



УДК 547.963.02:543.422.25:577.322.523

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ С, Е И G БАКТЕРИООПСИНА ПО ДАННЫМ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ $^1\text{H}$ -ЯМР

© 1995 г. И. В. Масленников\*, Э. В. Бочаров, А. С. Арсеньев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 28.12.94 г.

По данным двумерной спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР рассчитана пространственная структура синтетических пептидов, аналогов трансмембранных сегментов С (остатки 67 - 106), Е (128 - 162) и G (190 - 233) бактериоопсина *Halobacterium halobium*, солюбилизованных в смеси метанол-хлороформ (1 : 1) с 0.1 М LiClO<sub>4</sub>. Сегмент С образует правую  $\alpha$ -спираль на участке Pro77 - Val101. Остаток Pro91 в середине  $\alpha$ -спирали индуцирует ее "излом" на 25°. Сегмент Е образует правую  $\alpha$ -спираль на участке Val136 - Ser158. Сегмент G имеет  $\alpha$ -спиральный участок, начинающийся с СО-группы Ile198 и заканчивающийся N<sup>α</sup>H-группой Arg227. Величины торсионных углов боковых цепей  $\chi^1$  однозначно определены для большинства аминокислотных остатков  $\alpha$ -спиральных участков. Конформации боковых цепей некоторых аминокислотных остатков трансмембранных сегментов бактериоопсина в растворе отличаются от определенных ранее по данным электронной микроскопии. Уточнены конформации участков, терминирующих  $\alpha$ -спирали сегментов С и Е.

**Ключевые слова:** бактериородопсин; белки, пептиды, ЯМР; структуры – вторичная, пространственная.

Бактериородопсин (БР) – основной белок пурпурных мембран *Halobacterium halobium*. В его состав входит 248 аминокислотных остатков и ретиналь, связанный через шиффово основание с  $\epsilon$ -аминогруппой Lys216 [1]. Этот сравнительно небольшой (26 кДа) белок функционирует как светозависимый протонный насос, преобразующий энергию солнечного света в хемиосмотический потенциал [2 - 4].

Изучение механизма функционирования БР взаимосвязано с установлением его пространственной организации. В настоящее время наиболее полная модель пространственной структуры БР получена по данным электронной криомикроскопии (ЭКМ) [5]. Достигнутое разрешение (3.5 Å в плоскости мембраны и 10 Å в перпендикулярной плоскости) позволило соотнести аминокислотную последовательность БР со схемой укладки полипептидной цепи в пространстве и

определить границы  $\alpha$ -спиральных участков трансмембранных сегментов. Однако разрешение ЭКМ недостаточно для выяснения тонких деталей пространственного строения БР (точные границы  $\alpha$ -спиральных участков, конформации боковых цепей аминокислотных остатков, взаимодействие между спиральными участками и т.д.). Остается также под вопросом соответствие полученной Хендерсоном с соавт. [5] структуры реальному состоянию БР в мембране.

Ранее было показано [6], что солюбилизованный в смеси хлороформ-метанол БР сохраняет вторичную структуру, соответствующую нативному белку, и обладает специфической третичной структурой. Индивидуальные фрагменты БР, выделенные после расщепления полипептидной цепи, также сохраняют в этой смеси органических растворителей конформацию, характерную для фрагментов интактной молекулы [7 - 10]. На основании этих наблюдений предложена схема "модульной сборки" пространственной структуры мембранных белков по данным спектроскопии ЯМР [6].

К настоящему времени проведен анализ данных ЯМР и рассчитаны пространственные структуры протеолитических фрагментов BR2 (остатки 163 - 231, соответствующие трансмембранным спиральям F и G) [11] и C2 (остатки 1 - 71,

Сокращения: БР – бактериородопсин; БО – бактериоопсин; Nle – норлейцин; sC, сегмент С – [Nle<sup>68</sup>]БО-(67 - 106)-полипептид; sE, сегмент Е – [Nle<sup>145</sup>]БО-(128 - 162)-полипептид; sG, сегмент G – [Nle<sup>209</sup>]БО-(190 - 233)-полипептид; ЭКМ – электронная криомикроскопия; F, F<sub>яэо</sub> – штрафная функция, зависящая от разности экспериментальных и теоретически рассчитанных из расстояний между протонами и величин времени релаксации значений ЯЭО.

\* Автор для переписки.

спирали А и В) [8, 9], фрагмента А (остатки 1 - 36) [10], синтетического аналога трансмембранного сегмента В (остатки 34 - 65) [12, 13], солюбилизованного в смеси хлороформ-метанол, а также фрагмента А (1 - 36) [10] и синтетического аналога сегмента В [14], встроенных в мицеллы додецилсульфата натрия. По данным спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР охарактеризованы конформации трансмембранных сегментов С, Е, G [15] и D [16], солюбилизованных в смеси хлороформ-метанол.

В настоящей работе на основе интегральных интенсивностей кросс-пиков в двумерных спектрах ЯЭО, полученных ранее [15], проведен расчет пространственной структуры трансмембранных сегментов sC (остатки 67 - 106), sE (128 - 162) и sG (190<sup>1</sup> - 233) бактериоопсина, солюбилизованного в смеси хлороформ-метанол (1 : 1) с 0.1 M LiClO<sub>4</sub>. Проведен сравнительный анализ определенных по данным спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР структур трансмембранных сегментов БР в различных средах, моделирующих мембранное окружение (смесь хлороформ-метанол, мицеллы SDS) [7 - 16], с ЭКМ-структурой БР [5].

*Реконструкция пространственной структуры трансмембранных фрагментов бактериоопсина*, проведенная после анализа вторичной структуры пептидов [15], включала в себя следующие основные этапы.

*Анализ локальной структуры.* Методика такого анализа по данным спектроскопии ЯМР с использованием программы CONFORNMR была отработана ранее [17, 18] и применительно к трансмембранному сегменту В бактериоопсина подробно описана в работе [13]. Времена корреляции движения межпротонных векторов ( $\tau_c$ ) были определены для 9 остатков молекулы sC (диапазон значений 3 - 6 нс), 8 остатков sE (2 - 6 нс) и 12 остатков sG (5 - 7 нс), у которых зависимость штрафной функции ЯЭО от  $\tau_c$  ( $F(\tau_c)$ ) имеет выраженный минимум в указанных интервалах. В дальнейших расчетах время корреляции для sC и sE принято равным 4 нс, а для sG - 6 нс. Для многих пептидных единиц исследованных молекул минимум зависимостей  $F(\tau_c)$  оказался плохо выраженным из-за недостаточного числа измеренных объемов внутриостаточных кросс-пиков ЯЭО или существенной погрешности их измерения.

Ограничения на торсионные углы основной цепи  $\phi$  и  $\psi$ , необходимые для конструирования стартовых конформаций молекул, находили исходя из зависимостей штрафных функций  $F_{\text{ЯЭО}}(\phi, \psi)$  (конформационные карты), используя полученное время  $\tau_c$ . Результаты анализа локальной структуры показали, что конформации основной цепи сегментов БО характеризуются определенными диапазонами значений торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$ , соответствующими низкоэнергетическим областям R, В или Q конформационной карты. Для

всех остатков sC начиная от Trp80 до Val101, sE от Arg134 до Phe156 и sG от Val199 до Arg227 определились области R или Q, что согласуется со сделанными ранее выводами о наличии здесь  $\alpha$ -спиральных участков [15]. Для остатков глицина, а также Thr67, Leu94 (sC), Ser162 (sE) и Ile191 (sG) из-за недостатка экспериментальных данных не удалось определить диапазоны углов  $\phi$  и  $\psi$ . В таких случаях рассматривали весь диапазон стерически разрешенных значений торсионных углов основной цепи, определенных путем анализа локальной структуры sC, sE и sG, приведено в табл. 1.

*Расчет пространственной структуры трансмембранных сегментов бактериоопсина* проводился с помощью программы DIANA [19]. В качестве входных данных для предварительного расчета использовали ограничения сверху на межпротонные расстояния, оцененные по объемам кросс-пиков в спектре NOESY с помощью калибровки " $1/r^6$ " [11], и ограничения на торсионные углы, найденные при анализе локальной структуры. Полученные в результате наборы из 100 структур для каждого сегмента использовались для определения системы водородных связей и в качестве начальных структур для расчета ограничений на межпротонные расстояния по программе анализа матрицы релаксации MARDIGRAS [20].

Ограничения сверху на межатомные расстояния C=O...HN (22 пм) и C=O...N (32 пм) водородных связей вводились для медленно обменивающихся амидных протонов в тех случаях, если соответствующие им расстояния CO...HN  $\leq$  30 пм были обнаружены больше чем в 50 структурах из 100, полученных в результате предварительного расчета.

После расчета по программе DIANA с учетом ограничений на водородные связи и более точных ограничений сверху и снизу, определенных с использованием программы MARDIGRAS, получены наборы из 20 структур для sC, sE и sG, которые хорошо удовлетворяют экспериментальным данным. Количество использованных экспериментальных данных (ограничения на расстояния и углы) и оценка результатов расчета структур с помощью дистанционного алгоритма приведены в табл. 1.

*Систематический поиск конформаций боковых цепей* и оценка возможности реализации ротамеров боковой цепи для каждого остатка проводились на участках с хорошо определенным ходом полипептидной цепи. При этом в качестве стартовой использовали одну из структур сегмента, полученных на предыдущем этапе с помощью программы DIANA. Процедура систематического поиска конформации боковых цепей с использованием программы CONFORNMR подробно описана в работе [13], а полученные для молекул sC, sE и sG результаты приведены в табл. 2 - 4. На данном этапе были установлены

Таблица 1. Экспериментальные данные, результаты расчета и анализ полученных наборов пространственных структур для полипептидов sC, sE и sG бактериоопсина

Параметр		sC (67 - 106)	sE (128 - 162)	sG (190 - 233)	
Количество ограничений для программы DIANA	на расстояния по ЯЭО*	460	376	408	
	на водородные связи	48	48	50	
	на углы $\phi$ и $\psi^{2*}$	68	66	74	
Результаты расчета по программе DIANA	Время корреляции <sup>2*</sup> , нс	4	4	6	
	штрафная функция, Å <sup>2</sup>	1.9	1.3	0.9	
	сумма нарушений ограничений	верхних, нм	0.48	0.28	0.18
		$vdw^{3*}$ , нм	0.16	0.09	0.08
		углов, град	12.5	11.0	6.0
	α-спиральный участок, остатки		78 - 101	135 - 158	198 - 227
структурированный участок, остатки		76 - 101	131 - 158	198 - 227	
Однозначно определена конформация боковой цепи	для числа остатков	9	13	19	
	%	45	65	73	
Конформационная энергия <sup>4*</sup> , ккал/моль		-140	-128	-176	
Среднее для набора RMSD координат на структурированных участках	для тяжелых атомов, ±2 пм	36	27	20	
	для всех атомов, ±4 пм	105	101	90	

\* Получены по программе MARDIGRAS [20] (см. текст).

<sup>2\*</sup> Получены по результатам анализа локальной структуры (см. текст).

<sup>3\*</sup> Радиус Ван-дер-Ваальса.

<sup>4\*</sup> Рассчитана по потенциалам CHARMM [21] (см. текст).

Таблица 2. Значения штрафной функции  $F$  и относительной энергии  $\Delta E$  для ротамеров боковых цепей сегмента С бактериоопсина по результатам энергетической минимизации и перебора конформаций боковых цепей по программе CONFORNMR

Остаток	$F$ , Å			$\Delta E$ , ккал/моль			Возможные ротамеры
	$g^+$	$g^-$	$t$	$g^+$	$g^-$	$t$	
Gln75	0.00	0.09	0.00	3.8	5.0	0.0	$g^+, t$
Asn76	0.01	0.17	0.00	0.8	0.1	0.8	$g^+, t$
His78	0.00	0.29	0.30	0.0	23.6	15.6	$g^+$
Tyr79	0.61	0.84	0.00	5.1	19.1	0.0	$t$
Trp80	0.00	0.30	—*	2.2	1.0	—*	$g^+$
Tyr83	0.09	1.60	0.00	6.3	20.3	0.0	$t$
Asp85	0.01	0.33	0.00	0.0	4.5	0.1	$g^+, t$
Trp86	0.64	0.76	0.00	7.3	8.9	0.0	$t$
Leu87	0.00	0.79	0.00	1.5	5.2	0.0	$g^+, t$
Phe88	0.03	—*	0.00	2.4	—*	0.0	$g^+, t$
Thr89	0.19	0.00	0.31	0.0	5.5	11.7	$g^-$
Thr90	0.00	0.16	—*	5.3	0.0	—*	$g^+$
Asp96	0.00	0.64	0.01	0.0	6.1	0.0	$g^+, t$
Leu99	0.02	1.11	0.00	1.2	14.2	1.4	$g^+, t$
Leu100	0.11	0.35	0.00	0.0	13.2	2.9	$t$
Val101	0.80	0.29	0.00	12.9	8.6	0.0	$t$
Asp102	0.01	0.66	0.00	0.2	4.5	0.0	$g^+, t$
Asp104	0.03	0.67	0.00	0.1	4.7	0.0	$g^+, t$

\* По локальный энергетический минимум в диапазоне возможных значений угла  $\chi^1$ , соответствующем данному ротамеру, не найден. В таких случаях при энергетической минимизации происходил переход на один из альтернативных ротамеров.

**Таблица 3.** Значения штрафной функции  $F$  и относительной энергии  $\Delta E$  для ротамеров боковых цепей сегмента  $E$  бактериоопсина по результатам энергетической минимизации и перебора конформаций боковых цепей по программе CONFORNMR

Остаток	$F, \text{Å}$			$\Delta E, \text{ккал/моль}$			Возможные ротамеры
	$g^+$	$g^-$	$t$	$g^+$	$g^-$	$t$	
Phe135	0.01	0.06	0.00	22.7	7.7	0.0	$t$
Val136	0.29	0.12	0.00	10.8	4.0	0.0	$t$
Trp137	—*	0.08	0.00	—*	1.1	0.0	$t$
Trp138	0.21	0.00	0.00	40.4	9.9	0.0	$t$
Ile140	0.00	0.21	0.10	0.0	16.7	11.7	$g^+$
Ser141	0.00	0.20	0.06	0.0	0.0	11.1	$g^+$
Thr142	0.00	0.23	0.15	0.0	3.4	10.0	$g^+$
Met145	0.06	0.00	0.19	0.4	12.6	0.0	$g^+$
Tyr147	0.07	1.52	0.00	0.0	5.1	2.0	$g^+, t$
Leu149	0.05	0.18	0.08	1.7	10.5	1.2	$g^+, t$
Val151	0.62	0.09	0.00	7.1	4.2	0.0	$t$
Leu152	0.02	0.38	0.00	0.8	8.6	0.0	$g^+, t$
Phe153	0.05	0.34	0.00	13.3	18.3	0.0	$t$
Phe154	0.19	—*	0.01	12.7	—*	0.0	$t$
Thr157	0.00	0.03	0.20	0.0	9.3	17.4	$g^+$
Lys159	0.00	0.40	0.02	0.0	8.5	1.8	$g^+, t$
Glu161	0.05	0.20	0.00	6.1	5.9	0.0	$t$

\* См. сноску на табл. 2.

**Таблица 4.** Значения штрафной функции  $F$  и относительной энергии  $\Delta E$  для ротамеров боковых цепей сегмента  $G$  бактериоопсина по результатам энергетической минимизации и перебора конформаций боковых цепей по программе CONFORNMR

Остаток	$F, \text{Å}$			$\Delta E, \text{ккал/моль}$			Возможные ротамеры
	$g^+$	$g^-$	$t$	$g^+$	$g^-$	$t$	
Ile198	0.29	0.00	0.22	3.1	0.0	14.9	$g^-$
Leu201	0.11	0.25	0.00	2.6	15.8	1.4	$t$
Asp202	0.01	0.48	0.04	13.3	17.0	2.3	$t$
Ile203	0.06	0.09	0.02	0.0	5.0	4.0	$g^+, t$
Glu204	0.06	0.14	0.00	0.0	6.6	2.1	$g^+, t$
Thr205	0.00	0.33	0.25	0.0	6.3	7.6	$g^+$
Leu206	0.04	1.65	0.00	7.6	12.5	2.3	$t$
Leu207	0.00	1.23	0.08	9.3	8.9	0.0	$t$
Phe208	0.12	—*	0.00	3.8	—*	0.0	$t$
Met209	0.29	0.40	0.00	0.0	3.9	0.0	$t$
Val210	0.41	0.22	0.00	12.1	1.7	0.0	$t$
Leu211	0.00	0.18	0.12	0.0	3.7	4.5	$g^+$
Asp212	0.03	—*	0.00	30.5	—*	0.0	$t$
Val213	0.00	1.01	0.07	19.0	10.8	0.0	$t$
Lys216	0.05	0.32	0.00	0.0	15.0	31.7	$g^+$
Val217	0.11	0.07	0.00	28.0	0.0	1.4	$g^-, t$
Phe219	0.15	—*	0.00	5.7	—*	0.0	$t$
Leu221	0.01	0.00	0.10	0.6	13.3	0.0	$g^+$
Ile222	0.00	0.13	0.40	2.0	5.7	8.3	$g^+$
Leu223	0.00	0.58	0.10	2.4	25.8	0.0	$g^+$
Leu224	0.00	0.41	0.15	3.1	5.2	0.0	$g^+$
Arg225	1.08	0.69	0.00	0.0	6.9	2.6	$t$
Ile229	0.28	2.42	0.07	6.3	8.3	0.4	$t$

\* См. сноску на табл. 2.

конформации боковых цепей большинства аминокислотных остатков  $\alpha$ -спиральных участков исследованных пептидов. Торсионные углы боковых цепей  $\chi^1$  однозначно определились для 45% (9 из 20) аминокислотных остатков  $\alpha$ -спирального участка sC, 65% (13 из 20) остатков sE и 73% (19 из 26) остатков sG.

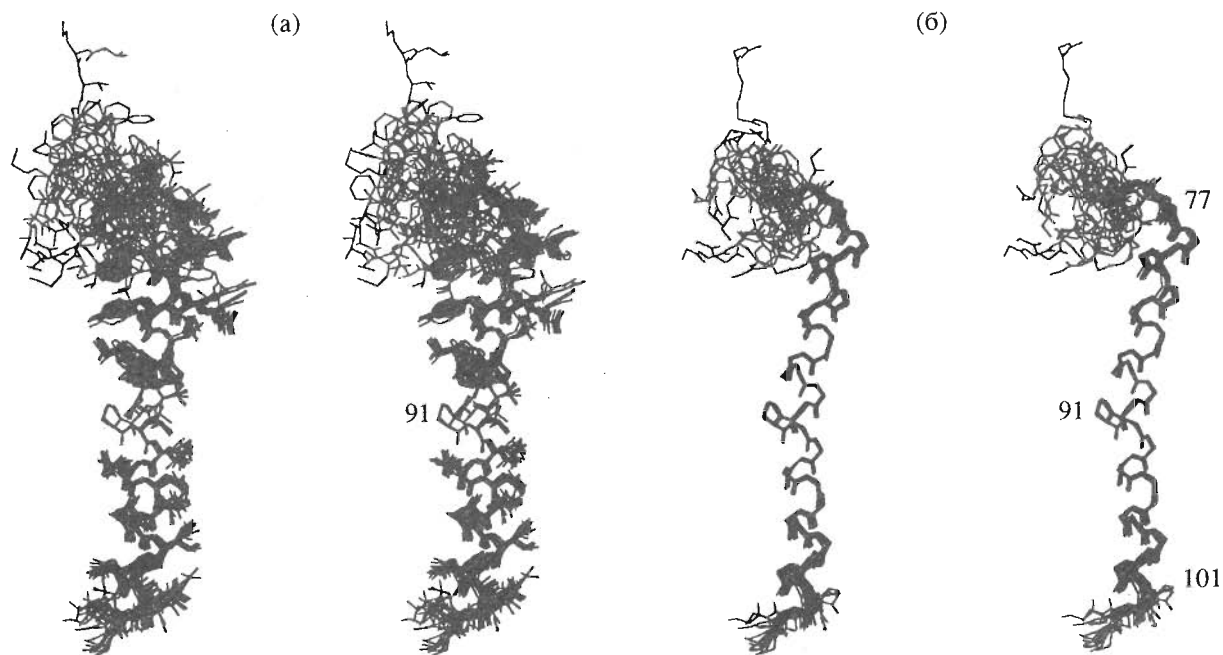
У части аминокислотных остатков несколько ротамеров боковых цепей в равной степени согласуются с измеренными объемами кросс-пиков ЯЭО. Так, для остатков Asp96, Leu99 (sC, табл. 2), Tyr147, Leu149 (sE, табл. 3), Ile203 (sG, табл. 4) интенсивности части кросс-пиков ЯЭО лучше удовлетворяются в одной, а части – в другой конформации. Это означает, что для перечисленных выше остатков в растворе, по-видимому, существует равновесная смесь двух ротамеров боковой цепи. Соответственно, если каждому из трех ротамеров удовлетворяет только часть из наблюдаемого набора кросс-пиков ЯЭО, возможна реализация всех трех конформаций боковой цепи.

*Уточнение пространственной структуры полипептидов и минимизация конформационной энергии.* После нескольких независимых стартов программы DIANA с дополнительными ограничениями на торсионные углы  $\chi^1$  и  $\chi^2$  боковых цепей аминокислотных остатков, найденными на предыдущем этапе, получены наборы из 40 конформаций для каждого сегмента. Минимизацию конформационной энергии полученных структур

в пространстве координат атомов с вариацией величин валентных углов и связей проводили по потенциалам CHARMM [21] с помощью программы QUANTA. По результатам минимизации отбирали по 20 структур с наименьшими значениями конформационной энергии.

Соответствие полученных в результате минимизации структур экспериментальным данным оценивали по значениям  $R^x$ -факторов, характеризующих степень согласования величин экспериментальных интенсивностей с теоретическими, рассчитанными с помощью программы CORMA [22] для полной матрицы релаксации. Средние величины  $R^x$ -факторов в окончательных наборах из 20 лучших структур для sC, sE и sG составляли соответственно 0.12, 0.15 и 0.17, что соответствует ошибкам в определении расстояний 12 - 17%.

Полученные в результате расчета наборы из 20 структур пептидов и распределение углов основной цепи  $\phi$  и  $\psi$  приведены на рис. 1, 4 (sC), 2, 5 (sE) и 3, 6 (sG), а среднеквадратичные отклонения (RMSD) координат тяжелых атомов – в табл. 1. Участки Trp80 - Val101 (sC), Arg134 - Ser158 (sE) и Ile198 - Arg227 (sG) образуют правые  $\alpha$ -спирали (рис. 1 - 3). Диапазон значений торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$  очень мал на  $\alpha$ -спиральных участках, но возрастает по мере приближения к N- и C-концам пептидов (рис. 4 - 6). Для большинства остатков, расположенных на  $\alpha$ -спиральных участках,



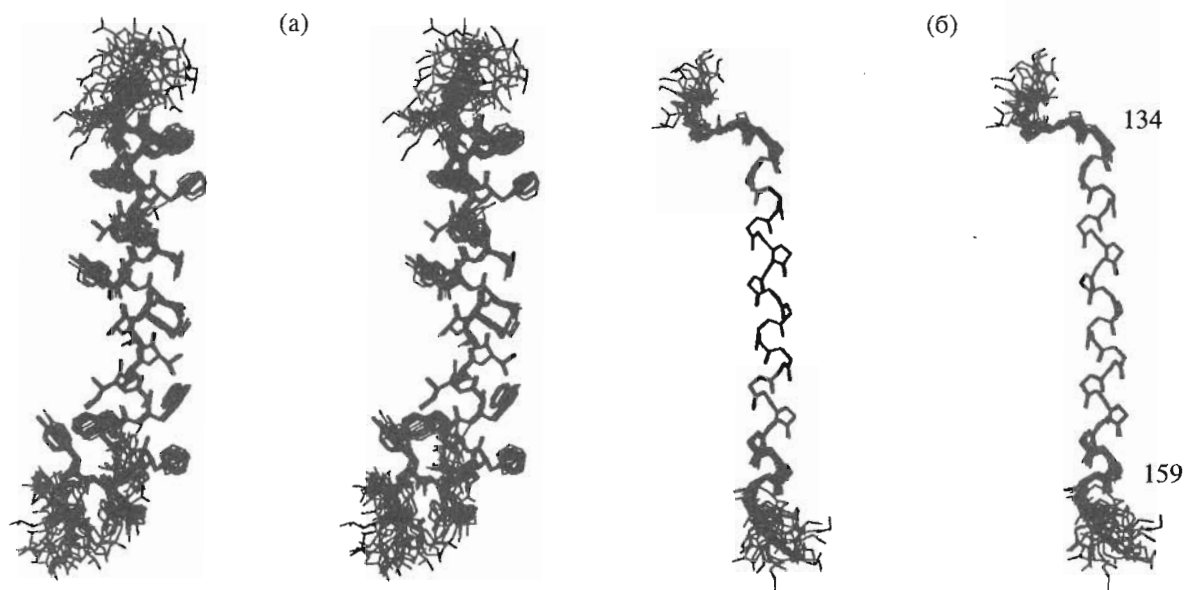
**Рис. 1.** Стереорепрезентация 20 структур sC, совмещенных по тяжелым атомам основной цепи участка Arg84 - Val101. Обозначены концевые остатки  $\alpha$ -спирального участка, а также остаток Pro91, вызывающий излом оси спирали. Здесь и далее на рис. 2 и 3 приведены структуры, полученные с помощью программы DIANA и затем энергетически минимизированные по потенциалам CHARMM. Показаны все тяжелые атомы молекулы (а) или только тяжелые атомы основной цепи (б).

определились ротамеры боковых цепей (табл. 1 - 4, рис. 4 - 6).

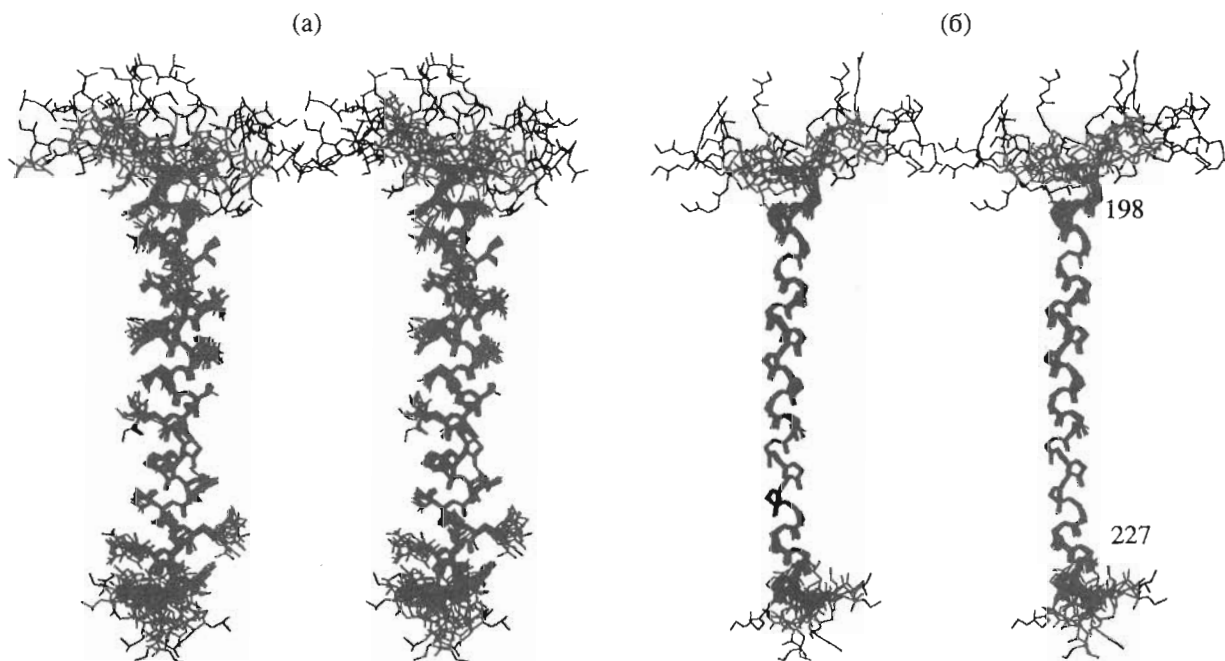
*Сравнение пространственной структуры бактериородопсина в пурпурной мембране и средах, моделирующих мембранное окружение, проводилось на основании результатов работ, использовавших методы  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в*

модельных средах (смесь хлороформ-метанол, мицеллы SDS) [7 - 16] и настоящая работа), а также данных, полученных методами ЭКМ [5].

Молекула БР образует семь протяженных  $\alpha$ -спиральных участков, пронизывающих мембрану [5]. Как правило, экспериментальные данные позволяют выделить стабильные участки



**Рис. 2.** Стереобразание 20 структур sE, совмещенных по тяжелым атомам основной цепи участка Arg134 - Ser158. Обозначены концевые остатки  $\alpha$ -спирального участка. Показаны все тяжелые атомы (а) или только тяжелые атомы основной цепи (б).



**Рис. 3.** Стереобразание 20 структур sG, совмещенных по тяжелым атомам основной цепи участка Asp202 - Arg227. Обозначены концевые остатки  $\alpha$ -спирального участка. Показаны все тяжелые атомы (а) или только тяжелые атомы основной цепи (б).

$\alpha$ -спирали, отличающиеся от концевых витков спирали медленным обменом амидных протонов на дейтерий растворителя (данные ЯМР) или более низким температурным фактором (данные ЭКМ [5]). Участки стабильной  $\alpha$ -спирали сегментов А, В, С, Е, F и G, определенные нами и в работах [8 - 14] с помощью ЯМР-спектроскопии, с точностью до одного остатка совпадают с  $\alpha$ -спиральными участками ЭКМ-модели БР [5] (рис. 7).

ЯМР-спектроскопия в отличие от методов ЭКМ дает возможность исследовать подвижные участки молекул и описывать протекающие в них динамические процессы. Данные ЯМР о внутримолекулярной подвижности БР показывают [23], что взаимодействие между  $\alpha$ -спиральными участками приводит к процессам конформационного обмена в миллисекундном масштабе времени в части молекулы, включающей  $\alpha$ -спиральные

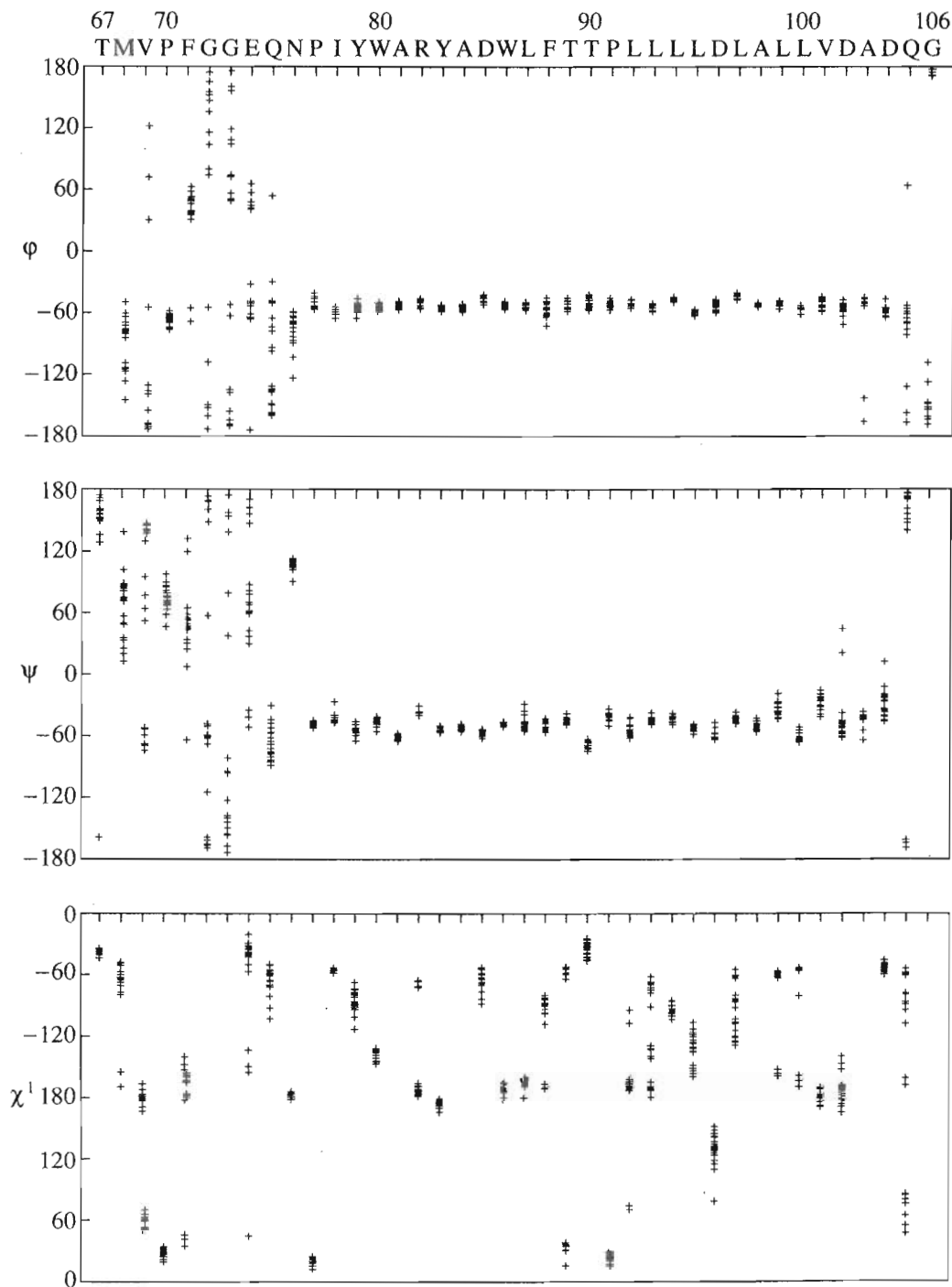


Рис. 4. Торсионные углы  $\phi_i$ ,  $\psi_i$  и  $\chi^1$  (град) в 20 лучших (см. текст) структурах sC.

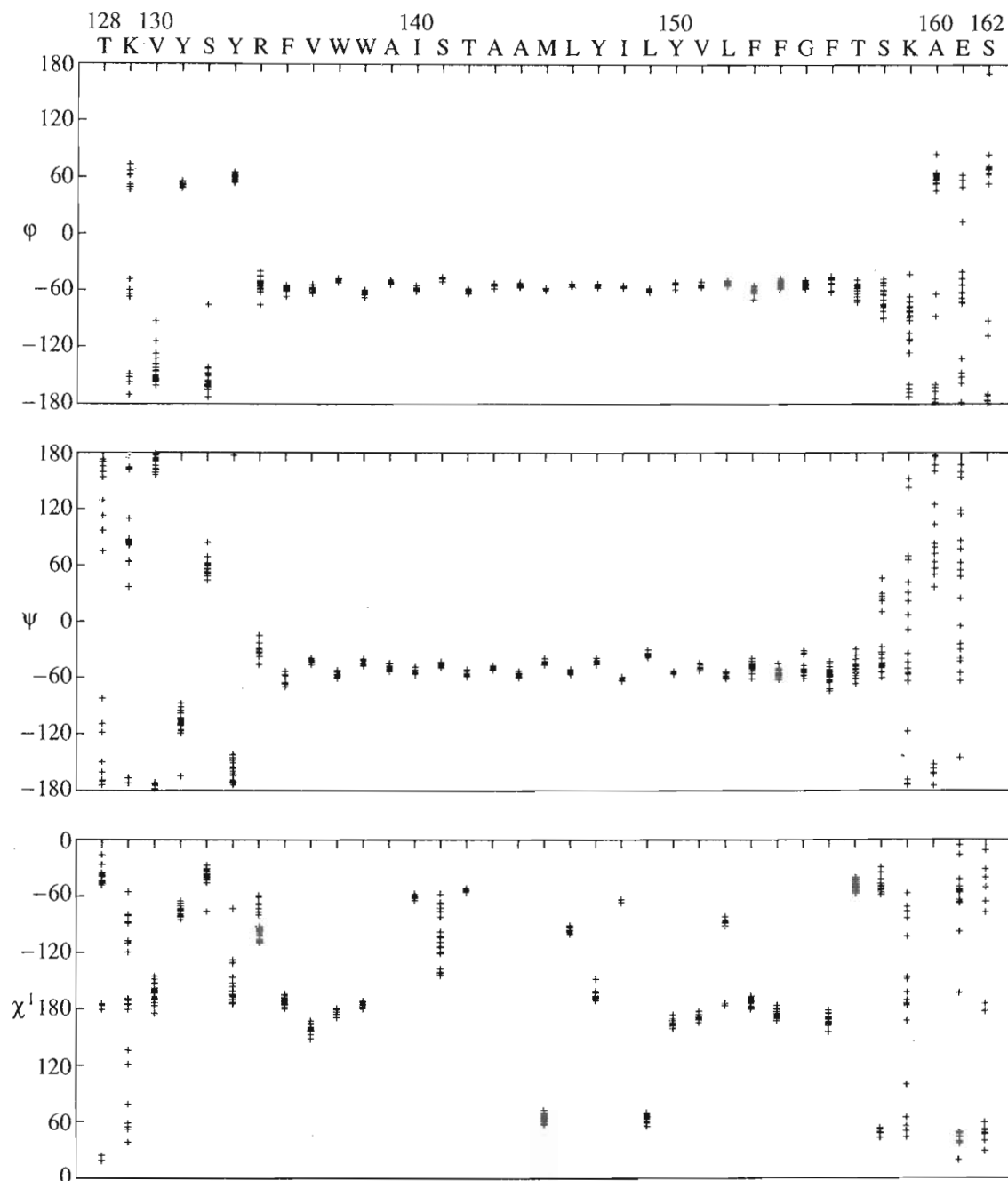


Рис. 5. Торсионные углы  $\phi_i$ ,  $\psi_i$  и  $\chi^1$  (град) в 20 лучших (см. текст) структурах sE.

сегменты С, D, E и F. Внутримолекулярная динамика БР может рассматриваться как суперпозиция движений в отдельных  $\alpha$ -спиралях и движений, обусловленных межспиральными взаимодействиями. В процессе динамики  $\alpha$ -спирали могут менять взаимную ориентацию, изгибаться, удлиняться или укорачиваться. Внутренняя динамика такого типа может играть существенную роль при функционировании БР и других мембранных белков.

Исследование пространственной структуры синтетических аналогов трансмембранных сег-

ментов БР позволило описать такие особенности конформации подвижных структурированных участков БР, как изгиб оси  $\alpha$ -спирали [24] и изменение ее длины (см. ниже). Согласно данным ЯМР [7 - 16], в смеси органических растворителей хлороформ-метанол большинство протяженных  $\alpha$ -спиральных трансмембранных сегментов БР заканчиваются неструктурированными подвижными участками. Исключение составляют N-концевые участки Ala2 - Glu6 сегмента А [10], Asp36 - Asp38 сегмента В, Asn76 - Ile78 сегмента С,



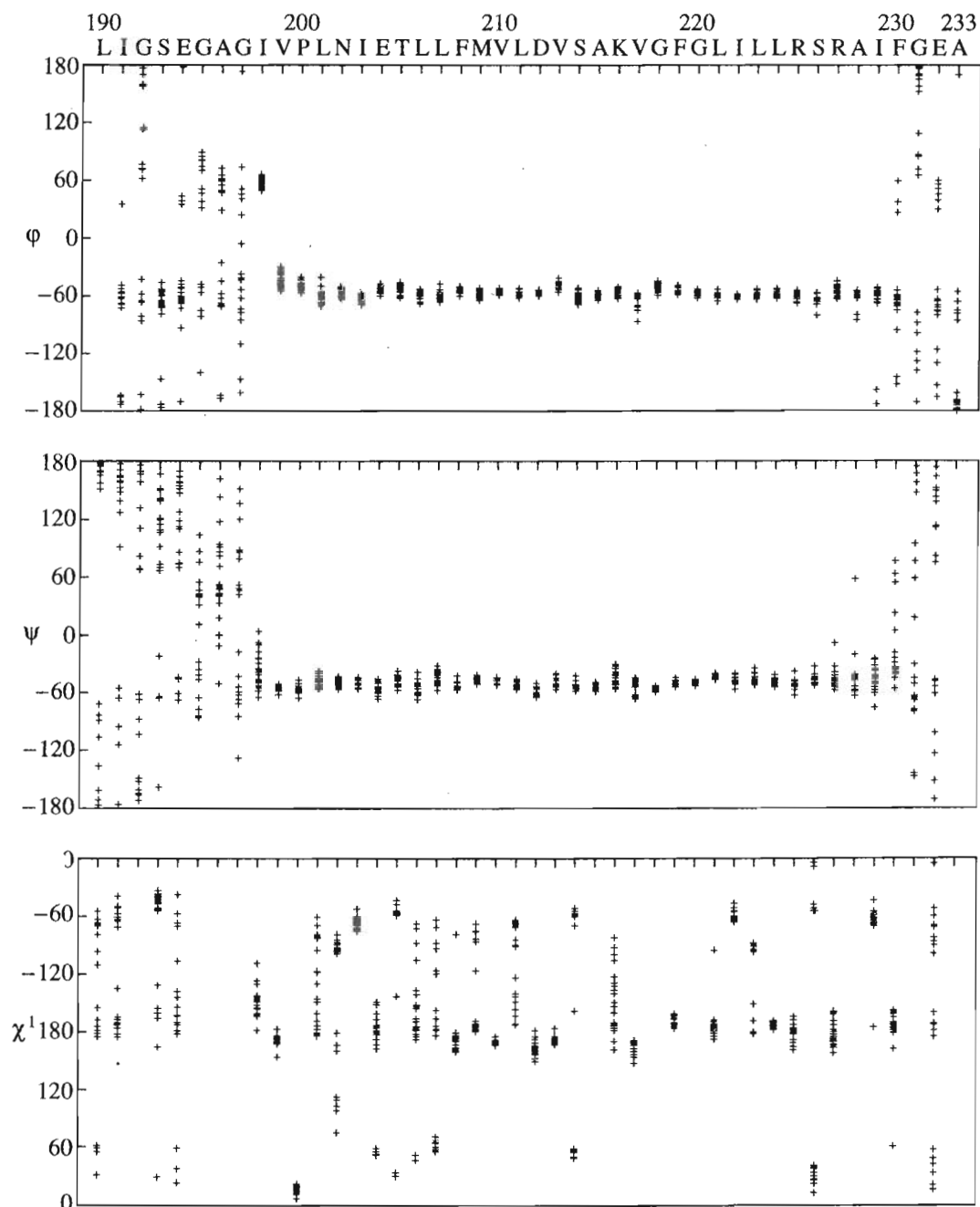
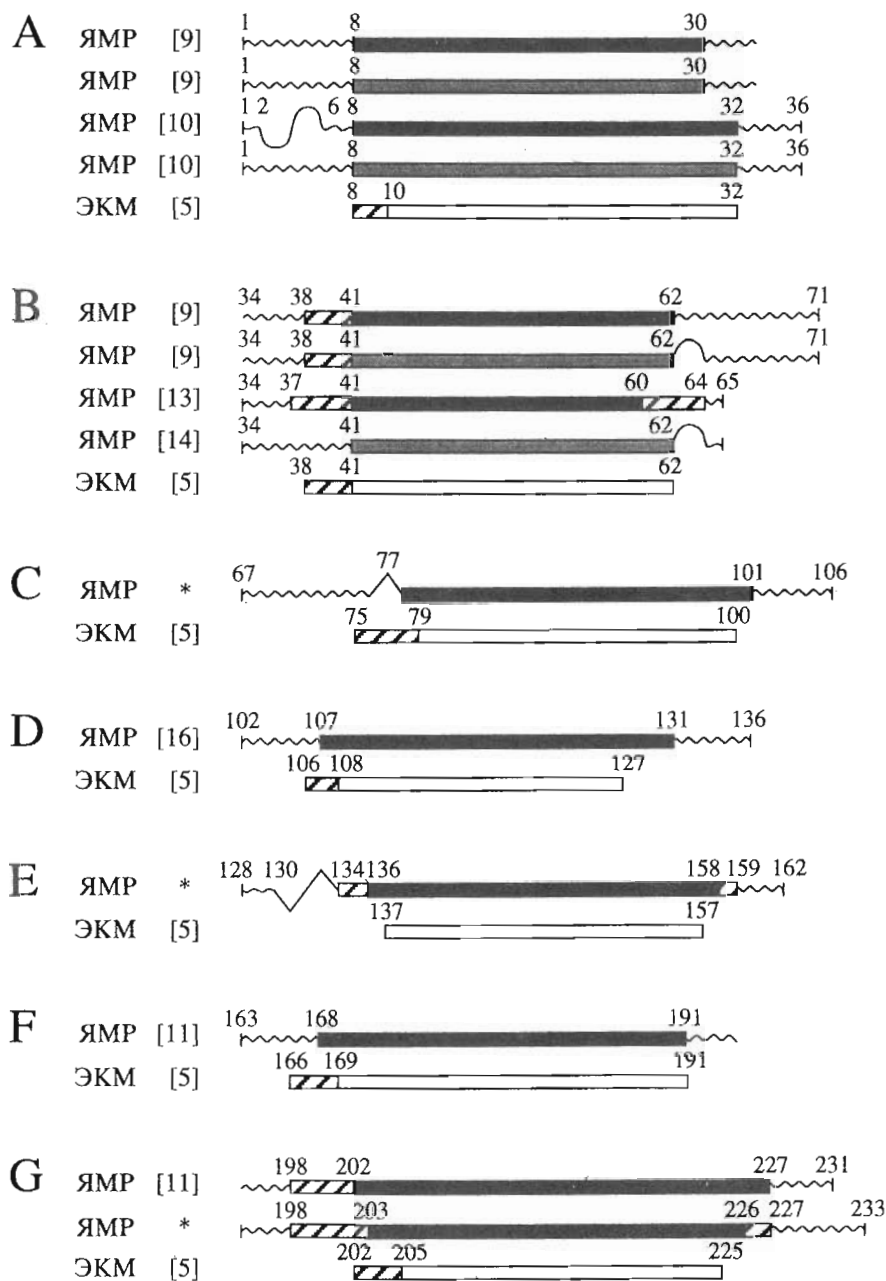


Рис. 6. Торсионные углы  $\phi_i$ ,  $\psi_i$  и  $\chi^1$  (град) в 20 лучших (см. текст) структурах sG.

Tyr131 - Tyr133 сегмента E и C-концевой участок Leu62 - Tyr64 сегмента B [14] (рис. 7).

$\alpha$ -Спиральный участок сегмента C на N-конце ограничивается Asx-изгибом (остатки Asn76-Pro77-Pe78), стабилизированным водородными связями амидных групп остатков Pe78 и Tyr79 с СО-группой боковой цепи остатка Asn76 (рис. 8). Asx-изгиб, топологически эквивалентный  $\beta$ -изгибу, довольно часто встречается в водорастворимых белках [25]. Участки такой конформации найдены также в мембранном белке фотосинтези-

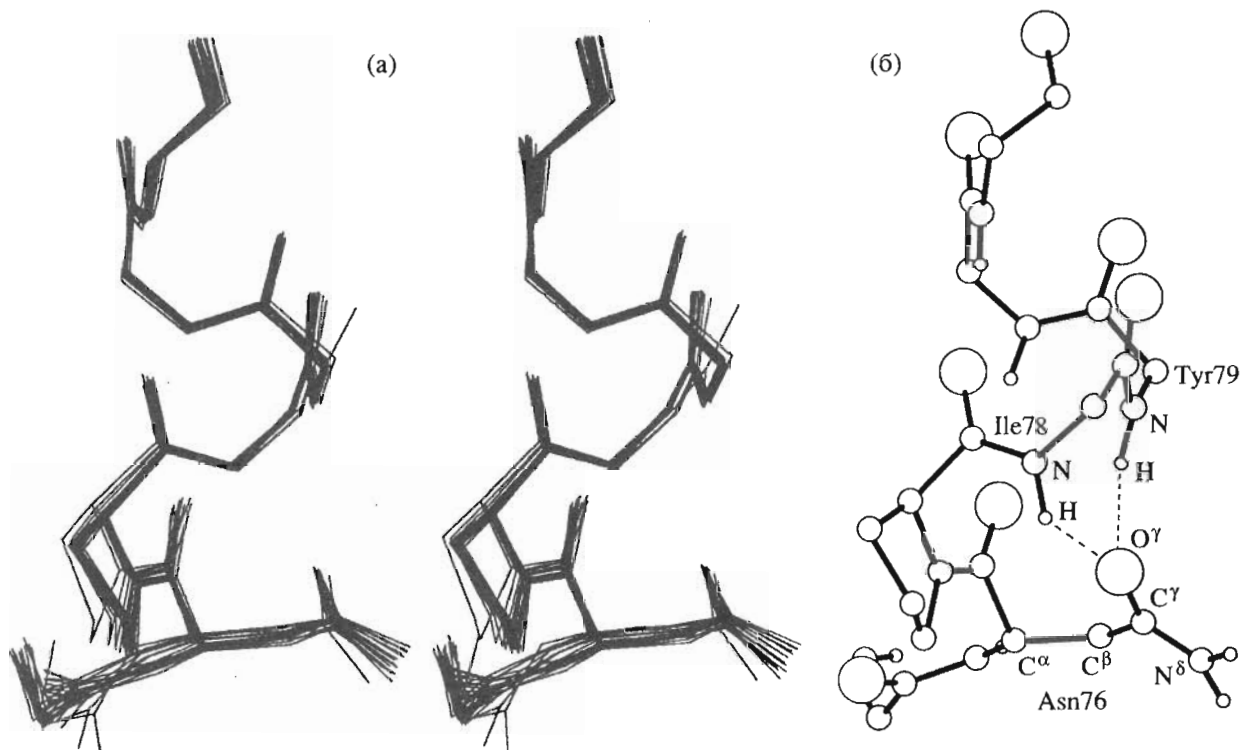
ческого реакционного центра галофильных бактерий [26]. По-видимому, и в нативном БР реализуется Asx-изгиб, ограничивающий с N-конца  $\alpha$ -спиральный участок трансмембранного сегмента C. Однако в конформации, предложенной по данным ЭКМ [5],  $\alpha$ -спираль сегмента C продолжается до остатка Gln75. По нашему мнению, электронную плотность от боковой цепи остатка Asn76 при анализе недостаточно точных данных ЭКМ ошибочно отнесли к основной цепи остатка Gln75.



**Рис. 7.** Сравнение участков вторичной структуры трансмембранных сегментов БР, определенных по данным ЯМР в смеси хлороформ-метанол (черные прямоугольники), и в мицеллах SDS (серые прямоугольники) с ЭКМ-моделью. В квадратных скобках даны номера ссылок на работы, в которых определено положение  $\alpha$ -спиралей. Сегменты, конформация которых определена в настоящей работе, помечены звездочкой. Прямоугольниками обозначены участки стабильной  $\alpha$ -спирали (см. текст). Заштрихованы  $\alpha$ -спиральные участки, характеризующиеся ускоренным обменом амидных протонов NH (ЯМР) или низкой электронной плотностью (ЭКМ). Дугой и изломами обозначены хорошо определенные конформации участков, ограничивающих  $\alpha$ -спирали. Волнистой линией обозначены участки неупорядоченной структуры.

$\alpha$ -Спиральный участок сегмента Е на N-конце ограничивается остатком Arg134, у которого углы основной цепи  $\phi$  и  $\psi$  соответствуют конформации  $3_{10}$ -спирали ( $\phi \approx -60^\circ$ ,  $\psi \approx -20^\circ$ ). Далее, к N-концу, основная цепь sE образует два последовательных изгиба (рис. 2, 5). Остатки Val130 (угол  $\psi \approx 180^\circ$ ) и Tyr131 ( $\phi \approx 60^\circ$ ) во всех структурах из

окончательного набора образуют изгиб типа VIIb, а остаток Ser132 ( $\phi \approx 180^\circ$ ,  $\psi \approx 60^\circ$ ) – изгиб типа VIIa [27]. При этом конформация участка 130 - 132 менее стабильна, чем  $\alpha$ -спираль, что приводит к промежуточным скоростям обмена амидных протонов NH остатков участка Arg134 - Trp137 на дейтерий растворителя.



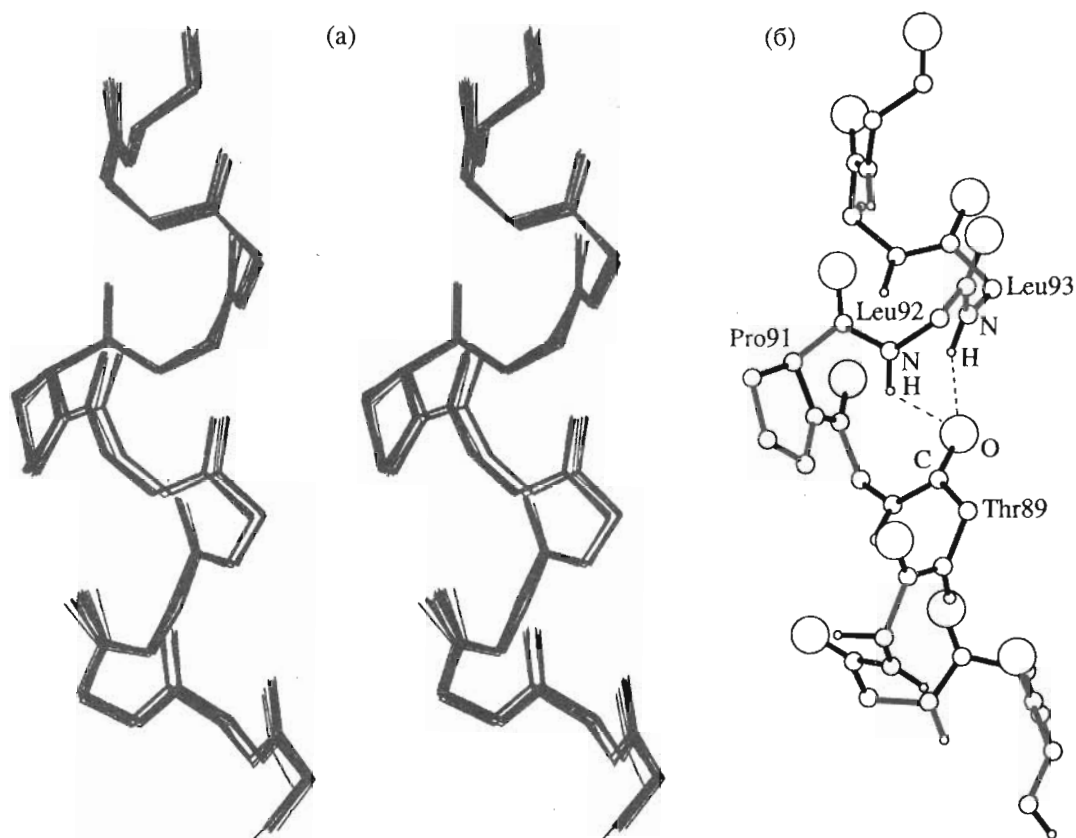
**Рис. 8.** Стереорепрезентация 20 совмещенных структур (а) и шаро-стержневая модель (б) N-концевого участка (остатки 76 - 81) сС. Обозначены тяжелые атомы боковой цепи Asn76 и атомы амидных групп Ile78 и Tyr79. Для шаро-стержневой модели штриховыми линиями показана бифуркационная водородная связь, образованная амидными группами Ile78 и Tyr79 и карбонильной группой боковой цепи Asn76, стабилизирующая конформацию типа "Asx-turn". Для ясности рисунка атомы боковых цепей показаны только для остатков Asn76 и Pro77.

Как уже отмечалось, участки стабильной  $\alpha$ -спирали молекул sE и sG, локализованные по данным ЯМР (остатки 137 - 159 и 203 - 226, рис. 2, 3), совпадают с участками (137 - 158, 203 - 227)  $\alpha$ -спиральной конформации в ЭКМ-модели БР [5]. Однако в отличие от ЭКМ-модели менее стабильные N-концевые участки  $\alpha$ -спиралей sE и sG, определенные по данным ЯМР в растворе, длиннее соответственно на 3 и 4 остатка (рис. 7). Следует отметить, что в имеющейся в нашем распоряжении ЭКМ-модели БР отсутствуют какие-либо данные об остатках Thr128 - Val136, а результаты исследования вторичной структуры участка 125 - 142 методом спектроскопии ЭПР [28]\* не противоречат выводам, полученным на основании данных ЯМР для изолированного сегмента E. Тем не менее, как показано ниже, небольшие изменения внешней среды могут существенно изменять конформацию менее стабильной части  $\alpha$ -спирали.

\* Мутантные аналоги БР (замена единичных аминокислотных остатков участка 125 - 142 на цистеин) были селективно модифицированы по остатку цистеина спиновой меткой и встроены в везикулы. Исследование доступности нитроксильного радикала спиновой метки парамагнитным зондом показало, что периодичность частоты столкновения молекул зонда с нитроксидом для остатков 131 - 138 соответствует  $\alpha$ -спирали, погруженной в мембрану, а остатки 129 - 131 экспонированы в водную фазу.

При повышении псевдо-pH ( $\text{pH}^*$ ) смеси метанол-хлороформ с 0.1 M LiClO<sub>4</sub> от 3.8 до 6.8 происходит депротонирование N-концевой аминогруппы sE, что приводит к разрушению  $\alpha$ -спиральной конформации менее стабильного участка Arg134 - Val136. Об изменении конформации свидетельствует исчезновение на указанном участке ранее наблюдавшихся характерных для  $\alpha$ -спирали кросс-пиков ЯЭО C <sup>$\alpha$</sup> H Arg134 - C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub> Trp137, C <sup>$\alpha$</sup> H Phe135 - C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub> Trp138, C <sup>$\alpha$</sup> H Arg134 - NH Trp137. При этом конформация участка Trp137 - Lys159, судя по картине кросс-пиков ЯЭО, остается  $\alpha$ -спиральной.

Таким образом, аминокислотная последовательность на участке Tyr133 - Val136 БР предполагает реализацию различных конформаций в зависимости от условий внешней среды. Эта возможность конформационной перестройки может иметь функциональное значение. Как известно [5], остатки 137 - 159 БР постоянно находятся внутри мембраны, а остатки 133 - 136 расположены вблизи поверхности раздела фаз. При переносе протона через пурпурную мембрану *H. halobium* молекулой БР изменяются локальное электрическое поле и значение pH вблизи поверхности мембраны. Это может вызвать конформационные изменения на близлежащих участках БР, аналогичные укорачиванию  $\alpha$ -спирали sE при повышении псевдо-pH смеси хлороформ-метанол.



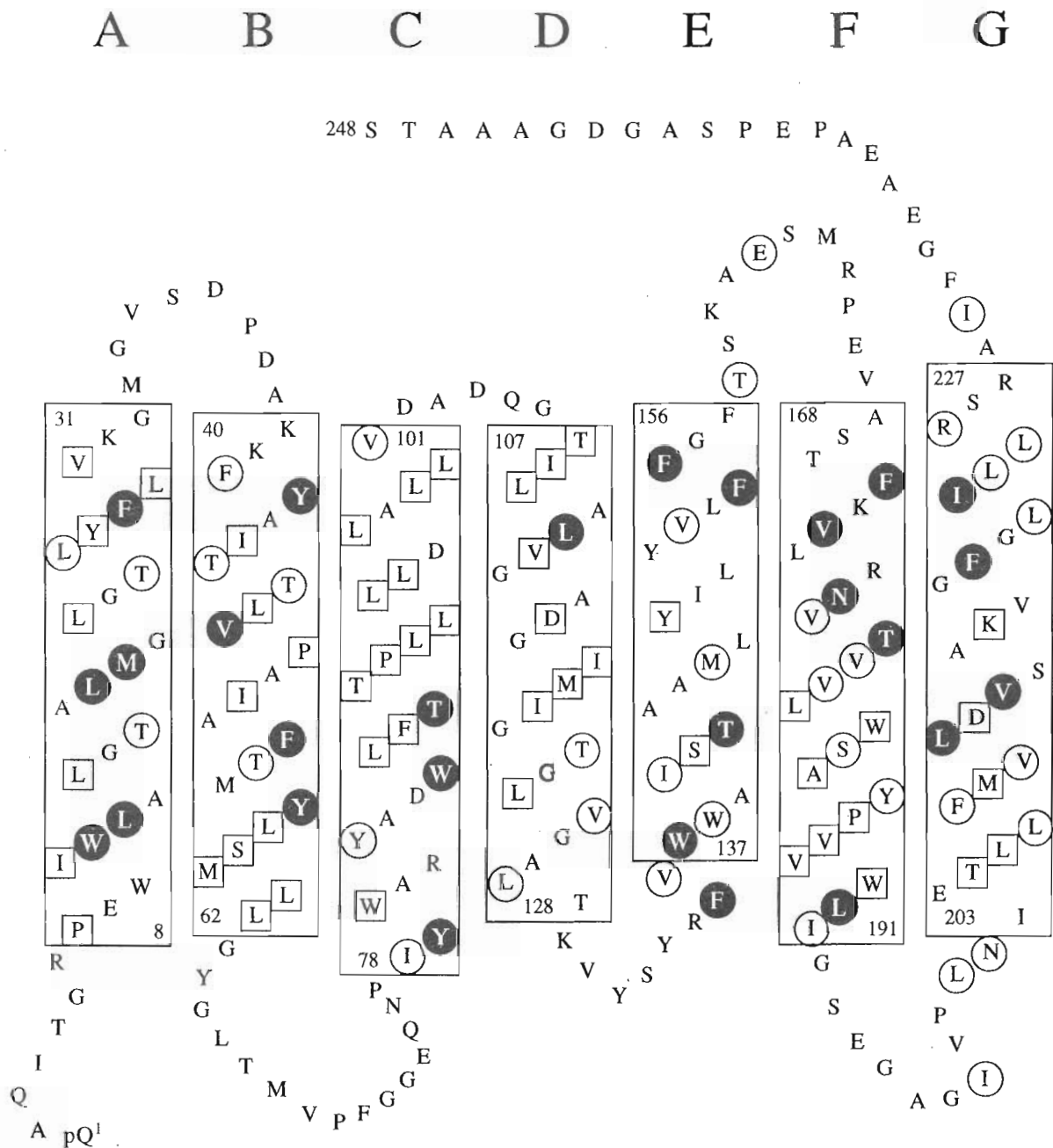
**Рис. 9.** Стереизображение 20 совмещенных структур (а) и шаро-стержневая модель (б) участка 85 - 95 сС. Обозначены атомы амидных групп Leu92 и Leu93 и атомы карбонильной группы Thr89. Для шаро-стержневой модели штриховыми линиями показана бифуркационная водородная связь, характерная для участков  $\alpha$ -спиральной конформации, содержащих остаток пролина.

Как уже отмечалось выше, N-концевая часть  $\alpha$ -спирали sG, по данным ЯМР, также длиннее на 4 остатка, чем в ЭКМ-модели. К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют какие-либо другие данные о пространственной структуре сегмента G, кроме наших, ЭКМ-модели [5] и полученных для протеолитического фрагмента BP2 (остатки 163 - 231, сегменты F и G) BP в растворе методами спектроскопии ЯМР [11]. Несмотря на различие методик солубилизации синтетического пептида sG и протеолитического фрагмента BP2 в смеси хлороформ-метанол, локализация в них структурированных участков сегмента G (стабильная спираль для остатков 203 - 226 и менее стабильная часть спирали для остатков 198 - 202), определенная методом ЯМР, совпадают (рис. 7). Отметим, что протяженность  $\alpha$ -спирали сегмента G (30 а. о.) в смеси хлороформ-метанол несколько больше, чем толщина мембранного слоя. По-видимому, изотропная слабополярная среда индуцирует  $\alpha$ -спираль на участках (в данном случае 198 - 202), предполагающих реализацию различных конформаций в зависимости от условий среды. В нативных условиях этот участок расположен вблизи поверхности мембраны, и, возмож-

но, за счет него, как и за счет участка 133 - 136 sE, может изменяться длина  $\alpha$ -спиралей в процессе конформационных изменений, сопровождающих функционирование БР\*.

Интегральные мембранные белки в отличие от глобулярных довольно часто содержат остатки пролина в трансмембранных  $\alpha$ -спиральных сегментах [29]. В БР имеются остатки пролина в средней части сегментов B, C и F, индуцирующие излом оси спиралей. Остаток Pro91 в середине  $\alpha$ -спирального участка sC вносит искажения в каноническую структуру  $\alpha$ -спирали (рис. 9). В районе этого остатка  $\alpha$ -спираль имеет излом  $\approx 25^\circ$ , что несколько больше, чем в структуре БР, полученной по данным ЭКМ ( $20^\circ$ ) [5]. Анализ пространственной структуры sC в смеси органических растворителей показал, что пролинсодержащие  $\alpha$ -спиральные участки сегментов B (Pro50) [9, 13, 14], C (Pro91) и F (Pro186) [11] имеют сходную конформацию, характеризующуюся изгибом оси спирали и образованием бифуркационной водородной связи (рис. 9).

\* Следует заметить, что способность отдельных участков БР изменять свою вторичную структуру может оказаться существенной также и при встраивании белка в мембрану.



**Рис. 10.** Схема укладки полипептидной цепи BP в мембране в виде семи трансмембранных тяжей (использовано однобуквенное обозначение аминокислотных остатков) в соответствии с данными ЯМР-спектроскопии. Участки трансмембранных тяжей, заключенные в прямоугольники, соответствуют стабильным частям  $\alpha$ -спиралей. Буквы A, B, C, D, E, F, G над рисунком – обозначения соответствующих тяжей. Отмечены остатки с однозначно определившейся конформацией боковой цепи: квадратами – конформация боковой цепи, определенная по данным ЭКМ и подтвержденная данными ЯМР; белыми кружками – конформация боковой цепи, определенная только при анализе данных ЯМР; черными кружками – конформация боковой цепи, определенная по данным ЯМР и не согласующаяся с ЭКМ-моделью.

*Конформационное пространство боковых цепей аминокислотных остатков* было исследовано в настоящей работе для молекул sC, sE и sG, в других работах – для sB (остатки 34 - 65 BP) [13], протеолитических фрагментов C2 (1 - 71) [9] и BP2 (163 - 231) [11] в смеси хлороформ-метанол (1 : 1), а также для sA (1 - 36) [10], sB [14] и фраг-

мента C2 [9] в мицеллах SDS. Структура  $\alpha$ -спирали накладывает сильные стерические ограничения на возможные ротамеры боковых цепей аминокислотных остатков [30]. Особенно существен этот эффект для остатков с объемной боковой цепью, таких, как Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile и Val. Как правило, для всех исследованных полипептидов

эти остатки имеют единственный ротамер вращения вокруг связи  $C^{\alpha}-C^{\beta}$  (торсионный угол  $\chi^1$ ), для которого согласуются вычисленные и измеренные объемы кросс-пиков в спектре NOESY и который обладает наименьшей относительной конформационной энергией (табл. 2 - 4).

При построении модели БР по данным ЭКМ участки высокой электронной плотности относили к массивным боковым цепям (фенилаланин, тирозин, триптофан). Затем полученное отнесение использовалось в качестве основы для соотношения аминокислотной последовательности с расположением трансмембранных  $\alpha$ -спиральных сегментов в пространстве и определения взаимной ориентации  $\alpha$ -спиралей [5]. Однако анализ ЭКМ-модели БР [5] показывает, что указанные в ней конформации многих боковых цепей невыгодны энергетически и практически не встречаются в  $\alpha$ -спиралях (рис. 10). Можно предположить, что различия в определении конформаций боковых цепей БР по данным ЯМР и ЭКМ обусловлены не влиянием взаимной упаковки  $\alpha$ -спиралей в БР на конформации боковых цепей, а недостаточным разрешением, достигнутым методом ЭКМ. Так, в ЭКМ-модели БР из 26 ароматических аминокислотных остатков на  $\alpha$ -спиральных участках молекулы 12 имеют энергетически невыгодную конформацию боковой цепи, а у 8 она вообще не определена [5]. Реконструкция упаковки трансмембранных  $\alpha$ -спиралей с использованием некорректных конформаций боковых цепей могла существенно исказить модель пространственной структуры БР.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что при построении пространственной структуры БР по методике [13, 15] с использованием результатов расчета конформаций отдельных фрагментов по данным ЯМР и известных в настоящее время данных ЭКМ [5] необходимо уточнить взаимную ориентацию  $\alpha$ -спиралей и их упаковку в ЭКМ-модели.

### Заключение

Синтетические фрагменты БР, солиubilизированные в смеси хлороформ-метанол, моделирующей мембранное окружение, приобретают конформации, хорошо согласующиеся с ЭКМ-моделью БР в пурпурной мембране [5]. Использование спектроскопии ЯМР позволяет при этом существенно повысить точность определения пространственной структуры (за счет локализации  $\alpha$ -спиралей, определения конформации боковых цепей, конформации N- и C-концевых участков трансмембранных сегментов) и изучить влияние среды солиubilизации на тонкие детали пространственной структуры молекулы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР** пептидов получены ранее в смеси  $\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OH}$  (1 : 1) с 0.1 М  $\text{LiClO}_4$  при 30°C и pH\* 3.8. Отнесение сигналов и первичный анализ спектров описаны в работе [15]. Дополнительно был снят двумерный спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР NOESY пептида sE в тех же условиях, что и в работе [15], но при значении pH\* 6.5.

Для измерения объемов кросс-пиков в спектрах NOESY применялась программа EASY [31], использующая нелинейный алгоритм аппроксимации формы линии сечений кросс-пика в двумерном спектре по обоим направлениям методом наименьших квадратов.

**Анализ локальной структуры** проводился с помощью программы CONFORNMR [17]. Программа CONFORNMR определяет эффективное время корреляции движения межпротонных векторов  $i$ -й пептидной единицы и диапазоны значений торсионных углов основной цепи  $\phi_i$  и  $\psi_i$  путем согласования полной матрицы релаксации протонов для каждого пептидного фрагмента белка (включающего в себя все атомы аминокислотного остатка, а также группу NH следующего по аминокислотной последовательности остатка) с экспериментальными интенсивностями кросс-пиков ЯЭО.

**Ограничения на межпротонные расстояния** рассчитывали с помощью программы анализа матрицы релаксации протонов MARDIGRAS [20] исходя из измеренных в спектре NOESY объемов перекрывающихся кросс-пиков ЯЭО, времени смешивания продольных компонентов протонной намагниченности ( $\tau_m$  200 мс), времени корреляции вращательного движения молекулы, а также стартовой конформации пептида, полученной с помощью программы DIANA.

**Пространственную структуру** рассчитывали при помощи программы дистанционного геометрического алгоритма DIANA [19]. В качестве входных данных в ней используются ограничения на межатомные расстояния, рассчитанные по объемам кросс-пиков в спектре NOESY или установленные при задании геометрии водородных связей, ограничения на торсионные углы, а также информация о стереохимическом отнесении протонов прохиральных групп. Если на предыдущем этапе реконструкции стереохимическое отнесение протонов прохиральных групп осталось неизвестным, то при расчете с помощью программы DIANA такие прохиральные группы заменяются на псевдоатомы с центром на соответствующем атоме углерода и ван-дер-ваальсовым радиусом. Программа DIANA случайным образом генерирует стартовые конформации молекулы, а затем минимизирует в пространстве торсионные углы полипептидной цепи штрафную функцию, включающую ограничения на межатомные расстояния

и торсионные углы. Минимизация штрафной функции проводилась в соответствии со стандартным протоколом.

Поиск конформаций боковых цепей аминокислотных остатков осуществляли на участках с хорошо определенным ходом полипептидной цепи с помощью программы CONFORNMR [18]. При этом в качестве стартовой использовалась одна из конформаций пептида, полученных с помощью программы DIANA. После минимизации конформационной энергии для стартовой модели молекулы торсионным углом  $\chi_i^1$  и  $\chi_i^2$  каждой  $i$ -й боковой цепи последовательно присваивали стандартные значения, возможные для боковой цепи аминокислотного остатка в  $\alpha$ -спиралях, а затем минимизировали энергию и рассчитывали штрафную функцию. При этом учитывали лишь ЯЭО-контакты с участием протонов боковой цепи данного  $i$ -го остатка и для экономии счетного времени рассматривали пептидный фрагмент, охватывающий остатки с  $i-5$ -го по  $i+5$ -й (фрагмент  $(i \pm 5)$ ). Затем для боковой цепи каждого аминокислотного остатка пептида выбирали ротамер, характеризующийся минимальной штрафной функцией. В тех случаях, когда значения штрафной функции для нескольких ротамеров отличались менее чем на 0.1 Å, учитывали конформационную энергию. Оптимальным считали ротамер, энергия которого была не менее чем на 5 ккал/моль ниже, чем у других ротамеров. Для более полного использования имеющейся спектральной информации при подсчете штрафной функции учитывались не только кросс-пики ЯЭО, однозначно отнесенные к определенной паре протонов (как, например, в программе DIANA), но и "суммарные" кросс-пики ЯЭО, образованные несколькими парами протонов.

Минимизация конформационной энергии пептидов проводилась в пространстве координат атомов с вариацией величин валентных углов и связей по потенциалам CHARMM [21]. Поскольку невозможно точно учесть электростатические взаимодействия, их вклад в конформационную энергию не учитывали.

Расчет теоретических объемов кросс-пиков ЯЭО и оценка согласования теоретических и экспериментальных интенсивностей проводилась с использованием программы CORMA [22].  $R^x$ -фактор для оценки согласования интенсивностей вычислялся по формуле

$$R^x = \sum_N^{i=1} |(I_0^i)^{1/6} - (I_c^i)^{1/6}| / \sum (I_0^i)^{1/6},$$

где  $N$  – число однозначно отнесенных кросс-пиков ЯЭО,  $I_0$  – экспериментальные, а  $I_c$  – расчетные интенсивности кросс-пиков ЯЭО.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bayley H., Huang K.S., Radhakrishnan R., Rose A., Takagaki J., Khorana H.G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 2225 - 2229.
2. Oesterhelt D., Stoekenius W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 2838 - 2857.
3. Racker E., Stoekenius W. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 662 - 663.
4. Danon A., Stoekenius W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 1234 - 1238.
5. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899 - 929.
6. Arseniev A.S., Kuryatov A.B., Tsetlin V.I., Bystrov V.F., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1987. V. 213. P. 283 - 288.
7. Barsukov I.L., Abdulaeva G.V., Arseniev A.S., Bystrov V.F. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321 - 327.
8. Sobol A.G., Arseniev A.S., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Bystrov V.F. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 161 - 171.
9. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Popov A.G., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 219. P. 571 - 583.
10. Первушин К.В., Соболев А.Г., Абдулаева Г.В., Мусина Л.Ю., Арсеньев А.С. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1397 - 1415.
11. Barsukov I.L., Nolde D.E., Lomize A.L., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 665 - 672.
12. Arseniev A.S., Maslennikov I.V., Bystrov V.F., Kozhich A.T., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 81 - 88.
13. Масленников И.В., Ломизе А.Л., Арсеньев А.С. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 1456 - 1469.
14. Lomize A.L., Pervushin K.V., Arseniev A.S. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 361 - 372.
15. Масленников И.В., Арсеньев А.С., Чикин Л.Д., Кожич А.Т., Иванов В.Т. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 5 - 20.
16. Масленников И.В., Арсеньев А.С., Чикин Л.Д., Кожич А.Т., Быстров В.Ф., Иванов В.Т. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 156 - 160.
17. Ломизе А.Л., Соболев А.Г., Арсеньев А.С. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 179 - 201.
18. Ломизе А.Л., Арсеньев А.С., Масленников И.В., Быстров В.Ф. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. P. 1310 - 1324.
19. Guntert P., Braun W., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1991. V. 217. P. 517 - 530.
20. Borgias B.A., James T.L. // J. Magn. Reson. 1990. V. 87. P. 475 - 487.
21. Brooks B.R., Brucoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. P. 187 - 217.
22. Keepers J.W., James T.L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. P. 404 - 426.
23. Orekhov V.Yu., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. P. 223 - 229.
24. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Korzhnev D.M., Arseniev A.S. // J. Biomol. NMR. 1995. In press.

25. Abbadi A., Mcharfi M., Aubri A., Premilat S., Bous-sard G., Marraud M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 2729 - 2735.
26. Deisenhofer J., Michel H. // *Angew. Chem.* 1989. V. 28. P. 829 - 968.
27. Robson B., Garnier J. *Introduction to Proteins and Protein Engineering.* 1988. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B. V.
28. Altenbach C., Marti T., Khorana H.G., Hubbell W.L. // *Science.* 1990. V. 248. P. 1088 - 1092.
29. Heijne G. von // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 218. P. 499 - 503.
30. Barlow D.J., Thornton J.M. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 201. P. 601 - 619.
31. Eccles C., Guntert P., Billeter M., Wuthrich K. // *J. Biomol. NMR.* 1991. P. 111 - 130.

## Spatial Structure of Transmembrane Segments C, E, and G of Bacterioopsin by Two-Dimensional $^1\text{H}$ NMR Spectroscopy

I. V. Maslennikov\*, E. V. Bocharov, and A. S. Arseniev

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

**Abstract** – The spatial structure of synthetic peptides with transmembrane segment sequences C (residues 67 - 106), E (128 - 162), and G (190 - 233) of bacterioopsin from *Halobacterium halobium* solubilized in methanol-chloroform 1 : 1 containing 0.1 M  $\text{LiClO}_4$  was computed based on 2D  $^1\text{H}$  NMR data. Segment C forms a right  $\alpha$ -helix between Pro77 and Val101. The residue Pro91 within the  $\alpha$ -helix induces a 25° “kink”. Segment E forms a right  $\alpha$ -helix between Val136 and Ser158. Segment G includes  $\alpha$ -helical region, which begins from CO of Ile198 and ends at  $\text{N}^\alpha\text{-H}$  of Arg227. The torsion angles,  $\chi^1$ , of the side chains were unambiguously determined for most of the residues within the  $\alpha$ -helical regions. Conformations of some side chains of the transmembrane segment residues in the solution were found to differ from their previously reported conformations determined by electron microscopy. Conformations of the sites terminating the C and E segment  $\alpha$ -helices were refined.

*Key words:* bacteriorhodopsin; NMR; peptides, structure, secondary, spatial.

\* To whom correspondence should be addressed.