



УДК 579.222.7'12.389 + 577.352.38

© 1990 г.

В. И. Бимюков, Н. М. Баздырева, Г. Д. Танцурев,
Е. Ф. Харатьян, А. С. Шапков**, Г. Б. Шумаев,
Д. Н. Островский*

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БРЕВИБАКТЕРИЙ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПЕРЕХОДЯЩИХ ПРИ ПОТЕРЕ ЭЛЕКТРОНА В СОСТОЯНИЕ ДОЛГОЖИВУЩЕГО РАДИКАЛА

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

**Институт энергетических проблем химической физики АН СССР, Москва;*

***Институт органической химии им. П. Д. Зелинского АН СССР, Москва*

Из клеток *Brevibacterium ammoniagenes* выделено производное глутаминовой кислоты, переходящее при потере электрона в состояние долгоживущего радикала. На основании ИК-, ЯМР- и ЭПР-спектров и ряда других данных для выделенного соединения предложена структура лактона N-гидрокси-N-(2-карбамоилэтил)глутамил-4-амино-2-гидроксипутирамида с локализацией парамагнитного центра на конце молекулы, несущем нитроксильную группу. По видовому названию бактерии-продуцента соединению дано название «амминогенния». Обсуждается возможное участие амминогенния в реакциях защиты бактериальной клетки от экстремальных факторов среды.

В связи с поиском эффективных способов детекции и контроля высокоактивных свободных радикалов очень остро стоит проблема спиновых ловушек, возникшая с зарождением радиобиологии и до сих пор не утрачивающая актуальности [1]. Поиск таких соединений по их антиоксидантным свойствам ведется очень интенсивно [2—4], в том числе среди пептидов биологического происхождения [5]. В некоторых биообъектах обнаружены и нитроксильные радикалы, например в синезеленых водорослях [6] и тканях животных [7], или соединения, близкие им по химической природе [8].

В присутствии слабого окислителя пермеабиллизованные клетки некоторых бактерий дают мультиплетный сигнал ЭПР с большими константами сверхтонного взаимодействия, принадлежащий долгоживущему радикалу. Такие сигналы обнаружены у микрококков, родококков и бревибактерий [9]. Выделенное из микрококков соединение было определено как азотсодержащий трисахарид [10].

Настоящая работа посвящена выделению и характеристике соединения, содержащего парамагнитный центр из *Brevibacterium ammoniagenes*.

Способность образовывать долгоживущий парамагнитный центр в присутствии слабого окислителя обнаружена только у одного из трех видов бревибактерий, причем только у штамма *B. ammoniagenes* 6872, а в штамме 6871 такое соединение не обнаружено [9].

Для уточнения природы ядер, входящих в парамагнитный центр, мы подобрали для роста бактерий синтетические среды, в которых либо источник азотистого питания был заменен на аналог, содержащий тяжелый изотоп ^{15}N (сульфат аммония или глутамат), либо источник углерода был заменен на дейтерированные продукты кислотного гидролиза клеток хлореллы, выращенной на D_2O . Спиновые числа для обычного азота ($S = 1$) и протия ($S = 1/2$) отличаются от таковых для ^{15}N ($S = 1/2$) и дейтерия

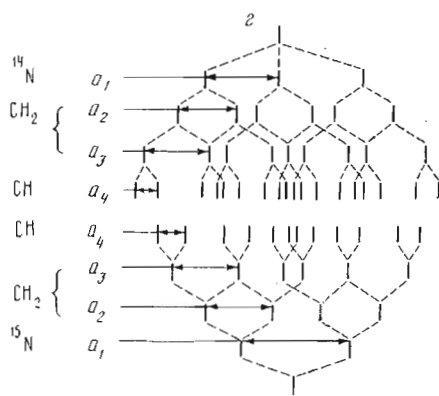
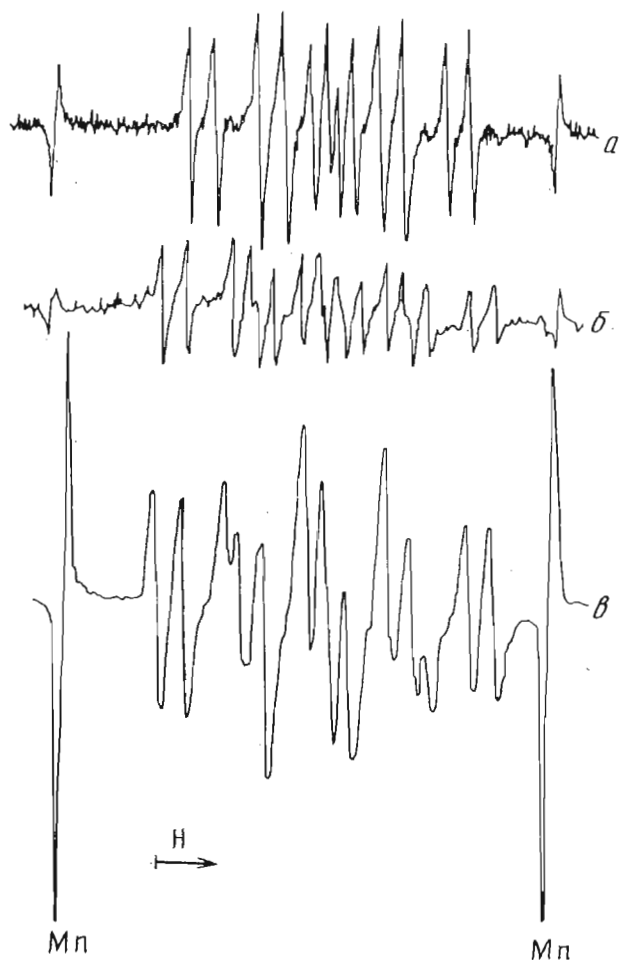


Рис. 1. Спектры ЭПР окисленной парамагнитной формы соединения из клеток бревибактерий, выращенных на среде с ^{15}N - (а), ^{14}N - (б) и ^{14}N -субстратом (в, вещество в D_2O), и схема сверхтонкого взаимодействия для ^{14}N - и ^{15}N - форм соединения (з)

($S = 1$), и характерные изменения спектра ЭПР являются безусловным доказательством участия этих ядер в формировании парамагнитного центра (рис. 1). Сам по себе факт замены сложной среды на синтетическую не вызывал нарушений в параметрах спектра ЭПР. Схема сверхтонкого взаимодействия (рис. 1б) удовлетворительно описывает реальный спектр при константах сверхтонкого взаимодействия: $a(^{14}\text{N}) = 14,9$ Гс, $a(\text{CH}_2) =$

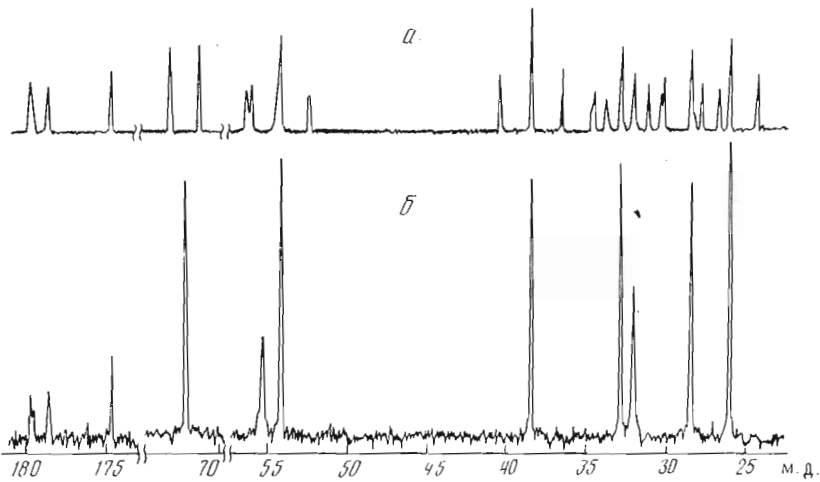


Рис. 2. Спектры ЯМР на ядрах ^{13}C соединения из бревибактерий при обычной регистрации (а) и в условиях подавления протонов (б)

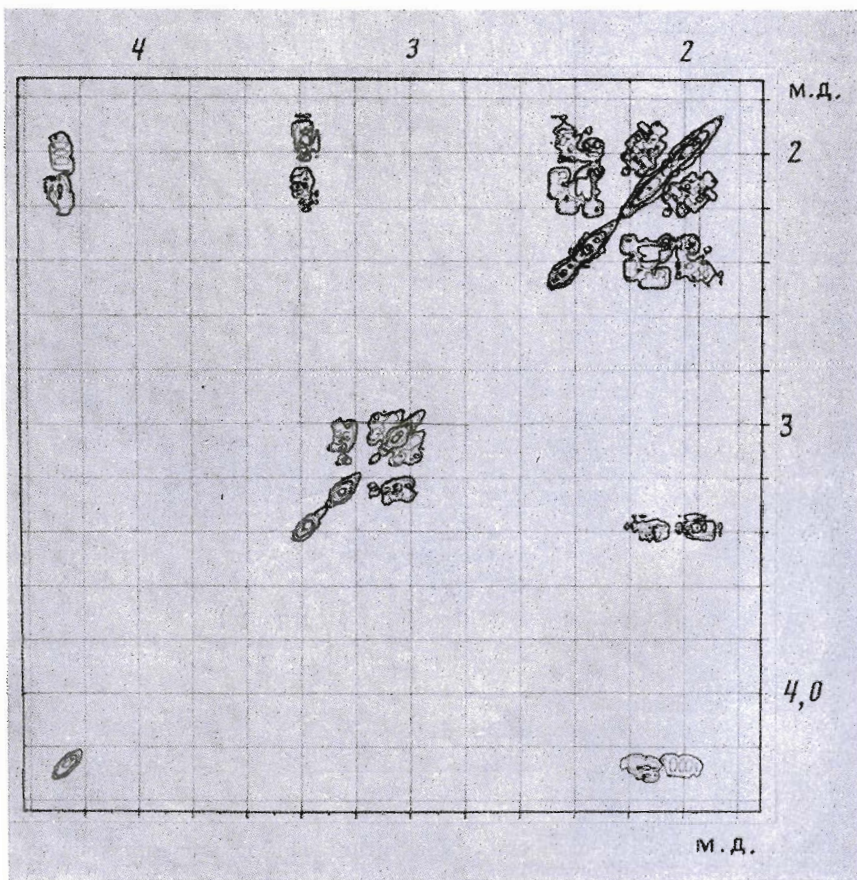


Рис. 3. Двумерный спектр COSY соединения из бревибактерий

$= 12,4$, $a(\text{CH}) = 4,5$, $\Delta H = 58,7$; $a(^{15}\text{N}) = 20,8$, $a(\text{CH}_2) = 12,4$, $a(\text{CH}) = 4,5$, $\Delta H = 50,1$ Гс.

На рис. 1в приведен спектр изолированного соединения в D_2O , показывающий отсутствие легкообменивающихся протонов в радикальном центре. Мы не приводим спектра ЭПР для материала, выращенного на дейтерированной среде ввиду невысокой степени замещения Н на D и

Параметры ^1H -ЯМР соединения из бревибактерий

| Протоны | δ , м.д. | Мультиплетность | КССВ, Гц |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| H2 | 3,38 | дд | 5,5; 8,5 |
| H3 | 2,12; 1,95 | | |
| H4 | 2,45; 2,45 | т | 3 |
| H6 | 4,27 | дд | 5; 8,5 |
| H7 | 2,15; 2,0 | | |
| H8 | 2,35; 2,35 | т | 3 |
| H10 | 3,26; 3,26 | т | 5 |
| H11 | 3,05; 3,05 | ддт | 4,5; 12,5; 13,7 |

Таблица 2

Параметры ^{13}C -ЯМР соединения из бревибактерий

| Атом | δ , м.д. | Атом | δ , м.д. | Атом | δ , м.д. |
|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|
| C1 | 178,5 | C6 | 72,1 | C10 | 54,2 |
| C2 | 55,3 | C7 | 28,4 | C11 | 32,0 |
| C3 | 26,0 | C8 | 38,4 | C12 | 179,5 |
| C4 | 32,8 | C9 | 179,6 | | |
| C5 | 174,5 | | | | |

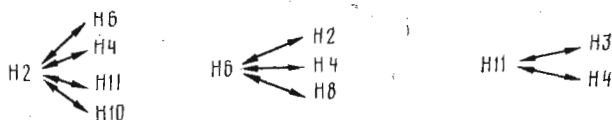
сложности результирующего спектра, не позволяющей сделать четкие отнесения. Однако сам факт изменения спектра свидетельствует об участии скелетных протонов в формировании радикального спектра.

Данные элементного анализа ($\text{H} = 5,97\%$, $\text{C} = 37,51\%$, $\text{N} = 13,84\%$) показывают, что на один атом азота в этом веществе приходится по три атома углерода.

На рис. 2, 3 приведены спектры ЯМР на ядрах ^{13}C и двумерный спектр COSY.

^1H -ЯМР-спектр в D_2O содержит сигналы 14 необменивающихся протонов, один из которых находится в области резонанса протонов при углеводе, связанном с кислородом (химический сдвиг 4,27 м.д.), пять сгруппированы в области 3,0—3,4 м.д. и восемь — в области 1,9—2,5 м.д. Спин-спиновая связь протонов была установлена с помощью двумерной спектроскопии COSY, а пространственная сближенность — с помощью спектров NOESY. Анализ спектра COSY показывает, что протоны образуют три не взаимодействующие друг с другом спиновые системы: а) метиновый протон H2 и две пары метиленовых протонов при C3 и C4 (табл. 1); б) метиновый протон H6 и две пары метиленовых протонов при C7 и C8; в) группировка из двух пар метиленовых протонов при C10 и C11.

NOESY-спектр обнаруживает пространственную сближенность протонов, не связанных спин-спиновым взаимодействием.



Спектр ^{13}C -ЯМР состоит из 12 сигналов: четыре углерода не протонированы, два несут по одному протону, а остальные — по два протона (данные из спектра, полученного в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия углеродов с протонами). Из четырех сигналов непротонированных атомов углерода три принадлежат, очевидно, карбонилам амидных группировок (химический сдвиг $\sim 179,5$ м.д.) и один — карбоксильной группе (174,5 м.д.). Один углерод метиновой группы связан с кислородом (сигнал 72,1 м.д.), а другой — с азотом (55,3 м.д.). С атомом азота связаны и две из метиленовых групп (54,2 и 36,4 м.д.), причем

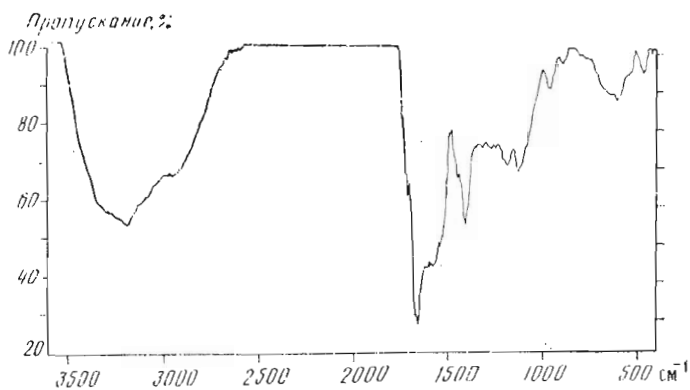


Рис. 4. Инфракрасный спектр сухой пленки соединения из бревибактерий

первая, наиболее вероятно, с азотом, несущим электроотрицательную группировку (табл. 2).

Инфракрасный спектр, снятый на сухой пленке вещества, нанесенной на пластинку из германия (рис. 4), подтверждает наличие карбонильной и пептидной групп. Таким образом, исследуемое вещество, по-видимому, является либо димером глутаминовой кислоты и амида γ -амино- α -гидроксимасляной кислоты, замкнутым в лактонное кольцо и модифицированным по аминокгруппе глутамата группой атомов, формирующей парамагнитный центр (рис. 5), либо эти аминокислоты соединены только одной пептидной связью, а вторая карбоксильная группа глутамата амидирована (что диктуется свободным прохождением вещества через анионообменную колонку). Линейная структура (триамид) более соответствует главной и наибольшей молекулярной массе, детектируемой масс-спектрометром (334 Да), однако требует наличия «лишнего» атома азота, поэтому нам представляется более вероятной циклическая структура, тем более что неэквивалентность двух протонов при 3-м атоме углерода и неэквивалентность двух протонов при C7 указывают на жесткость структуры.

Нужно сказать, что в предложенной структуре (рис. 5) возможна почти эквивалентная перестановка, если предположить, что в глутаминовой кислоте амидирована карбоксильная группа в положении 5, а не 1, а карбоксил в положении 1 образует сложноэфирную связь. Однако при таком варианте, как и при ориентации протонов у C2 и C6 в разные стороны от кольца в предполагаемой структуре, взаимодействие этих протонов становится невозможным, что противоречит данным NOESY.

Таким образом, выделенное соединение имеет, вероятно, строение 7-(N-гидрокси-N-карбамоилэтиламино)-2-карбамоилпергидро-1,5-оксазацин-6,10-диона. По видовому названию бактерии-производителя мы назвали соединение аммонигенином. Молекулярная масса аммонигенина составляет 316 Да, однако, по данным масс-спектрометрии при облучении быстрыми атомами, препарат содержит два вещества (316 и 334 Да), различающихся на массу одной молекулы воды, причем масса 316 Да приходится на минорный компонент. Очевидно, в изолированном виде аммонигенин прочно удерживает молекулу воды.

При обработке интактных клеток бревибактерий метанолом до концентрации 50% в экстракте без добавления окислителя появляется сигнал ЭПР, по интенсивности составляющий 10–30% от такового, возникающего при добавлении в ту же среду феррицианида калия. Действительно ли в интактной клетке такая часть аммонигенина находится в свободнорадикальной форме? Для проверки этого предположения суспензию бактерий, содержащую достаточно большое количество исследуемого вещества, пропускали непрерывно через резонатор спектрометра ЭПР с аэрацией на входе и регистрацией концентрации кислорода на выходе системы. В условиях избытка кислорода в среде сигнал ЭПР от исследуемого вещества не регистрируется, хотя чувствительность прибора

позволила бы уловить менее 5% радикальной формы соединения. Введение в проточную систему или независимая длительная инкубация клеток в буферном растворе в присутствии менадиона, способствующего шунтированию дыхательной цепи и образованию O_2^- [11], не привели ни к появлению радикальной формы, ни к уменьшению восстановленной формы соединения. Таким образом, либо супероксидный радикал разрушается дисмутазой, либо скорость регенерации восстановленной формы аммонигенина в интактной клетке чрезвычайно высока и потребуются модификация пула клеточных восстановителей, чтобы можно было зарегистрировать радикальную форму *in vivo*.

Какие функции можно приписать обнаруженным нами соединениям? Стремительное распространение знаний об участии свободных радикалов в биологически значимых процессах [12, 13], включая ферментативные реакции, например рибонуклеотидредуктазную, позволяет широко обсуждать эту тему, однако конкретные выводы относительно функций этих соединений в жизненном цикле бактериальных клеток еще предстоит сделать. Нам представляется весьма возможным участие этих веществ в поддержании устойчивости клеток в экстремальных условиях, таких, как высушивание, замораживание, облучение, гипероксигенация и др. Отсутствие радикальной формы в существенных количествах в интактной клетке и появление радикала при пермиабиллизации бактерии позволяет провести аналогию с раневой реакцией высших организмов. Вспомним, что при повреждении растительной ткани в зоне повреждения появляются фенолы, которые некротизируют поврежденный участок, убивают паразита, если он попал туда, и тем заживают рану. Может быть, и исследуемые соединения из бактерий переходят в радикальную форму при выходе из клетки через поврежденный участок и, присоединяясь к элементам клеточной оболочки, заживают повреждение?

Таким образом, целевое назначение исследуемого соединения, если в клетке реализуются особенности его парамагнитного центра, может состоять как в перехвате токсичных свободных радикалов восстановленной формой вещества внутри клетки, так и в заживлении поврежденной оболочки с участием радикальной формы вещества. Бактерии рода *Brevibacterium* широко применяются в биотехнологии при получении нуклеотидов, коэнзима А и аминокислот [14, 15] ввиду характерных нарушений их азотистого обмена, поэтому дальнейшее исследование метаболизма аммонигенина может оказаться весьма полезным для хозяйственных целей.

Экспериментальная часть

В работе использовали культуры бактерий *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 и 6871. Выделение исследуемого соединения из бревибактерий и его очистку проводили в основном так же, как и из микрококка [10]. Бактериальные клетки, снятые в раннестационарной фазе роста, обрабатывали смесью метанол — хлороформ — вода в соотношении 2:1:0,8 с последующим отделением водно-метанольной фазы при добавке хлороформа и воды (по одному объему). Экстракт упаривали до $1/3$ объема для удаления метанола. Для удаления анионогенных примесей материал пропускали через ДЕАЕ-целлюлозу (Cl⁻ форма), уравновешенную 20 мМ фосфатным буфером, pH 7,0. Частично разделяли и обессоливали полу-

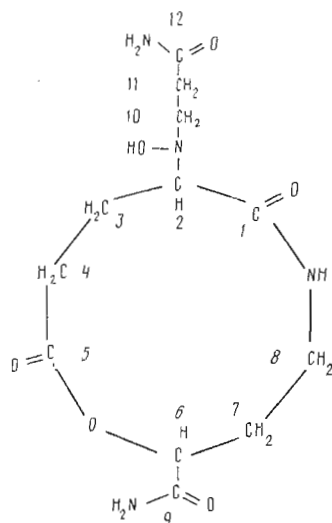


Рис. 5. Предполагаемая химическая структура аммонигенина

ченный препарат на сефадексе G-15, после чего препарат разделяли на фосфоцеллюлозе (H^+ -форма) в ступенчатом градиенте уксусной кислоты (собирали фракцию, элюируемую 0,34 М уксусной кислотой). Затем проводили очистку, используя ВЭЖХ на силосорбе С-18, 10 мкм (8×250 мм) в 0,01% уксусной кислоте (собирали фракцию с $K' = 0,7$). Окончательную очистку проводили на Sepharon-NH₂, 5 мкм (3×125 мм) в 0,1% уксусной кислоте. Вещество выходило индивидуальным пиком с $K' = 7,5$. Уксусную кислоту удаляли лиофилизацией.

Предполагая, что искоемое соединение в бревибактериях, как и в микрококках, является углеводом, мы испытали взаимодействие его с лектинами в реакции гемагглютинации и заметили, что по мере очистки соединения способность препарата предотвращать реакцию гемагглютинации эритроцитов лектинами (в частности, конканавалином А) снизилась до нуля. Это свидетельствует о, возможно, неуглеводной природе и является добавочным указанием на степень очистки от углеводных примесей.

Инфракрасные спектры снимали на приборе Specord SP-75 (ГДР) после нанесения раствора на пластинку из германия тонкой пленкой и подсушивания его на воздухе.

Спектры ЭПР снимали на радиоспектрометре РЭ-1306 в кварцевой ампуле на 0,1 мг с использованием Mn^{2+}/MgO в качестве внешнего стандарта (расстояние между линиями стандарта на приводимых спектрах соответствует $H = 86,76$ Гс). Количество аммонигенина определяли путем сравнения двойного интеграла спектров его радикальной формы с таковыми для синтетического нитроксильного радикала TEMPO (Reanal, Венгрия) * известной концентрации. Спектры нормированы по интенсивности спектров стандарта Mn^{2+}/MgO . К пробе 0,2 мл из каждой фракции добавляли 20 мкл 0,01 М $K_3Fe(CN)_6$ за 1 мин до регистрации спектра ЭПР. Сигнал ЭПР стабилен более 30 мин. В случае бактериальных клеток к центрифугированной биомассе добавляли равный объем метанола и феррицианид калия до 10^{-3} М. Сигнал ЭПР в этом случае убывает, как описано ранее [9].

Составы сред для выращивания бактерий: основная — пептона 1%, дрожжевого экстракта 1%, глюкозы 2%, NaCl 0,3%, биотина 30 мкг/л. рН доводили до 7,2—7,4 добавкой 1 н. KOH; специальная среда — глутамата натрия 5 г, K_2HPO_4 100 мг, NaCl 50 мг, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 30 мг, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 мг, биотин 30 мкг, глюкоза 10 г, водопроводная вода 1 л.

¹⁵N-Субстраты (сульфат аммония и глутамат) имели обогащение изотопом более 90%. Дейтерированные продукты получали как описано ранее [16].

В работе использовали 300 г биомассы, полученной осаждением в центрифуге (15 мин, 10 000 g). Выход вещества 35 мг (74% от возможного). Вещество хранили в жидком азоте в виде замороженных водных растворов в ампулах с аргоном.

Соотношение элементов Н, С и N определяли на приборе Carlo Erba EA-1106. Масс-спектры при бомбардировке электронами получены в аппарате Varian MAT-44, а также атомами Ag на спектрометре МИ-1201-Э в глицериновой матрице.

Спектры ЯМР на протонах и ядрах ¹³C записывали на спектрометрах Bruker WM-250 и AM-300 соответственно с внутренним стандартом DSS для ¹H-ЯМР (химический сдвиг 0 м. д.) и метанолом для ¹³C-ЯМР (50,15 м. д.). Образец вещества перед снятием спектра дважды лиофилизировали из D₂O и растворяли в D₂O. Температура измерения комнатная, рабочая частота спектрометра 250 МГц для протонов и 300 МГц для ¹³C. Спектры ¹H-ЯМР расшифрованы с помощью методики гомоядерного двойного резонанса.

Двумерный протонный спектр COSY снимали с использованием стандартной программы BRUKER COSYLR для ЭВМ Aspect-2000. Спектральное окно составляло 880 Гц при 512 точках для сбора данных в каждом измерении. Программа предусматривает последовательность 90- и

* 1-Оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-гидроксипиперидин.

45°-ного импульса. Применяли релаксационную задержку $D1$, равную 1 с, время смешивания $D2$ составляло 0,08 с (оптимально для КССВ 3 Гц). При преобразовании Фурье использовали синусоидальную функцию с нулевым сдвигом.

Двумерный спектр NOESY получали по стандартной методике BRUKER NOESYHG для ЭВМ Aspect-2000 с последовательностью из трех 90°-ных импульсов. Спектральное окно и размеры матрицы такие же, как и в случае COSY, релаксационная задержка $D1$ равна 1 с, время смешивания $D9$ составляло 0,1 с. При обработке данных использовали квадратичную синусоидальную функцию с нулевым сдвигом.

Степень очистки. После пяти стадий очистки исследуемый пептид элюировался с колонки Sepharon-NH₂ одним симметричным пиком, совпадающим с единственным пиком распределения радикальной формы, детектируемой по сигналу ЭПР при добавке в каждую фракцию $K_3Fe(CN)_6$. Метод масс-спектропии при бомбардировке быстрыми атомами не выявил посторонних примесей: сигнал, соответствующий массе 316 Да, мы приписываем самому веществу, а массу 334 Да относим к его гидратированной форме. Добавочный анализ на масс-спектрометре Varian MAT-44 подтвердил чистоту препарата. Сопоставление интегральных интенсивностей сигналов протонов в спектрах ¹H-ЯМР указывает на эквимольные соотношения H3, H4, H7, H8, H10 и H11 и вдвое меньшее количество H2 и H6. Примесные сигналы составляют менее 10% от основных.

Авторы очень благодарны канд. биол. наук И. Г. Жуковой и сотрудникам химического факультета МГУ Е. Полунину и А. Косиной за помощь в проведении некоторых анализов, сотруднику Института биохимии В. А. Еремину за предоставление деутерированных клеток хлореллы и сотруднику Института органической химии Ю. А. Книрелю за большую помощь при обсуждении материалов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зубарев В. Е. // Нитроксильные радикалы. М.: Наука, 1987. С. 144—174.
2. Дуда В. И., Гаенко Г. М. // Радиобиология. 1980. Т. 6. № 6. С. 926—929.
3. Бурлакова Е. В., Сторожок Н. М., Храпова Н. Г. // Биофизика. 1988. Т. 33. № 5. С. 781—786.
4. Giambarresi L., Jacob A. // Military radiobiology / Eds Conkin J., Walker R. N. Y.: Acad. Press, 1987. P. 265—303.
5. Boldyrev A., Dupin A., Bunin A., Babishev M., Severin S. // Biochem. Int. 1987. V. 15. № 15. P. 1105—1114.
6. Баренбойм Г. М., Брикентштейн В. Х., Королева А. М., Протазанова Л. Л., Соколова Н. В., Татьяненко Л. В. // Биофизика. 1987. Т. 32. № 2. С. 304—311.
7. Ванш А. Ф. // Биофизика. 1987. Т. 32. № 1. С. 128—131.
8. Deshpande V., Amberkar S., Shewale J. // Enzyme and microb. Technol. 1988. V. 10. № 8. P. 455—473.
9. Билюков В. И., Таптыкова С. Д., Островский Д. Н. // Микробиология. 1986. Т. 55. № 2. С. 342—344.
10. Билюков В. И., Степанов С. И., Танцырев Г. Д., Харатьян Е. Ф., Шапков А. С., Островский Д. Н. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1073—1079.
11. White E., Clark J. // Biochem. J. 1988. V. 253. № 2. P. 425—433.
12. Halliwell B., Gutteridge G. // Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 246. № 2. P. 501—514.
13. Stubbe J. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 11. P. 3893—3899.
14. Nara T., Komura T., Misawa M., Kinoshita S. // Agr. Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 1030—1036.
15. Ogata K., Shimizu S., Tanj Y. // Agr. Biol. Chem. 1971. V. 36. P. 84—90.
16. Еремин В. А., Чекулаева Л. Н., Харатьян Е. Ф., Островский Д. Н. // Микробиология. 1978. Т. 47. № 4. С. 629—633.

Поступила в редакцию
19.IV.1989

После доработки
5.VI.1989

V. BINYUKOV, N. BAZDYREVA, G. TANTSYREV*, E. KHARATY AN,
A. SHASHKOV**, K. SHUMAEV, D. OSTROVSKY

CHARACTERISTICS OF A GLUTAMIC ACID DERIVATIVE ISOLATED
FROM BREVIBACTERIUM AND CONVERTED INTO THE STATE OF LONG
LIVING RADICAL AT THE LOSS OF ELECTRON

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow:

**Institute of Energetic Problems of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

***N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A derivative of glutamic acid, converted into the state of long living radical, is isolated from *Brevibacterium ammoniagenes* cells and, accordingly, named ammonigenin. Structure of lacton of N-hydroxy-N-(2-carbamoylethyl)-glutamyl-4-amino-2-hydroxybutyric amide is suggested for the substance based on IR, ESR and NMR spectra and other data, with the paramagnetic centre localized at the nitroxyl group of the molecule. Possible participation of ammonigenin in the protection of cells against extremal factors of environment is discussed.