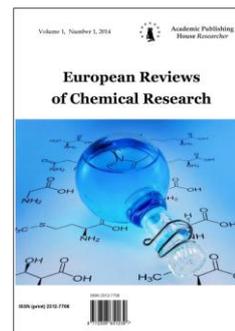


Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation  
European Reviews of Chemical Research  
Has been issued since 2014.  
ISSN: 2312-7708  
Vol. 2, No. 2, pp. 92-108, 2014

DOI: 10.13187/erchr.2014.2.92  
[www.ejournal14.com](http://www.ejournal14.com)



UDC 537.86 + 577.37

**Biosynthetic incorporation of deuterium-labeled aromatic amino acids - [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]phenylalanine, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]tyrosine and [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tryptophan into the molecule of transmembrane protein bacteriorhodopsin from halobacterium *Halobacterium halobium ET 1001***

<sup>1</sup> Oleg Mosin  
<sup>2</sup> Ignat Ignatov  
<sup>3</sup> Dmitry Skladnev  
<sup>4</sup> Vitaly Shvets

<sup>1</sup> Moscow State University of Applied Biotechnology, Russian Federation  
Senior research Fellow of Biotechnology Department, Ph. D. (Chemistry)  
103316, Moscow, Talalikhina ulitza, 33  
E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup> The Scientific Research Center of Medical Biophysics (SRC MB), Bulgaria  
Professor, D. Sc.  
1111, Sofia, N. Kopernik street, 32  
E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms "Genetika", Russian Federation  
Professor, D. Sc (Biology), leading scientist of "Genetika"  
117545, Moscow, 1st Dorozhniy proezd, 1  
E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> M.V. Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, Russian Federation  
Academician of Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Chemistry)  
119571, Moscow, Vernadskogo avenue, 86  
E-mail: mitht@mitht.ru

### Abstract

It was carried out the method for microbiological preparation and isolation of trans membrane photo-transforming protein bacteriorhodopsin (output 8–10 mg), labeled with deuterium on residues of [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]phenylalanine, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]tyrosine, and [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tryptophan. The protein was allocated from membranes of photoorganotrophic halobacterium *Halobacterium halobium ET 1001* 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-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride (dansyl) derivatives of amino acids.

**Keywords:** *Halobacterium halobium* ET 1001; [ $^2\text{H}$ ]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; RP HCLP.

### Ведение

Бактериородопсин (БР), названный по аналогии с белком зрительного аппарата млекопитающих родопсином, был выделен в 1971 году В. Стохениусом (США) и Д. Остерхельтом из клеточной мембраны экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* [1]. Этот фотопреобразующий мембранный белок с молекулярной массой ~26,5 кДа представляет собой хромопротеид, который содержит в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью 13-*транс*-ретинольного  $\text{C}_{20}$ -каротиноида – аналога витамина А, связанного альдиминной связью с остатком лизина-216 белковой части молекулы. Наряду с БР в клеточной мембране галобактерий содержится небольшое количество других сопутствующих каротиноидных пигментов, основной из которых бактериоруберин, определяет 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 исследованиям, молекула БР состоит из семи находящихся в конформации  $\alpha$ -спирали сегментов, пронизывающих всю толщу мембраны клетки в направлении, перпендикулярном её плоскости [4]. Гидрофобные домены молекулы БР представляют собой трансмембранные сегменты, а гидрофильные домены выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные  $\alpha$ -спиральные тяжи белковой молекулы [5].

В клеточной мембране молекула БР выполняет функции светозависимого протонного насоса, перекачивающего протоны через мембрану клетки и создающего электрохимический градиент протонов  $\text{H}^+$  на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании. При поглощении кванта света происходит обратимая фотоизомеризация 13-*Z*-БР ( $\lambda_{\text{макс}} = 548 \text{ нм}$ ) (квантовый выход 0,03 при  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) в *all-E*-БР ( $\lambda_{\text{макс}} = 568 \text{ нм}$ ), инициирующая каскад фотохимических реакций с образованием промежуточных интермедиантов –  $\text{J}_{625}$ ,  $\text{K}_{590}$ ,  $\text{L}_{550}$ ,  $\text{M}_{412}$ ,  $\text{N}_{560}$ , и  $\text{O}_{640}$  [6] с последующим отрывом  $\text{H}^+$  из ретинального остатка БР и его присоединением со стороны цитоплазмы. В результате между внутренней и внешней поверхностью мембраны образуется градиент концентрации  $\text{H}^+$ , 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]. Таким образом, молекула БР ведет себя как фотохромный переносчик с малым временем релаксации – переходом из возбужденного состояния в основное. Оптические и динамические характеристики БР изменяются в зависимости от условий получения пурпурных мембран (ПМ) и составом полимерной матрицы.

Уникальные свойства БР обеспечивают широкий диапазон био-, нано-технологических и биофизических приложений, в которых он может найти применение. Благодаря своей высокой светочувствительности и разрешающей способности БР используется в молекулярной биоэлектронике как природный фотохромный материал [8]. Кроме этого, БР очень привлекателен, как модельный объект для исследований, связанных с изучением функциональной активности и структурных свойств фотопреобразующих мембранных белков в составе искусственных энерго- и фотопреобразующих мембран [9].

Для структурно-функциональных исследований с БР целесообразно вводить в молекулу белка в качестве изотопной метки дейтерий ( $^2\text{H}$ ), позволяющий использовать для анализа изотопного включения метод высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ после химической модификации аминокислот в их летучие производные [10]. Большое научно-прикладное значение имеет БР, меченный дейтерием по остаткам функционально важных

ароматических аминокислот – [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина, [ $^2\text{H}$ ]тирозина и [ $^2\text{H}$ ]триптофана, участвующих в гидрофобном взаимодействии полипептидной цепи белка с липидным бислоем клеточной мембраны [11].  $^2\text{H}$ -меченые ароматические аминокислоты могут быть химически синтезированы методом обратного изотопного обмена ( $^1\text{H}$ – $^2\text{H}$ ) в молекулах протонированных аминокислот – [2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланин в 85%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  при 50 °С, [3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозин в 25%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  при слабом кипячении реакционной смеси, [2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофан в 75%-ной [ $^2\text{H}$ ]трифторуксусной кислоте при 25 °С [12].

Целью настоящей работы являлась разработка метода получения и выделения 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, а также исследование уровней дейтерированности молекулы БР методом масс-спектрометрии ЭУ метиловых эфиров N-5-(диметиламино) нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот после их разделения методом ОФ ВЭЖХ.

## Материалы и методы

### Объект исследования

В работе использовали каротиноидсодержащий штамм экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001, полученный из коллекции культур МГУ. Штамм модифицирован селекцией отдельных колоний на твердой (2%-ный агар) пептоновой среде с 4,3 М NaCl. Все неорганические соли предварительно перекристаллизовывали в 99,9 ат.%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (“Изотоп”, РФ),  $^2\text{H}_2\text{O}$  дистиллировали над  $\text{KMnO}_4$  с последующим контролем изотопной чистоты  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (Bruker Daltonics, Германия) (рабочая частота – 70 МГц, внутренний стандарт –  $\text{Me}_4\text{Si}$ ).

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

40 г фенилаланина растворяли в 300 мл 85%-ной  $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  (в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) и нагревали с обратным водяным холодильником при 50–60 °С при перемешивании 3 сут. По окончании реакционную смесь охлаждали, нейтрализовали 30%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 5,5. Продукт экстрагировали этанолом. Выход 24 г (58,7%);  $T_{\text{пл}} = 271\text{--}273$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 4,47$  (5 М HCl);  $pK_a = 2,20$  (COOH), 9,31 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,6$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5 об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl):  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})]$ : 257,5 ( $\epsilon$  195). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $^2\text{H}_2\text{SO}_4$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,25 (2H, H $\beta$ ),  $\delta$  4,4 (1H, H $\alpha$ ),  $\delta$  7,2–7,4 (0,07H), УД 90 ат.%  $^2\text{H}$ . Масс-спектр ЭУ [(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%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 4,5 и охлаждали 1 сут при 0 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали  $^2\text{H}_2\text{O}$  и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 90 г (86,5%);  $T_{\text{пл}} = 316\text{--}317$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 10,03$  (5 М HCl);  $pK_a = 2,20$  (COOH), 9,21 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,45$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5, об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl)  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})]$ : 223 ( $\epsilon$  8200) и 274,5 ( $\epsilon$  1340). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (1М  $^2\text{HCl}$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,32 (2H),  $\delta$  4,35 (1H),  $\delta$  6,9 (1H),  $\delta$  7,2 (2H), УД 96 ат.%  $^2\text{H}$ . Масс-спектр ЭУ [(M) $^+$  m/z (I, %)]: 181 (21), метиловый эфир N-Dns-[3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина: 429 (15), 430 (5).

### Синтез L-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофана

К 40 мл 99,9%-ной  $^2\text{H}_2\text{O}$  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%-ным  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH = 5,9, охлаждали 1 сут при 0 °С. Кристаллический продукт фильтровали, промывали  $^2\text{H}_2\text{O}$  и сушили при 10 мм рт. ст. Выход 19 г (60,3%);  $T_{\text{пл}} = 283\text{--}285$  °С;  $[\alpha]_{\text{d}}^{25} = 2,8$  (1 М HCl);  $pK_a = 2,46$  (COOH), 9,41 ( $\text{NH}_2$ );  $R_f = 0,5$  (n-бутанол–уксусная кислота–вода (12 : 3 : 5, об.%)). УФ-спектр (0,1 М HCl)  $[\lambda_{\text{макс}} \text{ нм} (\epsilon$

$M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ): 218 ( $\epsilon$  33500), 278 ( $\epsilon$  5550), 287,5 ( $\epsilon$  4550). Спектр  $^1H$ -ЯМР ( $CF_3COOH$  в  $^2H_2O$ ) ( $\delta$ , ppm):  $\delta$  3,4 (2H, H $\beta$ ),  $\delta$  4,4 (1H, H $\alpha$ ),  $\delta$  7,3 (1H, H $\epsilon$ ),  $\delta$  7,2–7,4 (0,1H, In-H), УД 98 ат.%  $^2H$ . Масс-спектр ЭУ [(M) $^+$   $m/z$  (I, %)]: 204 (28), метиловый эфир N-Dns-[ $^2H$ ]триптофана: 455 (9), 456 (11).

### **Синтез N-Dns-[ $^2H$ ]аминокислот**

К 4 мг сухого гидролизата БР в 1 мл 2 М  $NaHCO_3$  (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 М HCl до pH = 3,0 и экстрагировали этилацетатом (3  $\times$  5 мл). Объединенный экстракт промывали дист.  $H_2O$  до pH = 7,0 (2  $\times$  1 мл), сушили безводным  $Na_2SO_4$ , растворитель удаляли при 10 мм рт. ст. Выход 15,3 мг (78%). Последующий синтез метиловых эфиров N-Dns-[ $^2H$ ]аминокислот проводили обработкой образцов N-Dns-аминокислот в составе белкового гидролизата БР газообразным диазометаном по методике, указанной в работе [13].

### **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- $^2H_5$ ]фенилаланином,  $L$ -[3,5- $^2H_2$ ]тирозином и  $L$ -[2,4,5,6,7- $^2H_5$ ]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;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 20; KCl – 2;  $NH_4Cl$  – 0,5;  $KNO_3$  – 0,1;  $KH_2PO_4$  – 0,05;  $K_2HPO_4$  – 0,05;  $Na^+$ -цитрат – 0,5;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  –  $3 \cdot 10^{-4}$ ;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,065;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  –  $4 \cdot 10^{-5}$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  –  $5 \cdot 10^{-5}$ ; глицерин – 1,0; биотин –  $1 \cdot 10^{-4}$ ; фолиевая кислота –  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ; витамин  $B_{12}$  –  $2 \cdot 10^{-5}$ . Ростовую среду автоклавировали 30 мин при 0,5 атм, pH довели 0,5 М KOH до 6,5–6,7. Выращивание галобактерии 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 380-S (Biorad Labs, Венгрия) и освещении монохромными лампами ЛДС-40 (ООО “Альфа-Электро”, Россия) (3 лампы  $\times$  1,5 лк). Последующие операции по выделению БР проводили с использованием светозащитной лампы с оранжевым светофильтром ОРЖ-1.

### **Выделение фракции пурпурных мембран (ПМ)**

Сырую биомассу (1 г) промывали дист.  $H_2O$  и осаждали на центрифуге Т-26 (Carl Zeiss, Германия) (1500  $g$ , 20 мин). Осадок суспендировали в 100 мл дист.  $H_2O$  и выдерживали 3 ч при 4 °С. Реакционную смесь центрифугировали (1500  $g$ , 15 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл дист.  $H_2O$  и дезинтегрировали ультразвуком (22 кГц, 3  $\times$  5 мин) в водяной бане со льдом (0 °С). Клеточный гомогенат после промывки дист.  $H_2O$  суспендировали в 10 мл буфера 125 мМ NaCl, 20 мМ  $MgCl_2$ , 4 мМ Трис-HCl, (pH = 8,0), добавляли 5 мкг РНК-азы I (2–3 ед акт.) и инкубировали 2 ч при 37 °С. Затем добавляли 10 мл того же буфера, выдерживали 10–12 ч при 0 °С. Водную фракцию отделяли центрифугированием (1500  $g$ , 20 мин), осадок ПМ обрабатывали 50%-ным этанолом (5  $\times$  7 мл) при 0 °С с последующим отделением растворителя. Процедуру повторяли трижды до получения бесцветных промывных вод. Содержание белка в пробах определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) по соотношению  $D_{280}/D_{568}$  (молярные коэффициенты светопоглощения при длинах волн 280 и 568 нм:  $\epsilon_{280} = 1,1 \cdot 10^5$  и  $\epsilon_{568} = 6,3 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  [14]. Регенерацию ПМ проводили как описано в работе [15]. Выход фракции ПМ – 120 мг (химическая чистота 80–85%).

### **Выделение БР**

Суспензию ПМ (в H<sub>2</sub>O) (1 мг/мл) растворяли в 1 мл 0,5% ДДС-На, инкубировали 5–7 ч при 30 °С с последующим центрифугированием (1200 g, 15 мин). Осадок отделяли, к супернатанту добавляли дробными порциями метанол (3 × 100 мл) при 0 °С, выдерживали 14–15 ч при 0 °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 дист. <sup>2</sup>H<sub>2</sub>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, размерами 150 × 10 мм; неподвижная фаза – Сефадекс G-200 (Pharmacia, США) (удельный объем упакованных гранул – 30–40 ед. на 1 г сух. сефадекса), размер гранул – 40×120 мкм, уравновешенную буферным раствором, содержащим 0,1 % ДДС-На и 2,5 мМ ЭТДА. Колонка была оснащена UV/VIS детектором Waters 2487 (Waters Corp., США) с детекцией при длинах волн 280 и 568 нм. Элюирование проводили при 20±25 °С 1 мМ Трис-НСl буфером (рН = 7,6) со скоростью 10 мл/см<sup>2</sup> · ч. Объединенные белковые фракции подвергали сублимационной сушке, запаивали в стеклянные ампулы (10 × 50 мм) и хранили в морозильной камере при -12 °С.

### **Электрофорез БР**

Проводили в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На в соответствии с протоколом фирмы LKB (Швеция). Для количественного определения содержания синтезированного в клетке белка проводили сканирование покрашенного в растворе кумасси-голубой R-250 электрофоретического геля на лазерном денситометре Beckman CDS-200 (Beckman Coulter, США).

### **Спектры поглощения**

Регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (Beckman Coulter, США) в диапазоне длин волн  $\lambda = 200\text{--}700$  нм.

### **ОФ ВЭЖХ метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот**

Проводили на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (Knauer, Германия), снабженным УФ-детектором UF-2563 и интегратором C-R 3A (Shimadzu, Япония), используя колонку, t = 20±25 °С, размерами 250×10 мм с неподвижной обращенной фазой Separon SGX C18, 7 мкм (Kova, Словакия); подвижная фаза: (А) – ацетонитрил–трифторуксусная кислота = 100 : 0,1–0,5 об.% и (Б) – ацетонитрил = 100 об.% в условиях градиентного элюирования; объем пробы – 50–100 мкл; скорость элюирования – 1,5 мл/мин. Результаты градиентного элюирования показаны в таблице 1. Выход индивидуальных метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот – 75–89%; хроматографическая чистота – 95–98 %.

Таблица 1

**Результаты одноступенчатого градиентного разделения смеси метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ на колонке 250×10 мм, t = 20±25 °С, с октадецилсилановым силикагелем Separon SGX C18, 7 мкм (Kova, Словакия)**

Номер обработки	Компоненты подвижной фазы, об. %		Время элюирования, мин
	А*	Б**	
1	90	10	10
2	80	20	10
3	60	40	10
5	50	50	10

6	30	60	5
8	20	80	5
9	10	90	5
10	0	100	5

\* А – ацетонитрил – трифторуксусная кислота = 100 : 0,1–0,5 об.%

\*\* Б – ацетонитрил = 100 об.%

### **Масс-спектры метиловых эфиров *N*-Dns-[<sup>2</sup>H]аминокислот**

Получены методом электронного удара (ЭУ) на масс-спектрометре МВ-80А (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%-ную резкость изображения.

### **Обсуждение результатов**

#### **Биосинтез БР**

Выбор стратегии биосинтеза <sup>2</sup>H-меченого БР с использованием штамма экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001 определялся целью исследования, связанной с изучением принципиальной возможности получения <sup>2</sup>H-меченых трансмембранных фотопреобразующих белков в микропрепаративных количествах для реконструкции искусственных мембран в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O и структурно-функциональных исследований. При выборе [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланина, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозина и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофана в качестве источников дейтерия учитывалась их исключительная важность в гидрофобном взаимодействии молекулы БР с липидным бислоем клеточной мембраны, устойчивость к реакциям (<sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H) обмена в водной среде в условиях выращивания штамма-продуцента, а также возможность применения метода высокочувствительной масс-спектрометрии ЭУ для последующего анализа. <sup>2</sup>H-меченый БР получен при росте штамма фотоорганотрофных галобактерий *H. halobium* ET 1001 в синтетической среде (4,3 М NaCl) с [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном. В оптимальных условиях выращивания *H. halobium* ET 1001 (период инкубации 4–5 сут, *t* = 35 °С при освещении монохромным светом при  $\lambda = 560$  нм) в клетках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы  $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1,0$  идентичный природному БР. Рост штамма в синтетической среде с дейтерированными ароматическими аминокислотами (рисунок 1, кривая 2) ингибировался незначительно по сравнению с контролем (рисунок 1, кривая 1) на протонированной среде, что существенно упрощает и удешевляет оптимизацию условий биосинтеза <sup>2</sup>H-меченого БР, заключающуюся в эквивалентной замене протонированных ароматических аминокислот в среде выращивания на их дейтерированные аналоги – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином (0,26 г/л), [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином (0,2 г/л) и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном (0,5 г/л).

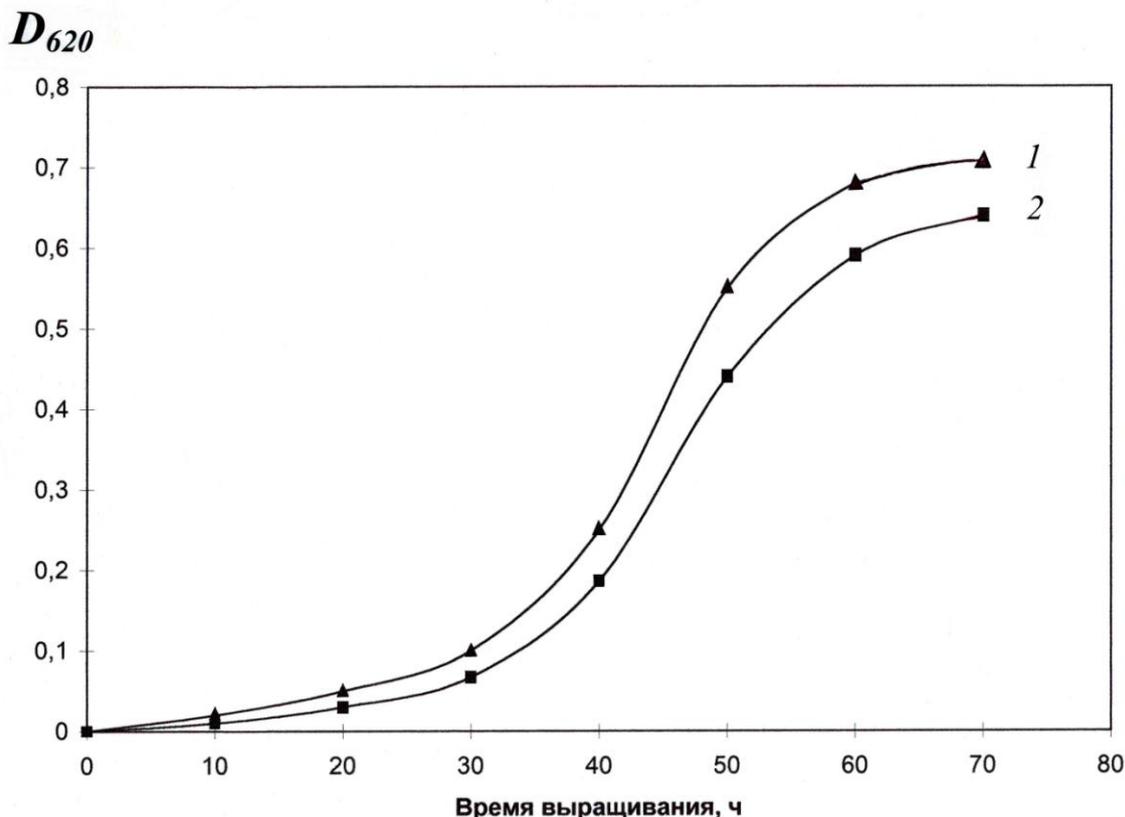


Рис. 1. Динамики роста галобактерии *H. halobium* ET 1001 в различных экспериментальных условиях: 1 – протонированная синтетическая среда; 2 – синтетическая среда с дейтерированными ароматическими аминокислотами – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланином (0,26 г/л), [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]тирозином (0,2 г/л) и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]триптофаном (0,5 г/л)

Основными этапами эксперимента являлись: выращивание галобактерий *H. Halobium* ET 1001 на синтетической среде; дезинтеграция клеток и лизис клеточных стенок; выделение фракции ПМ; очистка РМ от низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов; растворение ПМ в 0,5%-ном растворе ионного детергента – ДДС-Na с образованием микроэмульсии; осаждение БР из микроэмульсии метанолом; гель-проникающая хроматография на сефадексе G-200; электрофорез в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na. Поскольку выделяемый белок локализуется в ПМ, освобождения 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 с частотой 22 кГц. Последующую обработку клеточного гомогената РНК-азой I (2–3 ед. акт.) проводили для разрушения клеточной РНК. Поскольку фракция ПР наряду с выделяемым белком в комплексе с липидами и полисахаридами содержала примесь связанных каротиноидов и посторонних белков, применялись специальные методы фракционирования белка без повреждения его природной структуры и диссоциации ретинального остатка. Это существенно усложняло задачу выделения индивидуального бактериородопсина с применением методов декаротинизации и делипидизации (удаление каротиноидов и липидов), а также очистки и колоночной ГПХ на сефадексе. Декаротинизация, заключающаяся в многократной обработке суспензии ПМ 50%-ным этанолом при 0 °С, являлась рутинным, но обязательным этапом, несмотря на значительные потери хромопротеина. Использовалось не менее пяти обработок 50%-ным этанолом, чтобы получить спектр поглощения суспензии очищенных от каротиноидов (пик 4) и (пик 5) ПМ (степень хроматографической чистоты 80–85%), показанного на рисунке 2 на различных стадиях обработки (B) и (C) относительно природного БР (A). Образование 13-

ретиальпротеинового комплекса в молекуле БР приводит к батохромному сдвигу в спектре поглощения ПМ (рисунок 2, С) – основной пик (1) при максимуме поглощения  $\lambda = 568$  нм, вызванный световой изомеризацией хромофора по  $C_{13}=C_{14}$ -кратной связи определяется наличием 13-*транс*-ретиального остатка в основной спектральной форме БР<sub>568</sub>; дополнительный малоинтенсивный пик (2) при  $\lambda = 412$  нм характеризует незначительную примесь образующейся на свету спектральной формы *мета*-бактериородопсина ( $M_{412}$ ) с депротонированной альдиминной связью между остатком 13-*транс*-ретиала и белком, а общий пик (3) при  $\lambda = 280$  нм определяется поглощением ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) в полипептидной цепи белка (для чистого БР соотношение поглощений  $D_{280}/D_{568} = 1,5 : 1$ ). Данный метод получения БР позволяет контролировать содержание ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана в ростовой среде, добавляемых в количествах 0,26, 0,2 и 0,5 г/л.

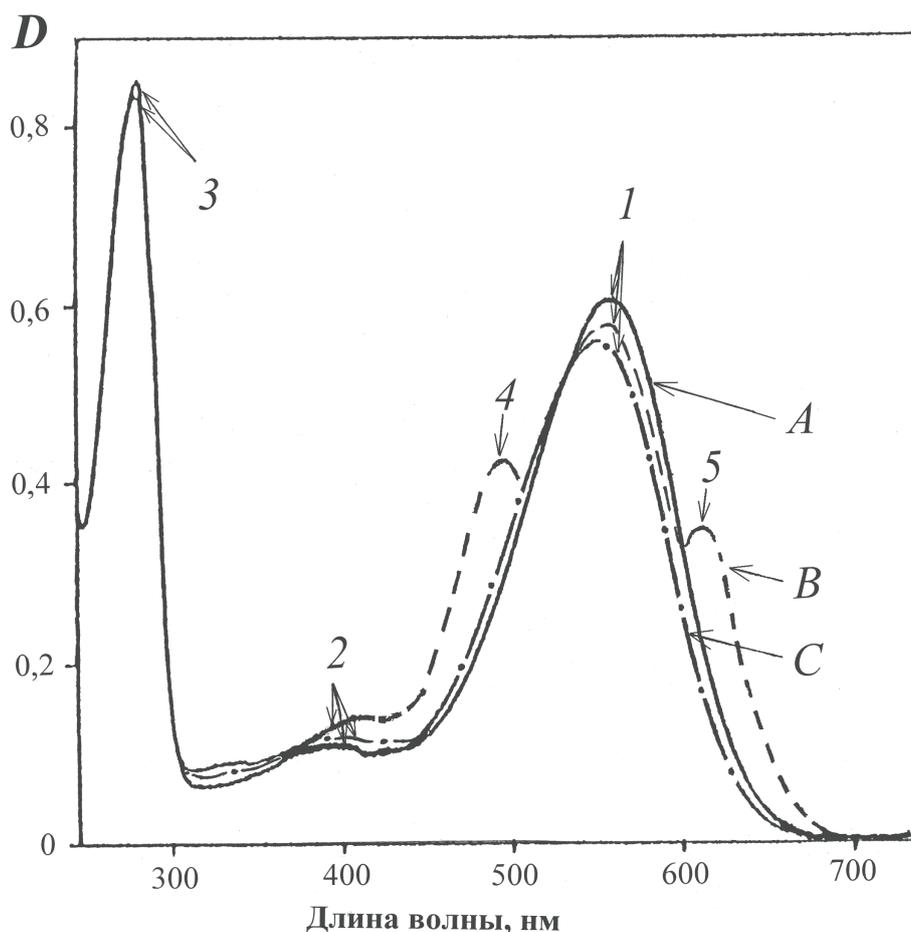


Рис. 2. Спектры поглощения суспензии ПМ (50%-ный этанол) на различных стадиях обработки: А – природный БР; В – ПМ после промежуточной обработки; С – очищенные от посторонних каротиноидов ПМ. Пик (1) соответствует основной спектральной форме БР<sub>568</sub>, (2) – примесь спектральной формы *мета*-бактериородопсина  $M_{412}$ , (3) – общий пик поглощения ароматических аминокислот, (4) и (5) – пики посторонних каротиноидов.  
В качестве контроля использовали природный БР

### Выделение и очистка БР

Фракционирование и хроматографическая очистка белка являлись следующим необходимым этапом. Поскольку БР, будучи трансмембранным белком, пронизывает билипидный слой в виде семи  $\alpha$ -сегментов, применение сульфата аммония и других традиционных высаливающих агентов не дает положительного результата при выделении белка. Решение задачи заключалось в переводе БР в растворимую форму за счет

коллоидного растворения (солюбилизации) полученной фракции ПМ в 0,5%-ном растворе ДДС-На с последующим низкотемпературным осаждением белка метанолом.

Использование в качестве ионного детергента ДДС-На диктовалось необходимостью максимальной солюбилизации белка в природной биологически-активной форме в комплексе с 13-*транс*-ретиналом с комбинированием стадии делипидизации (очистки от липидов) и осаждения, поскольку БР, солюбилизированный в слабоконцентрированном 0,5%-ном растворе ДДС-На, сохраняет спиральную  $\alpha$ -конфигурацию [16]. Поэтому отпала необходимость использования органических растворителей — ацетона, метанола и хлороформа для очистки от липидов, а делипидизация и осаждение белка совмещались в одну единственную стадию, существенно упрощающую фракционирование белка и уменьшающую его потери при выделении. Значительным преимуществом метода является, что целевой белок в комплексе с молекулами липидов и детергента распределяется в надосадочной жидкости, а другие высокомолекулярные примеси и остатки клеточных мембран — в непрореагировавшем осадке, легко отделяемом центрифугированием. Фракционирование солюбилизованного в 0,5%-ном ДДС-На БР с его последующим выделением в кристаллическом виде проводилось в три стадии дробным осаждением метанолом при 0 °С, уменьшая концентрацию детергента от 0,5 до 0,2 и 0,1%.

Окончательная стадия очистки БР заключалась в отделении белка от низкомолекулярных примесей гель-проникающей хроматографией, для чего БР-содержащие фракции (3 мг), растворенные в 100 мкл буфера, дважды пропускали через колонку (10 × 150 мм) с декстрановым сефадексом G-200 (Pharmacia, США), уравновешенную буферным раствором с 0,1%-ным ДДС-На и 2,5 мМ ЭТДА. Элюирование проводили при 20±25 °С 1 мМ Трис-НСl буфером (рН = 7,6) со скоростью 10 мл/см<sup>2</sup> · ч. Суммарные данные по очистке БР от каротиноидов и фосфолипидов показаны в таблице 2.

Согласно разработанному методу получено 8–10 мг <sup>2</sup>H-меченого БР из 1 г сухой бактериальной биомассы, гомогенность которого подтверждена электрофорезом в 12,5%-ным ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На, регенерацией апомембран с 13-*транс*-ретиналом и ОФ ВЭЖХ метиловых эфиров N-Dns-аминокислот.

Таблица 2

### Суммарные результаты по выделению и очистке БР различными методами

Образец	Содержание ПМ, моль ПМ/моль БР	Степень очистки от каротиноидов и фосфолипидов, %	Выход БР*, %
Фракция ПМ	20,5	–	–
ПМ после промывки EtOH:			
1 промывка	16,9	65	93
2 промывка	15,1	70	90
3 промывка	14,5	76	88
4 промывка	13,6	81	84
5 промывка	13,2	84	80
БР, перекристаллизованный из MeOH	12,9	86	75
БР после очистки на колонке с сефадексом G-200	10,2	92	86

\* Выход указан в масс.% по отношению к БР, солюбилизированному в 0,5% ДДС-На.

### Гидролиз БР

Условия проведения гидролиза <sup>2</sup>H-меченого БР определялись необходимостью предотвращения реакций изотопного (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) 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 М HCl или 4 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 110 °С, 24 ч) приводит к полному разрушению триптофана и частичному разрушению серина, треонина и некоторых других аминокислот в белке [17], которые для настоящего исследования не играют существенной роли. Модификация этого метода, заключающаяся в добавлении в реакционную среду фенола, тиогликолевой кислоты, β-меркаптоэтанола, позволяет сохранить до 80–85% триптофана [18]. Использование толуолсульфонокислоты с 0,2% 3-(2-аминоэтил)-индолом или 3 М меркаптоэтансульфонокислоты также эффективно для сохранения триптофана (до 93%) [19]. Однако для решения поставленной задачи вышеперечисленные методы непригодны, поскольку обладают существенным недостатком: в условиях кислотного гидролиза с высокой скоростью происходит изотопный (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) обмен ароматических протонов (дейтеронов) в молекулах триптофана, тирозина и гистидина, а также протонов при атоме С3 аспарагиновой и С4 глутаминовой кислот [20]. Поэтому даже проведение гидролиза в дейтерированных реагентах (6 М <sup>2</sup>HCl, 2 М <sup>2</sup>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) не позволяет получать реальные данные о включении дейтерия в белок.

При щелочном гидролизе белка (2 М Ba(OH)<sub>2</sub> или 4 М NaOH, 110 °С, 24 ч) реакций изотопного (<sup>1</sup>H–<sup>2</sup>H) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) явилось причиной выбора в качестве гидролизующего агента 2 М Ba(OH)<sub>2</sub>. Возможная *D,L*-рацемизация аминокислот при щелочном гидролизе не влияла на результат последующего масс-спектрометрического исследования уровня дейтерированности молекул ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот.

#### **Исследование уровня дейтерированности БР масс-спектрометрией ЭУ**

Для изучения включения ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот в молекулу БР использовали метод масс-спектрометрии ЭУ после модификации смеси аминокислот гидролизата БР в метиловые эфиры N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот. Чтобы получить воспроизводимый результат по уровню дейтерированности <sup>2</sup>H-меченого белка, сначала регистрировали полный скан масс-спектр ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот, полученных из гидролизата БР. Затем проводили разделение метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных ароматических аминокислот обращенно-фазовой ВЭЖХ и получали масс-спектры ЭУ для каждой выделенной индивидуальной [<sup>2</sup>H]аминокислоты. Уровень дейтерированности рассчитывали по разнице пиков молекулярных ионов [M]<sup>+</sup> производных дейтерированных и протонированных аминокислот.

Полный масс-спектр электронного удара ЭУ смеси метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, показанный на рисунке 3 (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 дансилхлоридом и диазометаном. Анализируемые [<sup>2</sup>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 [M]<sup>+</sup> 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 [<sup>2</sup>H]аминокислот проводили по наиболее распространенному пику молекулярного иона (M)<sup>+</sup> в каждом кластере с математически усредненной величиной [M]<sup>+</sup> (рисунок 3) – для <sup>2</sup>H-меченого производного фенилаланина пик молекулярного иона определялся [M]<sup>+</sup> при *m/z* 417, 14% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 412, 20% для немеченого производного (пики немеченых аминокислот не показаны)), [<sup>2</sup>H]тирозина – [M]<sup>+</sup> при *m/z* 429, 15% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 428, 13%), [<sup>2</sup>H]триптофана – [M]<sup>+</sup> при *m/z* 456, 11% (вместо [M]<sup>+</sup> при *m/z* 451, 17%). Уровень дейтерированности, соответствующий увеличению молекулярной массы составил для [<sup>2</sup>H]тирозина один (96 ат.% <sup>2</sup>H), [<sup>2</sup>H]фенилаланина – пять (90 ат.% <sup>2</sup>H) и [<sup>2</sup>H]триптофана – пять (98 ат.% <sup>2</sup>H) атомов дейтерия, что совпадает с данными по уровню дейтерированности исходных ароматических [<sup>2</sup>H]аминокислот – [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr, [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe и [2,4,5,6,7-

$^2\text{H}_5$ ]Trp, добавляемых в ростовую среду штамма продуцента. Полученные данные по уровню дейтерированности [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина, [ $^2\text{H}$ ]тирозина и [ $^2\text{H}$ ]триптофана позволяют сделать вывод о высокой селективности включения экзогенных [ $^2\text{H}$ ]ароматических аминокислот в молекулу БР: дейтерий детектировался во всех остатках [ $^2\text{H}$ ]ароматических аминокислот (таблица 3). Присутствие в масс-спектре ЭУ пиков  $[\text{M}]^+$  протонированных и полудейтерированных аналогов фенилаланина с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  413–418, тирозина с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  428–430 и триптофана с  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  453–457 с различными вкладами в уровни дейтерированности молекул, свидетельствует о сохранении в клетке небольшой доли минорных путей биосинтеза ароматических [ $^2\text{H}$ ]аминокислот *de novo*, приводящим к разбавлению дейтериевой метки (таблица 3).

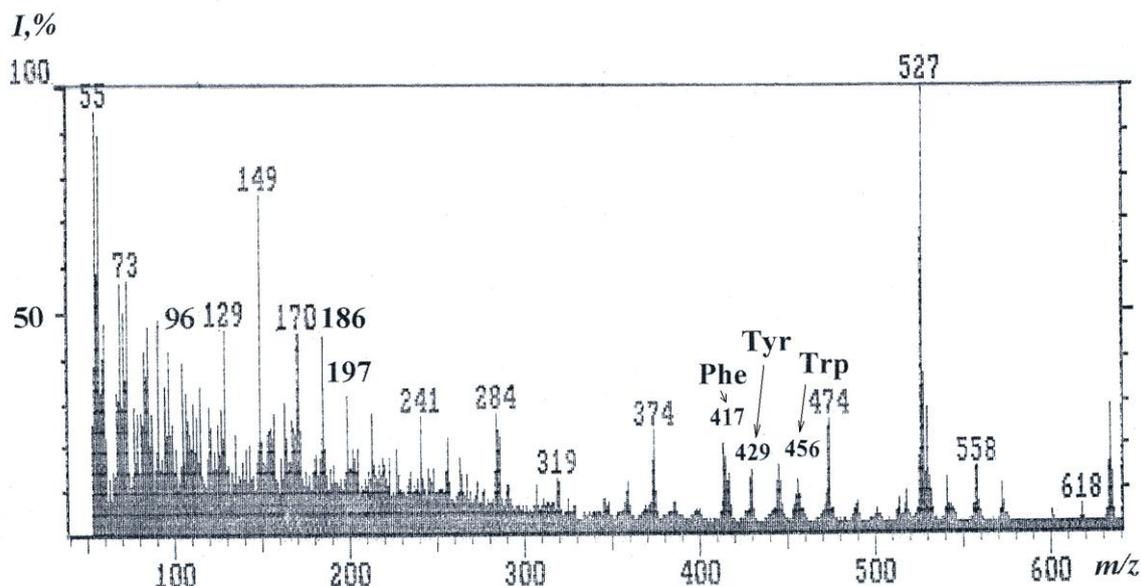


Рис. 3. Полный масс-спектр ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $^2\text{H}_5$  производных ароматических аминокислот, выделенных из гидролизата БР, полученного при выращивании *H. halobium ET 1001* в синтетической среде с  $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe}$ ,  $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr}$  и  $[2,4,5,6,7-^2\text{H}_5]\text{Trp}$ . Пики молекулярных ионов аминокислот соответствуют их производным,  $I$  – интенсивность пиков (%)

Таблица 3

**Величины пиков молекулярных ионов  $[\text{M}]^+$  в масс-спектре ЭУ метиловых эфиров N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe}$ , N-Dns- $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr}$  и N-Dns- $[2,4,5,6,7-^2\text{H}_5]\text{Trp}$  и уровни дейтерированности**

Соединение	Величина пика $[\text{M}]^+$	Интенсивность, %	Количество атомов дейтерия*	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода**
N-Dns- $[2,3,4,5,6-^2\text{H}_5]\text{Phe-Ome}$	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- $[3,5-^2\text{H}_2]\text{Tyr-Ome}$	428	12	–	–
	429	15	1	14
	430	5	2	29

N-Dns-[2,4,5,6,7- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]Trp-OMe	453	5	2	26
	454	6	3	38
	455	9	4	50
	456	11	5	64
	457	5	6	77

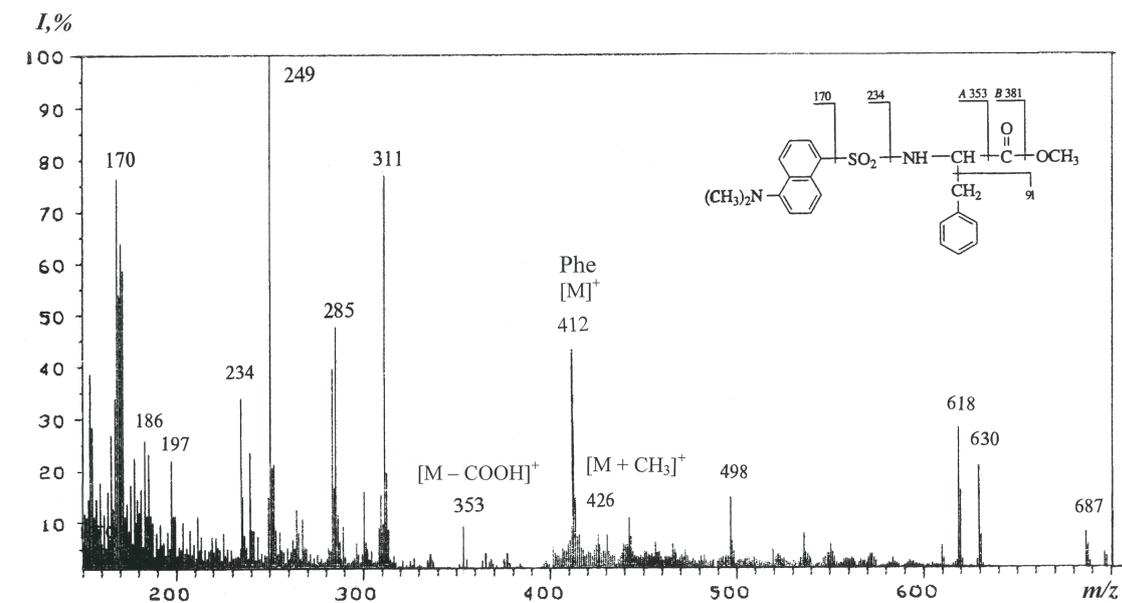
\* Прочерк означает отсутствие включения дейтерия

\*\* При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при COOH- и NH<sub>2</sub>-группах аминокислот не учитывались из-за лёгкости их диссоциации в H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O

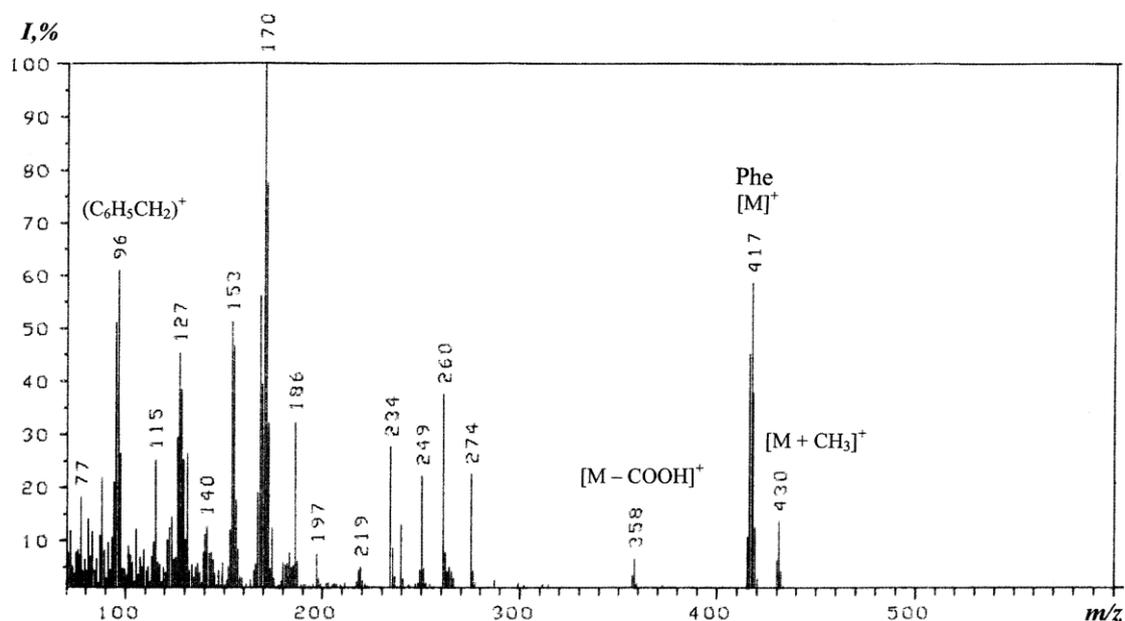
Согласно данным масс-спектрометрического анализа, пики молекулярных ионов [M]<sup>+</sup> метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных ароматических аминокислот обладали низкой интенсивностью и полиморфно расщеплялись, поэтому области их молекулярного обогащения были сильно уширены. Кроме этого, 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 [<sup>2</sup>H]аминокислот из белкового гидролизата.

Для решения поставленной задачи использовали ОФ ВЭЖХ на октадецилсилановом силикагеле Separon SGX C18, 7 мкм, эффективность которого подтверждалась разделением смеси метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот из других микробных объектов, как метилотрофные бактерии и микроводоросли [21–23]. Данные по хроматографическому разделению метиловых эфиров N-Dns-производных [<sup>2</sup>H]аминокислот из различных природных источников не отличаются от таковых для немеченых метиловых эфиров N-Dns-производных аминокислот, поскольку изотопное обогащение молекул практически не сказывается на хроматографических характеристиках. Метод адаптировали к условиям хроматографического разделения смеси метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот гидролизата БР, заключающийся в оптимизации соотношения элюентов, форме градиента и скорости элюирования с колонки. Кроме того, при использовании градиента существенно увеличивается максимальное количество пиков, способных разместиться на хроматограмме – пиковая емкость, что весьма немаловажно при разделении сложных многокомпонентных смесей, каковыми являются белковые гидролизаты. В этом случае каждый из компонентов смеси разделяется при наиболее оптимальном составе элюента, за счет чего достигается их полное и качественное разделение за гораздо меньшее время, чем при изократическом режиме.

Наилучшее разделение достигалось при градиентном элюировании метиловых эфиров N-Dns-[<sup>2</sup>H]производных аминокислот смесью растворителей (А) – CH<sub>3</sub>CN–CF<sub>3</sub>COOH (100 : 0,1–0,5 об.%) и (Б) – CH<sub>3</sub>CN (100 об.%) за счет постепенного повышения концентрации компонента Б в смеси от 10 до 100%. Пробы растворяли в 10 мл MeOH и наносили в количестве 50–100 мкл на колонку (250×10 мм) с октадецилсилановым силикагелем Separon SGX C18, 7 мкм. При этом удалось разделить триптофан и трудно разрешимую пару фенилаланин/тирозин.



a)



б)

Рис. 4. Масс-спектры ЭУ метилового эфира N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]Phe в различных экспериментальных условиях: а) – немеченый метиловый эфир N-Dns-Phe; б) – метиловый эфир N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]Phe, выделенный из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ (б)

Степени хроматографической чистоты выделенных из смеси белкового гидролизата БР метиловых эфиров N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина, N-Dns-[3,5- $^2\text{H}_2$ ]тирозина и N-Dns-[2,4,5,6,7- $^2\text{H}_5$ ]триптофана составили 89, 91 и 90% соответственно. Полученный результат подтвердил рисунок 4, б на котором приведен масс-спектр ЭУ метилового эфира N-Dns-[2,3,4,5,6- $^2\text{H}_5$ ]фенилаланина, выделенного из гидролизата БР методом ОФ ВЭЖХ (сканирование при  $m/z$  70–600, базовый пик  $m/z$  170, 100%) (масс-спектр приведен относительно немеченого метилового эфира N-Dns-фенилаланина (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 ( $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  417, 59% вместо  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  412, 44% для немеченого производного фенилаланина) и дополнительный пик обогащенного дейтерием бензильного  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -фрагмента молекулы [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина при  $m/z$  96, 61% (вместо  $m/z$  91, 55% в

контроле (не показан)) (рисунок 4, 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  $[M - COOCH_3]^+$  при  $m/z$  358, 7% ( $m/z$  353, 10%, контроль) является продуктом отщепления карбоксиметильной  $COOCH_3$ -группы из метилового эфира N-Dns- $[^2H]$ фенилаланина, а пик  $[M + CH_3]^+$  при  $m/z$  430, 15% ( $m/z$  426, 8%, контроль) – продуктом дополнительного метилирования по  $\alpha$ -аминогруппе  $[^2H]$ фенилаланина (рисунок 4, б). Согласно данным масс-спектрометрии ЭУ, разница между молекулярной массой “легкого” и “тяжелого” пиков  $[M]^+$  метилового эфира N-Dns-фенилаланина составляет пять единиц, что совпадает с первичными данными по уровню дейтерированности исходного  $[2,3,4,5,6-^2H_5]$ фенилаланина, добавляемого в среду выращивания. Масс-спектрометрические данные по уровням дейтерированности  $[3,5-^2H_2]$ тирозина и  $[2,4,5,6,7-^2H_5]$ триптофана также находятся в корреляции и подтверждены спектроскопией  $^1H$  ЯМР.

### Выводы

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой эффективности мечения БР дейтерием по остаткам ароматических аминокислот – Phe, Tug и Trp с выходом белка 8–10 мг на 1 г биомассы. Главным преимуществом метода является то, что выделенный БР сохраняет природную биологически активную конфигурацию в комплексе с 13-*транс*-ретиналом и способность к фотохимическим превращениям *in vitro*, что доказано электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na и регенерацией апомембран с 13-*транс*-ретиналом. Метод также применим к получению других аналогичных БР трансмембранных белков галобактерий – сенсородопсина и галородопсина. В дальнейшем планируется получать полностью дейтерированные образцы БР для реконструкции функционально активных систем трансмембранных белков в тяжелой воде с  $[^2H]$ 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.

### Благодарности

Работа осуществлялась при поддержке Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 12.

### Примечания:

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 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 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, № 2–7. P. 78–85.
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. In: Nanobiotechnology / Eds. Ch. Niemeyer, C. Mirkin. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 2004. 167 p.
9. Vought B.W., Birge R.R. (eds.) Molecular electronics and hybrid computers / in: Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering. NY: Wiley-Interscience. 1999. 490 p.

10. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швец В.И. Масс-спектрометрическая оценка уровня включения  $^2\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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 / in: 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  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  // Биотехнология. 1996. № 10. С. 24–40.
13. Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И. Микробный синтез дейтерий-меченного L-фенилаланина факультативной метилотрофной бактерией *Brevibacterium methylicum* на средах с различными концентрациями тяжелой воды // Биофармацевтический журнал. 2012. т. 4, № 1. С. 11–22.
14. Neugebauer D.C., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the purple membrane *in vivo* and *in vitro* // Journal Molecular Biology. 1978. V. 123. С. 247–257.
15. 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.
16. 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, № 6. P. 937–948.
17. Звонкова Е.Н., Зотчик Н.Ф., Филиппович Е.И., Митрофанова Т.К., Мягкова Г.И., Серебренникова Г.А. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия. 1970. 68 с.
18. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // Analytical Biochemistry. 1974. V. 60, № 1. P. 45–50.
19. Liu T.Y., Chang Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan // J. Biol Chem. 1971. V. 246, № 9. P. 2842–2848.
20. 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.
21. Егорова Т.А., Мосин О.В., Еремин С.В., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И.. Разделение аминокислот белковых гидролизатов природных объектов методом ВЭЖХ в виде карбобензоксипроизводных // Биотехнология. 1993. № 8. С. 21–25.
22. Мосин О.В., Игнатов И., Складнев Д.А., Швец В.И. Штамм грамположительных факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* – продуцент [ $^2\text{H}$ ]фенилаланина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 1(6). С. 58–67.
23. Мосин О.В., Игнатов И. Биологическое воздействие дейтерия на клетки прокариот и эукариот // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 2(7). С. 122–131.

## References

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin – like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. № 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. Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvec V.I.. Vkljuchenie dejterirovannyh aromaticeskikh aminokislot v molekulu bakteriorodopsina *Halobacterium halobium* // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 1999. V. 35, № 1. P. 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 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, № 2–7. P. 78–85.

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. In: *Nanobiotechnology* / Eds. Ch. Niemeyer, C. Mirkin. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 2004. 167 p.
9. Vought B.W., Birge R.R. (eds.) *Molecular electronics and hybrid computers* / in: *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*. NY: Wiley-Interscience. 1999. 490 p.
10. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvec V.I. Mass-spektrometričeskaja ocenka urovnja vključenija  $2N$  i  $13S$  v molekuly aminokislot bakterial'nyh ob"ektov // *Bioorganicheseskaja himija*. 1996. V. 22, № 10–11. S. 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 / in: *6th Intern. Conf. on Retinal proteins*. Leiden: Elsevier, 1994. p. 115.
12. Mosin O.V., Skladnev D.A., Egorova T.A., Shvec V.I. Metody poluchenija aminokislot i belkov, mečennyh stabil'nymi izotopami  $2N$ ,  $13S$ ,  $15N$ ,  $18O$  // *Biotehnologija*. 1996. № 10. S. 24–40.
13. Mosin O.V., Shvec V.I., Skladnev D.A., Ignatov I. Mikrobnyj sintez dejterij-mečennogo L-fenilalanina fakul'tativnoj metilotrofnj bakteriej *Brevibacterium mehylicum* na sredah s različnymi koncentracijami tjazheloj vody // *Biofarmaceutičeskij zhurnal*. 2012. V. 4, № 1. S. 11–22.
14. Neugebauer D.C., Zingsheim H.P., Oesterhelt D. Recrystallization of the purple membrane *in vivo* and *in vitro* // *Journal Molecular Biology*. 1978. V. 123. C. 247–257.
15. 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.
16. 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, № 6. P. 937–948.
17. Zvonkova E.N., Zotchik N.F., Filippovich E.I., Mitrofanova T.K., Mjagkova G.I., Serebrennikova G.A. *Himija biologičeski aktivnyh prirodnyh soedinenij*. M.: Himija. 1970. 68 s.
18. Penke B., Ferenczi R., Kovács K. A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins // *Analytical Biochemistry*. 1974. V. 60, № 1. P. 45–50.
19. Liu T.Y., Chang Y.H. Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan // *J. Biol Chem*. 1971. V. 246, № 9. P. 2842–2848.
20. Pshenichnikova A.B., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvec V.I. Metody poluchenija dejterirovannyh aminokislot // *Bioorganicheseskaja himija*. 1995. t. 21, № 3. S. 163–178.
21. Egorova T.A., Mosin O.V., Eremin S.V., Karnaukhova E.N., Zvonkova E.N., Shvec V.I. Razdelenie aminokislot belkovyh gidrolizatov prirodnyh ob"ektom metodom VJeZhH v vide karbobenzoksiproizvodnyh // *Biotehnologija*. 1993. № 8. S. 21–25.
22. Mosin O.V., Ignatov I., Skladnev D.A., Shvec V.I. Shtamm grampolozhitel'nyh fakul'tativnyh metilotrofnnyh bakterij *Brevibacterium methylicum* – producent  $[2H]$ fenilalanina // *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*. 2014. № 1(6). S. 58–67.
23. Mosin O.V., Ignatov I. Biologičeskoe vozdejstvie dejterija na kletki prokariot i jeukariot // *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*. 2014. № 2(7). S. 122–131.

УДК 537.86 + 577.37

**Биосинтетическое включение дейтерий-меченных ароматических аминокислот –  $[2,3,4,5,6-^2H_5]$ фенилаланина,  $[3,5-^2H_2]$ тирозина и  $[2,4,5,6,7-^2H_5]$ триптофана в молекулу трансмембранного белка бактериородопсина галобактерии *Halobacterium halobium ET 1001***

<sup>1</sup> Олег Викторович Мосин

<sup>2</sup> Игнат Игнатов

<sup>3</sup>Дмитрий Анатольевич Складнев

<sup>4</sup>Виталий Иванович Швец

<sup>1</sup> Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Российская Федерация

Старший научный сотрудник кафедры биотехнологии, канд. хим. наук

103316, Москва, ул. Талалихина, 33

E-mail: mosin-oleg@yandex.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр медицинской биофизики (РИЦ МБ), Болгария

Профессор, доктор наук Европейской академии естественных наук (ФРГ)

1111, София, ул. Н. Коперника, 32/6

E-mail: mbioph@dir.bg

<sup>3</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика, Российская Федерация

Профессор, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник ГосНИИГенетика

117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1.

E-mail: genetika@genetika.ru

<sup>4</sup> Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация

Академик РАН, доктор химических наук

117571, Москва, Вернадского просп., 86

E-mail: mitht@mitht.ru

**Аннотация.** Разработан метод микробиологического синтеза и выделения фотопреобразующего трансмембранного белка бактериородопсина (выход 8–10 мг), меченного дейтерием по остаткам функционально-важных аминокислот – [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe, [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr и [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Trp. Белок выделен из мембран экстремальной фотоорганотрофной галобактерии *Halobacterium halobium* ET 1001 лизисом клеток в дистиллированной воде, обработкой бактериальной биомассы ультразвуком, спиртовой экстракцией низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов, с последующей солюбилизацией конечного продукта в 0,5%-ном ДДС-Na и фракционированием метанолом. Гомогенность синтезируемого [<sup>2</sup>H]бактериородопсина и селективность включения дейтерия в молекулу исследованы комбинацией методов разделения и анализа белка, включая электрофорез в 12,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na, гель-проникающую хроматографию на сефадексе G-200, ОФ ВЭЖХ, масс-спектрометрию ЭУ метиловых эфиров N-5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

**Ключевые слова:** *Halobacterium halobium* ET 1001; [2,3,4,5,6-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Phe; [3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Tyr; [2,4,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Trp; [<sup>2</sup>H]бактериородопсин; биосинтез; масс-спектрометрия ЭУ; ОФ ВЭЖХ.