

УДК 579.871.08+577.112.385.4.08

© О. В. Мосин, В. И. Швеи, Д. А. Складнев, И. Игнатов

БИОСИНТЕЗ ФОТОПРЕОБРАЗУЮЩЕГО ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА [^2H]БАКТЕРИОРОДОПСИНА, МЕЧЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ ПО ОСТАТКАМ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe, [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp

Осуществлен биосинтез фотопреобразующего трансмембранного белка бактериородопсина (выход 8–10 мг), меченного дейтерием по остаткам функционально-важных аминокислот — [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe, [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp, что важно для нанотехнологии новых современных отечественных фотопреобразующих наноматериалов и биомолекулярной электроники. Белок выделен из мембран экстремальных фотоорганогетеротрофных галобактерий *Halobacterium halobium* лизисом клеток в дистиллированной воде, обработкой бактериальной биомассы ультразвуком, спиртовой экстракцией низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов с последующей солубилизацией конечного продукта в 0.5 %-м ДДС-Na и фракционированием метанолом. Гомогенность синтезируемого [^2H]бактериородопсина и селективность включения дейтерия в молекулу исследованы комбинацией методов разделения и анализа белка, включая электрофорез в 12.5 %-м ПААГ с 0.1 %-м ДДС-Na, гель-проникающую хроматографию на сефадексе G-200, ОФ ВЭЖХ, масс-спектрометрию ЭУ метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтаден-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

Кл. сл.: *Halobacterium halobium*, [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe, [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr, [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp, [^2H]бактериородопсин, биосинтез, масс-спектрометрия ЭУ

ВВЕДЕНИЕ

Бактериородопсин (БР), названный по аналогии с белком зрительного аппарата млекопитающих родопсином, был выделен в 1971 г. Д. Остерхельтом и В. Стохениусом (США) из клеточной мембраны экстремальной фотоорганогетеротрофной галобактерии *Halobacterium halobium* [1]. Этот фотопреобразующий белок молекулярной массой 26 кДа представляет собой хромопротеид, связанный шиффовым основанием (как в зрительных пигментах животных) с остатком Lys-216, который содержит в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного C_{20} -каротиноида, определяющего пурпурно-красный цвет галофильных бактерий. Наряду с БР в клеточной мембране галобактерий содержится небольшое количество других сопутствующих каротиноидных пигментов, основной из которых — бактериоруберин, определяющий устойчивость галобактерий к солнечному излучению [2].

Полипептидная цепь БР состоит из 248 аминокислотных остатков, 67 % которых являются гидрофобными, образованными с участием ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана [3]. Согласно структурным исследова-

ниям, молекула БР состоит из семи находящихся в конформации α -спирали сегментов, пронизывающих всю толщу мембраны клетки в направлении, перпендикулярном ее плоскости [4]. Гидрофобные домены представляют собой трансмембранные сегменты, а гидрофильные домены выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные α -спиральные тяжи белковой молекулы [5].

Благодаря своей структуре молекула БР выполняет функции светозависимого протонного насоса, перекачивающего протоны через мембрану клетки и создающего электрохимический градиент протонов H^+ на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. При поглощении кванта света происходит обратимая изомеризация 13-*Z*-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 548$ нм) (квантовый выход 0.03 при 20 °C) в *all-E*-БР ($\lambda_{\text{макс}} = 568$ нм) [6], инициирующая каскад фотохимических реакций с образованием промежуточных интермедиантов J_{625} , K_{590} , L_{550} , M_{412} , N_{560} и O_{640} с последующим отрывом H^+ из ретинального остатка БР и его присоединением со стороны цитоплазмы (рис. 1). В этом процессе молекула ретиналя изгибается в мембранном туннеле и переносит протон H^+ с внутренней цитоплаз-

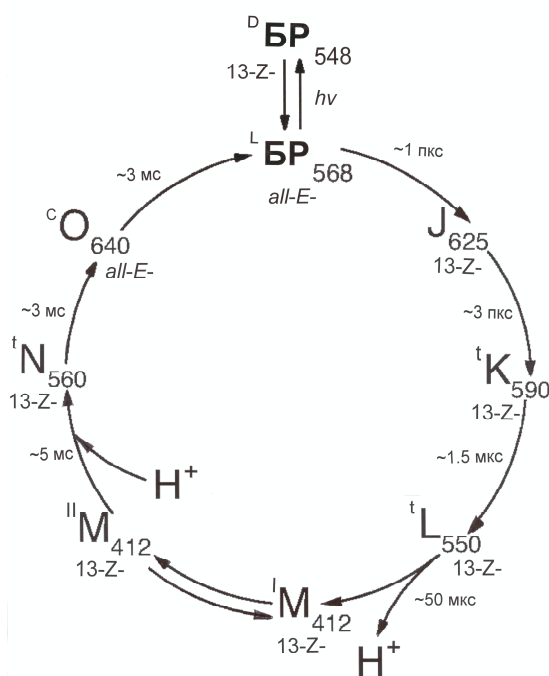


Рис. 1. Фотохимические реакции превращения БР (водная суспензия, pH ~ 7.2, 20 °C) [6]. Латинские цифры обозначают спектральные интермедианты БР. Верхние индексы "с" и "t" относятся к циклам 13-цис- и 13-транс-производных БР, "L" и "D" обозначают световую и темновую формы пигментов. Нижние индексы соответствуют положению максимума поглощения интермедиаторов фотоцикла (в нм)

матической мембраны на внешнюю мембрану клетки. В результате между внутренней и внешней поверхностями мембраны образуется градиент концентрации H^+ , приводящий к тому, что освещенные клетки галобактерий начинают синтезировать АТФ, т. е. преобразуют энергию света в химическую энергию связей. Этот процесс обратим и в темноте протекает в обратном направлении, что позволяет галобактериям развиваться в темноте, переключая фотосинтетический метаболизм на гетеротрофный [7].

Несмотря на структурно-функциональную изученность, БР остается в центре внимания био- и нанотехнологии прежде всего благодаря своей высокой светочувствительности и разрешающей способности и используется в молекулярной биоэлектронике, как природный фотохромный материал, в качестве управляемых светом или электрическими импульсами модулей компьютерных и оптических систем [8]. БР-содержащие нанопленки, полученные с использованием БР-содержащих пурпурных мембран галобактерий впервые были получены

и исследованы в нашей стране в рамках проекта "Родопсин", в ходе которого продемонстрирована эффективность и перспективы использования наноматериалов "Биохром" в качестве фотохромных материалов для голографической записи. Основной задачей при изготовлении БР-содержащих нанопленок является ориентация пурпурных мембран между гидрофобными и гидрофильными средами, например между водой и воздухом, как это распространено в природе. Как правило, для улучшения характеристик БР-содержащих пленок, используется несколько слоев, которые наносятся на поверхность полимерного носителя и высушиваются в определенных условиях с сохранением своей природной структуры. Наилучшие показатели достигаются при изготовлении пленок на основе желатина. Это позволяет добиться высокой концентрации БР (до 50 %) в нанопленках, избежать агрегации фрагментов пурпурных мембран, а также разрушения бактериородопсина в процессе изготовления. Встроенные в желатиновую матрицу фрагменты пурпурных мембран долговечны (около 10^4 ч) и устойчивы к воздействию многих факторов как при изготовлении, так и в процессе эксплуатации (колебания температуры, интенсивное воздействие светом с помощью лазера и др.).

Кроме этого, БР очень привлекателен как модельный объект для исследований, связанных с изучением функциональной активности и структурных свойств фотопреобразующих мембранных белков в составе искусственных нативных энерго- и фотопреобразующих мембран [9].

Для структурно-функциональных исследований с БР целесообразно вводить в молекулу белка в качестве изотопной метки дейтерий (2H), позволяющий использовать для анализа изотопного включения метод высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ [10]. Большое научно-прикладное значение имеет БР, меченный дейтерием по остаткам функционально-важных ароматических аминокислот — [2H]фенилаланина, [2H]тирозина и [2H]триптофана, участвующих в гидрофобном взаимодействии полипептидной цепи белка с липидным бислоем клеточной мембраны [11]. 2H -меченные ароматические аминокислоты могут быть синтезированы методом обратного изотопного обмена (1H - 2H) в молекулах протонированных аминокислот — [$2,3,4,5,6$ - 2H_5]фенилаланин в 85 %-й 2H_2SO_4 при 50 °C, [$3,5$ - 2H_2]тирозин в 15 %-й 2H_2SO_4 при слабом кипячении реакционной смеси, [$2,4,5,6,7$ - 2H_5]триптофан в 75 %-й [2H]трифторуксусной кислоте при 25 °C [12]. Однако, несмотря на изученность современных методов химического синтеза [2H]ароматических аминокислот, отечественная индустрия индивидуальных [2H]трансмембранных фотопреобразующих белков не получила должного развития.

Целью настоящей работы являлось разработка технологии микропрепаративного получения БР, меченного дейтерием по остаткам функционально-важных ароматических аминокислот [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]фенилаланина, [3,5- $^2\text{H}_2$]тирозина и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]триптофана, для реконструкции искусственных мембран, а также исследование уровней дейтерированности молекулы БР методом масс-спектрометрии ЭУ метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтаген-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот с последующим разделением методом ОФ ВЭЖХ.

ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для синтеза [^2H]аминокислот использовали протонированные D,L-аминокислоты ("Reanal", Венгрия), $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.9 ат. % ^2H) и ^2HCl (95.5 ат. % ^2H), полученные из Российского научно-исследовательского центра "Изотоп" (Санкт-Петербург, РФ). Для синтеза производных аминокислот использовали 5-(диметиламино)нафтаген-1-сульфонил хлорид (Dns-хлорид) ("Sigma", США) и диазометан, получаемый из N-нитрозомочевины ("Merck", ФРГ). Неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H -ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 ("Bruker Daltonics", ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si).

Электрофорез БР проводили в 12.5 %-м ПААГ с 0.1 %-м ДДС-Na в соответствии с протоколом фирмы LKB (Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование прокрашенного в растворе "кумасси-голубой" R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре Beckman CDS-200 ("Beckman Coulter", США).

Центрифугирование проб проводили на центрифуге T-26 ("Carl Zeiss", ФРГ) при 2000 g 10 мин.

Масс-спектры метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот получали методом электронного удара на приборе MB-80A ("Hitachi", Япония) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющем напряжении 8 кВ и температуре катодного источника 180–200 °С. Сканирование анализируемых образцов проводили при разрешении 7500 усл. ед., используя 10 % резкость изображения.

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали в $^2\text{H}_2\text{O}$ на приборе Bruker WM-250 ("Bruker Daltonics", ФРГ) с рабочей частотой 70 МГц; химические сдвиги протонов (δ , ppm) измерены в миллионных долях по отношению к Me_4Si .

Спектры поглощения регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6

("Beckman Coulter", США) в диапазоне длин волн 200–700 нм.

ОФ ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Knauer Smartline ("Knauer", ФРГ), снабженном насосом Gilson ("Gilson Inc.", ФРГ), детектором UF-2563 и интегратором CR-3A ("Shimadzu", Япония), используя колонку 250 × 10 мм с неподвижной обращенной фазой сепарон C18 (Kova, Словакия); элюент: (А) — ацетонитрил—трифторуксусная кислота 100: 0.1–0.5 об. % и (Б) — ацетонитрил 100 об. %; скорость элюирования — 1.5 мл / мин: от 0 до 20 % Б — 5 мин, от 20 до 100 % Б — 30 мин, 100 % Б — 5 мин, от 100 до 0 % Б — 2 мин, 0 % Б — 10 мин. ТСХ N-Dns-производных аминокислот проводили на хроматографических пластинках с закрепленным слоем флуоресцентного носителя Silufol UV-254 ("Kavalier", Словакия) в системе растворителей (А): н-бутанол—уксусная кислота—вода (12 : 3 : 5 об. %).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм-продуцент БР

В качестве продуцента БР использовали каротиноидсодержащий штамм экстремальных фотоорганогетеротрофных галобактерий *Halobacterium halobium* ET 1001, полученный из коллекции культур МГУ. Штамм модифицирован селекцией отдельных колоний на твердой (2 %-й агар) пептовой среде с 4.3 М NaCl.

Синтез L-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]фенилаланина

40 г фенилаланина растворяли в 300 мл 85 % $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ (в $^2\text{H}_2\text{O}$) и нагревали с обратным водяным холодильником при 50–60 °С при перемешивании 3 сут. По окончании реакцию смесь охлаждали, нейтрализовали 30 %-м NH_4OH до pH 5.5. Продукт экстрагировали этанолом. Выход 24 г (58.7 %); $T_{\text{пл}} = 271\text{--}273$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 4.47$ (5 М HCl); $pK_a = 2.20$ (COOH), 9.31 (NH_2); $R_f = 0.6$ (А). УФ-спектр (0.1 М HCl): $\lambda_{\text{макс}} [\text{nm}]$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 257.5 ($\epsilon = 195$). Спектр ^1H -ЯМР ($^2\text{H}_2\text{SO}_4$ в $^2\text{H}_2\text{O}$) (δ , ppm): δ 3.25 (2H, H β), δ 4.4 (1H, H α), δ 7.2–7.4 (0.07H), УД = 90 ат. % ^2H . Масс-спектр ЭУ ($[\text{M}]^+$ — m/z (I, %): 165 (34)), метиловый эфир N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]фенилаланина: 417 (14), 418 (6).

Синтез L-[3,5- $^2\text{H}_2$]тирозина

100 г тирозина растворяли в 150 мл 3 М $^2\text{H}_2\text{SO}_4$. Реакционную смесь нагревали 2 сут. при 40–50 °С с обратным водяным холодильником в токе азота. По окончании нейтрализовали 30 %-м NH_4OH до pH 4.5 и охлаждали 1 сут. при 4 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали $^2\text{H}_2\text{O}$ и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 90 г (86.5 %);

$T_{пл} = 316\text{--}317$; $[\alpha]_d^{25} = 10.03$ (5 М НСl); $pK_a = 2.20$ (COOH), 9.21 (NH₂); $R_f = 0.45$ (А). УФ-спектр (0.1 М НСl): $\lambda_{макс}$ [нм] (ε М⁻¹ см⁻¹) = 223 ($\varepsilon = 8200$) и 274.5 ($\varepsilon = 1340$). Спектр ¹Н-ЯМР (1 М ²НСl) (δ , ppm): δ 3.32 (2H), δ 4.35 (1H), δ 6.9 (1H), δ 7.2 (2H), УД = 96 ат.% ²Н. Масс-спектр ЭУ ($[M]^+ - m/z$ (I, %)): 181 (21); метиловый эфир N-Dns-[3,5-²H₂] тирозина: 429 (15), 430 (5).

Синтез L-[2,4,5,6,7-²H₅]триптофана

К 40 мл 100 % ²H₂O добавляли при 4 °С и перемешивании 80 мл трифторуксусного ангидрида (0.5 моль) и выдерживали 2 ч при 4 °С, затем дробными порциями добавляли 25 г триптофана. Реакционную смесь выдерживали 3 сут. в темноте при 22 °С, растворитель удаляли при 10 мм рт. ст., нейтрализовали 30 %-м NH₄OH до pH 5.9, охлаждали 1 сут. при 4 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали ²H₂O и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 19 г (60.3 %); $T_{пл} = 283\text{--}285$; $[\alpha]_d^{25} = 2.8$ (1 М НСl); $pK_a = 2.46$ (COOH), 9.41 (NH₂); $R_f = 0.5$ (А). УФ-спектр (0.1 М НСl): $\lambda_{макс}$ [нм] (ε М⁻¹ см⁻¹) = 218 ($\varepsilon = 3350$), 278 ($\varepsilon = 5550$), 287.5 ($\varepsilon = 4550$). Спектр ¹Н-ЯМР (CF₃COOH в ²H₂O) (δ , ppm): δ 3.4 (2H, H β), δ 4.4 (1H, H α), δ 7.3 (1H, H ε), δ 7.2–7.4 (0.1H, In-H), УД = 98 ат.% ²Н. Масс-спектр ЭУ ($[M]^+ - m/z$ (I, %)): 204 (28); метиловый эфир N-Dns-[2,4,5,6,7-²H₅]триптофана: 455 (9), 456 (11).

Синтез N-Dns-аминокислот

К 4 мг сухого гидролизата БР в 1 мл 2 М NaHCO₃ (pH 9–10) порциями при перемешивании добавляли 25.6 мг Dns-хлорида в 2 мл ацетона. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при перемешивании при 40 °С, подкисляли 2 н. НСl до pH 3.0 и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Объединенный экстракт промывали дистиллированной H₂O до pH 7.0 (2 × 1 мл), сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли при 10 мм рт. ст. Выход 15.3 мг (78 %).

Синтез метиловых эфиров N-Dns-аминокислот

Для получения диазометана к 20 мл 40 % KOH в 40 мл диэтилового эфира добавляли 3 г влажной N-нитрозометилмочевины и перемешивали 15–20 мин на водяной бане со льдом. После окончания газовыделения эфирный слой отделяли, промывали дистиллированной H₂O до pH 7.0, сушили Na₂SO₄ и использовали для обработки N-Dns-аминокислот. Выход 17.4 мг (69 %).

Биосинтез БР

Биосинтетический БР (выход 8–10 мг с 1 г биомассы) получен в синтетической среде, в которой протонированные фенилаланин, тирозин и триптофан были замещены их дейтерированными аналогами — L-[2,3,4,5,6-²H₅]фенилаланином, L-[3,5-²H₂]тирозином и L-[2,4,5,6,7-²H₅]триптофаном (г/л): D,L-аланин — 0.43; L-аргинин — 0.4; D,L-аспарагиновая кислота — 0.45; L-цистеин — 0.05; L-глутаминовая кислота — 1.3; L-глицин — 0.06; D,L-гистидин — 0.3; D,L-изолейцин — 0.44; L-лейцин — 0.8; L-лизин — 0.85; D,L-метионин — 0.37; D,L-фенилаланин — 0.26; L-пролин — 0.05; D,L-серин — 0.61; D,L-треонин — 0.5; L-тирозин — 0.2; D,L-триптофан — 0.5; D,L-валин — 1.0; АМФ — 0.1; УМФ — 0.1; NaCl — 250; MgSO₄ × 7H₂O — 20; KCl — 2; NH₄Cl — 0.5; KNO₃ — 0.1; KH₂PO₄ — 0.05; K₂HPO₄ — 0.05; Na⁺-цитрат — 0.5; MnSO₄ · 2H₂O — 3 · 10⁻⁴; CaCl₂ · 6H₂O — 0.065; ZnSO₄ · 7H₂O — 4 · 10⁻⁵; FeSO₄ · 7H₂O — 5 · 10⁻⁴; CuSO₄ · 5H₂O — 5 · 10⁻⁵; глицерин — 1.0; биотин — 1 · 10⁻⁴; фолиевая кислота — 1.5 · 10⁻⁴; витамин B₁₂ — 2 · 10⁻⁵. Ростовую среду автоклавировали 30 мин при 0.5 атм; pH доводили 0.5 М КОН до 6.5–6.7. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера, вместимостью 500 мл (объем реакционной смеси 100 мл) 4–5 сут. при 35 °С в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере Biorad 380-S (Венгрия) и освещении монохромными лампами ЛДС-40 (3 лампы по 1.5 лк). Последующие операции по выделению БР проводили с использованием светозащитной лампы с оранжевым светофильтром ОРЖ-1.

Выделение фракции пурпурных мембран (ПМ)

Биомассу (1 г) промывали дистиллированной водой и осаждали центрифугированием (1500 g, 20 мин). Осадок суспендировали в 100 мл дистиллированной H₂O и выдерживали 3 ч при 4 °С. Реакционную смесь центрифугировали (1500 g, 15 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл дистиллированной H₂O и дезинтегрировали ультразвуком (22 кГц, 3 раза по 5 мин) в водяной бане со льдом (0 °С). Клеточный гомогенат после промывки дистиллированной H₂O суспендировали в 10 мл буфера (125 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 4 mM Трис-НСl, pH 8.0), добавляли 5 мкг РНК I (2–3 ед. акт.) и инкубировали 2 ч при 37 °С. Затем добавляли 10 мл того же буфера, выдерживали 10–12 ч при 4 °С. Водную фракцию отделяли центрифугированием (1500 g, 20 мин), осадок ПМ обрабатывали 50 %-м этанолом (5 × 7 мл) при 4 °С с последующим

отделением растворителя. Процедуру повторяли трижды до получения бесцветных промывных вод.

Содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически по соотношению D_{280} / D_{568} ($\varepsilon_{280} = 1.1 \cdot 10^5$ и $\varepsilon_{568} = 6.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [13]). Регенерацию ПМ проводили, как описано в работе [14]. Выход фракции ПМ 120 мг (х. ч. 80–85 %).

Выделение БР

Фракцию ПМ (в H_2O) (1 мг / мл) растворяли в 1 мл 0.5 % ДДС-На, инкубировали 5–7 ч при 37 °С с последующим центрифугированием (1200 g, 15 мин). Осадок отделяли, к супернатанту добавляли дробными порциями метанол (3 раза по 100 мкл) при 0 °С, выдерживали 14–15 ч при 4 °С и центрифугировали при охлаждении (1200 g, 15 мин). Фракционирование проводили трижды, уменьшая концентрацию 0.5 % ДДС-На до 0.2 и 0.1 %. Кристаллический белок (8–10 мг) промывали холодной дистиллированной $^2\text{H}_2\text{O}$ (2×1 мл) и центрифугировали (1200 g, 15 мин).

Очистка БР

Пробу белка (5 мг) растворяли в 100 мкл буферного раствора и помещали на колонку размером 150×10 мм; неподвижная фаза — сефадекс G-200 ("Pharmacia", США) (удельный объем упакованных гранул — 30–40 ед. на 1 г сух. сефадекса), уравновешенная буферным раствором, содержащим 0.1 %-й ДДС-На и 2.5 мМ ЭТДА. Элюирование проводили 0.09 М трис-боратным буфером, содержащим 0.5 М NaCl с pH 8.35 ($I = 0.075$) со скоростью 10 мл / ($\text{cm}^2 \text{ ч}$). Объединенные белковые фракции подвергали лиофильной сушке, запаивали в стеклянные ампулы (10×50 мм) и хранили при –4 °С.

Получение апомембран (АП)

Суспензию ПМ (50 мг) в 50 мл 1 М NH_2OH (pH 6.0) выдерживали 10 ч при перемешивании на ледяной бане (4 °С) при освещении реакционной смеси ксеноновой лампой. Осадок отделяли центрифугированием (1000 g, 10 мин), дважды промывали дистиллированной водой и центрифугировали. Фракцию АП суспендировали в 2 мл 5 мМ 2-(N-морфолино)-этансульфониламида в 100 мМ NaCl.

Регенерация АП с 13-транс-ретиналем

К 2 мл суспензии АП ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в кварцевой кювете добавляли при перемешивании 0.1 мл 2 мМ раствора полностью 13-транс-ретинала в метаноле и выдерживали 6–8 ч в темноте при 40 °С. Степень регенерации ПМ определяли спек-

трофотометрически по соотношению $D_{\text{нат.280}}$, $D_{\text{нат.568}}$ и $D_{\text{рег.280}}$, $D_{\text{рег.568}}$, где D_{280} и D_{568} — поглощение суспензии нативных и регенерированных ПМ при $\lambda = 280$ и $\lambda = 568$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез БР

Выбор стратегии биосинтеза ^2H -меченного БР с использованием штамма экстремальной фотоорганогетеротрофной галобактерии *Halobacterium halobium* определялся целью исследования, связанной с изучением принципиальной возможности получения ^2H -меченных трансмембранных фотопреобразующих белков в микропрепаративных количествах для реконструкции искусственных мембран в $^2\text{H}_2\text{O}$ и БР-содержащих нанопленок.

При выборе [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]фенилаланина, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]тирозина и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]триптофана в качестве источников дейтерия учитывалась их исключительная важность в гидрофобном взаимодействии молекулы БР с липидным бислоем клеточной мембраны, устойчивость к реакциям (^1H – ^2H) обмена в водной среде в условиях выращивания штамма-продуцента, а также возможность применения метода высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ для последующего анализа. ^2H -меченный БР получен микробным синтезом штамма-продуцента фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium* при выращивании в синтетической среде (4.3 М NaCl) с [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]фенилаланином, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]тиозином и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]триптофаном. В оптимальных условиях выращивания *H. halobium* (период инкубации 4–5 сут., 35 °С при освещении монохромным светом при $\lambda = 560$ нм) в клетках синтезировался каротиноид-содержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы D_{280} / D_{568} 1.5 : 1.0 идентичный природному БР. Как показали результаты исследования, рост штамма на синтетической среде (рис. 2, б) ингибировался незначительно по сравнению с контролем (рис. 2, а) на протонированной среде, что существенно упрощает оптимизацию условий биосинтеза ^2H -меченного БР, заключающуюся в эквивалентной замене протонированных ароматических аминокислот их дейтерированными аналогами — [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]фенилаланином (0.26 г/л), [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]тиозином (0.2 г/л) и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]триптофаном (0.5 г/л).

Основными этапами эксперимента являлись: выращивание штамма продуцента *H. halobium* на синтетической среде с [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]фенилаланином (0.26 г/л), [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]тиозином (0.2 г/л) и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]триптофаном (0.5 г/л), отделение от клеточного содержимого, выделение фракции

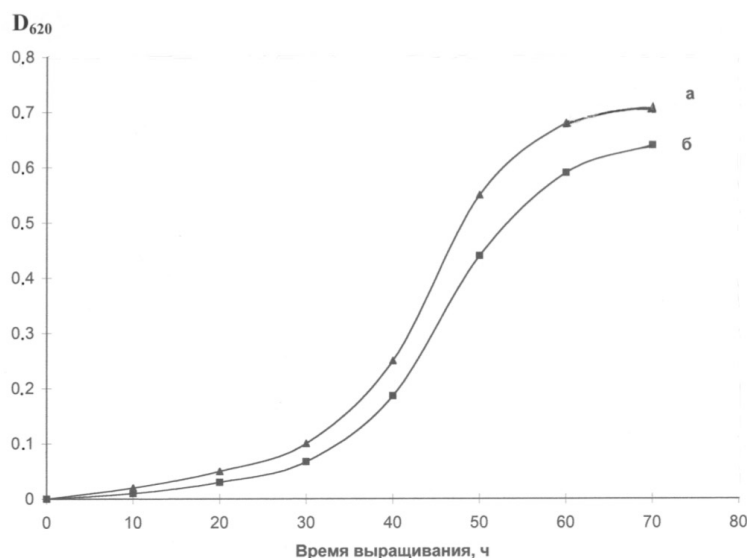


Рис. 2. Динамика роста штамма *H. halobium* в различных экспериментальных условиях.

Протонированная синтетическая среда (а); синтетическая среда с [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe (0.26 г/л), [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr (0.2 г/л) и [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp (0.5 г/л) (б). Период инкубации 4–5 сут., 35 °С, освещение монохромным светом при $\lambda = 560$ нм

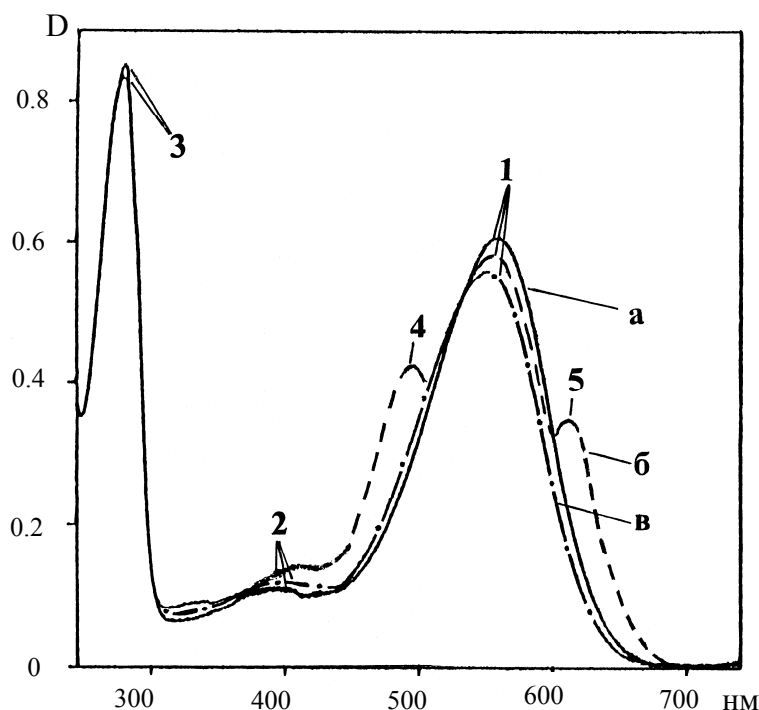


Рис. 3. Спектры поглощения ПМ (в 50 %-м этаноле) на различных стадиях обработки.

Природный БР (а); ПМ после промежуточной обработки (б); очищенные от посторонних каротиноидов ПМ (в). Полоса 1 — спектральная форма БР₅₆₈, 2 — примесь спектральной формы мета-бактериородопсина М₄₁₂, 3 — полоса поглощения ароматических аминокислот, 4 и 5 — посторонние каротиноиды. В качестве контроля использовали природный БР

пурпурных мембран (ПМ), отделение низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, пигментов (преимущественно каротиноидов) и липидов, фракционирование солюбилизованного в 0.5 % SDS-Na белка метанолом, ГПХ на сефадексе G-200, электрофорез в 12.5 %-м ПААГ с 0.1 %-м ДДС-Na. Поскольку белок локализуется в ПМ, освобождение от низкомолекулярных примесей и внутриклеточного содержимого достигали осмотическим шоком клеток дистиллированной

водой на холоде после удаления 4.3 М NaCl и последующим разрушением клеточной оболочки ультразвуком при 22 кГц. Для разрушения клеточной РНК проводили обработку клеточного гомогената РНК-азой I (2–3 ед. акт.). Фракция ПМ наряду с искомым белком в комплексе с липидами и полисахаридами содержала примесь связанных каротиноидов и посторонних белков. Поэтому применялись специальные методы фракционирования белка без повреждения его нативной струк-

туры и диссоциации, что требовало применения специальных методов очистки от каротиноидов и липидов и последующей колоночной гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-200. Очистка от каротиноидов, заключающаяся в многократной обработке ПМ 50 %-м этанолом при 4 °С, являлась рутинным, но обязательным этапом, несмотря на значительные потери хромопротеина. Использовалось не менее пяти обработок 50 %-м этанолом, чтобы получить спектр поглощения суспензии ПМ, очищенный от каротиноидов 4 и 5 (степень хроматографической чистоты 80–85 %), показанный на рис. 3, б и в, на различных стадиях обработки относительно природного БР (рис. 3, а). Образование ретинальпротеинового комплекса в молекуле БР приводит к батохромному сдвигу в спектре поглощения ПМ (рис. 3, в): основная полоса (1) при максимуме поглощения $\lambda = 568$ нм, вызванная световой изомеризацией хромофора по связи C13=C14, определяется наличием 13-*транс*-ретинального остатка ретиналя БР₅₆₈, дополнительная малоинтенсивная полоса 2 при $\lambda = 412$ нм характеризует незначительную примесь образующейся на свету спектральной формы мета-бактериородопсина M₄₁₂ с депротонированной альдиминной связью между остатком 13-*транс*-ретиналя и белком, а полоса 3 при $\lambda = 280$ нм определяется поглощением ароматических аминокислот в полипептидной цепи белка (для чистого БР соотношение D₂₈₀/D₅₆₈ равно 1.5 : 1.0).

Выделение и очистка БР

Следующим необходимым этапом являлось фракционирование и хроматографическая очистка белка. Поскольку БР, будучи трансмембранным белком (M_r 26.7 кДа), пронизывает билипидный слой в виде семи α -спиралей, применение сульфата аммония и других традиционных высаливающих агентов не дает положительного результата. Решение проблемы заключалось в переводе белка в растворимую форму солюбилизацией в 0.5 %-м ДДС-Na. Использование ионного детергента ДДС-Na диктовалось необходимостью максимальной солюбилизации белка в нативной биологически-активной форме в комплексе с 13-*транс*-ретиналем с комбинированием стадии делипидизации и осаждения, поскольку солюбилизованный в слабобоконцентрированном растворе ДДС-Na (0.5 %) БР, сохраняет спиральную α -конфигурацию [15]. Поэтому отпала необходимость использования органических растворителей — ацетона, метанола и хлороформа для очистки от липидов, а делипидизация и осаждение белка совмещались в одну стадию, что существенно упрощало дальнейшее фракционирование. Значительным преимуществом метода является то, что выделяемый белок в

комплексе с молекулами липидов и детергента распределяется в надосадочной жидкости, а другие высокомолекулярные примеси — в непрореагировавшем осадке, легко отделяемом центрифугированием. Фракционирование солюбилизованного в 0.5 %-м растворе ДДС-Na белка с его последующим выделением в кристаллическом виде достигали в три стадии дробным низкотемпературным (4 °С) осаждением метанола, уменьшая концентрацию детергента соответственно в 2.5 и 5 раз. Окончательная стадия очистки БР заключалась в отделении белка от низкомолекулярных примесей гель-проникающей хроматографией, для чего БР-содержащие фракции дважды пропускали через колонку с декстрановым сефадексом G-200, уравновешенным 0.09 М трис-боратным буфером (pH 8.35) с 0.1 %-м ДДС-Na и 2.5 мМ ЭТДА. Согласно разработанному методу, получено 8–10 мг ²H-меченного БР из 1 г бактериальной биомассы, гомогенность которого удовлетворяла требованиям, предъявляемым для реконструкции мембран, и подтверждалась электрофорезом в 12.5 %-м ПААГ с 0.1 %-м ДДС-Na, регенерацией апомембран с 13-*транс*-ретиналем и ОФ ВЭЖХ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот. Небольшой выход БР не был препятствием для последующего масс-спектрометрического анализа, однако необходимо подчеркнуть, что для обеспечения высокого выхода белка нужно наработать большее количество сырьевой биомассы.

Условия проведения гидролиза ²H-меченного БР определялись необходимостью предотвращения реакций изотопного (¹H-²H) обмена водорода на дейтерий в молекуле фенилаланина и сохранения остатков триптофана в белке. Рассматривались два альтернативных варианта — кислотный и щелочной гидролиз. Кислотный гидролиз белка в стандартных условиях (6 н. HCl или 8 н. H₂SO₄, 110 °С, 24 ч) приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот в белке [16], которые для настоящего исследования не играют существенной роли. Модификация этого метода, заключающаяся в добавлении в реакционную среду фенола, тиогликолевой кислоты, β -меркапто-этанол, позволяет сохранить до 80–85 % триптофана [17]. Использование п-толуол сульфокислоты с 0.2 % 3-(2-аминоэтил)-индолом или 3 М меркаптоэтансульфокислоты также эффективно для сохранения триптофана (до 93 %) [18]. Однако для решения поставленной задачи вышеперечисленные методы непригодны, поскольку обладают существенным недостатком: в условиях кислотного гидролиза с высокой скоростью происходит изотопный (¹H-²H) обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана,

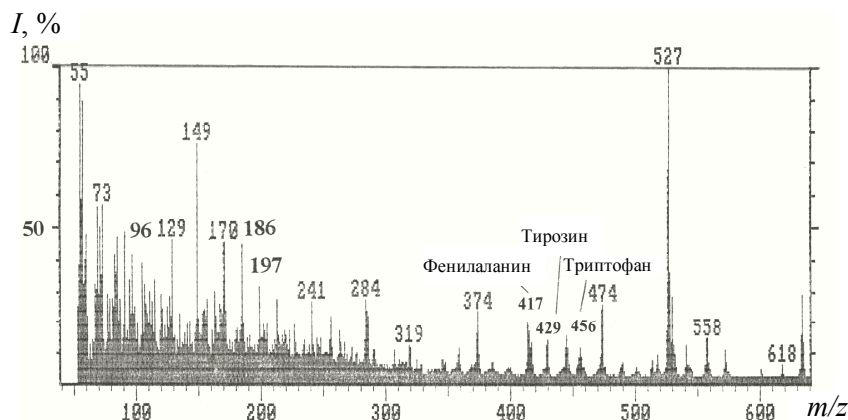


Рис. 4. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $^{[2]}\text{H}$ производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата БР из *H. halobium* (70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, 180–200 °С).

Условия получения: синтетическая среда с $[2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5]\text{Phe}$, $[3,5\text{-}^2\text{H}_2]\text{Tyr}$ и $[2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5]\text{Trp}$. Условия гидролиза БР: 4 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (в $^2\text{H}_2\text{O}$), 110 °С, 24 ч. Пики молекулярных ионов аминокислот соответствуют их производным. I — интенсивность пиков (%)

тирозина и гистидина, а также протонов при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [19]. Поэтому даже проведение гидролиза в дейтерированных реагентах (6 н. ^2HCl , 4 н. $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ в $^2\text{H}_2\text{O}$) не позволяет получать реальные данные о включении дейтерия в белок.

В условиях щелочного гидролиза (4 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или 4 н. NaOH , 110 °С, 24 ч) реакций изотопного (^1H - ^2H) обмена практически не наблюдается (исключением является протон (дейтерон) у атома С2 гистидина, а триптофан не разрушается, что определило выбор этого метода гидролиза в настоящей работе. Упрощение процедуры выделения смеси свободных аминокислот за счет нейтрализации H_2SO_4 (в $^2\text{H}_2\text{O}$) явилось причиной выбора в качестве гидролизующего агента 4 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Возможная *D,L*-рацемизация аминокислот при щелочном гидролизе не влияла на результат последующего масс-спектрометрического исследования уровня дейтерированности молекул аминокислот.

Исследование уровня дейтерированности БР масс-спектрометрией ЭУ

Для изучения включения $^{[2]}\text{H}$ ароматических кислот в молекулу БР использовали метод масс-спектрометрии ЭУ после модификации смеси аминокислот гидролизата БР в метиловые эфиры N-Dns-производных аминокислот. Чтобы получить воспроизводимый результат по уровню дейтерированности ^2H -меченного белка, сначала регистрировали полный скан масс-спектра ЭУ смеси

метиловых эфиров N-Dns-производных $^{[2]}\text{H}$ аминокислот, полученных из гидролизата БР. Уровень дейтерированности рассчитывали по пикам молекулярных ионов $[\text{M}]^+$ производных. Затем проводили разделение метиловых эфиров N-Dns- $^{[2]}\text{H}$ производных ароматических аминокислот обращенно-фазовой ВЭЖХ и получали масс-спектры ЭУ для каждой выделенной индивидуальной $^{[2]}\text{H}$ аминокислоты.

Полный масс-спектр электронного удара ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, показанный на рис. 4 (сканирование при m/z 50–640, базовый пик m/z 527, 100 %), характеризуется непрерывностью: пики в интервале m/z от 50 до 400 на шкале массовых чисел представлены фрагментами метастабильных ионов, низкомолекулярных примесей, а также продуктами химической модификации аминокислот. Анализируемые $^{[2]}\text{H}$ ароматические аминокислоты, занимающие шкалу массовых чисел m/z от 415 до 456, представлены смесями молекул с различным количеством включенных атомов дейтерия, поэтому молекулярные ионы $[\text{M}]^+$ полиморфно расщеплялись на отдельные кластеры со статистическим набором значений m/z в зависимости от количества водородных атомов в молекуле. Учитывая эффект изотопного полиморфизма, подсчет уровня дейтерированности молекул $^{[2]}\text{H}$ аминокислот проводили по наиболее распространенному пику молекулярного иона $[\text{M}]^+$ в каждом кластере с математически усредненной величиной $[\text{M}]^+$ (рис. 4) — для фенилаланина пик молекулярного

Величины пиков молекулярных ионов $[M]^+$ в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns-[2,3,4,5,6- 2H_5]Phe, N-Dns-[3,5- 2H_2]Tyr и N-Dns-[2,4,5,6,7- 2H_5]Trp и уровни дейтерированности

Соединение	Величина пика $[M]^+$	Интенсивность, %	Количество атомов дейтерия*	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода**
N-Dns-[2,3,4,5,6- 2H_5]Phe-OMe	413	7	1	13
	414	18	2	25
	415	15	3	38
	416	11	4	50
	417	14	5	63
	418	6	6	75
N-Dns-[3,5- 2H_2]Tyr-OMe	428	12	—	—
	429	15	1	14
	430	5	2	29
N-Dns-[2,4,5,6,7- 2H_5]Trp-OMe	453	5	2	26
	454	6	3	38
	455	9	4	50
	456	11	5	64
	457	5	6	77

Примечание.

* — прочерк означает отсутствие включения дейтерия; ** — при подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных $COOH$ - и amino NH_2 -группах аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного (1H - 2H) обмена.

иона определялся $[M]^+$ при m/z 417, 14 % (вместо $[M]^+$ при m/z 412, 20 % для немеченного производного (пики немеченных аминокислот не показаны)), тирозина — $[M]^+$ при m/z 429, 15 % (вместо $[M]^+$ при m/z 428, 13 %), триптофана — $[M]^+$ при m/z = 456, 11 % (вместо $[M]^+$ при m/z 451, 17 %). Уровень дейтерированности, соответствующий увеличению молекулярной массы, составил для $[^2H]$ тирозина — 2 (96 ат.% 2H), $[^2H]$ фенилаланина — 5 (90 ат. % 2H) и $[^2H]$ триптофана — 5 (98 ат.% 2H) атомов дейтерия, что совпадает с данными по уровню дейтерированности исходных ароматических аминокислот — [3,5- 2H_2]Tyr, [2,3,4,5,6- 2H_5]Phe и [2,4,5,6,7- 2H_5]Trp, добавляемых в ростовую среду штамма продуцента. Полученные данные по уровню дейтерированности

$[^2H]$ фенилаланина, $[^2H]$ тирозина и $[^2H]$ триптофана позволяют сделать вывод о высокой селективности включения $[^2H]$ ароматических аминокислот в молекулу БР: дейтерий детектировался во всех остатках $[^2H]$ ароматических аминокислот (таблица). Присутствие в масс-спектре ЭУ пиков $[M]^+$ протонированных и полудейтерированных аналогов фенилаланина с $[M]^+$ при m/z 413–418, тирозина с $[M]^+$ при m/z 428–430 и триптофана с $[M]^+$ при m/z 453–457 с различными вкладами в уровни дейтерированности молекул, свидетельствует о сохранении небольшой доли минорных путей биосинтеза *de novo*, приводящим к разбавлению дейтериевой метки и определяется условиями биосинтеза 2H -меченного БР (таблица).

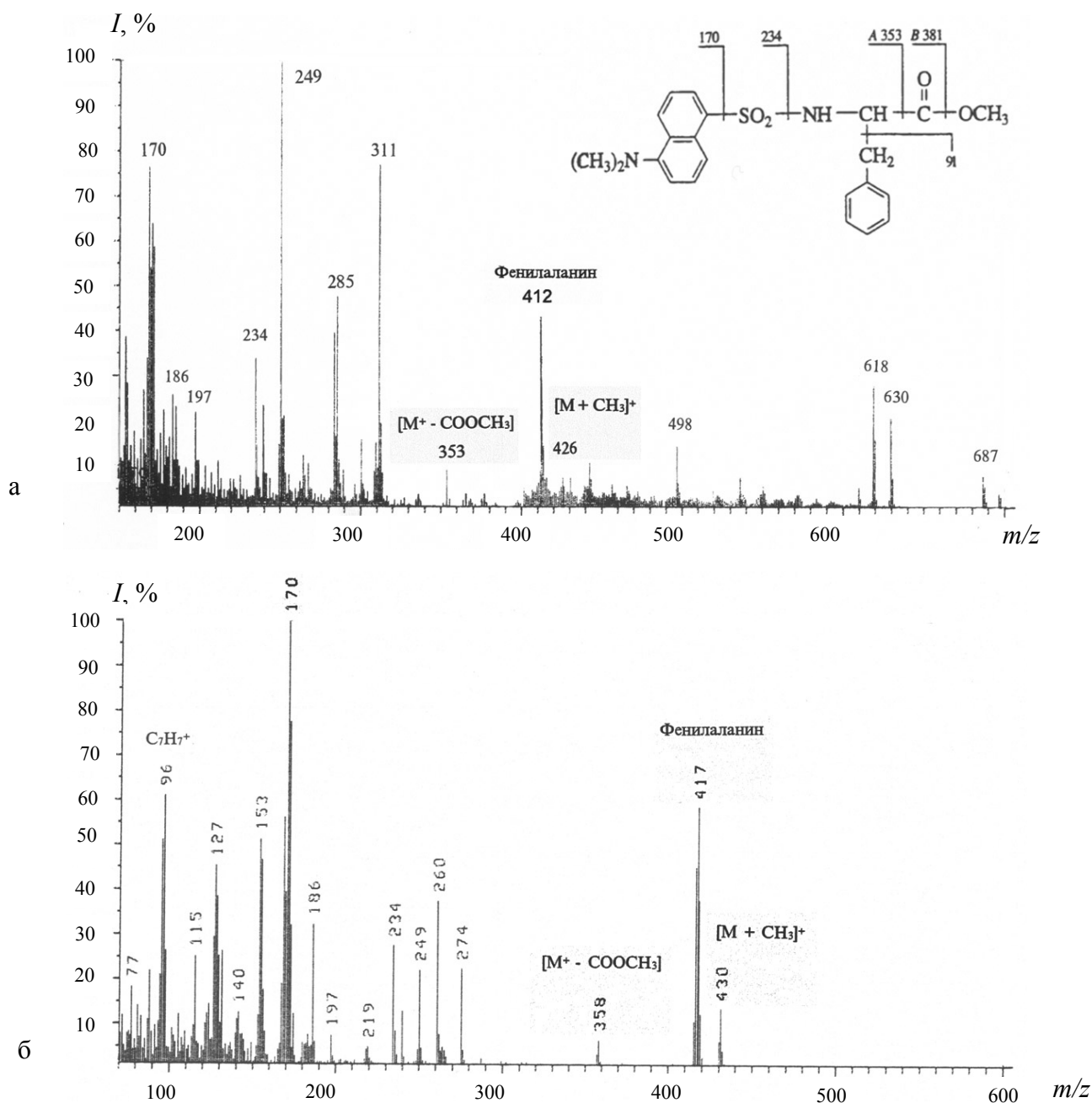


Рис. 5. Масс-спектры ЭУ метилового эфира N-Dns-[2,3,4,5,6-²H₅]Phe в различных экспериментальных условиях.

а — немеченный метиловый эфир N-Dns-Phe; б — метиловый эфир N-Dns-[2,3,4,5,6-²H₅]Phe, выделенный из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ. Условия разделения: жидкостной хроматограф Knauer ("Knauer", ФРГ), неподвижная фаза — сепарон C18 (Kova, Словакия), колонка 250 × 10 мм; элюент: (А) — CH₃CN—CF₃COOH (100 : 0.1–0.5 об.%) и (Б) — CH₃CN (100 об.%)

Согласно данным масс-спектрометрического анализа, пики молекулярных ионов [M]⁺ метиловых эфиров N-Dns-[²H]-производных ароматических аминокислот обладали низкой интенсивностью и

полиморфно расщеплялись, поэтому области их молекулярного обогащения были сильно уширены.

Кроме этого, масс-спектры компонентов смеси аддитивны, поэтому смеси можно анализировать,

только если имеются спектры различных компонентов, записанные в тех же условиях. Проводимые вычисления предусматривают решение системы из n уравнений с n неизвестными для смеси из n компонентов. Для компонентов, концентрация которых превышает 10 мол. %, правильность и воспроизводимость результатов анализа составляет ± 0.5 мол. % (при доверительной вероятности 90 %). Поэтому для получения воспроизводимого результата необходимо хроматографически выделять индивидуальные производные $[^2\text{H}]$ аминокислот из белкового гидролизата. Для решения поставленной задачи использовали ОФ ВЭЖХ на октадецилсилановом силикагеле силасорб С18, эффективность которого подтверждалась разделением смеси метиловых эфиров N-Dns-производных $[^2\text{H}]$ аминокислот из других микробных объектов, таких как метилотрофные бактерии и микроводоросли [20]. Метод адаптировали к условиям хроматографического разделения смеси метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ -производных аминокислот гидролизата БР, что заключалось в оптимизации соотношения элюентов, форме градиента и скорости элюирования с колонки. Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns- $[^2\text{H}]$ -производных аминокислот смесью растворителей CH_3CN — CF_3COOH (100 : 0.1–0.5 об. %). При этом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин / тирозин. Степени хроматографической чистоты выделенных из смеси белкового гидролизата БР метиловых эфиров N-Dns- $[2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5]$ фенилаланина, N-Dns- $[3,5\text{-}^2\text{H}_2]$ тирозина и N-Dns- $[2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5]$ триптофана составили 89, 91 и 90 % соответственно. Полученный результат подтвердил рис. 5, б, на котором приведен масс-спектр ЭУ метилового эфира N-Dns- $[2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5]$ фенилаланина, выделенного ОФ ВЭЖХ (сканирование при m/z 70–600, базовый пик m/z 170, 100 %) (масс-спектр приведен относительно немеченного метилового эфира N-Dns-фенилаланина (рис. 5, а), сканирование при m/z = 150–700, базовый пик m/z 250, 100 %). Доказательством включения дейтерия в молекулу фенилаланина является пик тяжелого молекулярного иона метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина ($[\text{M}]^+$ m/z 417, 59 % вместо $[\text{M}]^+$ m/z 412, 44 % для немеченного производного фенилаланина) и дополнительный пик обогащенного дейтерием бензильного $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы $[^2\text{H}]$ фенилаланина m/z 96, 61 % (вместо m/z 91, 55 % в контроле (не показан)) (рис. 5, б). Пики второстепенных фрагментов различной интенсивности со значениями m/z 249, 234 и 170 являются продуктами вторичного распада дансильного остатка до N-диметиламинонафталина, низкоинтенсивный пик $[\text{M} - \text{COOCH}_3]^+$ m/z 358, 7 % (m/z 353, 10 %, контроль)

является продуктом отщепления карбоксиметильной COOCH_3 -группы из метилового эфира N-Dns- $[^2\text{H}]$ фенилаланина, а пик $[\text{M} + \text{CH}_3]^+$ m/z 430, 15 % (m/z 426, 8 %, контроль) — продуктом дополнительного метилирования по α -аминогруппе $[^2\text{H}]$ фенилаланина (рис. 5, б). Согласно данным масс-спектрометрии ЭУ, разница между молекулярной массой легкого и тяжелого пиков $[\text{M}]^+$ метилового эфира N-Dns-фенилаланина составляет пять единиц, что совпадает с первичными данными по уровню дейтерирования исходного $[2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5]$ фенилаланина, добавляемого в среду выращивания. Масс-спектрометрические данные по уровням дейтерирования $[3,5\text{-}^2\text{H}_2]$ тирозина и $[2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5]$ триптофана также находятся в корреляции и подтверждены спектроскопией ^1H ЯМР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой эффективности мечения БР дейтерием по остаткам ароматических аминокислот Phe, Tyr и Trp с выходом $[^2\text{H}]$ БР 8–10 мг на 1 г биомассы. Главным преимуществом метода является то, что выделенный $[^2\text{H}]$ БР сохраняет природную биологически активную конфигурацию в комплексе с 13-транс-ретином и способностью к фотохимическим превращениям *in vitro*, что было доказано электрофорезом в 12.5 %-м ПААГ с 0.1 %-м ДДС-На и регенерацией апомембран с 13-транс-ретином. Метод также применим к получению других аналогичных БР трансмембранных белков галофильных бактерий — сенсородопсина и галородопсина. Уникальные свойства природных бактериородопсинов обеспечивают широкий диапазон био- и нанотехнологических приложений, в которых могут найти применение их ^2H -меченные аналоги. В дальнейшем планируется получать полностью дейтерированные препараты БР для реконструкции функционально активных систем трансмембранных белков в тяжелой воде с очищенными $[^2\text{H}]$ жирными кислотами и другими биологически активными соединениями. Эти исследования позволят дать ответ на вопрос, как функционирует БР в составе нативных мембран в условиях полного замещения протонов на дейтерий.

Работа осуществлялась при поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 012.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin — like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233, N 89. P. 149–160.

2. Oesterhelt D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from Halophilic Archaea // *Curr. Op. Struct. Biol.* 1988. V. 8. P. 489–500.
3. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1999. Т. 35, № 1. С. 34–42.
4. Grigorieff N. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin // *Journal of Molecular Biology*. 1996. V. 259. P. 393–421.
5. Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1999. V. 28. P. 367–399.
6. Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D. General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization / switch / transfer model // *Biochemistry*. 1997. V. 36, N 1. P. 2–7.
7. Lanyi J.K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // *Journal of Structural Biology*. 1998. V. 124. P. 164–178.
8. Hampp N., Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its potential in technical applications // *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives* / (Eds) C.M. Niemeyer, C.A. Mirkin. Weinheim: Wiley-VCH-Verlag, 2004. 167 p. (Ch. 11).
9. Vought B.W., Birge R.R. *et al.* Molecular electronics and hybrid computers // *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*. N.Y.: Wile Interscience, 1999. 490 p.
10. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения ^2H и ^{13}C в молекулы аминокислот бактериальных объектов // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22, № 10–11. С. 856–869.
11. Mosin O.V., Karnaukhova E.N., Pshenichnikova A.B., Reshetova O.S. Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin // 6th Intern. Conf. on Retinal proteins. Leiden. Elsevier, 1994. P. 115.
12. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Методы получения аминокислот и белков, меченных стабильными изотопами ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O // *Биотехнология*. 1996. № 10. С. 24–40.
13. Neugebauer D.Ch., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the Purple Membrane *in vivo* and *in vitro* // *Journal Molecular Biology*. 1978. V. 123. P. 247–257.
14. Rudiger M., Tittor J., Gerwert K., Oesterhelt D. Reconstitution of bacteriorhodopsin from the apoprotein and retinal studied by Fourier-transformed infrared spectroscopy // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 4867–4874.
15. Nonella M., Windemuth A., Schulten K. Structure of bacteriorhodopsin and *in situ* isomerization of retinal: a molecular dynamics study // *Journal Photochem. Photobiol.* 1991. V. 54, N 6. P. 937–948.
16. Звонкова Е.Н., Зотчик Н.В., Филиппович Е.И. и др. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия, 1970. 68 с.
17. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // *Analytical Biochemistry*. 1974. V. 60, N 1. P. 45–50.
18. Liu T.Y., Chang Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246, N 9. P. 2842–2848.
19. Пшеничникова А.Б., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И. Методы получения дейтерированных аминокислот // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21, № 3. С. 163–178.
20. Егорова Т.А., Мосин О.В., Еремин С.В., Карнаухова Е.Н. и др. Разделение аминокислот белковых гидролизатов природных объектов методом ВЭЖХ в виде карбобензоксипроизводных // *Биотехнология*. 1993. № 8. С. 21–25.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии (Мосин О.В.)

Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова (Швец В.И.)

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва (Складнев Д.А.)

Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София, Болгария (Игнатов И.)

Контакты: Мосин Олег Викторович,
mosin-oleg@yandex.ru;
Игнат Игнатов,
mbioph@dir.bg

Материал поступил в редакцию 10.09.2012

**BIOSYNTHESIS OF TRANSMEMBRANE PHOTO-TRANSFORMING
PROTEIN [^2H]BACTERIORHODOPSIN, LABELLED
WITH DEUTERIUM ON RESIDUES OF AROMATIC AMINO ACIDS
[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe, [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr, [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp**

O. V. Mosin¹, V. I. Shvets², D. A. Skladnev³, I. Ignatov⁴

¹*Moscow State University of applied biotechnology*

²*Moscow State University of Fine Chemical Technology named after M. V. Lomonosov*

³*State Research Centre of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

⁴*The Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, Bulgaria*

The microbial micropreparative synthesis of transmembrane photo-transforming protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg), labeled with deuterium on residues of [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]phenylalanine, [3,5- $^2\text{H}_2$]tyrosine, and [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]tryptophan was carried out that is important for nanoindustry of new modern domestic photo-transforming nanomaterials and molecular bioelectronics. The protein was allocated from membranes of photoorganoheterotrophic halobacterium *Halobacterium halobium* by cellular lysis by distilled water, processing of bacterial biomass by ultrasound, alcohol extraction of low and high-weight molecular impurities, cellular RNA, carotenoids and lipids, with the subsequent solubilization of final product with 0.5 % SDS-Na and fractionation by methanol. The homogeneity of the synthesized product, and the selectivity of deuterium incorporation into the molecule was proved by combination of preparative and analytical protein methods including electrophoresis in 12.5 % PAAG with 0.1 % SDS-Na, gel filtration chromatography on Sephadex G-200, reverse-phase HPLC, electron impact mass-spectrometry of methyl esters of N-Dns-derivatives of amino acids.

Keywords: *Halobacterium halobium*, [^2H]bacteriorhodopsin, [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$]Phe, [3,5- $^2\text{H}_2$]Tyr, [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$]Trp, biosynthesis; electron impact mass-spectrometry