

УДК 577.152

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКАХ И БЕЛКАХ

С. Д. Варфоломеев\*, Е. Н. Ефременко, В. В. Верхуша, П. В. Вржеш

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел.: (095) 939-35-89, факс: (095) 939-54-17; e-mail: sdvarf@enzyme.chem.msu.ru)

В работе продемонстрирована возможность получения белков тривиальным биосинтетическим путем с заменой ряда ключевых аминокислот на их элементоорганические аналоги. Установлено, что белки семейства зеленого флуоресцентного белка, содержащие фторзамещенные аналоги фенилаланина, триптофана и тирозина, обладают несколько иными характеристиками флуоресценции, в частности смещенным максимумом и измененной шириной спектров флуоресценции. Показано, что включение синтетических аналогов аминокислот в клеточные белки оказывает существенное влияние на кинетику роста клеток. В ряде случаев наблюдаются существенные изменения законов развития клеточных популяций. Установлено, что опухоль саркомы Эрлиха прекращает свой рост на 13–14-е сутки с начала введения 4-фторфенилаланина (ФФА), поскольку происходит его встраивание в структуру белков опухоли. ФФА действует как индуктор апоптоза раковых клеток. При включение того же аналога в белки дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* 232 была установлена 40%-я замена природной аминокислоты фенилаланина, при этом клетки продемонстрировали стабильный рост на средах с высокой концентрацией ФФА (до 5 г/л).

Большой интерес к получению белков, содержащих синтетические аминокислоты [1], обусловлен как возможностью решения ряда фундаментальных задач в области структуры белка и ее взаимосвязи со свойствами, так и их потенциально широким практическим применением [2–5]. Включение в белки химических аналогов аминокислот может позволить безгранично расширять возможности синтеза новых белков с ранее неизвестными свойствами и значительно изменять свойства отдельных уже хорошо изученных белков, ферментов в направлении их практического применения. В частности, можно ожидать расширения субстратной специфичности ферментов, изменения их стабильности, рН и температурного оптимума, кинетики фолдинга и т.п. [1]. Замена существенной доли аминокислот в белках микроорганизмов на их синтетические аналоги – это путь к созданию абсолютно новых биотехнологических процессов и получению новых продуктов на основе ранее неизвестных микробных продуцентов [6, 7]. Использование аналогов аминокислот и их производных для включения в белки клеток с высокими скоростями пролиферации может позволить создать новые противораковые и антимикробные препараты.

Данная статья имеет целью проиллюстрировать на конкретных экспериментальных примерах возможность включения неприродных аналогов аминокислот в состав белков, синтезируемых в клетках *de novo* и как следствие этого изменения свойств самих белков и клеток.

### Методы исследования

*Микроорганизмы.* В работе использовали клетки *E. coli*, трансформированные плазмидой с генами флуо-

ресцентных белков (FP), а также штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 230, 232, 233, взятые из микробиологической коллекции биологического факультета Московского государственного университета.

Среда роста для бактериальных клеток, приготовленная на основе 50 мМ фосфатного буфера, имела следующий состав: смесь 20 незаменимых аминокислот (по 0,25 г/л каждой), глюкоза (20 г/л), тиамин (250 мг/л), биотин (100 мг/л), ампициллин (500 мг/л). После выращивания клеток (37°, 180 об/мин) в течение 24 ч до конца логарифмической фазы роста биомассу отделяли от среды центрифугированием (*Beckman J2-21*, 8000 g, 10 мин) и помещали в среду, аналогичную по своему составу вышеприведенной, за исключением того, что глюкоза была замещена на глицерин (20 г/л), затем вводили синтетический аналог аминокислоты в исследуемой концентрации. В эту же среду вносили IPTG в качестве индуктора (0,5 мМ) и проводили экспрессию FP при 34° в течение 5 ч. Выделение и очистку FP проводили согласно методике, описанной в [8].

Дрожжи культивировали в среде, приготовленной на основе 100 мМ фосфатного буфера (рН 6,8) и содержащей 50 г/л глюкозы, 2 г/л дрожжевого экстракта (*Difco*), 1 г/л хлорида натрия и 0,5 г/л сульфата аммония. После 22 ч роста дрожжевую биомассу отделяли от среды на центрифуге (*Beckman J2-21*, 6 000 g, 10 мин) и разрушали с помощью ультразвука (22 кГц, 3 мин). В супернатант, полученный после отделения осадка (*Beckman J2-21*, 12000 g, 15 мин), добавляли ТХУ (до конечной концентрации 5%). Белковый осадок использовали в аминокислотном анализе (анализатор *Waters AccQ. Tag HPLC system*).

\*Адресат для переписки.

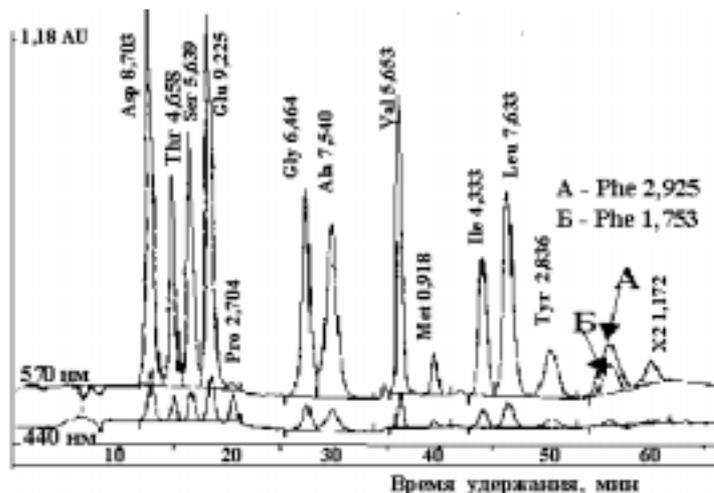


Рис. 1. Данные аминокислотного анализа общего белка, выделенного из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 232: клетки выращивали в отсутствие (А) и в присутствии (Б) ФФА. X<sub>2</sub> – пик, соответствующий ФФА

**Противоопухолевое действие 4-фторфенилаланина.** Исследования проводили на мышах линии С57В1 с привитой опухолью (саркома Эрлиха). Прививочная доза составляла 2·10<sup>6</sup> клеток/мышь. Опытная и контрольная группы состояли из четырех животных. Тестируемый аминокислотный аналог вводили внутривенно (доза 1,735 мг/мышь на 1, 3, 5, 7 и 10-е сутки после перевивки опухоли).

**Результаты и их обсуждение**

**Флуоресценция белка с заменой ряда аминокислот на их элементарноорганические аналоги.** Для получения белков с заменой ряда аминокислот на их синтетические аналоги нами был использован тот факт, что фермент аминоксил-т-РНК-синтетаза не обладает абсолютной специфичностью и способен присоединять к аминоксил-т-РНК ряд синтетических аналогов природных аминокислот, близких к ним по структуре [9]. Необходимым условием синтеза модифицированных белков является использование плазмиды с геном синтезируемого белка, «включение» синтеза которого может быть обеспечено наличием индуктора.

Метод синтеза генно-инженерных белков с заменой некоторых аминокислот на их аналоги включает следующие основные стадии: 1) выращивание культуры *E. coli* до конца логарифмической фазы роста на богатой среде; 2) смена среды на синтетическую с заменой необходимой аминокислоты на ее элементарноорганический аналог; 3) индукция плазмидного гена; 4) биосинтез плазмидного белка с включенной синтетической аминокислотой.

Нами был проведен синтез флуоресцентных белков семейства зеленого флуоресцентного белка (GFP) с заменой фенилаланина, триптофана и тирозина на их фторсодержащие производные. Показано, что замена природных аминокислот на их элементарноорганические аналоги изменяет спектральные характеристики флуоресценции, а именно: происходит смещение максимума и изменяется полуширина спектров флуоресценции.

*Рост клеток Saccharomyces cerevisiae в средах, содержащих элементарноорганические аналоги аминокислот.*

Было проведено изучение кинетики роста нескольких штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и показано, что 4-фторфенилаланин (ФФА) является ингибитором роста, при этом его влияние на рост популяции клеток имеет довольно сложный характер. Низкие концентрации ФФА (вплоть до 0,1 г/л) практически не влияют на рост клеток дрожжей. Присутствие ФФА в среде в концентрации 0,1–0,5 г/л приводит к снижению скорости роста дрожжей в 2–2,5 раза. Далее скорость роста популяции данных клеток практически перестает зависеть от концентрации синтетической аминокислоты в среде. Следует отметить устойчивый рост популяции дрожжей при концентрации ФФА, равной 1 г/л и выше. Наблюдаемая зависимость роста дрожжей от концентрации ФФА может быть достаточно хорошо описана следующим эмпирическим уравнением:

$$\mu(I) = \frac{\mu_1 \left( 1 + \frac{I}{k_1} \right) + \frac{\mu_2 I^2}{k_1 k_2}}{1 + \frac{I}{k_1} + \frac{I^2}{k_1 k_2}}, \tag{1}$$

где *I* – концентрация ФФА;  $\mu_1$  и  $\mu_2$  – удельные скорости роста дрожжей при нулевой и бесконечно большой концентрации ФФА соответственно;  $k_1$  и  $k_2$  – эмпирические константы.

**Кинетические параметры роста разных штаммов дрожжей в среде, содержащей 4-фторфенилаланин**

<i>S. cerevisiae</i> strains	$\mu_1, \text{ч}^{-1}$	$\mu_2, \text{ч}^{-1}$	$k_1, \text{мМ}$	$k_2, \text{мМ}$
230	0,22±0,09	0,087±0,005	2,54±0,07	6,19±0,05
232	0,34±0,09	0,16±0,05	0,081±0,01	0,42±0,03
233	0,35±0,07	0,19±0,05	0,79±0,06	1,72±0,04

В таблице приведены значения  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  для трех исследованных штаммов дрожжей. Величина  $k_1$  характеризует значения концентраций ФФА в зоне нечувствительности роста к этому веществу, а  $k_2$  – в зоне заметного падения скорости роста.

Лучшим по своим кинетическим характеристикам оказался штамм 232, демонстрирующий устойчивый рост на средах с высокими концентрациями ФФА (до 5 г/л). Данные аминокислотного анализа общего белка, выделенного из дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* 232, показали, что значительная часть фенилаланина заменилась на ФФА (рис. 1). В зависимости от условий культивирования 35–40% природной аминокислоты заменялось на синтетическую. Содержание остальных аминокислот при этом существенно не изменилось.

*Элементоорганические аналоги аминокислот как фактор остановки роста раковой опухоли.* Было исследовано влияние ряда аналогов аминокислот на динамику роста популяции раковых клеток на примере опухоли саркомы Эрлиха, перевитой животным. Показано, что введение в опухоль аналогов аминокислот принципиальным образом изменяет динамические закономерности роста раковых клеток.

Неприродные аминокислоты индуцируют остановку роста опухоли и формально действуют как фактор индукции апоптоза. На рис. 2 приведена динамика изменения веса опухоли саркомы Эрлиха, определенная по весу животных (г). Эти данные представляют собой усредненные значения веса опухолей у четырех мышей. Видно, что рост опухоли в контроле имеет экспоненциальный характер (рис. 2). В этом случае на 13–14-й день эксперимента наблюдается гибель всей исследуемой популяции мышей.

Рост опухоли описывается «классическим» экспоненциальным уравнением вида

$$N(t) = N_0 \cdot e^{\mu t}, \quad (2)$$

где  $N(t)$  – число клеток или вес опухоли в момент времени  $t$ ;  $N_0$  – начальный вес опухоли;  $\mu$  – удельная скорость роста опухоли.

Стрелками на рис. 2 обозначены моменты внутрибрюшинного введения ФФА животному (на 1, 3, 5, 7 и 10-е сут после перевивки опухоли). Видно, что под действием ФФА принципиально меняются законы роста опухоли: неприродная аминокислота индуцирует остановку

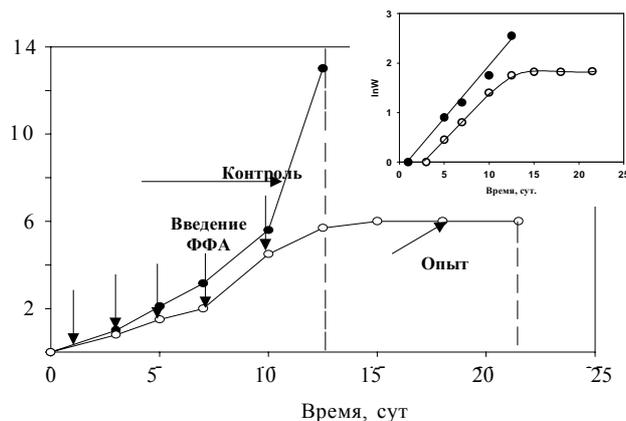


Рис. 2. Кинетика роста опухоли саркомы Эрлиха, перевитой мышам, в отсутствие инъекций ФФА (контроль) и под воздействием инъекций ФФА (опыт)

роста опухоли на определенном уровне. При этом животные сохраняют жизнеспособность до 20–21 сут с момента привития опухоли.

Для описания динамики роста популяции клеток с остановкой роста предлагается следующее уравнение:

$$N(t) = N_0 \exp\left\{ \frac{\mu}{\lambda} [1 - \exp(-\lambda t)] \right\}. \quad (3)$$

Уравнение (3) адекватно описывает кинетические кривые типа (2). Действительно, при малых временах процесса ( $t \rightarrow 0$ ) имеем  $N(t) = N_0 \cdot e^{\mu t}$ , а при больших временах ( $t \rightarrow \infty$ ) кинетическая кривая выходит на предел  $N(t \rightarrow \infty) = N_0 \cdot \exp(\mu/\lambda)$ . Видно, чем больше величина  $\lambda$ , тем ниже предельный уровень размера популяции. Параметр  $\lambda$  можно назвать константой скорости замедления роста популяции в процессе ее развития или кинетическим параметром апоптоза.

Оценка кинетических параметров роста исследуемой опухоли приводит к следующим значениям:

$$\mu_0 = 0,2 \text{ сут}^{-1}, \quad \mu_{\text{ФФА}} = 0,2 \text{ сут}^{-1}, \quad \lambda = 0,1 \text{ сут}^{-1},$$

где  $\mu_0$  и  $\mu_{\text{ФФА}}$  – удельные скорости роста опухоли в отсутствие и в присутствии ФФА. Молекулярный механизм влияния неприродных аминокислот на рост опухоли требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 00-04-48777).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pojitkov A., Efremenko E., Varfolomeyev, S.* // J. Molec. Catalysis B: Enzymatic. 2000. **10**. P. 47.
2. *Larsson R., Dhar S., Ehrsson H., Nygren P., Lewensohn R.* // Br. J. Cancer. 1998. **78**. P. 328.
3. *Gueguen P., Pardon M., Perbal B., Herve G.* // Biochim. Biophys. Acta. 1980. **615**. P. 59.
4. *Parsons J., Xiao G., Gilliland G., Armstrong R.* // Biochemistry. 1998. **37**. P. 6286.
5. *Morris H., Schlesinger M.* // J. Bacteriol. 1972. **111**. P. 203.
6. *Fukuda K., Watanabe M., Asano K., Ouchi K., Takasawa S.* // Current Genetics. 1991. **20**. P. 449.
7. *Rhodes P., Wilkie D.* // J. General Microbiology. 1975. **91**. P. 217.
8. *Ibba M., Hennecke H.* // FEBBS Letters. 1995. **364**. P. 272.
9. *MacLean S., Huber R.* // Cancer Research. 1971. **31**. P. 1669.

Поступила в редакцию 20.06.2000