



УДК 547.85.04:546.11*3

БИОСИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ
S-АДЕНОЗИЛ-*L*-МЕТИОНИНА ДРОЖЖЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Мясоедов Н. Ф., Кузнецова О. В., Козик В. С.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Описано биосинтетическое получение S-аденозил-*L*-[метил-³H]метионина из *L*-[метил-³H]метионина при культивировании диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофных по метионину, в условиях высокого содержания *L*-метионина в культуральной среде. Радиохимическая чистота превышает 95%. Показана биологическая активность полученных препаратов в реакции трансметилирования с участием дрожжевой гомоцистеин-метилтрансферазы.

S-Аденозил-*L*-метионин (SAM) играет большую роль в основных биохимических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность организма, таких, как трансметилирование, транссульфирование и трансаминопропилирование. SAM связан с метаболизмом РНК, ДНК, белков, аминокислот, пептидов, витаминов, гормонов, полисахаридов, алкалоидов, липидов, тиоферментов, биогенных аминов и др.

Успехи использования SAM для лечения ряда патологических расстройств организма (например, атеросклероза, деформирующего артроза, депрессии, бессонницы, болевых неврологических синдромов и т. д.) существенно расширили области применения этого соединения, ранее представлявшего интерес лишь для биохимиков. В связи с этим возросла потребность в SAM, в том числе и меченном радиоактивными изотопами.

В живых организмах SAM образуется в цитоплазме из *L*-метионина и АТФ с помощью метионин-аденозилтрансферазы (КФ 2.5.1.6). Для его препаративного получения используют энзиматический и микробиологический синтезы, поскольку химическим путем это соединение удастся получить лишь с очень низким выходом. Впервые синтез SAM был осуществлен из метионина и АТФ с помощью ферментной фракции, выделенной из печени кролика [1]. Впоследствии было описано получение SAM с участием SAM-синтазы, выделенных из дрожжей [2] и бактерий [3]. Доступным в больших количествах SAM стал после открытия уникальной возможности его накопления дрожжевыми клетками, выращенными в среде с избыточным содержанием *L*-метионина [4]. Способность к синтезу SAM была затем обнаружена и у других организмов — *Aspergillus*, *Penicillium*, *Lypomyces*, *Rhizopus* и т. д. [5]. Применительно к синтезу радиоактивного SAM этот способ приводит к большим потерям радиоактивного *L*-метионина (выход не превышает 15–20%) [6]. Однако микробиологический путь синтеза SAM казался предпочтительным ввиду своей простоты.

В основу получения меченных тритием препаратов SAM была положена методика Шленка с соавт. [7] с модификациями, изложенными ниже.

В работе [7] отмечено, что наивысший выход SAM достигается при использовании сухих коммерческих пекарских дрожжей. Применение влажных дрожжей (коммерческая форма в СССР), по этим данным, приводит к значительному снижению количества выделяемого SAM. Для получения SAM мы использовали лабораторную линию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофную по метионину, для предотвращения разбавления *L*-[метил-³H]метионина эндогенным метионином.

Наилучшие результаты были получены при использовании диплоидных дрожжей по сравнению с гаплоидными и триплоидными. Кроме того, количество SAM, синтезируемое ауксотрофными клетками, оказалось выше, чем у прототрофов. Так, диплоидные дрожжи *met*⁻генотипа синтезировали 12,5 мкмоль SAM в расчете на 1 г «сырых» клеток, тогда как в случае

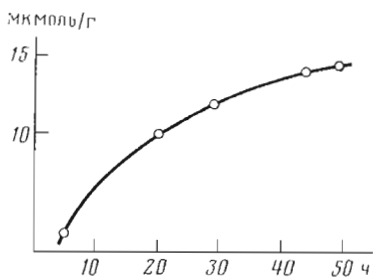


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика синтеза S-аденозил-L-метионина клетками *Saccharomyces cerevisiae*, штамм 22D

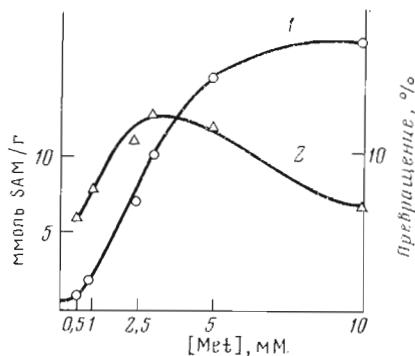


Рис. 2

Рис. 2. Количество S-аденозил-L-метионина, синтезируемое 1 г дрожжей (1), и процент превращения L-метионина в S-аденозил-L-метионин (2) в зависимости от концентрации L-метионина в культуральной среде

met⁺-генотипа — 7,8 мкмоль; для гаплоидных дрожжей — соответственно 7,5 и 4,5 мкмоль. Усиление аэрации в процессе инкубации позволило получить ~15 мкмоль SAM на 1 г отмытых дрожжевых клеток.

В наших условиях SAM активно синтезируется в течение ~40 ч инкубации (рис. 1), затем этот процесс резко замедляется.

Важной характеристикой синтеза радиоактивного соединения наряду с сохранением молярной радиоактивности является степень превращения исходного радиоактивного препарата в конечный продукт. Для ее определения была снята зависимость выхода SAM от концентрации L-метионина в культуральной среде. Из рис. 2 следует, что количество SAM возрастает с увеличением концентрации L-метионина в среде вплоть до 10 мМ (кривая 1). Однако максимальная степень превращения L-метионина в SAM, как видно из кривой 2 этого рисунка, соответствует концентрации L-метионина в среде, равной 3 мМ.

В работе [8] отмечалось, что в дрожжевых клетках помимо SAM может образовываться и некоторое (10–15%) количество S-аденозилгомоцистеина (SAH), примесь которого в препаратах SAM нежелательна. Показано, что дауэкс 50 в Na⁺-форме слабо удерживает SAH, который смывается со смолы 0,1 M NaCl, тогда как при использовании дауэкса 50 в H⁺-форме оба соединения элюируются 6 н. H₂SO₄ [9]. Сравнение данных по поглощению элюатов с обеих смол позволяет оценить количество SAH, присутствующего в экстракте дрожжевых клеток. В наших экспериментах расхождение в поглощении элюатов с колонок с дауэксом 50 (Na⁺) и дауэксом 50 (H⁺) не превышало 5%. Возможно, снижение способности к синтезу SAH характерно лишь для используемой линии дрожжей. Таким образом, в нашем случае нет особой необходимости в специальной очистке SAM от SAH, что существенно упрощает процедуру выделения радиоактивного продукта.

В таблице приведены результаты двух типичных опытов по синтезу меченого тритием SAM. К концу инкубации 55–60% радиоактивности обычно остается в среде. Анализ этой радиоактивности с помощью ТСХ показал, что на долю метионина приходится лишь 25% метки. Около 20% общей радиоактивности, взятой в опыт, составляет L-[³H]метионин, экстрагированный из клеток. Выход радиоактивного SAM оказывается несколько меньшим, чем в опытах с нерадиоактивным метионином (ср. с рис. 2). Возможно, это результат некоторой деградации L-[³H]метионина в процессе длительной (42 ч) инкубации клеток. Кроме того, выход меченого тритием SAM падал при использовании в опыте L-[³H]метионина в количествах менее 20 мкмоль. Молярная радиоактивность получаемых препаратов SAM обычно изменяется мало по сравнению с исходным L-[³H]метионином, снижаясь на ~5%, причем падение усиливается в тех

Синтез S-аденозил *L*-[метил-³H]метионина из *L*-[метил-³H] метионина

Опыт	³ H]метионин, мкмоль	Молярная радиоактивность, мКи/мкмоль	Объем среды, мл	Вес клеток, г	Радиоактивность, мКи			SAM, мкмоль	Молярная радиоактивность SAM, мКи/мкмоль
					среда и промывные воды	амберлит XE-89			
						H ₂ O	0,1 н. H ₂ SO ₄		
1	25	1,05	8	0,3	16,3	5,3	2,36	2,9	0,82
2	30	4,85	10	0,4	79,1	31,5	17,0	3,6	4,7

экспериментах, где используются меньшие количества *L*-[³H]метионина (опыт 1, таблица), что в свою очередь связано с уменьшением количества клеток и объема среды. По-видимому, при длительном культивировании клеток в малых объемах условия, необходимые для синтеза SAM, нарушаются, что существенно ограничивает применение этого метода для синтеза меченого тритием SAM из *L*-[метил-³H]метионина высокой молярной радиоактивности.

Радиохимическая чистота получаемых препаратов превышала 97%. Препараты хранили в 0,1 н. H₂SO₄ при -20° С. Через 3 мес хранения в этих условиях радиохимическая чистота составляла 92%.

Синтезированные препараты меченого тритием SAM проверяли на биологическую активность. Ее оценивали по реакции синтеза радиоактивного *L*-метионина из *L*-гомоцистеина с участием [метил-³H]SAM как метилирующего агента. Эта реакция катализируется гомоцистеин-метилтрансферазой (КФ 2.1.1.10).

Образовавшийся в результате реакции радиоактивный продукт хроматографическим разделением на амберлите XE-89 в H⁺-форме был выделен в водной фракции (~75% от взятой в опыт радиоактивности) и с помощью ТСХ идентифицирован как метионин.

Описанная выше методика может быть с успехом использована также для получения нерадиоактивного и меченого ¹⁴C SAM.

Экспериментальная часть

В работе использовали полиплоидную лабораторную линию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофных по метионину (штаммы УО 2022, 22D, X-354) и два метионин-независимых штамма (УО 2587 и 87D), полученные от Р. Мортимера (Беркли, США). Клетки дрожжей, смывые с косяка, вносили в 40 мл минимальной среды [7] с добавкой *L*-метионина (из расчета 20 мг на 1 л среды) и инкубировали 48 ч при 30° С. Эту культуру разводили 10-кратным объемом свежей среды с метионином и инкубировали 48 ч при той же температуре. Полученную биомассу отмывали от среды, взвешивали после центрифугирования и заливали свежей минимальной средой из расчета 100 мл на каждые 4 г влажных клеток. В среду добавляли *L*-метионин в концентрации 300 мкмоль на 100 мл.

Меченый тритием *L*-[метил-³H]метионин с молярной радиоактивностью 1—5 Ки/ммоль (37—185 ГБк) синтезирован нами.

После 42 ч инкубации при 30° С и усиленной аэрации клетки отделяли центрифугированием и дважды промывали дистиллированной водой. В указанных условиях практически не происходило дополнительного роста клеток (вес клеток не превышал исходный более чем на 10%). Биомассу замораживали и хранили при -20° С до дальнейшего использования.

Экстракцию SAM проводили 1,5 н. HClO₄ (5 мл на 1 г клеток) в течение 1,5 ч на качалке при 4° С. Низкая температура позволяла снизить содержание в экстракте нуклеотидной фракции без снижения количества экстрагируемого SAM, что в дальнейшем облегчает процедуру выделения SAM.

Для очистки SAM использовали слабокислотный катионит амберлит XE-89. Перед нанесением экстракта на колонку HClO₄ нейтрализовали сухим K₂CO₃ (рН 5,0) и после выдерживания при 0° С в течение 1 ч осадок KClO₄ удаляли центрифугированием. Колонку после нанесения эк-

стракта промывали водой. Элюцию SAM проводили 0,1 н. H₂SO₄. Концентрацию SAM в элюенте определяли спектрофотометрически по поглощению при 256 нм ($\epsilon=14,7$) [8]. Радиохимическую чистоту оценивали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV₂₅₄ в системах *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 60 : 15 : 25 (А) и этанол — уксусная кислота — вода, 65 : 1 : 34 (Б); *R_f* Met — 0,42 (А), 0,18 (Б), SAM — 0,15 (А), 0,5 (Б).

Гомоцистеин-метилтрансферазу для проверки биологической активности SAM выделяли из пекарских дрожжей по методике Шапиро [9]. Реакцию трансметилирования проводили в смеси следующего состава (общий объем 0,45 мл): 0,1 мл 0,2 М К-фосфатного буфера, pH 6,8; 0,05 мл 0,001 М ZnSO₄; 0,05 мл 0,06 М 2-меркаптоэтанола (свежеприготовленного); 0,05 мл 0,04 М *L*-гомоцистеина; 0,15 мл раствора [³H]SAM (0,2 мкмоль) и 0,05 мл ферментного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cantoni G. L.* J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 2942—2943.
2. *Mudd S. H., Cantoni G. L.* J. Biol. Chem., 1958, v. 231, p. 481—492.
3. *Tabor H., Tabor C. W.* In: Meth. Enzymol./Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 17, part B, p. 393—397.
4. *Schlenk F., De Palma R. E.* J. Biol. Chem., 1957, v. 229, p. 1037—1050.
5. *Tsuchida T., Yoshinada F., Okumura S.* Pat. 3.962.034 (USA), 1976.
6. *Schlenk F., Zydek C. R.* J. Lab. Comp., 1967, v. 3, p. 137—143.
7. *Schlenk F., Zydek C. R., Ehninger D. J., Dainko J. L.* Enzymologia, 1965, v. 29, p. 283—298.
8. *Shapiro S., Ehninger D. J.* Anal. Biochem., 1966, v. 15, p. 323—333.
9. *Shapiro S.* In: Meth. Enzymol./Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 17, part B, p. 400—407.

Поступила в редакцию
8.I.1985

BIOSYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED S-ADENOSYL-*L*-METHIONINE

MYASOEDOV N. F., KUZNETSOVA O. B., KOZIK V. S.

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Biosynthetic preparation of S-adenosyl-*L*-[methyl-³H]methionine from *L*-[methyl-³H]methionine by cultivation of diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* (methionine-auxotrophic) in a cultural medium with the high concentration of *L*-methionine is described. The radiochemical purity was over 95%. Biological activity of the preparations has been shown in transmethylation reactions in the presence of the yeast homo-cysteine-methyltransferase.