



УДК 547.963.03:543.422.25:577.322.523

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ФРАГМЕНТА 87-136 БАКТЕРИООПСИНА

© 1997 г. И. В. Масленников<sup>#</sup>, А. А. Луговской, А. С. Арсеньев, Л. Д. Чикин, В. Т. ИвановИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 11.02.97 г. Принята к печати 16.04.97 г.

Методом двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР исследована пространственная структура синтетического аналога фрагмента 87–136 бактериоопсина *Halobacterium salinarium*, солюбилизованного в смеси метанол–хлороформ (1 : 1), содержащей 0.1 M LiClO<sub>4</sub>. Проведено полное отнесение сигналов с использованием спектров DQF-COSY, TOCSY и NOESY. Расчет пространственной структуры пептида 87–136 показал наличие двух спирализованных участков (остатки 92–100 и 108–130), соответствующих С-концевой части трансмембранного сегмента С и трансмембранному сегменту D бактериородопсина. Участок 92–100 образует правую α-спираль, в то время как участок 108–130 может принимать различные спиральные конформации – правые α-спираль,  $3_{10}$ -спираль и их комбинации. Сравнение полученных результатов с моделью структуры бактериородопсина по данным электронной криомикроскопии показало хорошее совпадение на участке 91–100 (среднеквадратичное отклонение координат атомов основной цепи не превышает 0.51 Å) и гораздо большее отличие структуры на участке 108–130 (1.82 Å). По результатам исследования предложена динамическая модель конформации трансмембранного сегмента D, проанализировано ее соответствие имеющимся данным о динамике бактериородопсина в процессе его функционирования.

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

Бактериородопсин (БР) – один из наиболее изученных мембранных белков [1, 2]. По данным электронной криомикроскопии (ЭКМ) [3, 4] проведена реконструкция его пространственной структуры с разрешением 3.5 Å, определены границы α-спиральных участков трансмембранных сегментов и охарактеризованы конформации боковых цепей аминокислотных остатков [4]. Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что в процессе функционирования БР происходят существенные конформационные изменения [5, 6]. Для выяснения природы этих изменений имеющейся модели БР [4] недостаточно. Использование теоретических методов молекулярной динамики для анализа структуры и динамики БР в мембране ограничено как существующими вычислительными мощностями, так и недостатками эмпирических потенциалов, которые

не позволяют корректно учесть мембранное окружение [7].

Спектроскопия ЯМР в последнее десятилетие стала альтернативным методом установления пространственной структуры и основным в исследовании процессов молекулярной динамики пептидов и белков как в водном растворе, так и в условиях, имитирующих гидрофобную среду биологических мембран [8]. Как было показано ранее [9], БР, солюбилизованный в смеси метанол–хлороформ, сохраняет вторичную структуру нативного белка в пурпурной мембране и обладает специфической третичной структурой. Индивидуальные фрагменты БР, выделенные после расщепления полипептидной цепи, также сохраняют в этой смеси органических растворителей конформацию, характерную для них в составе молекулы [10–12].

Эти наблюдения позволили применить методы спектроскопии ЯМР для установления детальной пространственной структуры трансмембранных сегментов БР. К настоящему времени проведен анализ данных ЯМР и рассчитаны пространственные структуры трансмембранных сегментов А [11–13], В [11–15], С, Е [16], F [17] и G [16, 17], солюбилизованных в смеси метанол–хлороформ, а также сегмента А [13] и синтетического аналога сегмента В [18], встроенных в мицеллы. Охарак-

Сокращения: БР – бактериородопсин; БО – бактериоопсин; Nle – норлейцин; фрагмент 87–136 – [Nle<sup>18</sup>]БО-(87–136)-полипептид; ЭКМ – электронная криомикроскопия; СКО – среднеквадратичное отклонение; ДГА – дистанционный геометрический алгоритм; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; *d*-связи – межостаточные ЯЭО-контакты.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-74-83, факс: (095) 335-50-33, e-mail: main@nmr.ru).

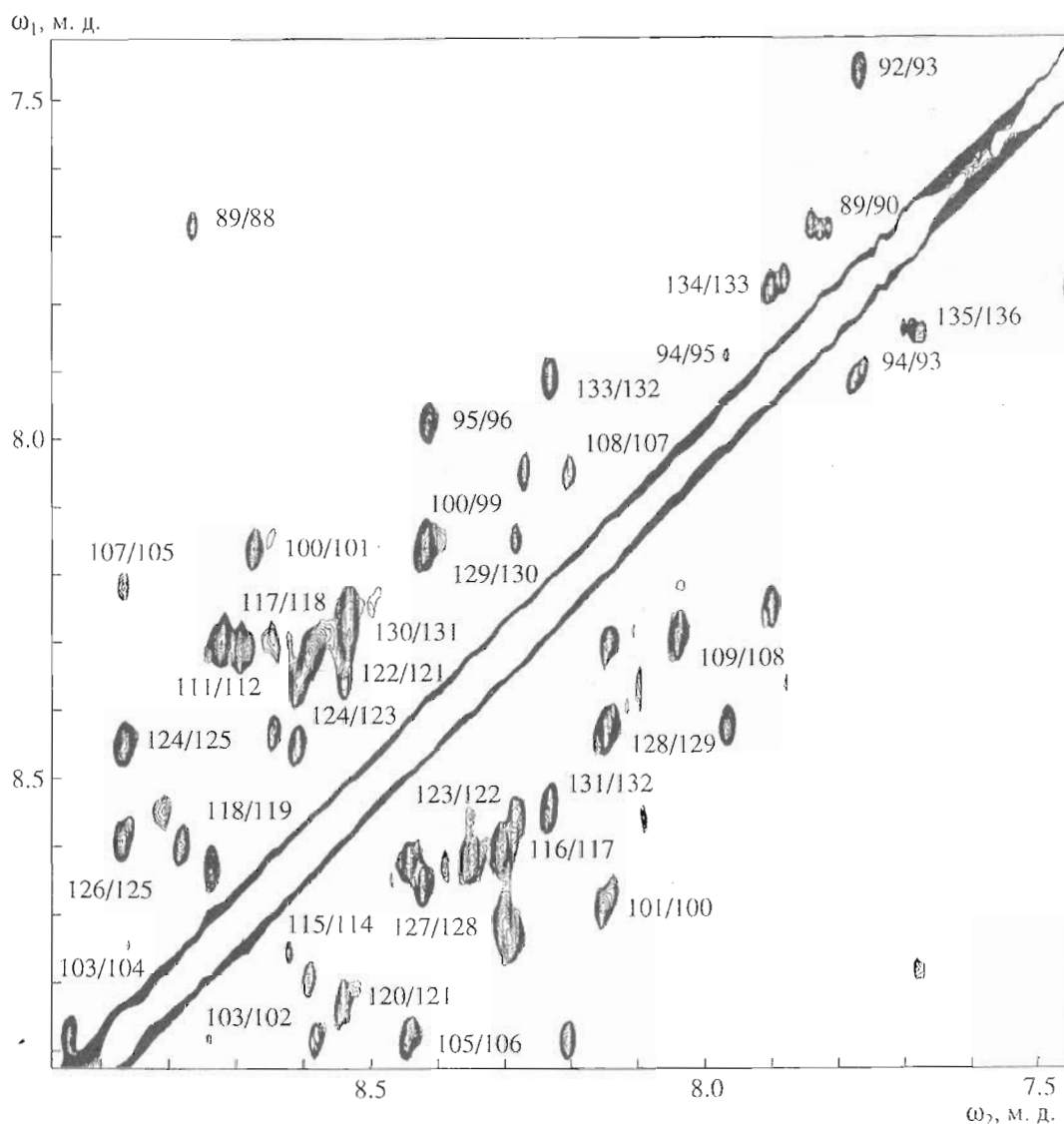


Рис. 1. NH/NH-Область спектра NOESY ( $\omega_1 = \omega_2 = 7.4-9.0$  м. д.) фрагмента 87–136 БО, солюбилизованного в смеси хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 M LiClO<sub>4</sub> при 30°C. Показано отнесение кросс-пиков N<sub>i</sub>H/N<sub>i+1</sub>H.

теризована вторичная структура трансмембранного сегмента D (остатки 102–136) [19]. Расчет пространственной структуры сегмента D в работе [19] не проводился, поскольку пептид 102–136 оказался полностью спиральным, за исключением С-концевых остатков 132–136, и было высказано предположение, что аминокислотная последовательность 102–136 несколько короче с N-конца, чем соответствующий трансмембранный сегмент БР.

Настоящее сообщение посвящено ЯМР-исследованию пространственной структуры [Nle<sup>118</sup>]бактериоопсин-(87–136)-полипептида. Им завершается цикл работ [11–19] по определению пространственных структур трансмембранных сегментов

БР, солюбилизованных в средах, моделирующих гидрофобное окружение мембраны.

Фрагмент спектра NOESY пептида 87–136 показан на рис. 1. Отсутствие минорных и неотнесенных кросс-пиков свидетельствует о конформационной однородности образца и отсутствии примесей. Результаты полного отнесения сигналов приведены в табл. 1, а схема ЯЭО-контактов показана на рис. 2. Данные, полученные при анализе спектров ЯМР и использованные в дальнейших расчетах, суммированы в табл. 2.

В результате расчета пространственной структуры фрагмента 87–136 по методу дистанционного геометрического алгоритма (ДГА, см. “Экспериментальную часть”) получен набор из 20 структур (рис. 3), конформационная энергия которых

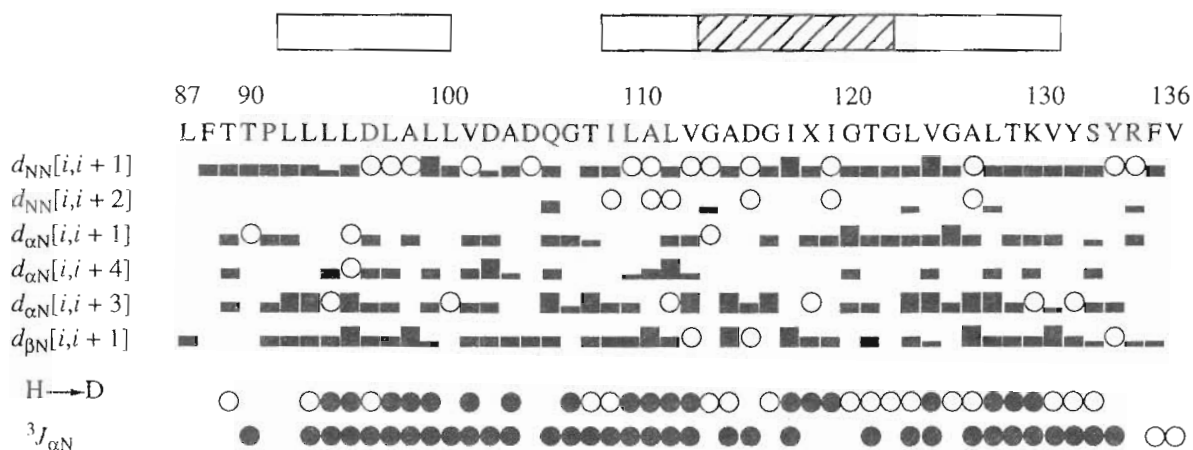
Таблица 1. Химические сдвиги сигналов протонов ( $\delta$ ,  $\pm 0.01$  м. д.) и времена полуобмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя ( $t_{1/2}$ , ч) [ $N^{15}$ ]BO-(87-136)-полипептида в смеси хлороформ-метанол (1 : 1) с 0,1 М LiClO<sub>4</sub> при 30°C

Остаток	$t_{1/2}$ *	Протоны			
		NH	C <sup><math>\alpha</math></sup> H**	C <sup><math>\beta</math></sup> H**	Другие
Leu87			4.26	1.85, 1.85	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.34, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10, 1.10
Phe88		8.77	4.08	3.38, 3.30	C <sup><math>\delta</math></sup> H, C <sup><math>\epsilon</math></sup> H, C <sup><math>\zeta</math></sup> H 7.46***
Thr89	10	7.68	4.40	4.39	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.33
Thr90		7.84	4.55	4.57	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.44
Pro91			4.41	2.56, 2.56	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 2.09, 2.33; C <sup><math>\delta</math></sup> H 4.01, 3.90
Leu92		7.45	4.24	1.92, 1.82	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.81, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10, 1.10
Leu93	<10	7.78	4.29	1.91, 1.96	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.55, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.09, 1.09
Leu94	25	7.88	4.21	1.98, 1.76	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.28, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.09, 1.09
Leu95	60	7.97	4.23	1.89, 2.04	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.75, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.09, 1.09
Asp96	<10	8.42	4.56	2.95, 3.31	
Leu97	15	8.35	4.13	1.98, 1.98	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.27, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10, 1.10
Ala98	21	8.35	4.24	1.74	
Leu99	15	8.42	4.24	2.08, 2.19	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.28, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10, 1.10
Leu100		8.15	4.16	2.20, 2.20	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.26, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.09, 1.09
Val101	100	8.68	3.79	2.41	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.14, 1.26
Asp102		8.74	4.59	3.35, 2.98	
Ala103	10	8.86	4.31	1.75	
Asp104		8.95	4.66	<b>3.35, 3.02</b>	
Gln105		8.88	4.22	2.49, 2.37	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 2.57, 2.73; N <sup><math>\epsilon</math></sup> H 7.07, 6.52
Gly106	14	8.42	4.08, 4.08		
Thr107	<10	8.21	4.09	4.61	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.43
Ile108	<10	8.04	3.86	2.20	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.96, 2.17; C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.39, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10
Leu109	50	8.28	4.16	2.08, 2.08	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.26, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.09, 1.09
Ala110	50	8.30	4.28	1.76	
Leu111	60	8.30	4.25	<b>1.80, 2.16</b>	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.28, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.12, 1.09
Val112	60	8.73	3.85	2.41	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.17, 1.29
Gly113	<10	8.70	4.07, 4.00		
Ala114	<10	8.62	4.25	1.77	
Asp115		8.74	4.64	2.93, 3.35	
Gly116	<10	8.65	<b>4.01, 3.98</b>		
Ile117	16	8.30	4.03	2.28,	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.36, 2.16; C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.99, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.10
Nle118	18	8.59	4.09	2.17, 2.17	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.48, 1.48; C <sup><math>\delta</math></sup> H 1.28, 1.28; C <sup><math>\epsilon</math></sup> H <sub>3</sub> 1.03
Ile119	16	8.78	3.94	2.11	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.35, 2.10; C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 2.00, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.11
Gly120	<10	8.81	3.96, 4.05		
Thr121	<10	8.54	4.09	4.48	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.47
Gly122	<10	8.35	4.05, 4.05		
Leu123	<10	8.61	4.33	<b>2.11, 1.87</b>	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.28, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.11, 1.11
Val124	30	8.44	3.81	2.38	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.16, 1.29
Gly125	<10	8.87	3.97, 4.04		
Ala126	<10	8.59	4.26	1.76	
Leu127	25	8.65	4.18	<b>2.09, 2.04</b>	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.28, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1.16, 1.10
Thr128	20	8.43	4.09	4.51	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.47
Lys129	40	8.15	4.22	2.19, 2.19	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 2.00, 2.00; C <sup><math>\delta</math></sup> H 1.75, 1.75; C <sup><math>\epsilon</math></sup> H 3.08, 3.08; N <sup><math>\zeta</math></sup> H <sub>3</sub> 7.19
Val130	<10	8.29	3.83	2.38	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.27, 1.09
Tyr131	<10	8.53	4.40	3.32, 3.32	C <sup><math>\delta</math></sup> H 7.27, C <sup><math>\epsilon</math></sup> H 6.88
Ser132	<10	8.24	4.40	4.19, 4.19	
Tyr133		7.90	4.55	3.25, 3.32	C <sup><math>\delta</math></sup> H 7.33, C <sup><math>\epsilon</math></sup> H 6.84
Arg134		7.82	4.28	1.95, 1.86	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1.56, 1.39; C <sup><math>\delta</math></sup> H 3.08, 3.08; N <sup><math>\epsilon</math></sup> H 7.18
Phe135		7.83	4.80	<b>3.06, 3.46</b>	C <sup><math>\delta</math></sup> H, C <sup><math>\epsilon</math></sup> H, C <sup><math>\zeta</math></sup> H 7.40***
Val136		7.70	4.34	2.39	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1.15, 1.15

\* Времена полуобмена ( $t_{1/2}$ ) протонов NH определены по серии двумерных спектров TOCSY. Отсутствие записи означает, что сигналы, соответствующие данному протону NH, отсутствовали в первом из серии спектров ЯМР, снятом в период 0,5–11 ч после растворения пептида. Запись "<10" означает, что сигналы от данного протона NH наблюдались в первом, но отсутствовали во втором спектре ЯМР, снятом в период 11–21,5 ч после растворения пептида.

\*\* Химические сдвиги пар протонов, для которых получено стереоспецифическое отнесение, указаны жирным курсивом в порядке, соответствующем росту нумерации протонов.

\*\*\* Химические сдвиги сигналов ароматических протонов совпадают у остатков Phe88 и Phe135.



**Рис. 2.** Аминокислотная последовательность фрагмента 87–136 и  $d$ -связи с участием протонов NH,  $C^{\alpha}H$  и  $C^{\beta}H$  ( $C^{\delta}H_2$ -протоны остатка пролина рассматривались как NH-протон). Использовано однобуквенное обозначение аминокислотных остатков, X – остаток норлейцина. Цифры соответствуют номеру остатка в аминокислотной последовательности БР. Толщина линий, отвечающих  $d$ -связям, характеризует интенсивности (сильные, средние и слабые) соответствующих кросс-пиков в спектрах NOESY ( $\tau_m = 100$  мс). Кружками отмечены  $d$ -связи, не идентифицированные однозначно из-за перекрытия сигналов в спектрах. Остатки с промежуточными (<10 ч) и замедленными (>10 ч) временами полюбумена амидных протонов на дейтерий отмечены соответственно светлыми и черными кружками в строке H  $\rightarrow$  D. В нижней строке черными кружками помечены остатки с КССВ протонов NH- $C^{\alpha}H < 5.5$  Гц, пустыми – с КССВ > 8.5 Гц, незаполненные поля соответствуют значениям КССВ в диапазоне 5.5–8.5 Гц. Прямоугольниками над аминокислотной последовательностью обозначены участки фрагмента 87–136, пространственная структура которых определена как  $\alpha$ -спираль (светлые прямоугольники) или  $\alpha$ - и  $^3_{10}$ -спирали, находящиеся в конформационном равновесии (заштрихованный прямоугольник).

затем была минимизирована. Практически весь пептид (остатки 90–130) принимает в растворе спиральную конформацию (рис. 3, 4), лишь N- и C-концевые участки (остатки 87–89 и 131–136) не имеют упорядоченной структуры. Характеристики структур в полученном наборе (количество нарушающихся ограничений, согласование структуры с экспериментальными данными и т.д.) до и после минимизации конформационной энергии приведены в табл. 2.

Сильное перекрытие сигналов в  $C^{\alpha}H/C^{\beta}H$ -области спектра не позволило экспериментально определить КССВ протонов  $H^{\alpha}C-C^{\beta}H$  и рассчитать диапазоны углов  $\chi^1$  боковых цепей. Поэтому для определения конформаций боковых цепей аминокислотных остатков применен метод исключения энергетически невыгодных (с учетом ограничений ЯЭО) ротамеров (см. "Экспериментальную часть"). Однако, учитывая возможное усреднение данных ЯЭО из-за подвижности боковых цепей и, как следствие, их неточную интерпретацию, мы лишь предполагаем наличие единственного ротамера угла  $\chi^1$  у следующих остатков: 93–97, 101, 104, 109, 112, 115, 118, 119, 123, 124, 127, 130 (все  $180^\circ$ ); 100, 107, 108, 128, 129 (все  $-60^\circ$ ). Величина угла  $\chi^1$  остатка Ile117 оказалась равной  $-108^\circ$ , при этом изменение в сторону стандартной для остатка изолейцина в  $\alpha$ -спирали величины угла  $\chi^1$  ( $-60^\circ$ , [20]) приводило к росту конформаци-

онной энергии на величину 8–12 ккал/моль. Причиной нестандартного значения угла может быть неправильная интерпретация усредненных по различным конформациям боковой цепи данных ЯМР. Однако отметим, что в ЭКМ-модели БР [4] величина угла  $\chi^1$  остатка Ile117 также отличается от канонической и составляет  $101.5^\circ$ . Анализ конформации участка 110–125 в ЭКМ-модели БР обнаружил наталкивание атомов кислорода СО-группы Gly113 и  $C^{\gamma}H_3$ -группы Ile117 (нарушение ван-дер-ваальсовых радиусов на  $0.14 \text{ \AA}$ ). Такое наталкивание может объясняться ошибочным стереохимическим отнесением областей электронной плотности от групп  $C^{\gamma}H_3$  остатка валина или  $C^{\gamma}H_3$  и  $C^{\delta}H_3$  остатка изолейцина. При использовании альтернативного отнесения величины угла  $\chi^1$  остатка Ile117 в ЭКМ-модели БР будет близка к полученной нами величине  $-108^\circ$ . Таким образом, причиной нестандартного значения угла  $\chi^1$  остатка Ile117 могут быть реальные искажения спирали на данном участке, вызванные отсутствием плотной упаковки боковых цепей соседних остатков и соседних витков спирали (Ile117 имеет в своем окружении лишь один остаток с массивной боковой цепью – Nle118).

По качеству определения пространственной структуры спираль 90–130 подразделяется на три участка: остатки 90–99 (часть трансмембранного сегмента С БР), 100–107 (перемычка между сег-



**Таблица 2.** Экспериментальные данные и результаты расчета пространственной структуры [Nle<sup>118</sup>]BO-(87–136)-полипептида в смеси хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 M LiClO<sub>4</sub>

Количество однозначно отнесенных кросс-пиков			920
Количество экспериментальных ограничений:			561
на расстояния по ЯЭО*			524
на углы основной цепи			37
Средняя в наборе сумма нарушений ограничений в рассчитанных структурах (DIANA/FANTOM) <sup>2*</sup>	верхних, Å		3.4/7.2
		нижних, Å	0.9/1.6
			vdw <sup>3*</sup> , Å
		углов, град	0.8/0.6
Штрафная функция <sup>4*</sup> , Å <sup>2</sup>			0.39
Конформационная энергия <sup>5*</sup> , ккал/моль			–103
СКО координат атомов в наборе структур <sup>6*</sup>	по атомам основной цепи	90–98	0.23
		108–129	1.00
	по всем тяжелым атомам	90–98	1.01
		108–129	1.52
Соответствие теоретических и экспериментальных интенсивностей ( <i>R</i> <sup>x</sup> -фактор) <sup>7*</sup>			0.09

\* Получены по программе MARDIGRAS (см. “Экспер. часть”).

<sup>2\*</sup> Приведены две величины – после расчета по программе DIANA/после минимизации конформационной энергии в программе FANTOM.

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

<sup>4\*</sup> Рассчитана в программе DIANA (см. “Экспер. часть”).

<sup>5\*</sup> Рассчитана в программе FANTOM по потенциалам ECEPP/2 (см. “Экспер. часть”).

<sup>6\*</sup> После расчета по программе DIANA.

<sup>7\*</sup> Рассчитан в программе CORMA (см. “Экспер. часть”).

ментами С и D) и 108–130 (сегмент D). Участок Leu92–Leu99 образует правую α-спираль, начинающуюся с изгиба, образованного остатками Thr90–Pro91–Leu92. Полученная пространственная структура участка 90–99 практически совпадает с рассчитанной ранее [16] конформацией участка 92–98 сегмента С (СКО координат тяжелых атомов основной цепи не превышает 0.38 Å). Следует отметить, что конформация пролинсодержащего участка Thr90–Pro91–Leu92 оказалась идентичной в середине α-спирали сегмента С и на N-конец α-спирального участка 90–98 фрагмента 87–136, несмотря на кардинальное различие конформаций остатков 87–89. По-видимому, конформация пролинсодержащих участков α-спиральных сегментов определяется стерическими взаимодействиями с основной и боковыми цепями следующих за пролином остатков, а не общей упаковкой предшествующих и следующих витков спирали.

Во всех 20 структурах из полученного набора конформация перемычки 100–107 оказалась близка к спиральной (рис. 4), но степень согласования экспериментальных данных и, как следствие, точность определения структуры существен-

но ниже, чем для участков 90–99 и 108–130 (табл. 2). Несмотря на общую спиральность структуры участка 100–107, имеющих данные (интенсивный кросс-пик NH-Gln105/NH-Thr107 и отсутствие кросс-пика между протонами NH остатков Gly106 и Thr107, рис. 1 и 2) достаточно для подтверждения деформации спирали и формирования изгиба с центральным остатком Gly106. В пурпурной мембране конформация коротких перемычек в БР определяется, по-видимому, упаковкой спиралей и взаимодействиями на поверхности мембраны, в то время как в растворе (и, возможно, в процессе встраивания белка в мембрану) конформация перемычки CD (как и DE, см. [16]) может быть спиральной.

Наибольший интерес представляет конформация участка 108–130, поскольку пространственная структура соответствующего ему трансмембранного сегмента D определена в ЭКМ-модели БР [4] с наименьшей точностью. Большую неопределенность конформации сегмента D авторы ЭКМ-модели БР [3] объясняли в первую очередь низкой электронной плотностью, обусловленной отсутствием ароматических остатков с тяжелыми боковыми цепями (триптофан, тирозин, фенилаланин) и наличием большого числа остатков глицина (на участке 105–130 их 6). К этому можно добавить, что специфика аминокислотной последовательности сегмента D приводит к повышенной

\* Худшее согласование экспериментальных данных может быть связано с их усреднением, вызванным быстрыми (в шкале времени ЯМР) движениями остатков участка 100–107.

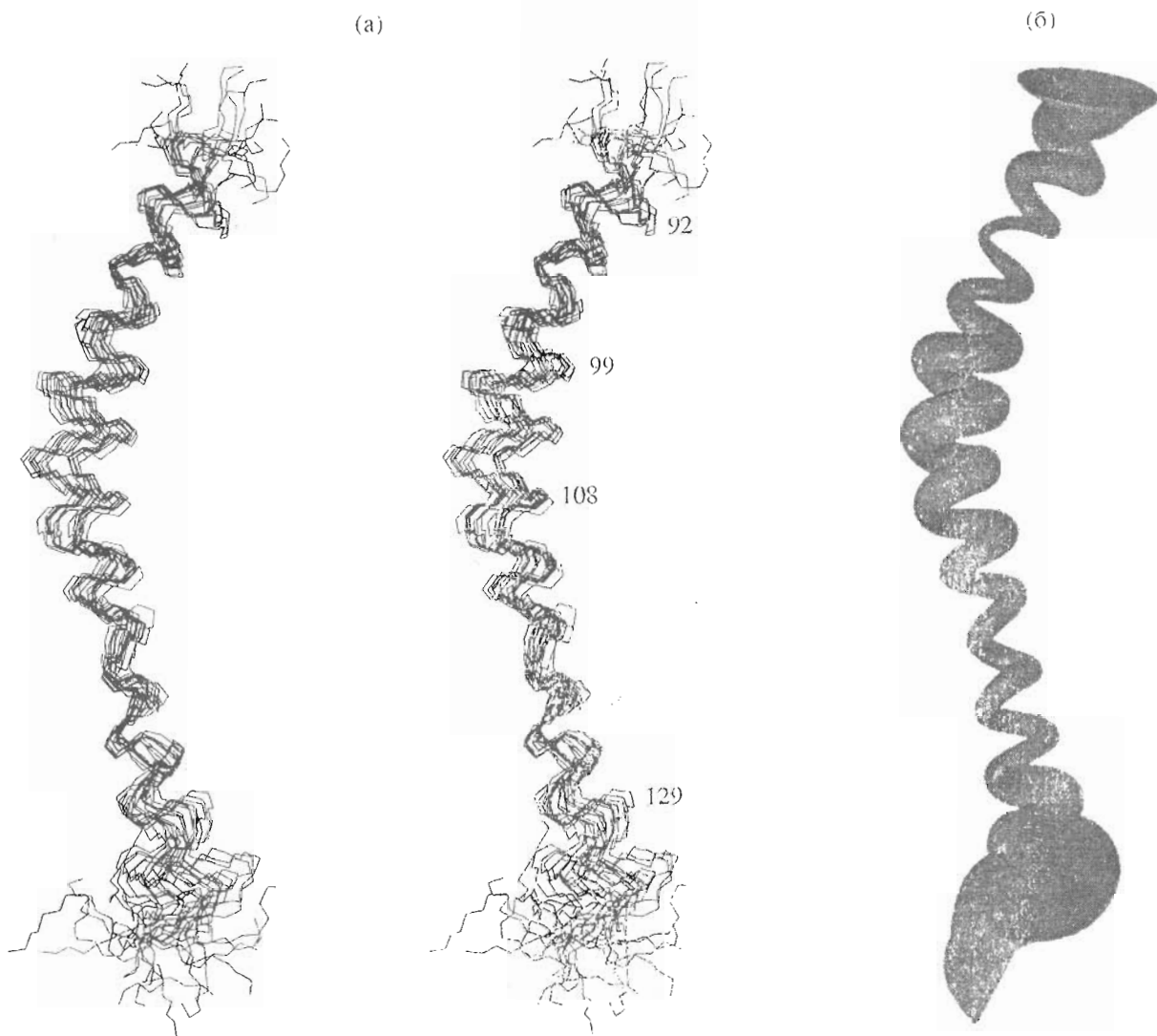


Рис. 3. Стереорепрезентация 20 структур фрагмента 87–136 БО, совмещенных по атомам основной цепи остатков 92–99 и 108–129 (а); 87–105, совмещенных по тяжелым атомам основной цепи остатков 92–99 (в); 106–136, совмещенных по атомам основной цепи остатков 108–129 (г). Показаны только тяжелые атомы основной цепи. Цифрами обозначены остатки, ограничивающие различные участки спирали (см. текст). "Трубочная" модель (б) показывает ход основной цепи пептида, толщина "трубки" соответствует локальной величине СКО  $C^{\alpha}$ -атомов в наборе структур.

конформационной гибкости, так как имеющих взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков соседних витков спирали недостаточно для поддержания стабильной конформации.

Проведенный по данным ЯМР расчет не позволил определить тип спирали на участке 108–130, так как полученные диапазоны углов  $\phi$  и  $\psi$  (рис. 4) согласуются и с  $\alpha$ -, и с  $3_{10}$ -спиралью. Минимизация конформационной энергии также показала возможность реализации конформации  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралей на отдельном или нескольких витках участка 108–130. В то же время все исследованные ранее аналоги трансмембранных сегментов БР имели  $\alpha$ -спиральную конформацию [11,

13, 15–18], а конформация  $3_{10}$ -спирали не соответствовала данным ЯМР и имела более высокую конформационную энергию.

Неточность определения конформации основной цепи в ЯМР-структурах чаще всего связывают с недостаточным количеством экспериментальных ограничений (<10 на аминокислотный остаток, [21]). Однако имеющих ограничений (272 на расстояния и 23 на углы) должно быть достаточно для точного определения конформации основной цепи участка 108–130. Очевидно, причина расширенного диапазона углов основной цепи  $\phi$  и  $\psi$  в полученном наборе структур кроется в использовании ограничений, усредненных по набору быстро обменивающихся конформационных

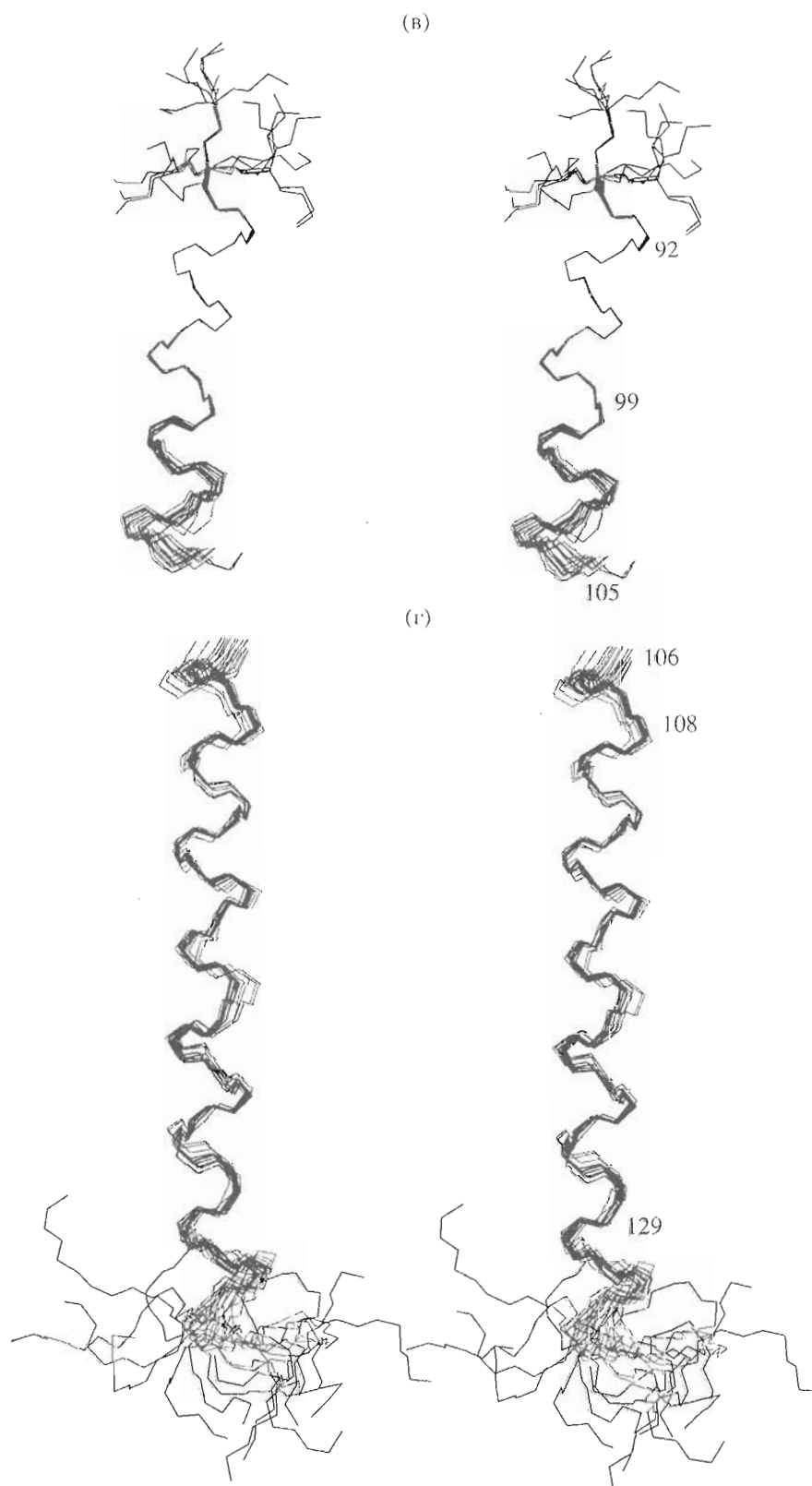


Рис. 3. Окончание.



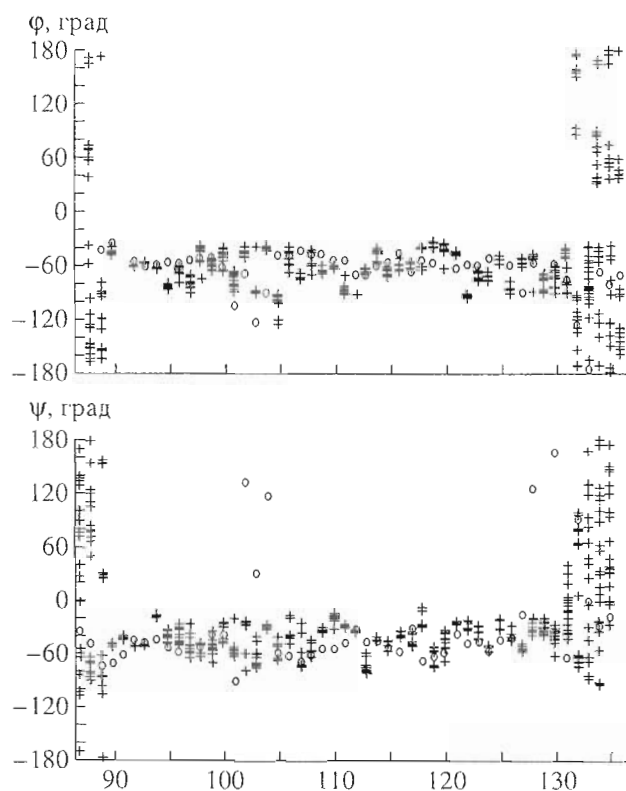


Рис. 4. Распределение торсионных углов  $\phi$ ,  $\psi$  основной цепи в 20 структурах фрагмента 87–136 (+); для сравнения показаны (o) величины углов основной цепи того же участка ЭКМ-модели БР [4]. На горизонтальной оси обозначены номера остатков.

состояний, которыми на участке 108–130 могут быть  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спирали.

Известно [22], что термодинамическая предпочтительность  $\alpha$ -спирали перед  $3_{10}$ -спиралью во многом определяется более плотной упаковкой боковых цепей, т.е. полипептид с невысоким содержанием аминокислотных остатков, имеющих массивную боковую цепь, при прочих равных условиях может принимать конформацию как  $\alpha$ -спирали, так и спирали  $3_{10}$ . Заметим, что в случае сегмента D БР наблюдается периодичность расположения “небольших” аминокислотных остатков в первичной структуре (рис. 2). Витки спирали, состоящие из остатков с “объемными” боковыми цепями (Leu, Val, Ile, Nle), чередуются с витками, образованными “небольшими” остатками (Gly, Ala, Thr). В результате стерические взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков соседних витков практически отсутствуют, что делает энергетически возможными конформационные переходы между  $\alpha$ -спиралью и  $3_{10}$ -спиралью.

Важной характеристикой вторичной структуры и одним из существенных различий  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралей является схема образования водо-

родных связей в молекуле. Экспериментальным свидетельством образования внутримолекулярной водородной связи принято считать замедленный обмен амидного протона NH на дейтерий растворителя. Однако на скорость обмена протонов помимо участия во внутримолекулярных водородных связях влияет множество других факторов, таких, как экранированность от растворителя, стабильность пространственной структуры и т.д.

В полученных структурах все амидные протоны остатков 108–130 участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей. Однако, согласно данным ЯМР, они имеют существенно различные скорости обмена на дейтерий растворителя (табл. 1, рис. 2), что не характерно для стабильных спиральных участков других сегментов БР (см., например, [10–14, 19]) и требует дополнительного анализа.

Промежуточный обмен амидных протонов остатков Gly113, 116, 120, 122, 125 и Ala114, 126 можно было бы объяснить отсутствием массивных боковых цепей, приводящим к повышенной доступности амидных протонов для растворителя. Для оценки влияния экранирования на скорость обмена по полученному набору структур была рассчитана доступная растворителю поверхность амидных групп NH. Оказалось, что медленный обмен согласуется с отсутствием доступной для растворителя поверхности протонов NH остатков Leu109–Val112, Ile117–Ile119, Val124 и Leu127–Val130, а промежуточные скорости обмена – с увеличенной ( $>0.2 \text{ \AA}$ ) доступной поверхностью амидных протонов остатков Ala114, Gly120 и Thr121. В то же время отсутствие доступной для растворителя поверхности не соответствует наблюдаемым скоростям обмена амидных протонов остатков Gly113, 116, 122, Leu123, Ala126 (промежуточный обмен) и Asp115 (быстрый обмен). Следовательно, существенно разная экранированность амидных протонов от растворителя ни в случае  $\alpha$ -спирали, ни в случае  $3_{10}$ -спирали не объясняет все наблюдаемые различия времен обмена.

С другой стороны, из рис. 2 видно, что остатки с близкими значениями времен полуобмена амидных протонов расположены в определенном порядке по аминокислотной последовательности. Медленный обмен остатков с массивными боковыми цепями (109–112 и 117–119) чередуется с промежуточным для “небольших” остатков (113–116 и 120–122). При этом размеры участков с близкими скоростями полуобмена совпадают с минимальной структурной единицей (витком)  $\alpha$ - или  $3_{10}$ -спирали (3.6 или 3 остатка). Как было сказано выше, для витков, не имеющих остатков с тяжелыми боковыми цепями, возможен конформационный переход от  $\alpha$ - к  $3_{10}$ -спирали. Переход такого рода включает перестроение водородной



связи протона NH  $i$ -го остатка с CO-группы ( $i - 4$ )-го остатка на CO-группу ( $i - 3$ )-го остатка, при этом амидные протоны могут образовывать временные связи с растворителем, что существенно увеличивает их скорость обмена. Таким образом, основной причиной наблюдаемых на спиральном участке сегмента D времен обмена амидных протонов на дейтерий растворителя может быть быстрый конформационный обмен между  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралью на участках 113–116 и 120–122.

Конформационный переход  $\alpha$ -спираль  $\longleftrightarrow 3_{10}$ -спираль изменяет длину спирали (рис. 5)\*. При удлинении спирали для предотвращения экспонирования гидрофобных остатков может изменяться угол наклона спирали относительно плоскости мембраны. В противном случае экспонируемый из мембраны гидрофобный участок спирали расплетается для оптимальной ориентации полярных групп CO и NH основной цепи (экспонированность в водную фазу) и гидрофобных боковых цепей (взаимодействие с поверхностью мембраны). Кроме того, конформационный переход  $\alpha \longleftrightarrow 3_{10}$ -спираль изменяет геометрию поверхности трансмембранного сегмента, т.е. расположение остатков на поверхности спирали.

В БР упаковка трансмембранных сегментов обеспечивается взаимодействием поверхностей соседних спиралей, определяемых аминокислотной последовательностью и пространственной структурой. Поэтому при конформационном переходе  $\alpha \longleftrightarrow 3_{10}$ -спираль для сохранения оптимальной упаковки БР трансмембранный сегмент D должен повернуться вокруг оси спирали и, возможно, изменить угол наклона к поверхности мембраны, что повлечет за собой перестройку конформаций петель CD и DE. Отметим, что исследование методом атомной силовой микроскопии [23] обнаружило изменения конформации петли CD в процессе функционирования БР. В свою очередь, моделирование молекулярной динамики БР [24] также свидетельствует о повышенной конформационной лабильности петли CD.

Современные представления о механизме функционирования БР основаны на данных исследований различными физико-химическими методами (см., например, обзоры [3, 5]) и подразделяют процесс транспортировки протона через мембрану на стадии: изомеризация ретиналя (13-тринс  $\rightarrow$  13-цис); перенос протона от основания Шиффа к карбоксильной группе Asp85; высвобождение протона во внеклеточную среду; перенос протона от карбоксильной группы Asp96 к основанию Шиффа; захват протона из цитоплаз-

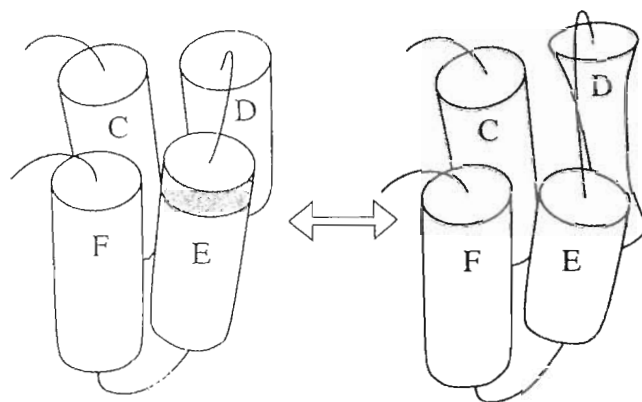


Рис. 5. Схема конформационного перехода в CDEF-блоке бактериородопсина: переход  $\alpha$ -спираль  $\longleftrightarrow 3_{10}$ -спираль на участке трансмембранного сегмента D и расплетание  $\alpha$ -спирали на N-концевом участке 133–135 (заштрихован) трансмембранного сегмента E.

мы; реизомеризация ретиналя. Однако природа и локализация конформационных изменений, соответствующих различным стадиям фотоцикла, до сих пор остаются неясными.

Исследования БР методами рентгеновской [25] и электронной [6] дифракции показали, что во время фотоцикла наибольшие конформационные изменения происходят в спиральях C, D, E и F. Данные ЯМР также показывают [26, 27], что специфические взаимодействия между спиральями приводят к процессам конформационного обмена в миллисекундном масштабе времени в части молекулы БР, включающей спирали C, D, E и F. Согласно [26], в процессе динамики спиральные участки БР могут менять взаимную ориентацию, изгибаться, удлиняться или укорачиваться. Моделирование молекулярной динамики одиночной спирали сегмента A и двухспирального фрагмента (сегменты A и B) БР [28] обнаружило различные типы внутримолекулярной подвижности, такие, как локальные искажения спирали ( $\alpha$ -аневризм), делокализованные деформации спирали (изгиб и растяжение), а также специфические изменения относительной ориентации спиралей. Анализ пространственных структур трансмембранных сегментов БР по данным ЯМР-спектроскопии обнаруживает способность к изменению конформации и длины спиральных участков трансмембранных сегментов E [16] и D (настоящая работа), а также к изменению длины петель CD и DE БР (рис. 5) и объясняет наблюдаемый конформационный обмен в четырехспиральном блоке CDEF.

Между трансмембранными сегментами, образующими четырехспиральный блок CDEF, располагается  $\beta$ -иононовое кольцо ретиналя [4]. На начальной стадии фотоцикла БР происходит изомеризация полностью-транс-ретиналя в 13-цис,

\* Исходя из стандартной геометрии можно заключить, что перестройка конформации одного витка  $\alpha$ -спирали в  $3_{10}$ -спираль приведет к увеличению длины спирали сегмента D на  $\approx 1.8$  Å или экспонированию одного остатка из мембраны.

существенно изменяющая его положение в молекуле. Так как наибольшие конформационные изменения спиралей С, D, E и F обнаружены уже после второй стадии фотоцикла [6], можно предположить, что изомеризация ретиналя инициирует конформационный переход  $\alpha$ -спираль  $\longleftrightarrow$   $3_{10}$ -спираль на отдельных участках сегмента D, который является источником конформационной подвижности всего блока CDEF бактериородопсина.

Внутренняя динамика, обусловленная взаимодействием спиралей и подвижностью отдельных спиральных участков, по-видимому, играет важную роль в процессе функционирования БР и может оказаться существенной для других мембранных белков.

ЯМР-исследование фрагмента 87–136 БР завершает цикл работ по установлению пространственных структур трансмембранных сегментов БР в средах, моделирующих гидрофобное окружение мембраны [9–18]. В результате детально охарактеризованы конформации всех семи трансмембранных спиралей БР. Анализ данных, полученных методом спектроскопии ЯМР, позволил выяснить причину конформационного обмена в четырехспиральном блоке CDEF бактериородопсина, составной частью которого являются конформационные переходы между  $\alpha$ - и  $3_{10}$ -спиралями в сегменте D.

Полученные в настоящей работе и ранее [9–18] результаты, их сопоставление с данными структурных и функциональных исследований БР другими методами подтверждают перспективность использования методов ЯМР высокого разрешения для конформационного анализа мембранных белков.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез пептида [Nle<sup>118</sup>]-87-136** описан в работе [29]. Остаток метионина-118 при синтезе заменен на остаток норлейцина. Подобная замена не влияет, как правило, на конформацию и функцию пептидов, но значительно упрощает синтез [30].

Пептид растворяли в смеси CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OH (или CD<sub>3</sub>OD) (1 : 1) с 0.1 М LiClO<sub>4</sub>, pH\* 3.8. Использовали растворители CD<sub>3</sub>OH (99% дейтерия, SIL, Великобритания), CD<sub>3</sub>OD (99.96% дейтерия, SIC, США), CDCl<sub>3</sub> (100% дейтерия, SIC, США).

**Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР** снимали при 30°C на спектрометре UNITY-600 Varian (США) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Получены следующие спектры <sup>1</sup>H-ЯМР: TOCSY [31] с периодом смешивания 30 и 80 мс, NOESY [32] с временем обмена компонент намагниченности ( $\tau_m$ ) 50, 100 и 200 мс, DQF-COSY [33]. Все 2D-спектры накоплены в фазоизбирательном режиме по методу [34]. Использовали задержку на релаксацию 1.4 с. Химические сдвиги сигналов протонов измеряли от-

носительно остаточного сигнала метильной группы метанола, химический сдвиг которого относительно сигнала тетраметилсилана равен 3.5 м.д. Оценка характерных времен обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя проводилась на основе анализа серии из 8 спектров TOCSY ( $\tau_m = 50$  мс) пептида, солюбилизованного в смеси CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD. Время накопления каждого спектра в серии составляло 10.5 ч, первый спектр был накоплен через 11 ч после растворения образца. Анализ спектров проводился при помощи стандартного пакета VNMR (Varian, США) и программы XEASY [35].

**Отнесение сигналов в спектрах ЯМР** проводилось по стандартной методике последовательного отнесения [36]. Для выделения спиновых систем протонов аминокислотных остатков использовали спектры DQF-COSY и TOCSY. Отнесение остатков к определенному положению в первичной структуре выполнено посредством анализа  $d_{\alpha N}(i, i+1)$ -,  $d_{\beta N}(i, i+1)$ - и  $d_{NM}(i, i+1)$ -связей ЯЭО между амидным протоном (i+1)-го остатка и соответственно протонами C<sup>α</sup>H, C<sup>β</sup>H и NH предыдущего по аминокислотной последовательности i-го остатка [36]. Полное отнесение сигналов (табл. 1) получено в основном при анализе  $d_{NM}(i, i+1)$ - и  $d_{\beta N}(i, i+1)$ -связей. Для измерения объемов кросс-пиков в спектрах NOESY применялась программа XEASY [35], использующая нелинейный алгоритм аппроксимации формы линий сечений кросс-пика в двумерном спектре по обоим направлениям методом наименьших квадратов.

**Расчет пространственной структуры** фрагмента 87–136 проводился с помощью программы дистанционного геометрического алгоритма DIANA [37]. 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. Минимизация штрафной функции проводилась в соответствии со стандартным протоколом [37].

При предварительном расчете в качестве входных данных использовались ограничения "сверху" на величины межпротонных расстояний, полученные из интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО с помощью калибровки "1/r<sup>6</sup>" [17], и ограничения на торсионные углы, определенные с помощью программы NABAS [37] по величинам констант спин-спинового взаимодействия с учетом полученных ранее ограничений на расстояния. 100 структур, полученных в результате предварительного расчета, были использованы для определения системы водородных связей и уточнения ограничений на расстоя-



ния по данным ЯЭО. Ограничения сверху на межатомные расстояния водородных связей (CO...HN 0.2 нм и CO...N 0.3 нм) вводились для медленно обменивающихся амидных протонов (время полуобмена  $\geq 10$  ч, табл. 1) в тех случаях, когда расстояния C=O...HN  $\leq 0.3$  нм были обнаружены более чем в 70 структурах из 100, полученных в результате предварительного расчета.

“Точный” расчет “верхних” и “нижних” ограничений на межпротонные расстояния выполняли с использованием предварительного набора структур по программе анализа полной матрицы релаксации MARDIGRAS [38] исходя из измеренных в спектре NOESY объемов непокрытых кросс-пиков ЯЭО, времени смешивания продольных компонент протонной намагниченности ( $\tau_m$ ) и времени корреляции вращательного движения молекулы (6 нс). Ограничения на водородные связи и более точные “верхние” и “нижние” ограничения на межпротонные расстояния учитывали при окончательном расчете набора структур по программе DIANA. В результате был получен набор из 20 структур, хорошо согласующихся с имеющимися экспериментальными данными ЯМР.

Минимизация конформационной энергии пептида проводилась с помощью программы FANTOM [39] в пространстве торсионных углов с фиксированными длинами связей по потенциалам ECEPP/2 [40] с учетом имеющихся экспериментальных ограничений на расстояния и двугранные углы. При расчете вклада электростатических взаимодействий в конформационную энергию диэлектрическую постоянную задавали равной расстоянию между взаимодействующими атомами в ангстремах.

Систематический поиск конформаций боковых цепей аминокислотных остатков осуществляли с помощью дополнительного модуля программы FANTOM, основываясь на процедуре исключения энергетически невыгодных комбинаций ротамеров (“dead-end elimination”) [41] с учетом рассчитанной ранее конформации основной цепи молекулы. После минимизации конформационной энергии стартовой модели для каждой пары остатков торсионным углам  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  и т.д. последовательно присваивали стандартные значения, возможные для боковой цепи аминокислотного остатка в соответствии со стандартной библиотекой [42], а затем минимизировали конформационную энергию с учетом экспериментальных ограничений на расстояния и торсионные углы.

Соответствие полученных в результате расчета структур экспериментальным данным оценивали по величинам  $R^x$ -факторов, характеризующих степень согласования экспериментальных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО с теоретическими (рассчитанными с помощью программы

CORMA [43] для полной матрицы релаксации протонов исходя из полученной структуры молекулы).

$R^x$ -фактор для оценки согласования интенсивностей вычислялся по формуле

$$R^x = \frac{\sum_{i=1}^N |\sqrt{I_0^i} - \sqrt{I_C^i}|}{\sum_{i=1}^N \sqrt{I_0^i}}$$

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

Визуальный анализ полученных структур и подготовка рисунков проводились с помощью программы MOLMOL [44].

Работа выполнена на установке “Комплекс ЯМР-спектроскопии” в Центре коллективного пользования при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям (рег. № 96-03-08) и Российского фонда фундаментальных исследований (ЦКП, грант РФФИ № 96-24-4И/373). Работа выполнялась и финансировалась по грантам РФФИ № 96-04-49788, 96-04-50893, 96-04-00054.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 179–191.
2. Oesterheld D., Stoeckenius W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 2838–2857.
3. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.Y. // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899–929.
4. Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K.H., Baldwin J.M., Henderson R. // J. Mol. Biol. 1996. V. 259. P. 393–421.
5. Lanui J.K. // Nature. 1995. V. 375. P. 461–463.
6. Subramaniam S., Gerstein M., Oesterheld D., Henderson R. // EMBO J. 1993. V. 12. P. 1–8.
7. Nolde D.E., Arseniev A.S., Vergoten G., Efremov R.G. // Int. J. Pept. Protein Res. 1997. In press.
8. Wagner G., Hyberts S., Peng J. // NMR of Proteins / Eds G.M. Clore, A.M. Gronenborn. L.: Macmillan Press, 1993. P. 220–257.
9. 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.
10. Barsukov I.L., Abdulaeva G.V., Arseniev A.S., Bystrov V.F. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321–327.
11. Sobol A.G., Arseniev A.S., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Bystrov V.F. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 161–171.

12. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Popov A.G., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 219. P. 571–583.
13. Первушин К.В., Соболев А.Г., Абдулаева Г.В., Мусина Л.Ю., Арсеньев А.С. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1397–1415.
14. 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.
15. Масленников И.В., Ломизе А.Л., Арсеньев А.С. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 1456–1469.
16. Масленников И.В., Бочаров Э.В., Арсеньев А.С. // Биорган. химия. 1995. Т. 21. С. 659–674.
17. Barsukov I.L., Nolde D.E., Lomize A.L., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 665–672.
18. Lomize A.L., Pervushin K.V., Arseniev A.S. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 361–372.
19. 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.
20. Barlow D.J., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 1988. V. 201. P. 601–619.
21. MacArthur M., Thornton J.M. // Proteins: Structure, Function, and Genetics. 1993. V. 17. P. 232–251.
22. Шульц Г., Шурмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
23. Muller D.J., Buldt G., Jahnig F. // J. Mol. Biol. 1995. V. 249. P. 239–243.
24. Edholm O., Berger O., Jahnig F. // J. Mol. Biol. 1995. V. 250. P. 94–111.
25. Koch M.H.J., Dencher N.A., Buldt G. // EMBO J. 1991. V. 10. P. 521–526.
26. Orekhov V.Yu., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. P. 223–229.
27. Orekhov V.Yu., Pervushin K.V., Korzhnev D.M., Arseniev A.S. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 6. P. 113–122.
28. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Korzhnev D.M., Arseniev A.S. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 5. P. 383–396.
29. Чикин Л.Д., Мошникова А.Б., Гребенникова Ж.О., Кожич А.Т., Иванов В.Т. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 56–65.
30. Erand R.M., Raymer K.E. // Int. J. Pept. Protein Res. 1987. V. 30. P. 515–521.
31. Bax A., Davis D.G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 65. P. 355–366.
32. Jeener J., Meier G.H., Bachman P., Ernst R.R. // J. Chem. Phys. 1979. V. 71. P. 4546–4553.
33. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner C., Ernst R.R., Wuthrich K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. P. 479–485.
34. States D.J., Habercorn R.A., Ruben D.J. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 286–292.
35. Bartels C., Xia T.-h., Billeter M., Guntert P., Wuthrich K. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 5. P. 1–10.
36. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: Wiley, 1986.
37. Guntert P., Braun W., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1991. V. 217. P. 517–530.
38. Borgias B.A., James T.L. // J. Magn. Reson. 1990. V. 87. P. 475–487.
39. Schaumann T., Braun W., Wuthrich K. // Biopolymers. 1990. V. 29. P. 679–694.
40. Nemethy G., Pottle M.S., Sheraga H.A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. P. 1883–1887.
41. Desmet J., De Maeyer M., Hazes B., Lasters I. // Nature. 1992. V. 356. P. 539–542.
42. Ponder J.W., Richards F.M. // J. Mol. Biol. 1987. V. 193. P. 775–779.
43. Keepers J.W., James T.L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. P. 404–426.
44. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.

## The Spatial Structure of the 87–136 Bacterioopsin Fragment

I. V. Maslennikov, A. A. Lugovskoi, A. S. Arseniev, L. D. Chikin, and V. T. Ivanov

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Abstract**—The [Nle18]-(87–136)-bacterioopsin, a fragment of bacterioopsin from *Halobacterium salinarium* synthesized by solid phase technique, was solubilized in a 1 : 1 chloroform–methanol mixture containing 0.1 M LiClO<sub>4</sub> and studied by two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The complete assignment of proton resonances was performed in the DQF-COSY, TOCSY, and NOESY spectra of this peptide, and its spatial structure was computed. As a result, two helical regions (92–100 and 108–130) were identified, which correspond to the C-terminal part of segment C and to segment D of bacteriorhodopsin, respectively. The 92–100 region forms a right-handed α-helix, and the 108–130 region can adopt right-handed α-helical, <sub>3</sub><sub>10</sub>-helical, and combined (from the two) conformations. A comparison of the structure computed with the bacteriorhodopsin model deduced from the electron cryomicroscopy data showed good agreement in the 91–100 region (the root-mean-square deviation of the backbone atoms was less than 0.51 Å) and considerable differences in the 108–130 region (1.82 Å). A dynamic model of the conformation of the D transmembrane segment was suggested, and the accordance of the model to the functional dynamics of bacteriorhodopsin was discussed.

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