



УДК 577.112:541.65

Мст

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ^{19}F - И ^{14}C -ПРОИЗВОДНЫЕ
БАКТЕРИОРОДОПСИНАКурятов А. В., Овечкина Г. В., Аленьчева Т. Н.,
Минаева Л. П., Цетлин В. П.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

При выращивании галобактерий *Halobacterium halobium* (R_1M_1) на синтетической среде с добавками [^{14}C]аминокислот — фенилаланина, пролина, изолейцина, тирозина или метионина — получены производные бактериородопсина, меченные преимущественно по соответствующей аминокислоте. Биосинтетическим путем получены аналоги бактериородопсина, в которых остатки Trp, Tyr или Phe заменены на их фторпроизводные. Показано, что фторированные аналоги сохраняют основные спектральные свойства бактериородопсина и способность к светозависимому транспорту протонов. Установлено, что уменьшение pK_a остатков тирозина не вызывает гипсохромного сдвига максимума поглощения ретинилиденового хромофора.

Бактериородопсин выполняет роль светозависимого протонного насоса в клетках галобактерий *Halobacterium halobium* [1]. В настоящее время это один из наиболее хорошо охарактеризованных мембранных белков, однако для получения детальной информации о пространственной организации и механизме функционирования бактериородопсина необходимы дальнейшие исследования с помощью различных физико-химических методов. Применение такого мощного инструмента исследования структуры белков, как протонный ядерный магнитный резонанс, в случае бактериородопсина весьма затруднено, хотя и появляются сообщения о подобных работах [2]. Можно полагать, что обогащение отдельных аминокислотных остатков бактериородопсина изотопом ^{13}C или введение в них атомов ^{19}F позволит воспользоваться методами ^{13}C - или ^{19}F -ЯМР-спектроскопии. Кроме того, фторирование аминокислотных остатков является удобным способом модификации белка, направленной на выяснение их функциональной роли.

В настоящей работе с целью выбора оптимальных условий получения ^{13}C -замещенных аналогов бактериородопсина осуществлен его биосинтез на средах, содержащих различные ^{14}C -меченые аминокислоты. Получены аналоги бактериородопсина, содержащие остатки Trp (5F), Tyr (3F), Phe (3F) или Phe (4F), определены их спектральные характеристики и транспортная активность.

При биосинтезе бактериородопсина на среде неопределенного состава (пептон или дрожжевой экстракт) нельзя добиться селективности и полноты замещения определенных аминокислотных остатков. На таких средах возможно получение производного, в котором природный изотоп какого-либо атома замещен на другой изотоп во всех аминокислотных остатках. Так, в работе [3] были получены полностью дейтерированное, а также обогащенное ^{15}N производные бактериородопсина. Для получения производных бактериородопсина, замещенных лишь по одной аминокислоте, необходима синтетическая среда. Состав такой среды для выращивания *H. halobium* был предложен ранее [4]; описано также получение бактериородопсина, содержащего ^3H - или ^2H -меченые остатки фенилаланина или валина, а также биосинтез производного, содержащего изотоп ^{15}N в ϵ -аминогруппах остатков лизина [5, 6].

Мы проводили биосинтез на описанной синтетической среде [4], добавляя наряду с природной радиоактивную аминокислоту: [^{14}C]фенилаланин, [^{14}C]тирозин, [^{14}C]метионин, [^{14}C]пролин или [^{14}C]изолейцин. Можно

Радиоактивность [имп./((мин·нмоль белка)] компонентов пурпурной мембраны *H. halobium*, выращенных на среде с добавлением радиоактивной аминокислоты

Внесенная [¹⁴ C]аминокислота	Пурпурная мембрана	Ретиналь	Липиды	Белок	
				Суммарная	Остатки аминокислот, внесенных в виде ¹⁴ C-производных
Изолейцин	27 500	930	11 770	14 800	12 700
Метионин	9200	160	1500	7540	6980
Фенилаланин	17 400	—	160	17 240	14 950
Пролин	6350	—	120	6230	5670
Тирозин	8200	—	150	8050	6880

Таблица 2

Выращивание *H. halobium* на среде с фторсодержащими аминокислотами. Зависимость выхода белка (мг/л среды) и включения фтораминокислоты от времени ее внесения в среду *

Время внесения аминокислоты, ч	3-Фторфенилаланин		4-Фторфенилаланин		3-Фтортирозин		5-Фтортриптофан	
	выход	включение	выход	включение	выход	включение	выход	включение
0	0	—	0	—	0	—	—	—
24	16	54	15	53	20	35	17	95 (110)
32	14	55 (60)	15	56 (60)	10	40 (50)	—	—
48	0	—	0	—	0	—	—	—

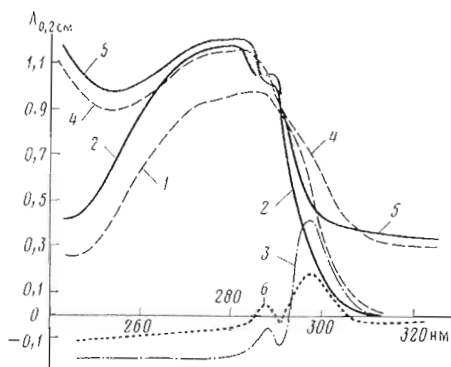
* Выход белка определяли спектрофотометрически, исходя из известного молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{270} 63\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [13]. Выход бактериородопсина, полученного в оптимальных условиях [4], составлял 45 мг/л среды. Включение представляет собой выраженное в процентах отношение количества фторпроизводной аминокислоты к суммарному количеству фторированной и природной аминокислот (данные аминокислотного анализа); в скобках приведены значения, полученные спектрофотометрически.

было ожидать, что эти аминокислоты будут слабо метаболизироваться в процессе биосинтеза и удастся добиться селективного включения меченых аминокислот в молекулу бактериородопсина. В работе [4] было показано, что синтез бактериородопсина начинается на 2-е сут и заканчивается к концу 5-х сут культивирования. В настоящей работе этот диапазон оказался шире: начало биосинтеза зарегистрировано через 24 ч, а конец — на 6–8-е сут.

Пурпурные мембраны, выделенные в соответствии с работой [7], делипидировали на сефадексе LH-60 в системе этанол — муравьиная кислота (7 : 3) [8] и после полного кислотного гидролиза белка определяли наличие радиоактивности в отдельных аминокислотах. Аминокислоты разделяли с помощью хроматографии на бумаге [9] или в виде дансильных производных ТСХ на силикагеле [10]. Радиоактивность преимущественно включалась в остатки тех аминокислот, которые в виде меченых производных вносили в среду (табл. 1). При культивировании в присутствии [¹⁴C]изолейцина значительная радиоактивность была найдена в липидах и ретинале, что свидетельствует об участии изолейцина в их биосинтезе. Можно предположить, что в молекуле ретиналя фрагмент изолейцина $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{}$ повторяется 4 раза; поскольку радиоактивность этого фрагмента, составляющая $\frac{5}{6}$ от радиоактивности изолейцина, включенного в белок, равна 700 имп./((мин·нмоль), или 28 000 имп/мин на 4 нмоль фрагмента, количество включившейся в ретиналь радиоактивности — 930 имп./((мин·нмоль) — позволяет сделать вывод, что биосинтез ретиналя на одну треть осуществляется из изолейцина.

¹⁴C-Производные бактериородопсина оказались полезными для обнаружения и идентификации пептидов, получаемых при различных его гидролизах в ходе структурно-функциональных работ [11]. Выращивание гало-бактерий в среде с [¹⁴C]изолейцином представляет собой достаточно простой путь получения радиоактивного ретиналя. Анализ включения радиоактивных аминокислот показывает, что для биосинтеза препаратов

Рис. 1. Спектры поглощения 1 мМ водных растворов 5-фтортриптофана (1) и триптофана (2) и их разностный спектр (3), а также суспензий пурпурных мембран ($5,11 \cdot 10^{-5}$ М белка), содержащих [Trp(F)] бактериородопсин (4) и бактериородопсин (5), и их разностный спектр (6)



бактериородопсина, пригодных для последующих ^{13}C -ЯМР-исследований, целесообразно использовать ^{13}C -меченые пролин, фенилаланин и тирозин. Так, нами был получен бактериородопсин, содержащий остатки [$1\text{-}^{13}\text{C}$]фенилаланина.

В литературе отсутствуют сведения о способности галобактерий *H. halobium* расти на средах с фторсодержащими аминокислотами. Согласно имеющимся данным для *E. coli* [12, 13] и *Lactobacillus casei* [14], при культивировании на синтетических средах с использованием вместо некоторых аминокислот их фторированных аналогов биосинтез белков протекает с меньшим выходом или полностью подавляется. Успеха удавалось достичь в том случае, когда посевной материал культивировали на среде, дефицитной по определенной аминокислоте, а ее фторированный аналог вносили в точно выбранный момент роста культуры. В составе синтезированных белков были обнаружены остатки не только фторированных, но и соответствующих природных аминокислот [12, 13]. С учетом этих данных нами был проведен поиск оптимальных условий культивирования *H. halobium* в присутствии фторсодержащих ароматических аминокислот.

Триптофан не является необходимой аминокислотой для роста культуры галобактерий, поэтому он не входит в состав синтетической среды. Учитывая динамику роста культуры [4], 5-фтортриптофан добавляли в начале экспоненциальной фазы, т. е. через 24–26 ч после внесения посевного материала. Дальнейшая задержка с внесением 5-фтортриптофана была нецелесообразна, так как к этому моменту уже начинался биосинтез бактериородопсина.

Отсутствие в синтетической среде тирозина или фенилаланина приводило к ингибированию роста галобактерий и биосинтеза бактериородопсина к концу 2-х или в начале 3-х сут культивирования *H. halobium*, причем добавление этих аминокислот через 48 ч после внесения посевного материала не предотвращало ингибирования роста культуры. Результаты исследования выхода соответствующих аналогов бактериородопсина и степени включения фторированных аминокислот в зависимости от времени внесения последних (табл. 2) свидетельствуют, что при получении [Phe(F)]бактериородопсина фтораминокислоту можно добавлять через 24–32 ч после начала культивирования. В случае [Tyr(F)]бактериородопсина увеличение времени инкубирования клеток в отсутствие тирозина с 24 до 32 ч сопряжено с уменьшением выхода белка в 2 раза и ростом включения фтортирозина с 35 до 40%, дальнейшее увеличение времени культивирования галобактерий в среде без тирозина приводит к сильному ингибированию биосинтеза бактериородопсина. В связи с этим для получения максимально обогащенных фтортирозином препаратов бактериородопсина эту аминокислоту необходимо вносить в строго определенное время — через 30–32 ч после начала роста культуры.

Во всех случаях максимальный выход фторированных производных бактериородопсина оказался в 2,5–4,5 раза меньше, чем нативного белка, полученного в оптимальных условиях (табл. 2). Согласно данным аминокислотного анализа, отношение Trp(5F)/Trp в [Trp(F)]бактериородопсине равно 20 : 1, т. е. произошло достаточно полное замещение остатков триптофана на его фторпроизводное. В остальных случаях включение мет-

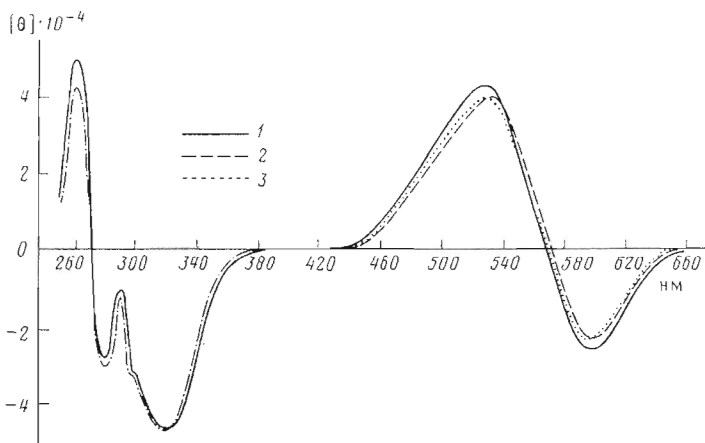


Рис. 2. Спектры КД нативного бактериородопсина (1), [Trp(F)]- и [Tyr(F)]бактериородопсина (2), [Phe(3F)]- и [Phe(4F)]бактериородопсина (3)

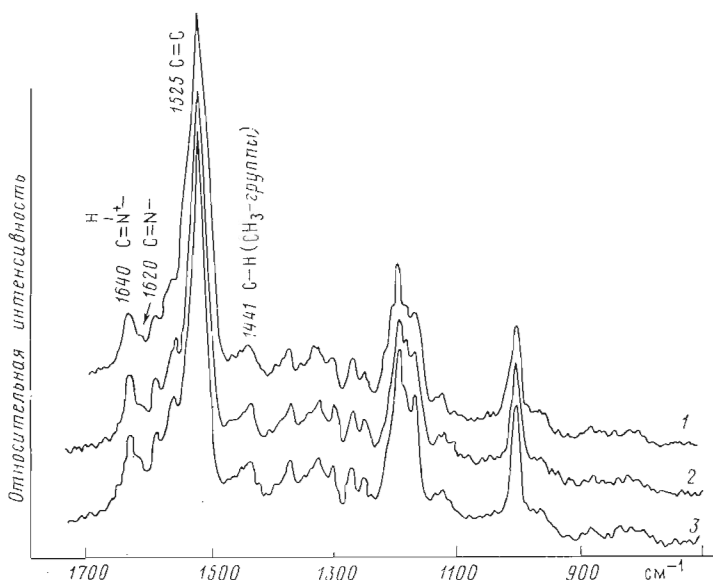


Рис. 3. Лазерные спектры КР нативного бактериородопсина (1) и [Tyr(F)]бактериородопсина при pH 6,5 (2) и 9,5 (3)

ки прошло хуже: отношение количеств фторированной и природной аминокислот близко к 1 : 1 в случае фенилаланина и к 2 : 3 в случае тирозина (см. табл. 2).

Степень включения фторированных аминокислот оценивали также по амплитуде полосы в дифференциальном спектре фторированного производного и нативного белка, взятых в равных концентрациях (рис. 1); при расчетах исходили из предположения, что любая ароматическая аминокислота в белке имеет такой же молярный коэффициент поглощения, как и в водном растворе. Так, разность молярных коэффициентов поглощения триптофана и 5-фтортриптофана при 297 нм составляет $2060 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Используя эту величину, можно определить, что в молекуле [Trp(F)]-бактериородопсина присутствует 8–9 остатков 5-фтортриптофана (в нативном бактериородопсине — 8 остатков Trp). Спектральная оценка содержания фтораминаокислот во всех полученных производных бактериородопсина, хотя и дает несколько завышенные результаты, достаточно хорошо согласуется с результатами аминокислотного анализа. Дополнительное доказательство включения атомов фтора в молекулу [Trp(F)]бактериородопсина получено с помощью спектроскопии ^{19}F -ЯМР (470,5 МГц):

спектр, снятый в смеси $C^2H_3OH-CHCl_3$ (1 : 1), содержащей 0,1 М $LiClO_4$, состоит из восьми сигналов, что соответствует числу остатков триптофана в молекуле бактериородопсина.

Максимумы полос поглощения адаптированных к свету форм $[Trp(F)]$ бактериородопсина и $[Tyr(F)]$ бактериородопсина расположены при 575 нм, т. е. сдвинуты на 5 нм в длинноволновую область относительно максимума поглощения нативного бактериородопсина. Это говорит о возможном участии остатков триптофана и тирозина в формировании окружения альдимида ретиналя. Спектры КД фторпроизводных бактериородопсина практически не отличаются друг от друга и близки к спектру нативного белка (рис. 2). Данные спектрофотометрического титрования $[Tyr(F)]$ бактериородопсина указывают на присутствие в молекуле белка трех остатков фтортирозина с pK_a 8,9. Можно полагать, что это остатки фтортирозина в положениях 26, 64 и 131 или 133, т. е. в тех положениях, которые в нативном бактериородопсине занимают остатки тирозина, доступные для химической модификации [16, 17]. В отличие от нативного бактериородопсина, в котором остаток Tyr^{26} значительно менее основен (pK_a 10,5), чем остальные остатки тирозина [17, 18], в $[Tyr(F)]$ бактериородопсине не обнаружено какого-либо остатка фтортирозина, который имел бы более низкое значение pK_a , чем другие остатки. Лазерные спектры КР $[Tyr(F)]$ бактериородопсина, снятые при pH 6,5 и 9,5, не отличаются друг от друга и совпадают со спектром нативного бактериородопсина (рис. 3). Эти данные говорят о том, что титрование остатка (или остатков) тирозина если и влияет на спектральные свойства хромофора, то лишь в очень слабой степени. В целом спектральные данные свидетельствуют о сохранении нативной структуры хромофорного центра бактериородопсина в его фторпроизводных.

В то же время, несмотря на практическое тождество параметров флуоресценции 5-фтортриптофана и триптофана (при равенстве квантовых выходов максимумы полос в спектре испускания отличаются лишь на 1 нм), параметры собственной флуоресценции $[Trp(F)]$ бактериородопсина ($\lambda_{эмиссии}$ 322 нм, квантовый выход 0,015) отличаются от параметров нативного бактериородопсина ($\lambda_{эмиссии}$ 315 нм, квантовый выход 0,01). Это может указывать на менее плотную упаковку полипептидной цепи фторированного аналога бактериородопсина в мембране по сравнению с нативным белком, а также на то, что остатки фтортриптофана в нем более экспонированы в водную фазу, поскольку аналогичные, но более выраженные изменения флуоресценции наблюдаются при переходе от бактериородопсина к бактериоопсину [18].

Сравнение спектральных характеристик фторсодержащих аналогов бактериородопсина показывает, что введение атомов фтора не приводит к существенным нарушениям структуры хромофорного центра. Поэтому замещение остатков ароматических аминокислот на их фторпроизводные можно рассматривать как чрезвычайно мягкий метод модификации бактериородопсина.

В свете полученных результатов интересно проанализировать имеющиеся в литературе данные о роли остатков тирозина в организации хромофорного центра бактериородопсина. По мнению ряда авторов, гипсохромный сдвиг максимума полосы поглощения альдимида ретиналя, наблюдаемый при различных химических модификациях остатков тирозина в бактериородопсине, свидетельствует о присутствии тирозина в хромофорном центре [16, 19, 20].

Например, нитрование остатка Tyr^{26} приводит к сдвигу максимума полосы поглощения хромофора от 570 к 530 нм [17]. Авторы полагают, что этот сдвиг обусловлен уменьшением pK остатка Tyr^{26} , образующего водородную связь с альдиминной группой (см. «Обсуждение» в [16]). Полученные нами данные позволяют предложить иную интерпретацию такого результата. Действительно, степень включения фтортирозина в биосинтетический аналог бактериородопсина составляет ~40%. На основании имеющихся в литературе данных о равномерном включении фторааминокислот в полипептидную цепь белков [12, 13] можно заключить, что сте-

Электрогенная активность фторпроизводных бактериородопсина (нэкв. H⁺/мг белка) в липосомах из фосфатидилхолина при pH 6,0 и 9,0

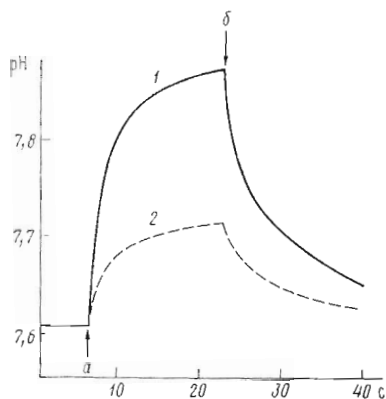
Производное бактериородопсина (BRh)	pH 6,0	pH 9,0
Нативный BRh	130±20	20±5
[Trp(5F)]BRh	60±10	—
[Trp(3F)]BRh	50±10	10±3
[Phe(3F)]BRh	50±10	10±3
[Phe(4F)]BRh	50±10	—

пень модификации любого остатка тирозина, в том числе и остатка Tyr²⁶, должна быть близка к 40%. Фторирование остатка тирозина снижает его pK_a на 2, а если бы образование коротковолновой формы было сопряжено только с уменьшением основности остатка тирозина, ее легко можно было бы обнаружить спектрально. Однако, как было отмечено выше, [Tyr(F)]бактериородопсин имеет максимум поглощения при 575 нм, и положение этого максимума практически не меняется при увеличении pH от 6 до 9. Очевидно, описанное в работе [17] нитрование остатка тирозина вызывает опосредованные перестройки в хромофорном центре, которые отсутствуют при фторировании.

В работе [19] было получено иодированное производное бактериородопсина (степень модификации меньше 30%), которое имеет λ_{max} 550 нм. Судя по данным резонансной спектроскопии КР, такая модификация не приводит к существенному изменению окружения альдимида ретиналя. Обнаружено, что на скорость фотоиндуцированного превращения полученного производного в форму *M* 412 влияет группа с pK_a 8,2, т. е. скорее всего моноиодтирозин. В случае же нативного бактериородопсина этот процесс контролирует группа с pK_a 10,2±0,3. На скорость превращения полученного нами препарата [Tyr(F)]бактериородопсина, в котором содержатся как остатки тирозина, так и фтортирозина, в форму *M* 412 оказывали влияние группы с pK_a 8,6 и 10,2. Очевидно, в бактериородопсине имеется остаток тирозина, ионизация оксигруппы которого играет важную роль в депротонировании альдимида, однако, на наш взгляд, имеющиеся в литературе данные нельзя рассматривать как доказательство непосредственного контакта этого остатка с хромофором.

Проверка способности фторсодержащих производных бактериородопсина транспортировать протоны осуществлена путем их встраивания в липосомы, приготовленные как в работе [21], и последующего измерения изменений pH среды, вызываемых освещением ($\lambda > 530$ нм) (рис. 4). Из табл. 3 видно, что все фторпроизводные имеют приблизительно одинаковую электрогенную активность (50–60 нэкв. H⁺/мг белка), которая, однако, в 2–3 раза меньше активности нативного бактериородопсина. Наблюдаемое в случае [Tyr(F)]бактериородопсина снижение эффективности протонного транспорта в 4–5 раз при увеличении pH от 6 до 9, по-видимому, не связано с ионизацией фенольной группы остатка (остатков) фтортирозина, поскольку аналогичное уменьшение эффективности транспорта в этом диапазоне pH характерно как для нативного бактериородопсина, так и для [Phe(3F)]бактериородопсина. Вероятно, снижение электрогенной активности фторпроизводных обусловлено небольшими нарушениями пространственной упаковки бактериородопсина при включении в молекулу белка фторсодержащих аминокислот. Полученные данные не позволяют сделать однозначного вывода о роли остатков тирозина в транспорте протонов, однако они свидетельствуют о том, что для эффективного транспорта существенна организация всей молекулы в целом. Вероятно, небольшие нарушения пространственной упаковки полипептидной цепи при фторировании даже таких аминокислот, как фенилаланин, участие которых в цепи переноса протонов представляется маловероятным, оказывают влияние на перенос протона через мембрану.

Рис. 4. Фотоиндуцированные изменения pH в суспензии липосом, содержащих бактериородопсин (1) и [Trp(F)]бактериородопсин (2). Для освещения использована лампа КГМ-150/24, снабженная фокусирующей системой, тепловым фильтром (1 см 5% раствора CuSO_4) и светофильтром ЖС-18. Стрелками указаны моменты включения (а) и выключения (б) света



Экспериментальная часть

H. halobium (штамм R₁M₁) выращивали в соответствии с методикой, описанной в работе [4]. Приводим состав синтетической среды с указанием концентраций компонентов в г/л. L-Аминокислоты и нуклеотиды (Reanal, ВНР): аланин — 0,215, аргинин — 0,4, цистин — 0,05, глутаминовая кислота — 1,30, глицин — 0,06, изолейцин — 0,22, лейцин — 0,4, лизин — 0,425, метионин — 0,185, фенилаланин — 0,13, пролин — 0,075, серин — 0,305, треонин — 0,25, тирозин — 0,2, валин — 0,5, адениловая кислота — 0,1, урициловая кислота — 0,1, глицерин — 1; соли: NaCl — 250, MgSO₄·7H₂O — 20, KCl — 2, NH₄Cl — 0,5, KNO₃ — 0,1, K₂HPO₄ — 0,05, KH₂PO₄·3H₂O — 0,064, цитрат натрия — 0,5, MnSO₄·7H₂O — 3·10⁻⁴, CaCl₂·6H₂O — 6,5·10⁻³, ZnSO₄·7H₂O — 4·10⁻⁵, FeSO₄·7H₂O — 5·10⁻⁴, CuSO₄·5H₂O — 5·10⁻⁵. Для приготовления растворов использовали соли марки х.ч. и ч.д.а. pH среды доводили до 6,5 раствором NaOH. Культуру выращивали в 1 л среды в колбах объемом 4 л, куда вносили 100 мл посевного материала. 5-Фтор-DL-триптофан (ICN Pharmaceuticals, США) добавляли в количестве 55 мг/л; 3-фтор-DL-фенилаланин (Koch-Light, Англия), 4-фтор-DL-фенилаланин (Fluka, Швейцария), [1-¹³C]-DL-фенилаланин (Stohler Isotope Chem., США) и 3-фтор-DL-тирозин, любезно предоставленный Ю. Б. Алаховым (Институт белка, Пушкино), добавляли в 2 раза больше, чем необходимо по методике, в среду, дефицитную по соответствующей аминокислоте. ¹⁴C-Меченые L-аминокислоты (Amersham, Англия) добавляли в среду в следующих количествах (мг): изолейцин (345 Ки/моль) — 0,38, метионин (285 Ки/моль) — 0,39, фенилаланин (59 Ки/моль) — 1,4, пролин (285 Ки/моль) — 0,1, тирозин (459 Ки/моль) — 0,2.

Выделение пурпурных мембран после 6 сут инкубации проводили обычным способом [7], но использование штамма R₁M₁ позволило обойтись без центрифугирования в сахарозном градиенте и ограничиться промыванием водой. Для определения содержания остатков фтортриптофана в препарате [Trp(F)]бактериородопсина кислотный гидролиз последнего проводили в метансульфоновой кислоте (Merck, ФРГ) 24 ч при 106° С, в остальных случаях использовали 6 н. HCl. Аминокислотные анализы фторпроизводных бактериородопсина выполнены И. Е. Федуловой (ИБХ им. М. М. Шемякина, Москва).

Липосомы готовили из L-α-фосфатидилхолина (тип III S, Sigma, США), как в работе [21]. Раствор липида в хлороформе упаривали в токе азота, остаток растворяли в эфире и снова упаривали. Липид высушивали в вакууме не менее 15 ч при давлении не выше 0,1 мм рт. ст., затем суспендировали в 0,15 М KCl (конечная концентрация липида 20 мг/мл) и озвучивали на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т при 44 кГц в атмосфере азота при 4° С до просветления раствора (~1 ч). Полученные липосомы центрифугировали 30 мин при 16 000 об/мин на центрифуге К-24 (ГДР), к супернатанту добавляли суспензию пурпурных мембран (белок — липид 1 : 20, по весу), смесь озвучивали 15 мин при 80% мощности диспергатора и центрифугировали, как описано выше.

В работе использовали спектрофотометр Specord UV VIS (Carl Zeiss, ГДР), спектрофотофлуориметр SPF-1000 Cs (Aminco, США), дихрограф Dichrographe III CNRS (Roussel-Jouan, Франция), ЯМР-спектрометр WM 500 (Bruker, ФРГ). Спектры комбинационного рассеяния снимали на раман-спектрометре (Jobin Ivon, Франция), снабженном аргоновым лазером мощностью 40 мВт, в полосе возбуждения 514,5 нм (Spectra Physics, модель 164-03, США). Измерение рН проводили с помощью рН-метра 701 А (Orion Research, США). Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляторе Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике Inter-technique-SL 30 (Франция).

Авторы выражают благодарность Н. И. Хорошиловой и И. Н. Тележинской за разделение дансильных производных аминокислот, И. Р. Набиеву и А. С. Арсеньеву за съемку спектров КР и ¹⁹F-ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stoeckenius W.* Acc. Chem. Research, 1980, v. 13, № 10, p. 337–344.
2. *Huang K.-S., Bayley H., Liao M.-J., London E., Khorana H. G.* J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 8, p. 3802–3809.
3. *Lewis A., Marcus M. A., Ehrenberg B., Crespi H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 10, p. 4642–4646.
4. *Gochmauer M. B., Kushner D. J.* Can. J. Microbiol., 1969, v. 15, № 10, p. 1157–1165.
5. *Engelman D. M., Zaccai G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 10, p. 5894–5898.
6. *Argade P. V., Rothschild K. J., Kawamoto A. H., Herzfeld J., Herlihy W. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 3, p. 1643–1646.
7. *Oesterheld D., Stoerkenius W.* Meth. Enzymol., 1974, v. 31, p. 667–678.
8. *Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Biemann K., Khorana H. G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 1, p. 227–231.
9. *Abbasi A., Ali R., Zaidi Z. H. J.* Biochem. and Biophys. Methods, 1980, v. 3, № 5, p. 311–313.
10. *Gray W. R.* Meth. Enzymol., 1967, v. 11, p. 139–147.
11. *Цеглин В. И., Запис В. И., Алдашев А. А., Курятов А. В., Овечкина Г. В., Шныров В. Л.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1589–1605.
12. *Pratt E. A., Ho C.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 13, p. 3035–3040.
13. *Lu P., Jarema M., Mosser K., Daniel W. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 10, p. 3471–3475.
14. *Kimber B. J., Griffiths D. V., Birdsall B., King R. W., Scudder P., Feeney J., Roberts G. C. K., Burgen A. S. V.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 15, p. 3492–3500.
15. *Oesterheld D., Hess B.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, № 2, p. 316–326.
16. *Lemke H.-D., Bergmeyer J., Straub J., Oesterheld D. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9384–9388.
17. *Lemke H.-D., Oesterheld D.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 3, p. 595–604.
18. *Алдашев А. А., Ефремов Е. С.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 11–25.
19. *Gogel G., Lewis A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 103, № 1, p. 175–181.
20. *Katsura T., Lam E., Packer L., Seltzer S.* Biochem. Internat., 1982, v. 5, № 3, p. 445–456.
21. *Racker E.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 55, № 1, p. 224–230.

Поступила в редакцию
14.IX.1983

BIOSYNTHETIC ¹⁹F- AND ¹⁴C-DERIVATIVES OF BACTERIORHODOPSIN

KURYATOV A. B., OVECHKINA G. V., ALYONYCHEVA T. N.,
MINAEVA L. P., TSETLIN V. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Bacteriorhodopsin derivatives labeled predominantly at the respective amino acid residues have been obtained by growing halobacteria *Halobacterium halobium* (strain R₁M₁) on a synthetic medium supplemented with [¹⁴C]amino acids — phenylalanine, proline, isoleucine, tyrosine or methionine. Bacteriorhodopsin analogues having tryptophan, tyrosine or phenylalanine residues substituted for their fluoro-derivatives have been also prepared biosynthetically. Fluorine-containing bacteriorhodopsin analogues are shown to essentially preserve spectral properties of the native chromoprotein and its capacity for a photoinduced proton transport. A decrease in pK_a of tyrosine residues due to their fluorination is shown to entail no blue shift of the retinylidene chromophore absorption maximum.