Reshetova O. S. // *Amino Acids*. - 1993. - V. 5. - P. 125.
7. Складнев Д. А., Мосин О. В., Егорова Т. А., Ерёмин С. В., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 5. - С. 14-20.
8. Мосин О. В., Складнев Д. А., Егорова Т. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 3. - С. 3-12.
9. Мосин О. В., Егорова Т. А., Складнев Д. А., Швец В. И. // *Биоорганическая химия*. - 1996. - Т. 22. - N 10-11. - С. 861-874.
10. Мосин О. В. Разработка методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных $2H$ (D) и $13C$, с высокими степенями изотопного обогащения. Автореф. дис. канд. хим. наук. М.: МИТХТ им. М. В. Ломоносова. - 1996. - С. 3-23.
11. Мосин О. В., Егорова Т. А., Чеботаев Д. А., Складнев Д. А., Юркевич А. М., Швец В. И. // *Биотехнология*. - 1996. - N 4. - С. 27-34.
12. Мосин О. В., Карнаухова Е. Н., Пиеничникова А. Б., Складнев Д. А., Акимова О. Л. // *Биотехнология*. - 1993. - N 9. - С. 16-20.
13. Mosin O.V., Skladnev D. A., Svets V.I. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 1998.
14. Skladnev D. A., Tsygankov Y. D. // *Conversion of stable isotope labeled methanol to components of bacterial biomass. Proc. 6 th Eur. Conf. on Biomass for Energy. - Athens. - Greece. - 22-26 April. - 1991. - P. 234.*

*15. Егорова Т. А., Еремин С.В , Мосин О. В., Мицнер Б.И, Звонкова Е.. Н., Швец В.И.
Биотехнология. - 1993. - N 5. - С. 32-36.*